

**EINFLUSS DER AMPK-
AKTIVITÄT AUF
ENDOTHELFUNKTION,
OXIDATIVEN STRESS UND
VASKULÄRE INFLAMMATION**

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades

**„DOKTOR DER
NATURWISSENSCHAFTEN“**

Am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Swenja Schuhmacher
Geboren am 02.08.1979 in Diez

Mainz, im August 2010

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 06. Dezember 2010

Veröffentlichungen

Jansen T, Hortmann M, Oelze M, Opitz B, Steven S, Schell R, Knorr M, Karbach S, **Schuhmacher S**, Wenzel P, Münzel T, Daiber A.: Conversion of biliverdin to bilirubin by biliverdin reductase contributes to endothelial cell protection by heme oxygenase-1-evidence for direct and indirect antioxidant actions of bilirubin. *J Mol Cell Cardiol.* 2010, 49(2):186-195.

Schuhmacher S, Wenzel P, Schulz E, Oelze M, Mang C, Kamuf J, Gori T, Jansen T, Knorr M, Karbach S, Hortmann M, Mäthner F, Bhatnagar A, Förstermann U, Li H, Münzel T, Daiber A.: Pentaerythritol tetranitrate improves angiotensin II-induced vascular dysfunction via induction of heme oxygenase-1. *Hypertension.* 2010; 55(4):897-904.

Schuhmacher S, Schulz E, Oelze M, König A, Roegler C, Lange K, Sydow L, Kawamoto T, Wenzel P, Münzel T, Lehmann J, Daiber A.: A new class of organic nitrates: investigations on bioactivation, tolerance and cross-tolerance phenomena. *Br J Pharmacol.* 2009; 158(2):510-

Daiber A, Oelze M, Wenzel P, Wickramanayake JM, **Schuhmacher S**, Jansen T, Lackner KJ, Torzewski M, Münzel T.: Nitrate tolerance as a model of vascular dysfunction: Roles for mitochondrial aldehyde dehydrogenase and mitochondrial oxidative stress. *Pharmacol Rep.* 2009; 61(1):33-48.

Schulz E, **Schuhmacher S**, Münzel T.: When metabolism rules perfusion: AMPK-mediated endothelial nitric oxide synthase activation. *Circ Res.* 2009; 104(4):422-4.

Daiber A, Wenzel P, Oelze M, **Schuhmacher S**, Jansen T, Münzel T.: Mitochondrial aldehyde dehydrogenase (ALDH-2)--maker of and marker for nitrate tolerance in response to nitroglycerin treatment. *Chem Biol Interact.* 2009; 178(1-3):40-7

Schulz E, Dopheide J, **Schuhmacher S**, Thomas SR, Chen K, Daiber A, Wenzel P, Münzel T, Keaney JF Jr.: Suppression of the JNK pathway by induction of a metabolic stress response prevents vascular injury and dysfunction. *Circulation.* 2008; 118(13):1347-57.

Wenzel P, **Schuhmacher S**, Kienhöfer J, Müller J, Hortmann M, Oelze M, Schulz E, Treiber N, Kawamoto T, Scharffetter-Kochanek K, Münzel T, Bürkle A, Bachschmid MM, Daiber A.: Manganese superoxide dismutase and aldehyde dehydrogenase deficiency increase mitochondrial oxidative stress and aggravate age-dependent vascular dysfunction. *Cardiovasc Res.* 2008; 80(2):280-9

Wenzel P, Schulz E, Oelze M, Müller J, **Schuhmacher S**, Alhamdani MS, Debrezion J, Hortmann M, Reifenberg K, Fleming I, Münzel T, Daiber A.: AT1-receptor blockade by

telmisartan upregulates GTP-cyclohydrolase I and protects eNOS in diabetic rats. *Free Radic Biol Med.* 2008; 45(5):619-26.

Wenzel P, Mollnau H, Oelze M, Schulz E, Wickramanayake JM, Müller J, **Schuhmacher S**, Hortmann M, Baldus S, Gori T, Brandes RP, Münzel T, Daiber A.: First evidence for a crosstalk between mitochondrial and NADPH oxidase-derived reactive oxygen species in nitroglycerin-triggered vascular dysfunction. *Antioxid Redox Signal.* 2008; 10(8):1435-47.

Wenzel P, Müller J, Zurmeyer S, **Schuhmacher S**, Schulz E, Oelze M, Pautz A, Kawamoto T, Wojnowski L, Kleinert H, Münzel T, Daiber A.: ALDH-2 deficiency increases cardiovascular oxidative stress--evidence for indirect antioxidative properties. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008; 367(1):137-43

Mollnau H, Wenzel P, Oelze M, Treiber N, Pautz A, Schulz E, **Schuhmacher S**, Reifenberg K, Stalleicken D, Scharffetter-Kochanek K, Kleinert H, Münzel T, Daiber A.: Mitochondrial oxidative stress and nitrate tolerance--comparison of nitroglycerin and pentaerithryl tetranitrate in Mn-SOD+/- mice. *BMC Cardiovasc Disord.* 2006; 6:44

Tagungsbeiträge:

Schuhmacher S, Knorr M, Oelze M, Steven S, Heeren T, Wenzel P, Teutsch C, Kauser K, Münzel T, Daiber A: Pleiotropic Antioxidant Effects Of Telmisartan Improve Nitroglycerin-triggered Vascular Dysfunction. *ATVB Scientific Sessions, 2010 San Francisco, Kalifornien*

Schuhmacher S, Schulz E, Hortmann M, Wenzel P, Oelze M, Kleschyow A, Daiber A, Münzel T: Knockout of the alpha1-AMPK Enhances Endothelial Dysfunction, Oxidative Stress and Vascular Inflammation during Chronic Angiotensin II Treatment. *75. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie 2009, Mannheim*

Schuhmacher S, Schulz E, Hortmann M, Wenzel P, Oelze M, Kleschyow A, Daiber A, Münzel T: Knockout of the alpha1-AMPK Enhances Endothelial Dysfunction, Oxidative Stress and Vascular Inflammation during Chronic Angiotensin II Treatment. *AHA Scientific Sessions, 2008 New Orleans, Louisiana*

Schuhmacher S, Schulz E, Hortmann M, Wenzel P, Oelze M, Daiber A, Münzel T: Activity of vascular AMPK determines vascular oxidative stress, endothelial function, and vascular inflammation during AT II hypertension.. *Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin 2008, Wiesbaden*

Schuhmacher S, Schulz E, Hortmann M, Wenzel P, Oelze M, Daiber A, Münzel T: Activity of vascular AMPK determines vascular oxidative stress, endothelial function, and vascular inflammation during AT II hypertension. 74. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie 2008, Mannheim

Schuhmacher S, Schulz E, Hortmann M, Wenzel P, Oelze M, Daiber A, Münzel T: Activity of the AMP-activated protein kinase determines vascular ROS production and endothelial function during Angiotensin II-induced hypertension. AHA Scientific Sessions, 2007 Orlando, Florida

Schuhmacher S, Schulz E, Hortmann M, Wenzel P, Oelze M, Daiber A, Münzel T: Knockout of vascular AMPK leads to increased mitochondrial stress and decreased vasodilator sensitivity towards organic nitrates. AHA Scientific Sessions, 2007 Orlando, Florida

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abkürzungsverzeichnis	V
1. Einleitung	1
1.1 Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System	1
1.2 Funktion und Dysfunktion des Endothels	5
1.3 Oxidativer Stress	10
1.2.1 NADPH-Oxidasen.....	10
1.2.2 Mitochondriale Atmungskette.....	13
1.2.3 Xanthinoxidoreduktase.....	16
1.4 AMP-abhängige Proteinkinase (AMPK)	17
1.5 Stand der Forschung.....	21
1.6 Zielsetzung	22
2. Material und Methoden	23
2.1 Chemikalien / Reagenzien.....	23
2.2 Verbrauchsmaterialien	27
2.3 Antikörper	30
2.4 Geräte	30
2.5 Puffer und Lösungen	35
2.6 Tierzucht / Behandlung	40
2.7 Genotypisierung der $\alpha 1$ -AMPK knock out Mäuse.....	42
PCR Ansatz	45
PCR-Bedingungen.....	45
2.8 Implantation osmotischer Minipumpen	46
2.9 Tötung der Maus und Organentnahme.....	49
2.10 Implantation von Telemetrie-Kathetern in Ratten	52
2.11 NO-Analyzer zur Bestimmung von Nitrit.....	56
2.12 DPPH Test.....	59
2.13 Xanthinoxidase Aktivitäts-Assay	60
2.14 Chemilumineszenztests zur Detektion freier Radikale	62
2.14.1 Luzigenin basierte Chemilumineszenz.....	62
2.14.2 Herstellung der Herzmembranfraktionen.....	63

2.14.3 L-012-vermittelte Chemilumineszenz.....	64
2.14.4 Isolation von Mitochondrien	65
2.14.5 Proteinbestimmung nach Lowry	65
2.14.6 Oxidativer Stress in isolierten Aortensegmenten.....	66
2.15 Bestimmung der Gefäßfunktion mittels isometrischer Tonusstudien.....	67
2.16 Proteinextraktionen aus Gewebe.....	71
2.17 Proteinbestimmung nach Bradford.....	71
2.18 Dot Blot.....	73
2.19 Protein-Gelelektrophorese (diskontinuierliche SDS-PAGE).....	74
2.20 Western Blot / Protein-Transfer	76
2.21 Immunologische Nachweise von Proteinen auf Membranen.....	77
2.22 Isolierung von RNA	79
2.22 Bestimmung der DNA- und RNA-Konzentration.....	81
2.24 Reverse Transkription	81
2.25 Real time-PCR (qRT-PCR).....	82
Auswertung der qRT-PCR	84
PCR-Bedingung	85
2.26 Detektion von ROS in Aortensegmenten.....	86
2.27 Elektronen-Spin-Resonanz-Spektroskopie (ESR).....	87
2.28 Immunhistochemie	89
3. Ergebnisse	91
3.1 Effekte der Aktivierung der AMPK.....	91
3.1.1 Überprüfung der AMPK-Aktivierung mittels Western Blot.....	92
3.1.2 Analyse der Gefäßfunktion mittels isometrischer Tonusstudien	93
3.1.3 Telemetrische Messung des arteriellen Blutdrucks.....	96
3.1.4 NO-Gehalt.....	97
3.1.4.1 Bestimmung des NO-Gehalts im Serum mittels des NO-Analyzers.....	98
3.1.4.2 NO-Bioverfügbarkeit in Aortengewebe.....	99
3.1.5 Tyrosinnitrierung als Maß der Peroxynitrit-Produktion.....	100
3.1.6 ROS in intaktem Aortengewebe.....	101
3.1.7 Analyse der möglichen Superoxidquellen.....	104
3.1.7.1 Aktivität von NADPH-Oxidase in Herzmembranfraktionen.....	105
3.1.7.2 Xanthinoxidase Aktivität im Serum.....	106

3.1.7.3 Mitochondriale ROS-Produktion	107
3.1.8 mRNA-Expression der NADPH-Oxidase Untereinheiten	108
3.1.9 Vaskuläre Inflammation	110
3.1.10 Modulation der H ₂ O ₂ -induzierten Endothelzellnekrose und des JNK-Signalwegs durch AMPK-Aktivierung	113
3.2 Effekte der AMPK-Defizienz durch genetische Manipulation	118
3.2.1 Analyse des AMPK-knock outs mittels Western Blots	119
3.2.1 Analyse der Gefäßfunktion mittels isometrischer Tonusstudien	121
3.2.2 NO-Gehalt	125
3.2.2.1 Bestimmung des NO-Gehalts im Serum mittels des NO-Analyzers	125
3.2.2.2 NO-Bioverfügbarkeit in Aortengewebe	126
3.2.3 Tyrosinnitrierung als Maß der Peroxynitrit-Produktion	127
3.2.4 ROS-Detektion in intaktem Aortengewebe	128
3.2.5 Analyse der möglichen Superoxidquellen	130
3.2.5.1 NADPH-Oxidase Aktivität in Herzmembranfraktionen	130
3.2.5.2 Xanthinoxidase Aktivität im Serum	131
3.2.5.3 Mitochondriale ROS-Produktion	132
3.2.6 Detektion von oxidativem Stress in Aortensegmenten durch Chemilumineszenz	134
3.2.7 mRNA-Expression der NADPH-Oxidase Untereinheiten	136
3.2.8 Vaskuläre Inflammation	140
3.2.10 Proteinexpressionsstudien	143
3.2.11 Immunhistochemische Untersuchung in Aortensegmenten	146
3.2.12 Antioxidative Kapazität des Serums	148
3.3 Zusätzliche Tiermodelle	150
3.3.1 Lipopolysaccharid-induzierter oxidativer Stress & Endotheldysfunktion	150
3.3.1.1 Bestimmung der Gefäßfunktion mittels isometrischer Tonusstudien	150
3.3.1.2 ROS-Detektion in intaktem Aortengewebe	152
3.3.2 Effekte der PGC-1 α Defizienz durch genetische Manipulation	153
4. Diskussion	155
4.1 AMPK in der Endothelfunktion	155
4.2 AMPK-Aktivität und NO-Produktion	159
4.3 AMPK und oxidativer Stress	162
4.3.1 NADPH-Oxidase	163

4.3.2 Mitochondrien	165
4.3.3 Xanthinoxidase	167
4.4 AMPK und vaskuläre Inflammation	168
4.5 AMPK und Endothelzellnekrose und -apoptose	170
4.6 AMPK im arteriellen „Hypertoniemodell“	172
4.7 AMPK und Diabetes	173
4.8 AMPK-Isoformen.....	174
4.9 Phänotyp der α 1-AMPK-Defizienz.....	176
4.10 Fazit und Ausblick	177
5. Zusammenfassung.....	179
6. Abbildungsverzeichnis.....	180
7. Tabellenverzeichnis.....	194
8. Literaturverzeichnis.....	196
Lebenslauf.....	218
Danksagung.....	219
Veröffentlichung	221
Erklärung.....	232

Abkürzungsverzeichnis

μ_B	Bohr'sches Magneton
2-HE	2-Hydroxyethidium
3-HMG-CoA	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoenzymA-Reduktase
ACC	Acetyl CoA Carboxylase
ACE	Angiotensin-Conversions-Enzym
ACh	Acetylcholin
ADH	antidiuretisches Hormon
AICAR	5-Aminoimidazol-4-Carboxamid-Ribonukleosid
AMPK	Adenosinmonophosphat-abhängige Kinase
APS	Ammoniumpersulfat
Arg	Arginin
ASC-Domäne	Caspase Rekrutierungs Domäne
AT II	Angiotensin II
AT ₁ Rezeptor	Angiotensin Rezeptor Typ 1
AT ₂ Rezeptor	Angiotensin Rezeptor Typ 2
AU	engl. arbitrary units
AUC	engl. area under the curve
Bcl-2/Bcl-X	engl. B cell lymphoma-2 / B cell lymphoma-X
BH ₄	Tetrahydrobiopterin
bp	Basenpaare
BSA	Bovin serum albumin (engl.)
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CBS-Domäne	AMP/ATP bindende Domäne
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
c-Jun	humanes proto Oncogen
CoA	Coenzym A
COX-2	Cyclooxygenase 2
C _T	engl. threshold cycle
CTR	control (engl.) Kontrolle
DAG	1,2-Diacylglycerol
Dea/NONOat	Diethylamin NONOat
dest.	destilliert
DHE	Dihydroethidium
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphate
DPP	1,1-Diphenyl-1-picryl-hydrazyl
DTT	Dithiotreitol
EC	endothelial cell (engl.), Endothelzelle
EC ₅₀	Konzentration eines Wirkstoffes, der die halbmaximale Wirkung hervorruft

ECL	enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglykol-bis (aminoethylether)-N,N,N'N'-Tetraessigsäure
eNOS	endotheliale NO-Synthase
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERR	estrogen receptor related receptor (engl.)
ESR	Elektronen-Spin-Resonanz-Spektroskopie
FADH ₂	Flavin-Adenin-Dinukleotid
Fe-(DETC) ₂	Eisen (II)-Diethyldithiocarbamat
FMN	Flavinmononukleotid
FRET	Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer
G ₁₂	Subfamilie der großen Familie der G-Proteine
g _e	Elektronen g-Faktor
gp91phox	Glucoprotein 91, phagozytäre Oxidase
G-Protein	GTP-bindendes Enzym
G _q	Rezeptor-gekoppeltes G-Protein
GTP-CH	GTP-Cyclohydrolase
HMG-CoA-Reduktase	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoenzymA-Reduktase
HPLC	high performance liquid chromatography (engl.)
HRP	Peroxidase aus Meerrettisch
HUVEC	human umbilical vein endothelial cell (engl.) Endothelzellen aus menschlichen Nabelschnurvenen
IMP	Imidazol-4-Carboxamid-Ribonukleosid-Monophosphat
iNOS	induzierbare NO-Synthase
IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
IRAG	IP ₃ -Rezeptor-assoziiertes cGMP-Kinase Substrat
K ₂ HPO ₄	Di-Kaliumhydrogenphosphat
KH	Krebs-Hepes-Puffer
KH-I	Krebs-Hepes-Puffer mit Inhibitoren
KIS-Domäne	Kinase Domäne
ko / KO	knock out
L-012	8-Amino-5-Chloro-7-Phenylpyrido[3,4-d]pyridazin-1,4-(2H,3H)Dion
LC	Luzigenin
LDH	Laktatdehydrogenase
LHON	Leber'sche hereditäre Optikusneuroretinopathie
LKB1	STK11, <u>S</u> erin/ <u>T</u> hreonin <u>K</u> inase 11
L-NAME	N ^G -Nitro-L-Argininmethylester
LPS	Lipopolysaccharid
MAPK	mitogen activated protein kinase (engl.)
MAPKK	mitogen activated protein kinase kinase (engl.)
Met	Metformin

mRNA	"messenger" RNA (engl.)
m_s	magnetisches Elektronenmoment
NaN_3	Natriumazid
NO	Stickstoffmonoxid
NO_2^-	Nitrit
NO_3^-	Nitrat
NOX	NADPH-Oxidase
NTG	Nitroglyzerin
OD	optische Dichte
OH^\bullet	Hydroxylradikal
ONOO^-	Peroxynitrit
PAEC	pulmonary artery endothelial cell (engl.)
PBS	Phosphate buffered saline (engl.)
pD_2	negativer Logarithmus des EC_{50} Wertes
PDE	Phosphodiesterase
PGC-1 α	Peroxisomen Proliferator-aktivierter Rezeptor-gamma Coaktivator 1 alpha
PGE_2	Prostaglandin E_2
PGI_2	Prostaglandin I_2 (Prostazyklin)
PGI-S	Prostazyklin-Synthase
PIP_2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PMSF	Phenylmethansulfonyl-fluorid
$\text{PPAR}\gamma$	Peroxisomen Proliferator-aktivierter Rezeptor-gamma
Ptgs-2 (=COX-2)	Prostaglandin-endoperoxide synthase 2
PVDF-Membran	Polyvinylidenfluorid
Q	Ubichinon
QH_2	Ubichinol
qRT-PCR	quantitative real time polymerase chain reaction (engl.)
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RNS	reaktive Stickstoffspezies
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate (engl.)
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Ser	Serin
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris/Borsäure/EDTA Puffer
TBS	engl. Tris buffered saline
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TG	Trockengewicht
Thr	Threonin

V ₁	Vasopressin Rezeptor 1
VASP	Vasodilator stimuliertes Phospho-Protein
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule 1 (engl.)
VSMC	vascular smooth muscle cell (engl.)
WB	Western Blot
WHO	World Health Organization (engl.)
WT	Wildtyp
XDH	Xanthindehydrogenase
XO	Xanthinoxidase
XOR	Xanthinoxidoreduktase
ZMP	5-Aminoimidazol-4-Carboxamid-Ribonukleosid-Monophosphat
Zn	Zink

1. Einleitung

Herz-Kreislaferkrankungen sind weiterhin die führende Todesursache in der westlichen Welt. Es müssen daher Anstrengungen unternommen werden, um diese Erkrankungen möglichst im Frühstadium zu erkennen und entsprechende Therapiemaßnahmen einzuleiten, bevor schwerwiegende Folgeerkrankungen wie Schlaganfall, Herzinfarkt oder arterielle Verschlusskrankheit auftreten. Diesen klinischen Manifestationen liegen in aller Regel atherosklerotische Gefäßveränderungen zugrunde, deren Ursachen multifaktoriell sind. Neben klassischen Risikofaktoren wie der arteriellen Hypertonie, Diabetes mellitus und Hypercholesterinämie zählen hierzu auch verbreitete Lebensgewohnheiten wie Bewegungsmangel, fettreiche Ernährung und Übergewicht sowie das Rauchen. Neben einer erhöhten Aufklärungsarbeit zur Prävention von Herz-Kreislaferkrankungen gilt es, die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen zu verstehen, um neuartige Ansatzpunkte für die Therapie zu entwickeln.

Die vorliegende Arbeit wird sich mit den Folgen der Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems - als einem gemeinsamen pathophysiologischen Element von Gefäßkrankungen - auf die vaskuläre Biologie beschäftigen. Dabei sollen vor allem die Effekte der AMP-abhängigen Proteinkinase (AMPK) auf vaskulären oxidativen Stress, die Stickstoffmonoxid-Bioverfügbarkeit und die Endotheldysfunktion untersucht werden.

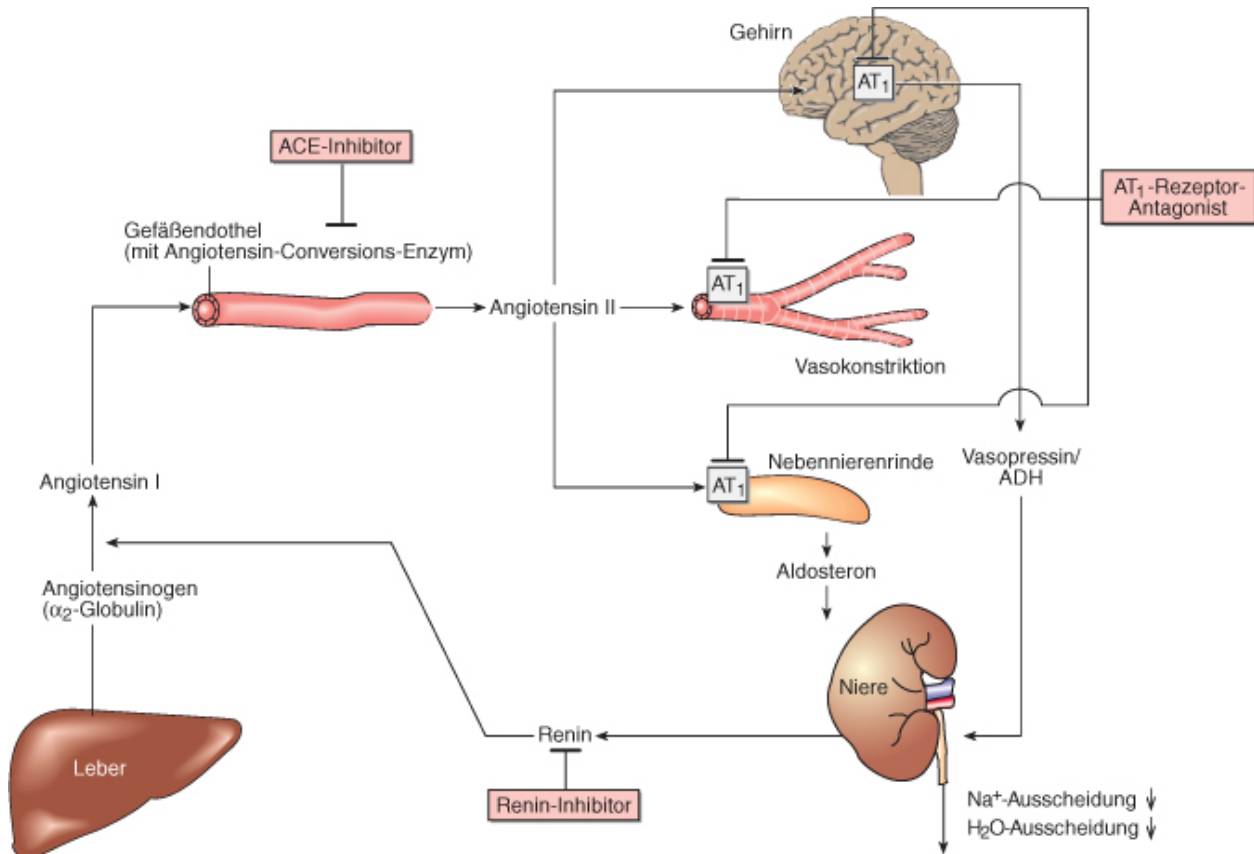
1.1 Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System

Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) ist neben dem katecholaminergen System das bedeutendste hormonelle System zur Regulation des Blutdrucks (Abbildung 1). Im Wesentlichen bildet das RAAS eine Kaskade von Hormonen und Enzymen, die durch die Freisetzung von Renin aus den juxtaglomerulären Zellen der Niere als Ort der Synthese gestartet wird.¹ Die Renin-Freisetzung wird durch die folgenden Mechanismen streng reguliert.

- Der Sympathikus kann über das adrenerge/noradrenerge System durch die Stimulation von β_1 -Rezeptoren der juxtaglomerulären Zellen die Renin-Freisetzung erhöhen.

- Die Barorezeptoren des Vas afferens (Blutgefäß, das die Glomeruli mit Blut versorgt) reagieren auf verminderten Perfusionsdruck im Gefäß mit erhöhter Reninausschüttung, während ein erhöhter Perfusionsdruck die Reninausschüttung senkt.
- Die Natriumchloridkonzentration (NaCl) im distalen Tubulus der Niere wird durch sogenannte Macula-densa-Zellen erfasst. Verringert sich die NaCl-Konzentration im distalen Tubulus, so wird die Renin-Freisetzung gesteigert. Erhöht sich die NaCl-Konzentration, so verringert sich die Renin-Ausschüttung.
- Auch Prostaglandine (PGI_2 und PGE_2) scheinen eine steigernde Wirkung auf die Renin-Freisetzung zu haben.^{1,2}

Renin selbst hat als Protease keine bisher nachgewiesene Gefäßwirkung, spaltet aber aus Angiotensinogen (α_2 -Globulin aus der Leber) das Dekapeptid Angiotensin I ab. Angiotensin I hat selbst auch wenig biologische Wirkung, es stellt jedoch das Substrat des Angiotensin-Conversions-Enzyms (ACE), einer zinkhaltigen Peptidase, dar. Diese Peptidase wird neben anderen Zelltypen vor allem in Endothelzellen exprimiert und setzt dort aus Angiotensin I das Oktapeptid Angiotensin II frei. Dieses Peptid ist der stärkste bekannte Konstriktor peripherer und renaler Arteriolen und wirkt bis zu 40fach stärker vasokonstriktorisch als Noradrenalin. Weiterhin führt die Angiotensin II-Produktion zur Aldosteronsekretion aus den Glomerulosa-zellen der Nebennierenrinde. Die Wirkungen von Angiotensin II sind vielfältig und beschränken sich nicht auf das vaskuläre System. So bewirkt Angiotensin II neben der Vasokonstriktion auch Kontraktionen des Uterus. Diese Systeme werden vor allem über den AT_1 -Rezeptorsubtyp angesprochen, der eine Signalkaskade in Gang setzt, die die Konstriktion von glatten Muskelfasern einleitet. Abbildung 1 zeigt eine schematische Darstellung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems.¹



Aktories et al.: Pharmakologie, 9.A. © Elsevier GmbH. www.studentconsult.de

Abbildung 1. Essentielle Komponenten des Renin-Angiotensin-Aldosteron-System: Synthese-, Freisetzungs- und Wirkungsorte der einzelnen Substanzen (AT₁ = Angiotensin-Rezeptor 1). Für Details siehe Text (verändert nach¹).

Die Freisetzung von Angiotensin II durch das in Endothelzellen exprimierte ACE hat zur Folge, dass der G_q- und G₁₂-Protein gekoppelte AT₁-Rezeptor aktiviert wird und dies die Aktivierung der Phospholipase C (PLC) in der glatten Gefäßmuskulatur nach sich zieht. Abbildung 2 zeigt die beschriebenen Vorgänge.

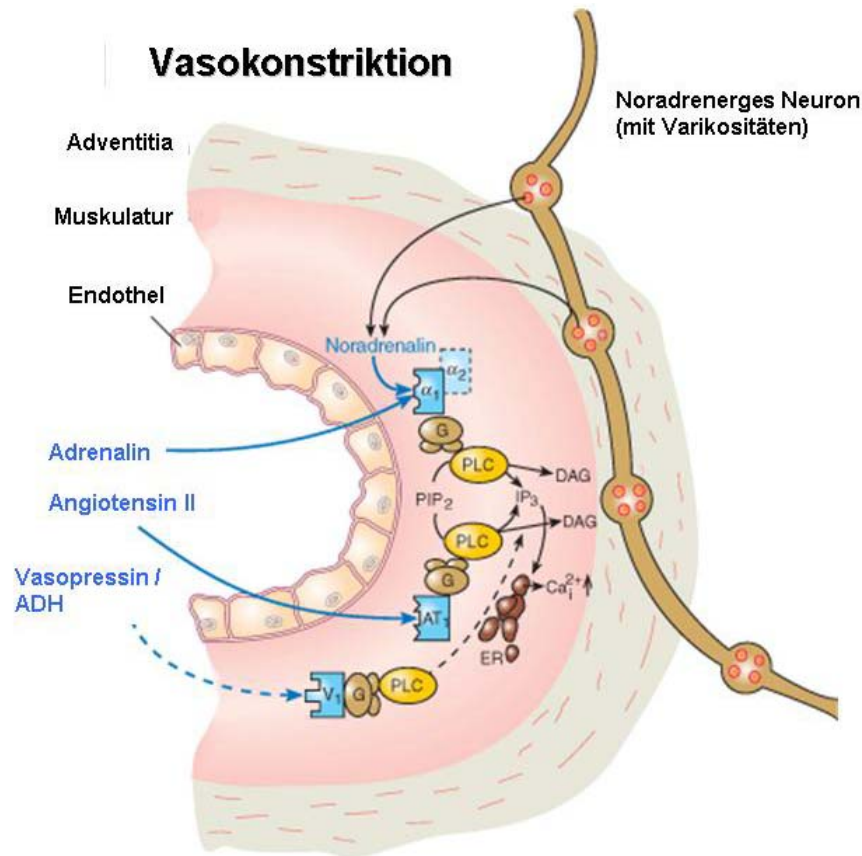


Abbildung 2. Vorgänge bei Vasokonstriktion: Angiotensin II wirkt über den AT₁-Rezeptor und führt zu einer Aktivierung der PLC; auch Adrenalin und Vasopressin / ADH wirken über die Aktivierung der PLC, die durch die Bildung von IP₃ und DAG eine Muskelkontraktion und andere Effekte hervorruft. Für Details siehe Text (verändert nach¹).

Die aktivierte Phospholipase C setzt Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) zu Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP₃) und 1,2-Diacylglycerol (DAG) um. Das gebildete IP₃ führt zu einem intrazellulären Ca²⁺-Anstieg durch Freisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum (ER). Der Anstieg von Ca²⁺ in der Zelle führt zu einer Calmodulin-vermittelten Phosphorylierung und Aktivierung der Myosin-Leichtkettenkinase, die die Kontraktion ermöglicht.^{1, 3} Neben IP₃ aktiviert DAG ebenfalls entscheidende Signalkaskaden. Die Aktivität der Proteinkinase C (PKC) wird durch DAG gesteigert, wodurch es zur Expression von Protoonkogenen kommt, die die proliferative Wirkung von Angiotensin II auf Gefäßmuskelzellen erklären.⁴ Eine weitere Funktion der PKC ist die Aktivierung der NADPH-Oxidasen, die als das wichtigste Enzymsystem zur Entstehung des vaskulären oxidativen Stresses gelten. Über den gesteigerten oxidativen Stress kann Angiotensin II außerdem eine Endotheldysfunktion auslö-

sen, die dabei zugrunde liegenden molekularen Mechanismen werden im nächsten Abschnitt erläutert.^{5,6}

1.2 Funktion und Dysfunktion des Endothels

Das Endothel kleidet als einzelne Zellschicht alle Blutgefäße des Körpers aus und stellt den Kontakt zwischen dem strömenden Blut und der Gefäßwand her.⁷ So werden alle Änderungen im Blut, z.B. Konzentrationsänderungen vasoaktiver Substanzen oder metabolische Faktoren, vom Endothel wahrgenommen und an die Gefäßwand weitergeleitet.⁷ Als 1980 R. Furchgott den „endothelium derived relaxing factor“ (EDRF) nachwies, wurde die herausragende Bedeutung des Endothels für die Regulation der Gefäßfunktion und auch die Entstehung von kardiovaskulären Krankheiten durch eine Endotheldysfunktion allgemein anerkannt.¹ Ende der 80er Jahre zeigte sich dann durch Studien mit Nitrovasodilatoren, dass der EDRF mit Stickstoffmonoxid identisch ist und als endogener Stimulator der löslichen Guanylatzyklase fungiert.^{8,9} Damit ist NO das kleinste endogen gebildete bioaktive Molekül. Es wird durch die NO-Synthase aus der Aminosäure L-Arginin gebildet. Das im Endothel gebildete NO diffundiert leicht in benachbarte Zellen und beeinflusst so nicht nur den Tonus der Gefäße, sondern moduliert auch die Zellmigration, beeinflusst Prozesse der Strukturierung von extrazellulärer Matrix sowie das Wachstum glatter Muskelzellen, hemmt die Thrombozyten- und Monozytenaggregation sowie deren Adhäsion und Infiltration. Weiterhin beeinflusst und reguliert das Endothel die Blutgerinnung und reagiert auf im Blut zirkulierende Substanzen wie Hormone, Zytokine und Wachstumsfaktoren. Auch physikalische Stimuli wie pulsatile Dehnung oder veränderte Scherkräfte werden durch das Endothel wahrgenommen und auf unterschiedlichen Signalwegen weitergeleitet.^{3,7} Diese wichtigen Vorgänge können nur durch ein intaktes, funktionierendes Endothel geleistet werden, wodurch der Funktion des Endothels eine herausragende Bedeutung in der Homöostase des Gefäßtonus zukommt.

Die Funktion des Endothels und die Regulation des Gefäßtonus unterliegen einem komplexen System von Signalwegen, die über Vasodilatoren und Vasokonstriktoren gesteuert werden. Bekannte Vasokonstriktoren wie Noradrenalin, Adrenalin, Angiotensin II, Endothelin-1, Arachidonsäureprodukte (Thromboxan A₂ = TxA₂) binden direkt an Rezeptoren der Gefäßmuskelzellen, die dann über G-Proteine die Phospholipase C (PLC) aktivieren. Diese Aktivierung bedingt, dass aus Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) Inositol-1,4,5-trisphosphat

(IP₃) und 1,2-Diacylglycerol (DAG) gebildet werden und es zu einer Kontraktion glatter Muskelzellen kommt (Abbildung 2).

Im Gegensatz dazu ist das Endothel durch die Bildung von NO durch die endotheliale NO-Synthase der wichtigste Mediator der Vasodilatation. NO hat unter anderem aufgrund seiner hohen Membranpermeabilität, die eine rasche Diffusion über mehrere Zellschichten ermöglicht, eine herausragende biologische Wirksamkeit, die sich nicht nur auf unmittelbar benachbarte Strukturen beschränkt. Durch die Reaktion mit NO-Akzeptoren wie Hämoglobin, Myoglobin oder Eisen-Schwefelkomplexen werden Protein- oder auch Rezeptoraktivitäten beeinflusst. So wird auch die lösliche Guanylatzyklase (sGC) durch Bindung von NO an seine Häm-Gruppe aktiviert, und es kommt zu Bildung des „second messengers“ cGMP.^{8, 10} Hierdurch wird die cGMP-abhängige Proteinkinase (PKG) aktiviert und damit die Phosphorylierung des Rezeptors für IP₃ und des IP₃-Rezeptor-assoziierten cGMP-Kinase Substrats (IRAG) vermittelt. Diese Phosphorylierungen hemmen die Freisetzung von Ca²⁺ aus dem ER, wodurch die Vasodilatation eingeleitet wird. Gleichzeitig können K⁺-Kanäle durch Phosphorylierung aktiviert werden, was zu einer Hyperpolarisation der Muskelzelle und zu einem verminderten Ca²⁺ Einstrom in die Zelle führt. Abbildung 3 fasst die genannten Vorgänge zusammen.^{1, 3, 7}

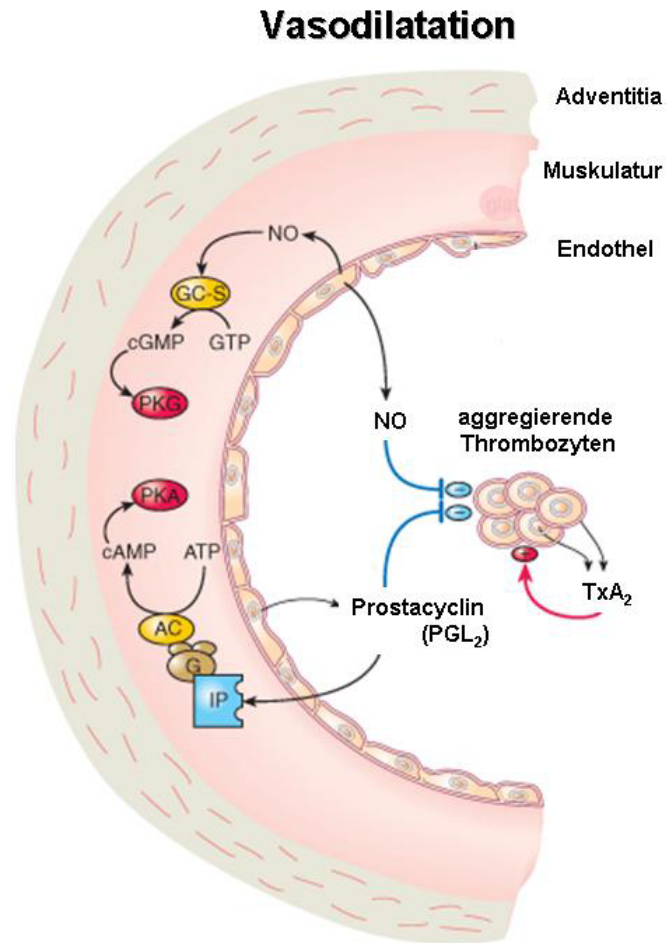


Abbildung 3. Wichtige lokale Effektorsysteme, die den peripheren Gefäßtonus regulieren: Der Gefäßtonus wird über die Bildung von NO und über die Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase reguliert. Durch Bildung von cGMP wird die cGMP-abhängige Proteinkinase aktiviert, die durch Phosphorylierungsreaktionen die Vasodilatation einleitet. Für Details siehe Text (verändert nach¹).

Diese Regelkreise zeigen die essentielle Rolle von NO und der endothelialen NO-Synthase für die Gefäßregulation. Nur ein intaktes Endothel kann die bedarfsgesteuerte Vasodilatation durch eine ausreichende NO-Bioverfügbarkeit garantieren und damit die Homöostase des Gefäßsystems aufrechterhalten.

Ein essentieller Baustein in dieser streng regulierten Balance ist die NO-Synthase, deren Aktivität durch Phosphorylierung des Enzyms, dessen subzelluläre Lokalisation sowie durch Cofaktoren und die Bindung an andere Proteine reguliert wird. Die Produktion von NO aus L-Arginin hängt von der vollständigen Aktivierung des eNOS-Homodimers ab, die durch Bindung von Ca/Calmodulin, Depalmitoylierung, Oxidation des Eisen-Schwefel-Clusters, den

Cofaktor Tetrahydrobiopterin, Entfernung von Caveolin-1 und die Freisetzung von eNOS aus Caveolen bestimmt wird.^{11, 12} Weitere aktivierende und inhibierende Vorgänge sind die aktivierende Akt-vermittelte Phosphorylierung an Serin 1177 (Akt = Proteinkinase B) und die inhibierende Proteinkinase C-vermittelte Phosphorylierung an Threonin 495. Die Dephosphorylierung an Threonin 495 durch die Proteinphosphatase 1 kann zur Aktivität beitragen und erfolgt als Reaktion auf Bradykinin.^{13, 14}

Weiterhin kann die Aktivität der eNOS durch Änderungen ihrer Genexpression gesteigert bzw. reduziert werden.^{15, 16} Diese Regelkreise weisen auf eine sehr wichtige, aber auch kritische Funktion der eNOS hin. Eine wichtige Rolle spielt hierbei der essentielle Cofaktor BH₄ (Tetrahydrobiopterin), dessen Fehlen oder Oxidation zu einer Entkopplung der NO-Synthese führt und damit zur Endotheldysfunktion beitragen kann, wie im nächsten Abschnitt noch detailliert dargestellt wird.¹⁷ Abbildung 4 zeigt die Struktur des eNOS-Komplexes.

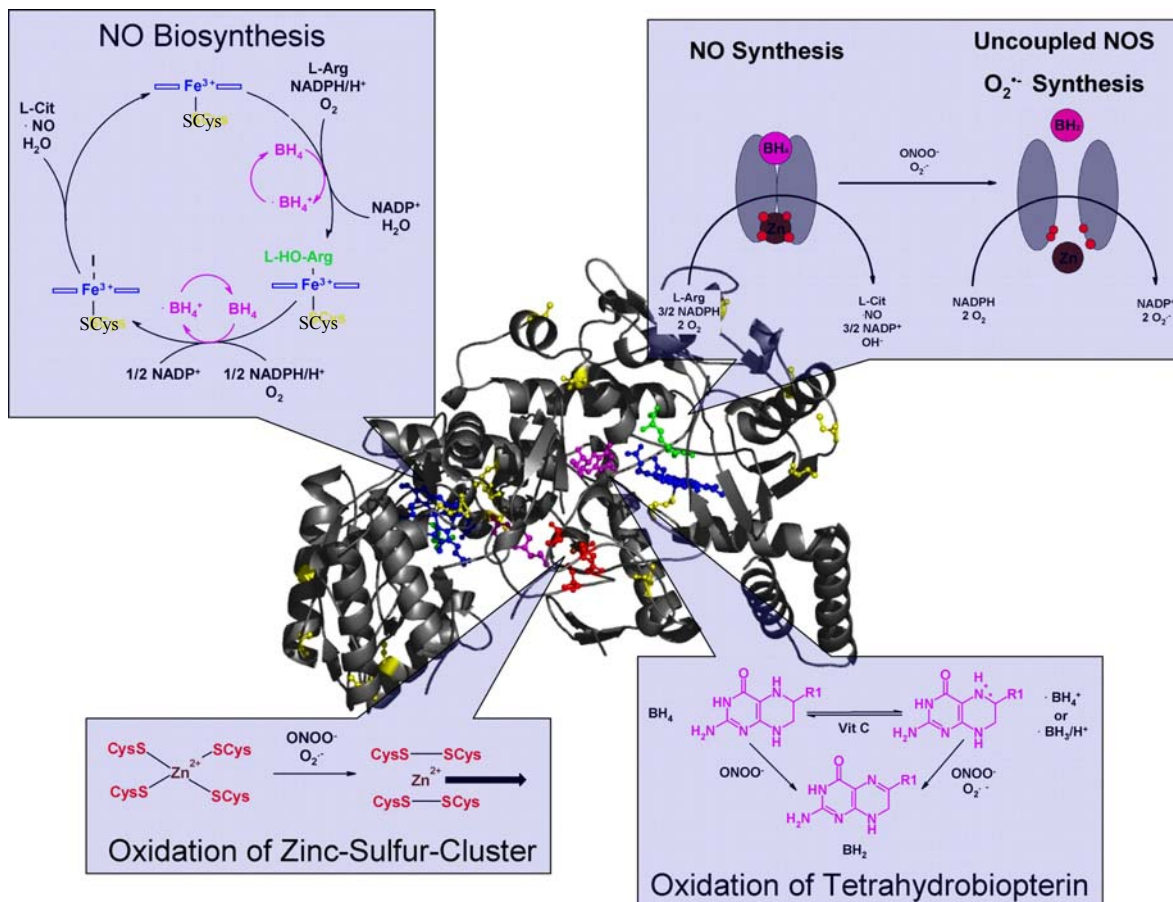


Abbildung 4. Struktur der humanen eNOS, blau: Eisenporphyrin, grün: Substrat L-Arginin, schwarz-gelb: P450 bindender, axialer Eisen-Thiolat-Ligand von Cystein, lila: Cofaktor BH₄, rot: Zink-Thiol-Komplex bildende Cysteine, braun: Zn²⁺. Für Details siehe Text (verändert nach³).

Zu einer endothelialen Dysfunktion (Endotheldysfunktion (ED)) kann es bei einer massiven Verminderung der NO-Produktion oder einer vermehrten NO-Inaktivierung, in erster Linie vermittelt durch freie Sauerstoffradikale, kommen. In diesem Zustand kann das Gefäß nicht mehr auf endogen und exogen induzierte Veränderungen mit einer entsprechenden Regulation des Gefäßtonus reagieren. Diese Störung der Endothelfunktion gilt als Vorstufe von makroskopischen Gefäßveränderungen, wie sie im Rahmen der Atherosklerose auftreten und ist bei Vorliegen kardiovaskulärer Risikofaktoren wie arterieller Hypertonie, Diabetes mellitus, Hypercholesterinämie und Rauchen häufig. In der Entstehung der Endotheldysfunktion spielt der oxidative Stress eine entscheidende Rolle. So führen zum Beispiel lokal erhöhte Angiotensin II-Spiegel zu einer gesteigerten Aktivierung des AT₁-Rezeptors, was zur verstärkten Bildung von DAG und somit zur dauerhaften Aktivierung der PKC führen kann. Das kann die Aktivierung von NADPH-Oxidasen bewirken, und es kommt zu gesteigertem vaskulären oxidativem Stress. Hieraus resultiert ein Anstieg freier Radikale, von denen insbesondere Superoxidanionen sehr schnell mit NO reagieren, damit das freie NO inaktivieren und eine Endotheldysfunktion auslösen können.

Der Dilator NO kann also durch erhöhte Konzentrationen von Superoxidanionen abgefangen werden, wodurch einerseits die protektiven Eigenschaften von NO vernichtet werden, andererseits zusätzlich ein noch potenteres Oxidanz, Peroxynitrit (ONOO⁻), gebildet wird. Peroxynitrit reagiert besonders mit Häm- und Hämthiolathaltigen sowie mit Eisen-Schwefel-Cluster Proteinen, die meist tyrosinnitriert (bzw. oxidiert) und damit inaktiviert werden.¹⁸⁻²² Beispiele sind die Prostazyklinsynthase und die Mangan-Superoxiddismutase (MnSOD), die beide durch die genannte Reaktion inaktiviert werden und somit ihre protektiven Funktionen verlieren.

Die endotheliale NO-Synthase nimmt im Zusammenhang des oxidativen Stresses eine Sonderstellung ein. Bei Oxidation des Cofaktors BH₄ oder durch Oxidation des Zink-Thiolat-Clusters verliert dieses Enzym nicht nur die protektiven Eigenschaften der NO-Produktion, sondern es kommt zu einer Entkopplung, wodurch durch Übertragung der Elektronen auf molekularen Sauerstoff zusätzliches Superoxidanion gebildet wird.²³ Die NO-Bioverfügbarkeit wird somit durch zwei unabhängige Mechanismen verringert: einerseits wird der basale Gehalt an NO durch die Reaktion mit Superoxid reduziert und andererseits die NO-Produktion durch die Entkopplung der endothelialen NO-Synthase vermindert.

1.3 Oxidativer Stress

Als oxidativer Stress wird eine Stoffwechsellage bezeichnet, in der die Produktion von reaktiven Sauerstoff- bzw. Stickstoffspezies (eng. reactive oxygen / nitrogen species, kurz ROS / RNS) das physiologische Ausmaß überschreitet und die vorhandenen antioxidativen Schutzmechanismen (Superoxiddismutasen oder Katalase, niedermolekulare Antioxidanzien wie Ascorbat) nicht ausreichen.²⁴ Zu den im Organismus produzierten Sauerstoffradikalen, die im Zusammenhang mit oxidativem Stress von Bedeutung sind, zählen das Hydroxyl-Radikal (OH^\bullet), das Superoxidradikal $\text{O}_2^{\bullet-}$ sowie sein Dismutationsprodukt Wasserstoffperoxid (H_2O_2). Dem Superoxidradikal wird im Gefäßsystem die überragende Rolle zugeordnet, da es wegen seiner Allgegenwärtigkeit und der bedeutenden Wechselwirkung mit NO eine zentrale Funktion in der Übermittlung von Pathomechanismen innehat.³ NO ist ebenfalls ein Radikal, das wegen seiner relativen Reaktionsträgheit nur mit einigen Biomolekülen Reaktionen eingeht. Peroxynitrit, das Produkt der Reaktion von NO^\bullet und $\text{O}_2^{\bullet-}$ ist hier wichtig, da es ein viel potenteres Oxidanz ist als die beiden vorgenannten,^{18, 19} was durch seine Beteiligung an der Entstehung kardiovaskulärer Krankheiten und neurodegenerativer Prozesse belegt wird.^{10, 20, 25-29}

Zu den Quellen des oxidativen Stresses im kardiovaskulären System zählen die NADPH-Oxidase, die mitochondriale Atmungskette, die Xanthinoxidase und die entkoppelte NO-Synthase. Diese Quellen sollen nachfolgend detailliert dargestellt werden.

1.2.1 NADPH-Oxidasen

NADPH-Oxidasen sind hier die einzige Superoxidquelle, deren physiologische Funktion tatsächlich die Produktion von Superoxid darstellt, die insbesondere für die Abwehr schädlicher Mikroorganismen durch neutrophile Granulozyten essentiell ist. Ein Fehlen dieses Enzymsystems verhindert die Eliminierung von Mikroorganismen und führt zum klinischen Bild der chronischen Granulomatose. Darüber hinaus gibt es Hinweise, dass die basale ROS-Produktion durch NADPH-Oxidasen in verschiedenen Geweben wichtige Signalfunktionen übernimmt, wie z.B. Angiogenese und Neovaskularisierung,^{30, 31} oder die zelluläre Vermittlung der Insulinwirkung.^{32, 33, 34, 35} Ein weiterer Nebeneffekt der NADPH-Oxidase besteht in der Steigerung der ROS-Produktion anderer Enzymsysteme.

Zur letzteren Gruppe kann unter anderem die endotheliale NO-Synthase gezählt werden, die durch die Degradation eines Cofaktors (Tetrahydrobiopterin BH₄) entkoppelt werden kann und dadurch statt Stickstoffmonoxid Superoxidradikale produziert.³⁶ Auch die Xanthinoxidoreduktase kann durch eine primäre ROS-Quelle, z.B. die NADPH-Oxidase, in die Superoxid-generierende Form, die Xanthinoxidase, konvertiert werden, worauf folgend genauer eingegangen wird.³⁷

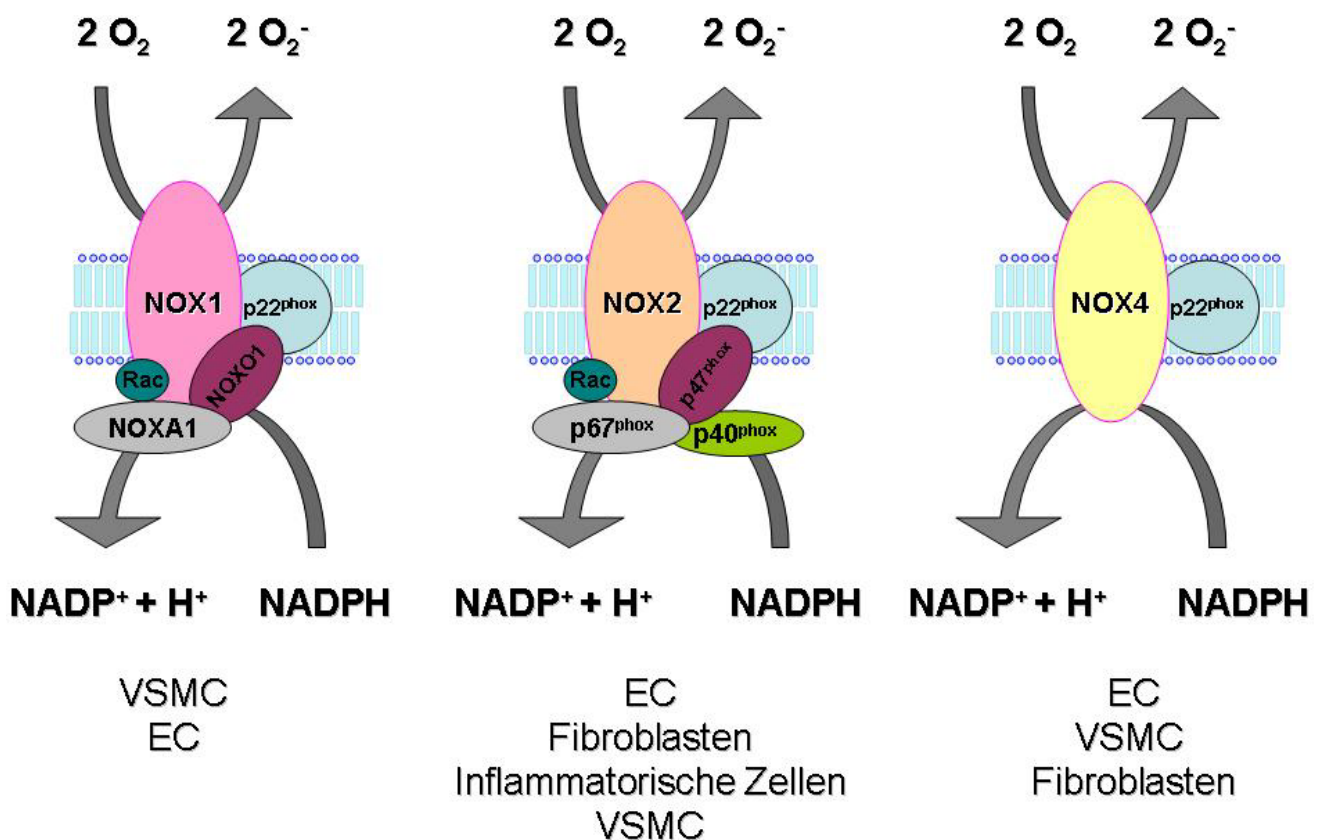


Abbildung 5. Schematisches Diagramm mit Beispielen unterschiedlicher NADPH-Oxidase-Isoformen und Teilreaktionen, sowie die zelluläre Distribution: NOXA1 und NOXO1 sind Homologe zu p67^{phox} und p47^{phox}, die für die Aktivierung der NOX1 benötigt werden; NOX4 benötigt diese Untereinheiten nicht, sondern wird transkriptionell reguliert. VSMC = vascular smooth muscle cell, EC = endothelial cell (verändert nach³⁸).

Die NADPH-Oxidasen wurden zuerst in neutrophilen Granulozyten beschrieben, wo sie bei der nichtspezifischen Abwehr von Mikroorganismen große Mengen an Superoxid und Proto-

nen freisetzen.³¹ Die phagozytäre NADPH-Oxidase besteht aus zwei membranständigen Untereinheiten (p22^{phox} und gp91^{phox} = NOX-2), die ein Flavocytochrom (Cytochrom b558) bilden. Der Prozess des Elektronentransfers von NADPH auf molekularen Sauerstoff wird durch die Translokation von verschiedenen zytosolischen regulatorischen Untereinheiten (p47^{phox}, p67^{phox}, p40^{phox} und Rac) an das Cytochrom b558 reguliert. Erst nach vollständiger Assoziation der Untereinheiten kann der Elektronentransfer ablaufen. Die Entdeckungen vieler verschiedener Homologe von gp91^{phox} führten zu einer ganzen Familie von NADPH-Oxidasen, die jeweils nach der membranständigen größten Untereinheit als NOX-1 – 5 benannt wurden (NOX steht dabei für NADPH-Oxidase), wobei NOX-2 der gp91^{phox} entspricht. Verschiedene Isoformen und Zusammensetzungen der zytosolischen Untereinheiten wurden zum Beispiel in Gefäßmuskelzellen (VSMCs, engl. vascular smooth muscle cells),³⁹ in Endothelzellen,⁴⁰ adventitialen und kardialen Fibroblasten⁴¹ aber auch in Kardiomyozyten⁴² identifiziert (siehe Abbildung 5). Die gewebsspezifischen Expressionsmuster deuten auf unterschiedliche Funktionen hin. Die einzelnen NOX-Isoformen unterscheiden sich durch die Calcium-Abhängigkeit, die Assoziation mit zytosolischen Untereinheiten sowie eine konstitutive oder induzierbare Aktivität.

In Endothelzellen werden die NOX-2 und NOX-4 Isoformen exprimiert, wobei auch schon die Expression von NOX-1 und NOX-5 in diesen Zellen beschrieben wurde.⁴³⁻⁴⁶ Dabei ist zu unterstreichen, dass die NOX-4 Isoform 20fach höher exprimiert vorliegt als NOX-2,⁴⁷ konstitutiv aktiv ist und die konventionellen, zytosolischen Untereinheiten für die Aktivierung nicht benötigt (siehe Abbildung 5). Möglicherweise übernehmen diese Isoformen unterschiedliche Funktionen durch ihre unterschiedliche subzelluläre Lokalisierung innerhalb der Endothelzelle.^{30, 48}

Die Aktivierung der NADPH-Oxidase wird durch die Translokation der verschiedenen zytosolischen Komponenten an die Zellmembran erreicht, die durch verschiedene Stimuli (Angiotensin II, Endothelin I, Wachstumsfaktoren, Cytokine, physikalische Kräfte) ausgelöst werden kann. Dazu gehört primär die Bindung von p67^{phox} an die Aktivierungsstelle von NOX-2, um die katalytische Aktivität zu initiieren. Dieser Prozess wird durch die Bindung von p47^{phox} und p22^{phox} ermöglicht. Neben der Rac-Bindung an den Enzym-Komplex stellt die Phosphorylierung der p47^{phox} Untereinheit einen entscheidenden Schritt in der Aktivierungskaskade dar, weil dieser Schritt für die p47^{phox} Translokation an die Membran essentiell

ist. Die Rac-Untereinheit wird durch Isoprenylierung moduliert, um die Translokationsinformation an die Membran zu erhalten. Dazu wird wiederum die Aktivität der 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoenzymA-Reduktase benötigt. Weiterhin können alle Untereinheiten über die Expression der entsprechenden Genregionen reguliert werden. Diese komplexen Regulationsmechanismen stellen die Wichtigkeit der Regulation, aber auch die Gefährlichkeit einer Dysregulation der NADPH-Oxidase für das vaskuläre System dar. So verstärkt eine Steigerung der endothelialen ROS-Produktion sowohl die Genese der endothelialen Dysfunktion als auch die endotheliale Aktivierung, was zur Entstehung von Hypertonie, Atherosklerose und vaskulärer Inflammation beiträgt. Besonders sind hier die Inaktivierung von NO durch die Superoxidradikale und die damit einhergehende Peroxynitritbildung zu nennen, die gleichzeitig andere Enzymsysteme, wie die Prostaglandinsynthase, in ihrer Aktivität beeinträchtigen.

Aber nicht nur die NADPH-Oxidasen können als mögliche vaskuläre ROS-Quellen in Betracht gezogen werden, auch die mitochondriale Atmungskette wurde als wichtige Quelle des oxidativen Stresses identifiziert (siehe 1.2.2).

1.2.2 Mitochondriale Atmungskette

Mitochondrien sind zytoplasmatische Organellen mit zwei Membranen, deren wichtigste Aufgabe darin besteht, aus Fettsäuren und Zuckern universell nutzbare Energie in Form von ATP für die Zellarbeit bereitzustellen. Die Mitochondrien enthalten dafür die Enzyme des Citratzyklus, der Fettsäureoxidation und vor allem die Komplexe der Atmungskette. Die mitochondriale Atmungskette besteht aus vier multiheteromeren Komplexen, die in die innere Membran der Mitochondrien eingebettet sind. Durch die Energie des Elektronenflusses entlang der Komplexe der Atmungskette wird ein Wasserstoffionengradient über die innere Mitochondrienmembran aufgebaut, der schließlich zur ATP-Synthese durch die ATP-Synthase genutzt wird. Als Donatoren von Elektronen stehen die Reduktionsäquivalente NADH und FADH₂ aus dem Citratzyklus zur Verfügung. Coenzym Q und Cytochrom c sind ebenfalls Bestandteile der Atmungskette und dienen als „Elektronen-Shuttles“ zwischen den Komplexen. Abbildung 6 zeigt die vier Atmungskettenkomplexe mit ihren Funktionen.

Komplex I besitzt zwei prosthetische Gruppen, FMN und ein Eisen-Schwefel-Cluster, die Elektronen von NADH übernehmen und diese in die Elektronentransportkette einschleusen.

Die Übertragung der zwei Elektronen erfolgt auf Coenzym Q (auch Ubichinon (Q) genannt), wodurch es zum Ubichinol (QH₂) reduziert wird. Durch diesen Elektronentransfer können vier Protonen (H⁺) von der Matrix in den Intermembranraum der Mitochondrien gepumpt werden, was zum Aufbau des Protonengradienten beiträgt. Komplex II besteht aus dem Succinat-Q-Reduktase-Komplex, der die Oxidation von Succinat zu Fumarat katalysiert. Das dabei gebildete FADH₂ gibt seine Elektronen direkt an den Eisen-Schwefel-Cluster ab, die dann auf Coenzym Q übertragen werden. Die Änderung der freien Energie ist hierbei (FADH₂-Q-Reduktase) im Gegensatz zur NADH₂-Q-Reduktase zu gering, um gleichzeitig Protonen in den Intermembranraum zu pumpen. Deshalb wird bei der Oxidation von FADH₂ weniger ATP gebildet als bei der Oxidation von NADH₂. Komplex III ist eine Cytochrom c-Reduktase, die die Elektronenübertragung vom Ubichinol (QH₂) auf Cytochrom c katalysiert und dabei gleichzeitig Protonen durch die innere Mitochondrienmembran pumpt. Komplex IV ist der letzte der protonenpumpenden Komplexe der Atmungskette und überträgt die Elektronen vom reduzierten Cytochrom c zum molekularen Sauerstoff (O₂) als letztem Akzeptor. Die ATP-Synthase nutzt den aufgebauten Protonengradienten (protonenmotorische Kraft) zur ATP-Synthese. Die Funktionen der einzelnen Komplexe sind essentiell für das Überleben der Zellen, da sie ATP für die Funktionen der Zelle herstellen.^{49, 50}

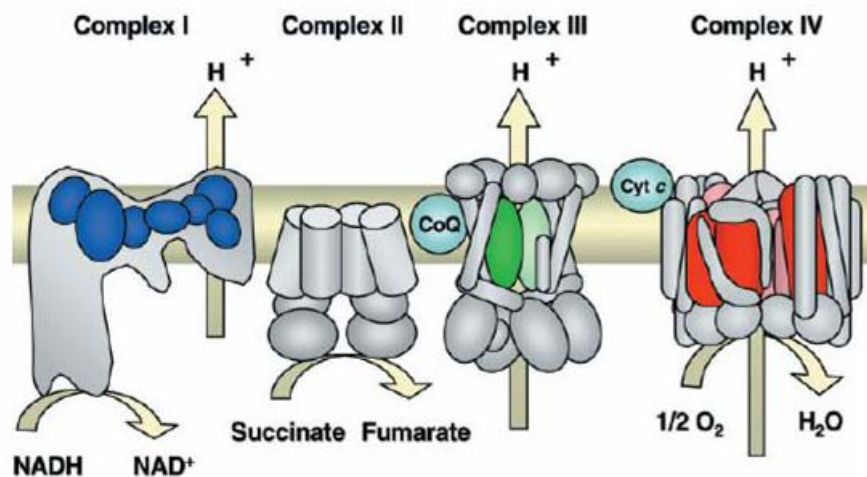


Abbildung 6. Schematisches Diagramm der vier Atmungsketten-Komplexe: Komplex I ist die NADH-Dehydrogenase, die Elektronen auf Ubichinon (Q) überträgt und als Protonenpumpe fungiert; Komplex II oxidiert Succinat zu Fumarat und überträgt ebenfalls die Elektronen auf Ubichinon (Q), fungiert dabei aber nicht als Protonenpumpe; Komplex III, die Ubichinol-Cytochrom c-Reduktase übernimmt die Elektronen von Ubichinol und überträgt diese auf Cytochrom c, wobei Protonen gepumpt werden können; die Cytochrom-Oxidase oder Komplex IV übernimmt die Elektronen vom reduzierten Cytochrom c und überträgt diese auf den Endakzeptor, molekularen Sauerstoff (verändert nach⁵⁰).

Durch den Elektronenfluss in der Atmungskette werden vor allem an Komplex I und III durch Ein-Elektronen-Reduktionen Sauerstoffradikale produziert.^{51, 52} Unter normalen physiologischen Bedingungen werden diese Radikale durch die antioxidativen Abwehrmechanismen abgefangen und schnell unschädlich gemacht. Werden die Abwehrmechanismen überfordert, sie können die gebildeten Superoxidradikale nur unzureichend abgefangen werden und es kommt zum mitochondrialen oxidativen Stress.^{53, 54} Viele Arbeiten beschäftigen sich in den letzten Jahren mit dieser pathophysiologischen Situation, ihren Auswirkungen auf das kardiovaskuläre System und möglichen Kreuzverbindungen zu den NADPH-Oxidasen.^{49, 53, 55} Dabei scheinen die Mitochondrien eine der wichtigsten Quellen für oxidativen Stress im Diabetes mellitus zu sein und sind insbesondere für die makrovaskulären Komplikationen verantwortlich.⁵⁶ Auch neurodegenerative Krankheiten wie LHON (Leber'sche hereditäre Optikusneuropathie) sind auf dysfunktionelle Mitochondrien zurückzuführen.⁵⁰

1.2.3 Xanthinoxidoreduktase

Die Xanthinoxidoreduktase ist neben den NADPH-Oxidasen und der mitochondrialen Atmungskette die dritte Hauptquelle des vaskulären oxidativen Stresses. Die Xanthinoxidoreduktase (XOR) wurde 1902 von F. Schadinger in Milch identifiziert und besitzt zwei durch Proteolyse interkonvertible Formen, die Xanthinoxidase und die Xanthindehydrogenase.⁵⁷⁻⁶⁰ Diese beiden Formen katalysieren die Konversion von Hypoxanthin zu Xanthin und von Xanthin zu Harnsäure, den beiden terminalen Reaktionsprodukten der Purin-Degradation.^{61, 62} Dabei unterscheiden sich die beiden homodimeren Formen darin, dass die Xanthinoxidase (XO) ausschließlich Sauerstoff und die Xanthindehydrogenase (XDH) sowohl Sauerstoff als auch NAD^+ reduzieren kann, mit der größeren Affinität zum Letzteren.^{59, 60}

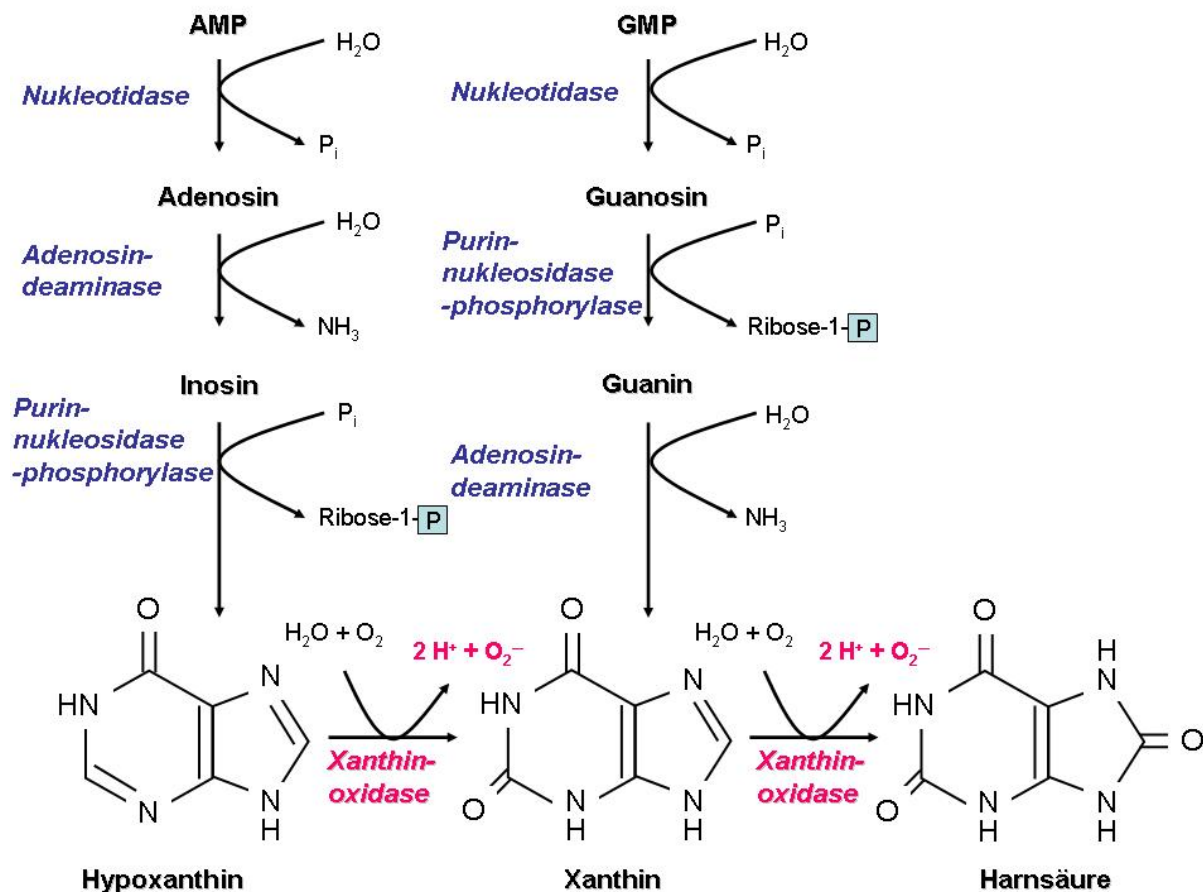


Abbildung 7. Reaktionen der Purin-Degradation durch die Xanthinoxidase: die Xanthinoxidase katalysiert die beiden terminalen Reaktionen der Purin-Degradation von Hypoxanthin zum Xanthin zur Harnsäure; die Elektronen werden auf Sauerstoff übertragen, wobei Wasserstoffperoxid gebildet wird. Die physiologische Reaktion wird durch die Xanthindehydrogenase katalysiert, die NAD^+ als Elektronenakzeptor verwendet; (verändert nach⁶³).

Die Xanthinoxidase rückte vor allem in den Fokus der Forschung, als die Bildung von Superoxid und die damit potentiell pathophysiologische Rolle der Oxidase bekannt wurde.⁶⁴⁻⁶⁶ Mit der Entdeckung von oxidativem Stress als Faktor in der Entstehung von vaskulären Erkrankungen, wurde der Xanthinoxidase als ROS-generierendes Enzym eine pathologische Funktion in der Hypercholesterinämie nachgewiesen.⁶⁷ 1999 konnte zudem von Houston et al. gezeigt werden, dass die Xanthinoxidase die Vasorelaxation negativ beeinflussen konnte, indem die NO-abhängige cGMP-Produktion im glatten Gefäßmuskel inhibiert wurde.⁶⁸ Weiterhin konnte in vielen klinischen Studien gezeigt werden, dass Allopurinol, ein Xanthinoxidase-Inhibitor, den NO-stimulierten Blutfluss bei Rauchern und Diabetikern stimulieren kann.^{69, 70} Auch der Einfluss der Xanthinoxidase in der Pathologie der Hypertension konnte durch Swee et al. 1999 aufgezeigt werden, weil die Inaktivierung der Xanthinoxidase in Ratten zu einem deutlich niedrigeren Blutdruck führte, als in den Kontrolltieren.⁷¹

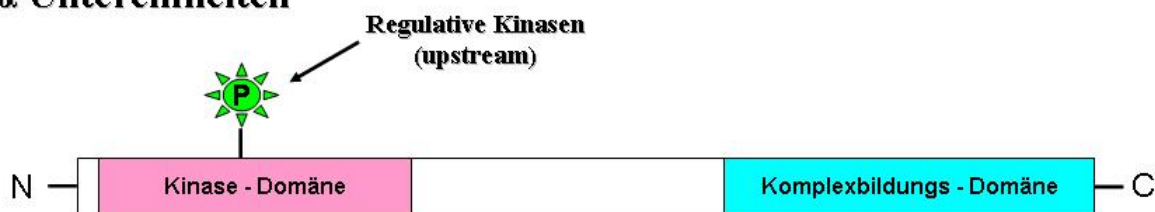
1.4 AMP-abhängige Proteinkinase (AMPK)

Die AMP-abhängige Proteinkinase wurde 1973 erstmals durch die Arbeitsgruppen Gibson und Kim unabhängig voneinander beschrieben, damals noch in Unkenntnis ihrer Struktur und Funktion.^{72, 73} Die beiden Arbeitsgruppen beschrieben jeweils ein Enzym, das AMP-abhängig die Schlüsselenzyme der Cholesterinsynthese (HMG-CoA-Carboxylase) bzw. der Fettsäurensynthese (Acetyl-CoA-Carboxylase) inhibierte. Es dauerte mehr als zehn Jahre, bis die Engländer Grahame Hardie und David Carling 1986 zeigen konnten, dass es sich um ein und dasselbe Enzym handelte, das von ihnen in „AMP-abhängige Proteinkinase“ umbenannt wurde.⁷⁴ Die AMP-abhängige Proteinkinase ist ein hochkonserviertes Enzym, das in allen Eukaryoten vorkommt, was darauf hindeutet, dass die Urform dieses Enzyms bereits seit ca. einer Milliarde Jahren existiert.⁷⁴

Die AMPK ist ein heterotrimerer Komplex ($\alpha\beta\gamma$), bestehend aus der katalytischen α -Untereinheit und den beiden regulatorischen Untereinheiten β und γ . Alle Untereinheiten werden von zwei bis drei Genen kodiert und liegen daher als Gemisch verschiedener Isoformen vor ($\alpha 1, \alpha 2, \beta 1, \beta 2, \gamma 1, \gamma 2, \gamma 3$).^{75, 76} Die Kombinationsmöglichkeiten der drei verschiedenen Untereinheiten mit zusätzlichen Splice-Varianten weisen auf große Variabilität der Komplexe hin.⁷⁴ Die Domänenstruktur der Untereinheiten ist in Abbildung 8 schematisch darge-

stellt. Die α -Untereinheit, die in zwei Isoformen ausgeprägt ist ($\alpha 1$, $\alpha 2$), enthält die konventionelle Kinase-Domäne am N-Terminus und die Komplexbildungs-Domäne am C-Terminus, die es ermöglicht, die beiden anderen Untereinheiten zu binden.⁷⁷ Die β -Untereinheit weist zwei konservierte Regionen auf, die ursprünglich als KIS und ASC Domäne benannt wurden.⁷⁸ Die ASC Domäne ist verantwortlich für die Komplexbildung mit der α - und der γ -Untereinheit, während die KIS-Domäne die Bindungsstelle für Glykogen beherbergt.⁷⁹ Die N-terminalen Regionen der γ -Untereinheiten sind in Größe und Sequenz unterschiedlich, an diese schließen sich vier konservierte Tandemrepeats (CBS-Domänen) an, die für die ATP- bzw. AMP-Bindung verantwortlich sind.^{80, 81}

α Untereinheiten



β Untereinheiten



γ Untereinheiten

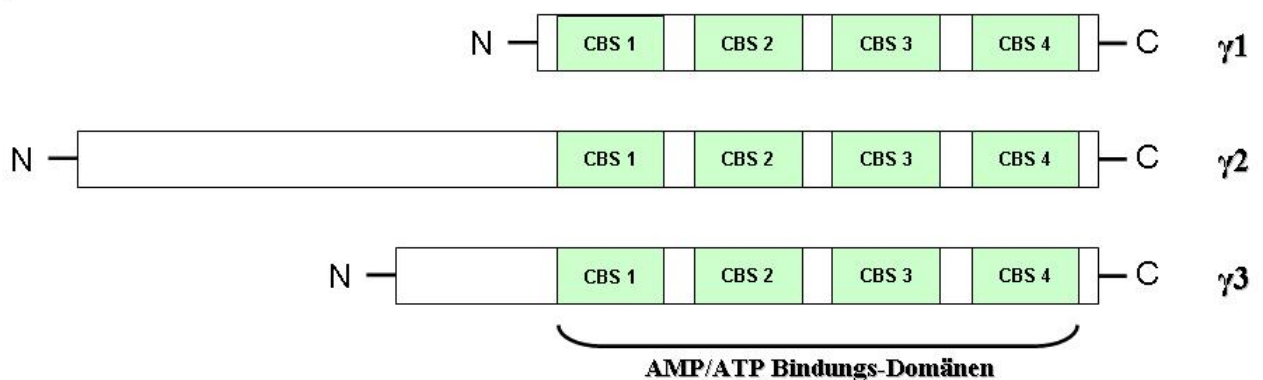


Abbildung 8. Domänenstruktur der drei AMPK-Untereinheiten α , β und γ : Die zwei Isoformen der α - ($\alpha 1$, $\alpha 2$) und β -Untereinheiten ($\beta 1$, $\beta 2$) haben sehr ähnliche Strukturen und sind daher nicht einzeln aufgeführt; die Isoformen der γ -Untereinheit enthalten variable N-Termini mit ungeklärter Funktion (verändert nach^{75, 76}).

Die Funktionen des AMPK-Komplexes werden oftmals als zellulärer Energiesensor, Kraftstoffmesser oder Energiemanager beschrieben, was die metabolischen Wirkungen auch sehr treffend formuliert.^{74, 82-84} Der entscheidende Parameter ist das zelluläre Verhältnis von AMP zu ATP, das viel sensitiver ist als das Verhältnis von ADP zu ATP.⁸⁵ Ist das Verhältnis von AMP zu ATP erhöht, so werden katabole Reaktionen wie die Glykolyse oder die oxidative Phosphorylierung aktiviert und gleichzeitig anabole Reaktionen, die ATP verbrauchen, inhibiert. So sind zum Beispiel Schlüsselenzyme von Biosynthesewegen wie 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA-Reduktase (Cholesterinsynthese), Acetyl-CoA-Carboxylase (Fettsäurensynthese) oder die Glykogensynthase zu nennen.⁸⁶ Durch dieses System kann das Überleben der Zelle auch unter Bedingungen des zellulären Energiemangels gesichert werden.^{84, 87, 88}

Die Regulation des AMPK-Komplexes basiert auf drei Möglichkeiten, die alle über die AMP-Konzentration bestimmt und durch hohe Konzentrationen von ATP antagonisiert werden.^{74, 76}

- (1) Der erste Mechanismus ist die allosterische Aktivierung der AMPK durch die Bindung von AMP. Diese Bindung steigert die Aktivität maximal fünffach und ist von der Beschaffenheit des AMPK-Komplexes abhängig.
- (2) Darüber hinaus unterstützt die AMP-Bindung einen zweiten Mechanismus der AMPK-Aktivierung: die Affinität von vorgeschalteten (engl. upstream) Regulator-Kinasen, z.B. des Tumorsuppressors LKB1 zur AMPK wird erhöht.⁸⁹ Diese Regulator-Kinasen phosphorylieren die α -Untereinheit an dem konservierten Threonin 172 im so genannten Aktivierungsring (engl. activation loop), was zu einer 50 – 100fachen Steigerung der AMPK-Aktivität führt.⁷⁶
- (3) Die AMP-Bindung an den AMPK-Komplex wirkt nicht nur allosterisch aktivierend, sondern ist auch in der Lage, den Komplex vor der Dephosphorylierung des Threonin-Restes zu schützen.⁹⁰

Dass AMP über drei Angriffspunkte eine Aktivierung des Komplexes hervorrufen kann, führt zu einer deutlichen Sensitivitätssteigerung des Systems, indem nur eine kleine Änderung des AMP zu einer proportional stärkeren Aktivierung der AMPK-Aktivität führt.⁸⁸ Dieses System ist ein Beispiel für die sogenannte „Multistep-Sensitivität“, die durch ein Signalmolekül ausgelöst wird, welches mehr als nur einen Schritt einer Kaskade bestimmt.^{91, 92} Ein weiterer, die Sensitivität beeinflussender Faktor, ist das Vorkommen von vier CBS-Domänen, die die kooperative Bindung von zwei Molekülen AMP ermöglichen.⁹³

Die Regulation durch AMPK wird in intakten Zellen durch jegliche Art von Stress ausgelöst, der den ATP-Verbrauch erhöht oder die ATP-Produktion inhibiert.⁹⁴ Neben einer teils physiologischen Verminderung der ATP/AMP-Relation, wie sie im Rahmen einer Gewebsischämie oder Hypoxie auftritt (z.B. bei Ausdauertraining, aber auch durch stenosierende Gefäßveränderungen), zählen hierzu auch Stimuli wie Hitzeschock, metabolische Zellgifte wie Arsen oder Inhibitoren der mitochondrialen Atmungskette oder auch der oxidative Stress.⁹⁵⁻⁹⁸ Um das System und dessen Wirkung zu untersuchen, müssen Methoden angewandt werden, die es ermöglichen, die Aktivität der AMPK zu manipulieren, ohne eine ATP-Depletion einzuleiten, was neben der AMPK-Aktivierung auch andere AMP-abhängige Enzymsysteme oder Stoffwechselwege beeinflussen könnte. Eine etablierte Methode zur pharmakologischen AMPK-Aktivierung stellt die Gabe von 5-Aminoimidazol-4-Carboxamid-Ribonukleosid (AICAR) dar, welches von der Zelle aufgenommen wird und zu 5-Aminoimidazol-4-Carboxamid-Ribonukleosid-Monophosphat (ZMP) phosphoryliert wird. ZMP aktiviert die AMPK direkt als AMP-Analogon.^{86, 99, 100} Abbildung 9 zeigt schematisch die Metabolisierung von AICAR.

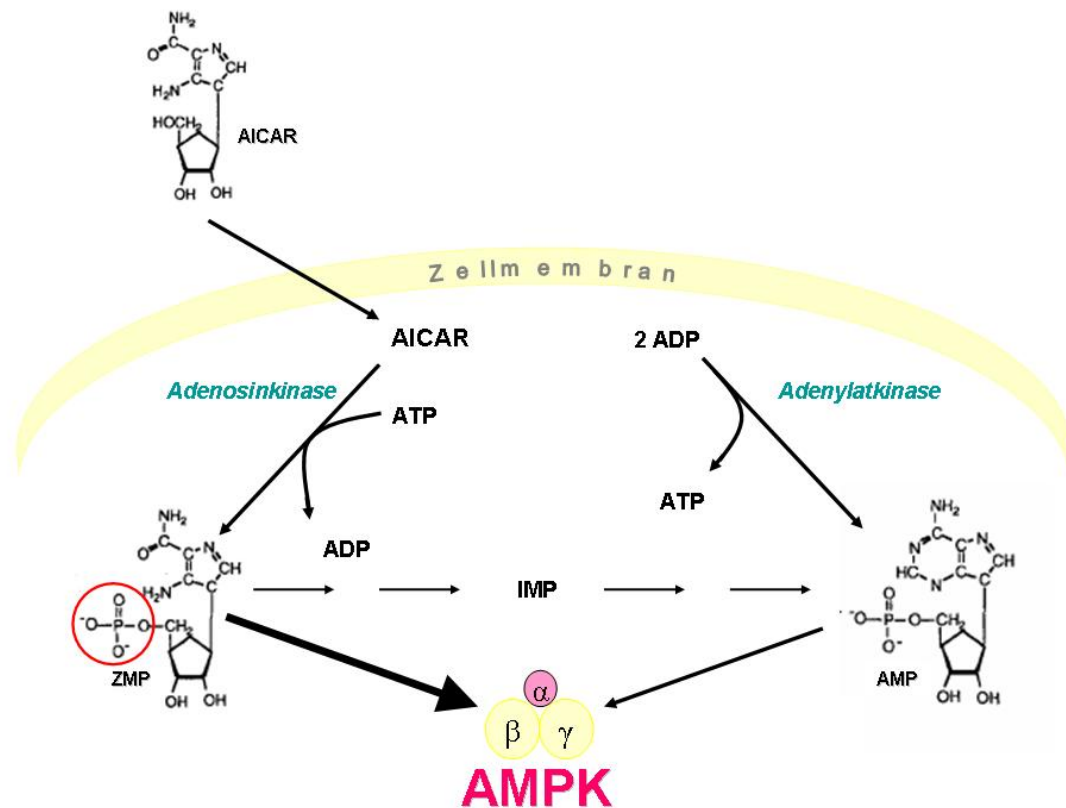


Abbildung 9. Mechanismus der AICAR-Wirkung in intakten Zellen: AICAR wird über die Plasmamembran transportiert und im Zytoplasma durch die Adenosinkinase phosphoryliert; entstandenes ZMP (5-Aminoimidazol-4-Carboxamid-Ribonucleosid-Monophosphat) ist in der Lage, die AMPK zu aktivieren, kann aber auch verzögert zu AMP umgebaut werden (verändert nach⁸⁶).

1.5 Stand der Forschung

In den letzten Jahren ist die AMPK immer mehr in den Fokus der vaskulären Forschung gerückt, da man zeigen konnte, dass sich die Funktionen dieses Enzyms nicht nur auf den Energiestoffwechsel beschränken. Es konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass die AMPK über eine Phosphorylierung an Serin 1177 oder die Bindung an heat shock protein 90 (hsp90) eine Aktivierung der NO-Synthase induzieren kann.⁹⁸ Weiterhin erwies sich durch die Arbeit der Gruppe um K. Walsh, dass die AMPK als positiver Mediator der Angiogenese fungiert,¹⁰¹ was durch Untersuchungen der Angiogenese im Skelettmuskel *in vivo* bestätigt wurde.¹⁰² Ein weiterer Hinweis, dass die AMPK im vaskulären System eine entscheidende Funktion einnimmt, zeigten wieder Nagata et al.: In ihrer Arbeit machten sie deutlich, dass die Aktivierung der AMPK eine Inhibition des durch Angiotensin II-induzierten Gefäßmuskelzellwachstums zur Folge hatte.⁴ Gleichzeitig konnte durch eine Aktivierung der AMPK mittels AICAR die

Hyperglykämie-induzierte Endothelzellapoptose aufgehalten werden, was die Gruppe um N. Ruderman zeigte.¹⁰³ Alle hier aufgeführten AMPK-gesteuerten Vorgänge, wie Endothelzellapoptose, Gefäßmuskelwachstum, Angiogenese und oxidativer Stress, tragen zur Entstehung von vaskulären Krankheiten essentiell bei, wurden aber bisher nur in Zellkultur untersucht. Daten über eine Modulation der AMPK-Aktivität durch pharmakologische Substanzen, wie AICAR, oder genetische Deletionen und deren Wirkung auf die Endothelfunktion, oxidativen Stress und vaskuläre Inflammation wurden *in vivo* bisher nicht erhoben und sind Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

1.6 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist es, Effekte der vaskulären AMPK-Aktivität *in vivo* auf die Endothelfunktion, den oxidativen Stress, die NO-Bioverfügbarkeit und die vaskuläre Inflammation zu untersuchen. Als Tiermodell für oxidativen Stress wurde die chronische Angiotensin II-Infusion verwendet, die in diesem Zusammenhang bereits durch mehrere Arbeitsgruppen gut charakterisiert ist.^{5, 6, 104} Es ist bekannt, dass die chronische Angiotensin II-Behandlung den vaskulären oxidativen Stress erhöht, eine Endotheldysfunktion auslöst, den arteriellen Blutdruck steigert und auch eine vaskuläre Inflammation induziert.^{35, 105, 106} Vor diesem Hintergrund sollen die Effekte der pharmakologischen AMPK-Aktivierung einerseits und deren Inhibition über die Deletion der $\alpha 1$ AMPK-Isoform andererseits untersucht werden.

Die pharmakologische AMPK-Aktivierung sollte mit dem AMP-Analogon AICAR erreicht werden, das, wie oben beschrieben (siehe Abbildung 9), in intakten Zellen aufgenommen und zu ZMP phosphoryliert wird.^{86, 90} Da der Doppel-Knockout für beide katalytischen Untereinheiten der AMPK ($\alpha 1$ und $\alpha 2$) bei Mäusen embryonal letal ist (ca. 10,5 Tagen nach Empfängnis), wurde als Kompromiss in dieser Arbeit zur AMPK-Inhibition ein Knockout der vaskulär vorherrschenden $\alpha 1$ AMPK-Isoform gewählt.¹⁰⁷

Weiterhin sollen Ratten verwendet werden, denen Telemetriekatheter implantiert werden um die durch Angiotensin II induzierte Hypertonie für die Tiere stressfrei zu verfolgen. Alle weiteren Untersuchungsmethoden bezüglich Radikalmessungen, Stickstoffmonoxidmessungen oder die Untersuchung der Endothelfunktion von intakten Aortensegmenten werden im nachfolgenden Material und Methoden Teil detailliert beschrieben.

2. Material und Methoden

2.1 Chemikalien / Reagenzien

Produkt	Cat.#	Firma, Sitz
(R)-(-)-Phenylephrinhydrochlorid	P6126	Sigma-Aldrich, D-21147 Hamburg
1,1-Diphenyl-1-picryl-hydrazyl, freies Radikal	D9132	Sigma-Aldrich, D-21147 Hamburg
2-Mercaptoethanol	M6250	Sigma-Aldrich, D-21147 Hamburg
Acetylcholinchlorid	A6625	Sigma-Aldrich, D-21147 Hamburg
Acetonitril Optigrade	SO-9128- B025	LGC Standards GmbH, D-46485 Wesel
Acrylamid/Bis Lösung 40% 29:1 (3,3%C)	161-0146	BIORAD Laboratories GmbH, D-80939 München
Agarose ElektrophoreseGrad	15510-027	Invitrogen GmbH, D-76131 Karlsruhe
AICAR (5-Aminoimidazol-4- carboxamid-1-beta-d- ribonucleosid)	A611700	Toronto Research Chemicals Inc., CA-M3J 2J8 North York, On.
Albumin Fraktion V (BSA)	8079.3	Carl Roth GmbH, D-76185 Karlsruhe
AMPK IRES-Fa2 (5'-GGG CTG CAG GAA TTC GAT ATC AAG C-3')	7937 156	Eurofins MWG Operon, D-85560 Ebersberg
AMPK 3.0 Ra1 (5'-CCT TCC TGA AAT GAC TTC TGG TGC- 3')	7937 157	Eurofins MWG Operon, D-85560 Ebersberg
AMPK α 1 wt forw. (5'AGC CGA CTT TGG TAA GGA TG-3')	7937 154	Eurofins MWG Operon, D-85560 Ebersberg
AMPK α 1 wt rev. (5'-CCC ACT TTC CAT TTT CTC CA-3')	7937 155	Eurofins MWG Operon, D-85560 Ebersberg
Angiotensin II (AT II), human	10383	Fluka & Riedel, D-30918 Seelze
Aprotinin (from bovine lung)	A6279	Sigma-Aldrich, D-21147 Hamburg
APS (Ammoniumpersulfat)	A3678	Sigma-Aldrich, D-21147 Hamburg
Aqua ad iniectabilia Braun	3450317	B.Braun Melsungen AG, D-34209 Melsungen
BenchMark TM Protein Ladder	10747-012	Invitrogen GmbH, D-76131 Karlsruhe
Bernsteinsäuredinatriumsalz, He- xahydrat (Succinat)	14170	Fluka & Riedel, D-30918 Seelze

Bio-Rad D _C Protein Assay Reagent A	500-0113	BIORAD Laboratories GmbH, D-80939 München
Bio-Rad D _C Protein Assay Reagent B	500-0114	BIORAD Laboratories GmbH, D-80939 München
Bio-Rad D _C Protein Assay Reagent S	500-0115	BIORAD Laboratories GmbH, D-80939 München
Braunol® (Providon-Iod)	3864065	B.Braun Melsungen AG, D-34209 Melsungen
Bromphenol-Blau	A2331	AppliChem, D-64291 Darmstadt
Butangas (Flaschen für Fireboy)		
CaCl ₂ (Calciumchlorid)	21102	Fluka & Riedel, D-30918 Seelze
Cytochrom c	C2506	Sigma-Aldrich, D-21147 Hamburg
D-(+)-Glukose 45%	G8769	Sigma-Aldrich, D-21147 Hamburg
D-Glukose (α-D(+). Glukose-Monohydrat	6780.1	Carl Roth GmbH, D-76185 Karlsruhe
Dako REAL™ Hematoxylin	S2020	Dako Deutschland GmbH, D-22769 Hamburg
DHE (Dihydroethidium)	37291	Fluka & Riedel, D-30918 Seelze
Direct PCR Lysis Reagent (Tail)	31-101-T	PEQLAB Biotechnologie GmbH, D-91052 Erlangen
D-Mannitol	17311	Fluka & Riedel, D-30918 Seelze
DMSO (Dimethylsulfoxid)	41639	Fluka & Riedel, D-30918 Seelze
DNA Molecular Weight Marker VIII	11336 045 001	Roche, D-68305 Mannheim
DTT (Dithiotreitol)	US15397	AmershamLife Science, GB-HP7 9NA Buckinghamshire
EDTA (Ethylendiamintetraacetat)	8043.1	Carl Roth GmbH, D-76185 Karlsruhe
EDTA-free COMPLETE Protease Inhibitor Cocktail	11873580001	Roche, D-68305 Mannheim
EGTA (Ethylenglykol-bis (aminoethylether)-N,N,N'-Tetraessigsäure)	E4378	Sigma-Aldrich, D-21147 Hamburg
Essigsäure 100%	1.000.631.011	Merck KGaA, D-64293 Darmstadt
Ethidiumbromid	E1385	Sigma-Aldrich, D-21147 Hamburg
Forene (1-Chloro-2,2,2-trifluoroethyldifluoromethylether)	015-080201	ABBOTT GmbH & Co KG, D-65205 Wiesbaden
Gel Loading Solution	G2526	Sigma-Aldrich, D-21147 Hamburg

Glyzerin (wasserfrei)	A1123	AppliChem, D-64291 Darmstadt
Glycin	3908.2	Carl Roth GmbH, D-76185 Karlsruhe
HCl (Salzsäure)	1. 09057	Merck KGaA, D-64293 Darmstadt
Hämoglobin (from bovine blood)	H2625	Sigma-Aldrich, D-21147 Hamburg
Heparin-Natrium-25000-ratiopharm®	N68542.02	Ratiopharm GmbH, D-89070 Ulm
Hepes (N-(2-Hydroxyethyl) piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure) heminatiumsalz	H2393	Sigma-Aldrich, D-21147 Hamburg
Histowax	0374 32123	Leica Microsystems Nussloch GmbH, D-69226 Nussloch
HotstarTaq Master Mix Kit	1010023	QIAGEN GmbH, D-40724 Hilden
Hypoxanthin	56700	Fluka & Riedel, D-30918 Seelze
Indometacin	I7378	Sigma-Aldrich, D-21147 Hamburg
K ₂ HPO ₄ (Di-Kaliumhydrogenphosphat Trihydrat)	6878.1	Carl Roth GmbH, D-76185 Karlsruhe
Kaliumiodid	1.050.400.250	Merck KGaA, D-64293 Darmstadt
KCl (Kaliumchlorid)	A3582	AppliChem, D-64291 Darmstadt
Ketamin HCl/Xylazin HCl Lösung	K113	Sigma-Aldrich, D-21147 Hamburg
L-012 (8-Amino-5-Chloro-7-Phenylpyrido[3,4-d]pyridazin-1,4-(2H,3H)Dion), Luminol Analogon	129-04621	Wako Chemicals GmbH, D-41468 Neuss
Leupeptin-Hydrochlorid (min. 90% (HPLC))	L0649	Sigma-Aldrich, D-21147 Hamburg
Lipopolysaccharid from <i>E.coli</i>	L2755	Sigma-Aldrich, D-21147 Hamburg
L-Glutamin 200mM 100x GIBCO	25030	Invitrogen GmbH, D-76131 Karlsruhe
L-NAME (N ^G -Nitro-L-Argininmethylester)	N5751	Fluka & Riedel, D-30918 Seelze
Luminol 98%	9253	Fluka & Riedel, D-30918 Seelze
Luzigenin (N,N'-Dimethyl-9,9'-biacridiumdinitrat)	39685	Fluka & Riedel, D-30918 Seelze
Methanol	10158BG	VWR International GmbH, D-64295 Darmstadt
MgSO ₄ (Magnesiumsulfat)	P027.2	Carl Roth GmbH, D-76185 Karlsruhe
Microscopy Entellan®	HX 787224	Merck KGaA, D-64293 Darmstadt

Milchpulver	T145.2	Carl Roth GmbH, D-76185 Karlsruhe
Na-Hepes (Natrium-Hepes)	9105.4	Carl Roth GmbH, D-76185 Karlsruhe
Na ₂ HCO ₃ (Dinatrium- hydrogencarbonat)	A1046	AppliChem, D-64291 Darmstadt
NaCl (Natriumchlorid)	9265.2	Carl Roth GmbH, D-76185 Karlsruhe
NaCl (Natriumchlorid), isotone Kochsalz Lösung 0,9% Braun	3820084	B.Braun Melsungen AG, D-34209 Melsungen
NaCl 0,9% B. Braun Ecotainer	0082489E	B.Braun Melsungen AG, D-34209 Melsungen
NADPH (β-Nicotinamid- adeninedinucleotidphosphat)	N5130	Sigma-Aldrich, D-21147 Hamburg
NaF (Natriumfluorid)	6449	Merck KGaA, D-64293 Darmstadt
NaH ₂ CO ₃ (Natriumdihydrogen- carbonat)	A1047	AppliChem, D-64291 Darmstadt
NaN ₃ (Natriumazid)	S2002	Sigma-Aldrich, D-21147 Hamburg
NaOH (Natriumhydroxid)	1. 09137	Merck KgaA, D-64293 Darmstadt
Natriumnitrit	0.65490500	Merck KgaA, D-64293 Darmstadt
Natriumorthovanadat	590088	Sigma-Aldrich, D-21147 Hamburg
Nitroglyzerin (Nitrolingual Infusi- onslösung)	7242812	G. Pohl-Boskamp GmbH & Co. KG, D-25551 Hohenlockstedt
PBS (Phosphate buffered saline)	14190-094	Invitrogen GmbH, D-76131 Karlsruhe
Pepstatin A	P5318	Sigma-Aldrich, D-21147 Hamburg
Peroxidase from horseradish Type VI	P8375	Sigma-Aldrich, D-21147 Hamburg
Phosphatase Inhibitor Cocktail 1	P2850	Sigma-Aldrich, D-21147 Hamburg
Pierce ECL Western Blotting Sub- strate (Peroxide Solution, Luminol Enhancer Solution)	1859701, 1859698	Perbio Science, B-9320 Erembodegem-Aalst
PMSF (Phenylmethansulfonyl- fluorid)	P7626	Sigma-Aldrich, D-21147 Hamburg
Ponceau S Lösung	P7170	Sigma-Aldrich, D-21147 Hamburg
Precision Plus Protein TM Dual Color Standards	161-0374	BIORAD Laboratories GmbH, D-80939 München
Protease Inhibitor Cocktail	P8340	Sigma-Aldrich, D-21147 Hamburg
Proteinase K	1019497	QIAGEN GmbH, D-40724 Hilden

RNAse freies Wasser	1012888	QIAGEN GmbH, D-40724 Hilden
Roti®-Histofix	P087.3	Carl Roth GmbH, D-76185 Karlsruhe
Roti®-Histol	6640.1	Carl Roth GmbH, D-76185 Karlsruhe
Roti® -Quant für lösliche Proteine 108	K015.1	Carl Roth GmbH, D-76185 Karlsruhe
SDS (=Sodium Dodecyl Sulfate)	428015	Carl Roth GmbH, D-76185 Karlsruhe
Saccharose (Sucrose)	S9378	Sigma-Aldrich, D-21147 Hamburg
TBE (Tris/Borsäure/EDTA Puffer)	161-0733	BIORAD Laboratories GmbH, D-80939 München
TEMED (N,N,N',N'- Tetramethylethylendiamin)	T9281	Sigma-Aldrich, D-21147 Hamburg
Tris(Tris(hydroxymethyl)- aminomethan)-base	T1503	Sigma-Aldrich, D-21147 Hamburg
Tris(Tris(hydroxymethyl)- aminomethan)-HCl	9090.3	Carl Roth GmbH, D-76185 Karlsruhe
Triton X-100	93443	Fluka & Riedel, D-30918 Seelze
Tween-20	39796	SERVA Electrophoresis GmbH, D-69115 Heidelberg
VECTOR M.O.M. Peroxidase Kit	PK-2200	Vector Laboratories, Inc.; CA-9410 Burlingame, USA
Zitronensäure (citric acid monohydrate)	C1909	Sigma-Aldrich, D-21147 Hamburg

Alle hier nicht aufgeführten Chemikalien oder Reagenzien wurden von der Firma Sigma-Aldrich in Hamburg bzw. von der Firma Carl Roth GmbH in Karlsruhe bezogen.

2.2 Verbrauchsmaterialien

Produkt	Cat.#	Firma, Sitz
Adhesive Towel (OP Abdecktuch)	706500	Mölnicke Health Care, Se-40252 Göteborg, Schweden
Alzet Mikro-osmotische Pumpe (0,5 µl pro Stunde für 7 Tage)	1007	ALZET Osmotic Pumps, Cupertino, CA 95015-0530
Alzet Mikro-osmotische Pumpe (1 µl pro Stunde für 7 Tage)	2001	ALZET Osmotic Pumps, Cupertino, CA 95015-0530
Alzet Mikro-osmotische Pumpe (10 µl pro Stunde für 7 Tage)	2ML1	ALZET Osmotic Pumps, Cupertino, CA 95015-0530

BD Microlance™ 3 (0,9mmx40mm)	301300	Becton Dickinson GmbH, D-69126 Heidelberg
BD Plastipak Insulinspritze	300026	Becton Dickinson GmbH, D-69126 Heidelberg
Cellstar® PP-Test tubes, 15 ml steril	188271	Greiner Bio-One GmbH, D-72636 Frickenhausen
C ₁₈ Nucleosil HPLC Säule	100-3	Machery & Nagel GmbH & Co KG D-52313 Düren
Cellstar® PP-Test tubes, 50 ml steril	227270	Greiner Bio-One GmbH, D-72636 Frickenhausen
Einwegskalpell No. 10	02.001.30.010	Feather Safety Razor Co., LTD., Osaka 531-0075, Japan
Eppendorf-Pipettenspitzen epT.I.P.S. Standard 50-1000µl	0030 000.919	Eppendorf AG, D-22331 Hamburg
Gazin Tupfer aus Verbandmull	15177	Lohmann & Rauscher International GmbH & Co. KG, D-56579 Rengsdorf
Gel Blotting Papier GB 002	10 427 724	Whatman GmbH - Schleicher und Schuell, D-37582 Dassel
Mersilene-0 ETHICON nicht resorbierbar	EH6855H	Johnson & Johnson International, BE-1932 St.-Stevens-Woluwe, Belgien
Mesh Biopsie Kassetten Tissue Tek®	Pink-4307	Sakura Finetechnical Europe B.V., Zoterwoude, Niederlande
Micro Amp Optical Well Reaction Plate	4306737	Applied Biosystems, Foster City, CA 94404
Mini-Trans-Blot Filterpapier	170 3932	BIORAD Laboratories GmbH, D-80939 München
Nunc Lab Tec Chamber Slide	547485	Nalge Nunc International, Rochester NY-14625, New York USA
Objektträger	1709261	Paul Marienfeld GmbH & Co KG, D-97922 Lauda-Königshofen
Optical Adhesive Covers	4360954	Applied Biosystems, Foster City, CA 94404
PDS*II 6-0 ETHICON resorbierbar	Z1702H	Johnson & Johnson International, BE-1932 St.-Stevens-Woluwe, Belgien
PDS*II 7-0 ETHICON resorbierbar	Z1701E	Johnson & Johnson International, BE-1932 St.-Stevens-Woluwe, Belgien

Pipettenspitze 200µl, gelb	70.760.002	SARSTEDT AG & Co., D-51582 Nümbrecht
Prolene* 7-0 ETHICON	EH7405H	Johnson & Johnson International, BE-1932 St.-Stevens-Woluwe, Belgien
Protran Nitrozellulose Transfer Membran	FM0485-1	Whatman GmbH - Schleicher und Schuell, D-37582 Dassel
Protran Nitrozellulose Transfer Membran (DotBlot)	10 402 588	Whatman GmbH - Schleicher und Schuell, D-37582 Dassel
Rneasy® Fibrous Tissue Mini Kit	74704	QIAGEN GmbH, D-40724 Hilden
Self Sealing Septum	998	Waters Corporation, Milford, MA 01757, USA
S-Monovette Blutentnahmesystem (7,5 ml Z-Gel)	11.602	SARSTEDT AG & Co., D-51582 Nümbrecht
Sterican® Einmal-Injektionskanüle Gr. 18, 0,45 x 25mm	4665457	B.Braun Melsungen AG, D-34209 Melsungen
Sterile Flieskompressen	128348	Fink & Walter GmbH, D-66589 Merchweiler
TipOne 0,1-10µl Extended Length Natural Tips	S1110-3000	STARLAB GmbH, D-22926 Ahrensburg
TipOne Bevelled Filter Tips 1 - 20 µl	S1120-1810	STARLAB GmbH, D-22926 Ahrensburg
TipOne Extended Length Filter Tips 0,1 - 10 µl	S1120-3810	STARLAB GmbH, D-22926 Ahrensburg
TipOne Filter Tips 101 - 1000 µl	S1126-7810	STARLAB GmbH, D-22926 Ahrensburg
TipOne Graduated Filter Tips 1 - 200 µl	S1120-8810	STARLAB GmbH, D-22926 Ahrensburg
Tissue-Tek O.C.T.™ Compound	4583	Sakura Finetek Europe B.V., NL-2382 AT Zoeterwoude
Vicryl* rapide 5-0 ETHICON resorbierbar	V4930H	Johnson & Johnson International, BE-1932 St.-Stevens-Woluwe, Belgien
Wundklammer Michel (7,5x1,75mm) Aesculap	BN507R	Aesculap AG & Co. KG, D-78532 Tuttlingen

Alle hier nicht aufgeführten Verbrauchsmaterialien wurden von der Firma Sigma-Aldrich in Hamburg bzw. von der Firma VWR International GmbH in Darmstadt bezogen.

2.3 Antikörper

Antikörper	Cat.#	Firma, Sitz
Anti-Acetyl CoA Carboxylase	07-439	upstate cell signaling solutions; Lake Placid, NY 12946, USA
Anti-AMPK α 1	07-350	upstate cell signaling solutions; Lake Placid, NY 12946, USA
Anti-AMPK α 2	07-363	upstate cell signaling solutions; Lake Placid, NY 12946, USA
Anti-gp91-phox	07-024	upstate cell signaling solutions; Lake Placid, NY 12946, USA
Anti-nitrotyrosine, clone 1A6	05-233	upstate cell signaling solutions; Lake Placid, NY 12946, USA
Anti-phospho-Acetyl CoA Carboxylase (Ser79)	07-303	upstate cell signaling solutions; Lake Placid, NY 12946, USA
Anti-phospho-AMPK α (Thr172)	07-681	upstate cell signaling solutions; Lake Placid, NY 12946, USA
Anti-phospho-eNOS (Ser1177)	07-428	upstate cell signaling solutions; Lake Placid, NY 12946, USA
c-Jun Antibody	9165	cell signaling technology, Danvers, MA 01923, USA
Anti-eNOS/NOS Type III	610296	BD Transduction Laboratories; B-9320 Erembodegem, Belgien
Phospho-c-Jun (Ser63)II Antibody	9261	cell signaling technology, Danvers, MA 01923, USA
PhosphoDetect TM Anti-VASP (pSer239) Mouse mAB (16C2)	676602	Calbiochem, Merck KGaA, D-64293 Darmstadt
α -Actinin Antibody	A5044	Sigma-Aldrich, D-21147 Hamburg
Anti Mouse MCP-1	AAM43	AbD Serotec, OX51GE Oxford, Groß- britannien
Anti-Human CD68	M0876	DakoCytomation, DK-2600 Glostrup, Dänemark

2.4 Geräte

Produkt	Cat.#	Firma, Sitz
Applied Biosystems 7900HT Fast Real-Time PCR System	7900HT	Applied Biosystems, D64293 Darmstadt
Biemer Anlegepinzette	FD568 R	Stoss Medika, D-65205 Wiesbaden

Biemer Gefäßclip	FD562 R	Stoss Medika, D-65205 Wiesbaden
Biomate3 Photometer	3082345	Fisher Scientific GmbH, D-58239 Schwerte
Bulldogklemmen	FB329 R	Stoss Medika, D-65205 Wiesbaden
Bulldogklemmen	FB328 R	Stoss Medika, D-65205 Wiesbaden
Cryostat Leica	CM3050S	Leica Biosystems Nussloch GmbH, D-69226 Nussloch
DUROGRIP Nadelhalter	BM033 R	Stoss Medika, D-65205 Wiesbaden
DUROTIP-Fadenschere	BC210 R	Stoss Medika, D-65205 Wiesbaden
DUROTIP-Fadenschere	BC211 R	Stoss Medika, D-65205 Wiesbaden
Federschere "Noyes Spring Scissors - 14mm Blades"	15011-12	Fine Science Tools GmbH, D-69121 Heidelberg
Federschere Student Vannas Spring	91500-09	Fine Science Tools GmbH, D-69121 Heidelberg
Federschere Vannas-Stil	15000-00	Fine Science Tools GmbH, D-69121 Heidelberg
Fluoreszenzmikroskop Axiovert 40CFL + AxioCam MR	40 CFL	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, D-37073 Göttingen
GeneAmp® PCR System 9700	4314878	Applied Biosystems, D64293 Darmstadt
GENterphorese System	98529	GENterprise Genomics, D55128 Mainz
Hairclipper	QC5090	Philips Medizin Systeme GmbH, D-22335 Hamburg
Heizplatte Leica	HI1220	Leica Microsystems Nussloch GmbH, D-69226 Nussloch
Hitachi Sorvall Discovery (Ultrazentrifuge)	M120SE	Thermo Scientific GmbH, D-63505 Langenselbold
HPLC Apparatur	50.200.015	Klaus Ziemer GmbH - Gynkotec, D-52379 Langerwehe
HPLC System Jasco	FP920	Jasco Labor- & Datentechnik GmbH, D-64823 Groß-Umstadt
HPLC System Jasco	UV2077	Jasco Labor- & Datentechnik GmbH, D-64823 Groß-Umstadt
HPLC System Jasco	AS2057	Jasco Labor- & Datentechnik GmbH, D-64823 Groß-Umstadt

HPLC System Jasco	CO2067	Jasco Labor- & Datentechnik GmbH, D-64823 Groß-Umstadt
HPLC System Jasco	LC Net II / ADC	Jasco Labor- & Datentechnik GmbH, D-64823 Groß-Umstadt
HPLC System Jasco	DG2080-53	Jasco Labor- & Datentechnik GmbH, D-64823 Groß-Umstadt
HPLC System Jasco	PU2080 Plus	Jasco Labor- & Datentechnik GmbH, D-64823 Groß-Umstadt
IKA RW 16 basic (Laborrührer)	2572100	IKA® Werke GmbH & Co. KG, D-79219 Staufen
Innova® CO ₂ Incubator Brutschrank	CO-170	New Brunswick Scientific Co., Inc., Edison, New Jersey 08817 USA
Inversmikroskop Axiovert 40C	40C	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, D-37073 Göttingen
Irispinzette	OC026 R	Stoss Medika, D-65205 Wiesbaden
Irispinzette	OC024 R	Stoss Medika, D-65205 Wiesbaden
Kaltlicht Lampe KL1500 electronic	KL1500	Schott AG, D-55122 Mainz
Kern KB Präzisionswaage	KB 800-2	Kern & Sohn GmbH, D-72336 Balingen
Klammer Applikator "Graefe For- ceps - 0.8mm-1mm Tip"	12018-12	Fine Science Tools GmbH, D-69121 Heidelberg
Kühlplatte Leica	EG1150C	Leica Microsystems Nussloch GmbH, D-69226 Nussloch
Lumat LB 9507 (2x) Chemilumineszenz-Counter	LB9507	Berthold Technologies GmbH & Co. KG, D-75323 Bad Wildbad
Magnetrührer MR 1000	MR 1000	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, D-91126 Schwabach
Magnetrührer MR 3001	504-10000-00- 1	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, D-91126 Schwabach
Mess- & AnalysePC BenQ Chemilumineszenz Imager	Intas Kom- plettsystem	Intas - Science Imaging Instruments GmbH, D-37079 Göttingen
Micro 22 R 1110 (Zentrifuge)	22R, 1110	Andreas Hettich GmbH & Co.KG, D-78532 Tuttlingen
Microplate Reader MRX II Dynex Für UV/Vis Absorption	DynexMRX II	ilf bioserve, D-89129 Langenau
Microprocessor pH-Meter	HI 111	HANNA Instruments Deutschland GmbH, D-77694 Kehl am Rhein
Mikroliter Spritze	10644-02	Hamilton Bonaduz AG, CH-7402 Bonaduz, Schweiz
Mikrotom Leica	RM2145	Leica Microsystems Nussloch GmbH,

		D-69226 Nussloch
Mikropinzette	BD329 R	Stoss Medika, D-65205 Wiesbaden
Mikropinzette	BD331 R	Stoss Medika, D-65205 Wiesbaden
Mikroskop MSZ 5400 Für Gefäßpräparation	135 401 0704	A.KRÜSS Optronic GmbH, D-22297 Hamburg
Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell	170-3930	BIORAD Laboratories GmbH, D-80939 München
Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell	170-3935	BIORAD Laboratories GmbH, D-80939 München
Minifold® I System (DotBlot System)	10447900	Whatman GmbH - Schleicher und Schuell, D-37582 Dassel
Mini-Protean 3 Cell	165-3301	BIORAD Laboratories GmbH, D-80939 München
Mini-Protean 3 Cell	165-3302	BIORAD Laboratories GmbH, D-80939 München
Minispin Plus Zentrifuge	29972	Eppendorf AG, D-22331 Hamburg
Nadeldose	BL930 R	Stoss Medika, D-65205 Wiesbaden
Nanodrop ND-1000 Spektrophoto- meter	91-ND-1000	PEQLAB Biotechnologie GMBH, D-91052 Erlangen
Nitric Oxide Analyzer SIEVERS 280	DLM 01401- 01	FMI GmbH, D-64342 Seeheim/Ober Beerbach
Paraffinspender Leica	EG1120	Leica Microsystems Nussloch GmbH, D-69226 Nussloch
Photometer Helios α	9423 UVA 10002E	Thermo / Fisher Scientific GmbH, D-58239 Schwerte
Pinzette Heizbar Leica	EGF	Leica Microsystems Nussloch GmbH, D-69226 Nussloch
Pinzette "Dumont Mini Forceps - Inox Style 5"	11200-14	Fine Science Tools GmbH, D-69121 Heidelberg
Pinzette "Graefe Forceps - 0.8mm- 1mm Tip"	11050-10	Fine Science Tools GmbH, D-69121 Heidelberg
Pipette Eppendorf Research 0,1 - 2,5 μ l	3111 000.114	Eppendorf AG, D-22331 Hamburg
Pipette Eppendorf Research 0,5 - 10 μ l	3111 000.122	Eppendorf AG, D-22331 Hamburg
Pipette Eppendorf Research 10 - 100 μ l	3111 000.149	Eppendorf AG, D-22331 Hamburg
Pipette Eppendorf Research 100 - 1000 μ l	3111 000.165	Eppendorf AG, D-22331 Hamburg

Pipette Eppendorf Research 2,0 - 20 µl	3111 000.130	Eppendorf AG, D-22331 Hamburg
Pipette Eppendorf Research 20 - 200 µl	3111 000.157	Eppendorf AG, D-22331 Hamburg
Pipette Eppendorf Research 500 - 5000 µl	3111 000.173	Eppendorf AG, D-22331 Hamburg
Power Pac TM Basic Power Supply	164-5050	BIORAD Laboratories GmbH, D-80939 München
Programm: 7900HT Fast Real Time System		Applied Biosystems, D-64293 Darmstadt
Programm: Adobe Photoshop CS2 Version 9.0.2		Adobe Systems GmbH, D-80992 München
Programm: Axiovision Rel 4.3		Carls Zeiss Vision GmbH, D-73430 Aalen
Programm: Clarity Lite Chromatographie Station		DataApex TECHLAB GmbH, D-38173 Erkerode
Programm: Gel-Pro Analyser 6.0 (densitometrische Auswertung)	Intas Komplettsystem	Intas - Science Imaging Instruments GmbH, D-37079 Göttingen
Programm: NO Analyzer Noa-Wibn32.V1.4g		Sievers Instruments, Inc., Boulder, CO 80301 USA
Programm: Organbad, Chart 5		ADInstruments GmbH, D-74937 Spechbach
Programm: Revelation 4.25	MRX II Software	ilf bioserve, D-89129 Langenau
Programm: Screenshot CHEMICAM Bildaufnahme Software	Intas Komplettsystem	Intas - Science Imaging Instruments GmbH, D-37079 Göttingen
Programm: SigmaStat Statistical Software		Jandel Scientific Software GmbH, D-40699 Erkrath
Radnoti 4 Channel Tissue Bath System	159920	ADInstruments GmbH, D-74937 Spechbach
Sartorius Präzisionswaage	LE225D	Sartorius AG, D-37075 Göttingen
Schere "Iris - Delicate"	14060-10	Fine Science Tools GmbH, D-69121 Heidelberg
Schere "Mayo"	14011-15	Fine Science Tools GmbH, D-69121 Heidelberg
Schwenktisch GFL 3005	10201299	GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH, D-30938 Burgwedel
Sonopuls Ultraschallnadel	HD 2070, MS 73	BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, D-12207 Berlin
Telemetrie Katheter "Ratte" Typ TA11PA-C40 Implant	270-0040-008	DSI Data Sciences International, St. Paul, MN 55112 USA

Test Tube Thermostat TCR 100	9806088	Carl Roth GmbH, D-76185 Karlsruhe
Thermomixer Comfort	5355 34840	Eppendorf AG, D-22331 Hamburg
TissueLyser QIAGEN	85220	Retsch GmbH, D-42781 Haan
Transferpette Eppendorf 200 µl	703610	BRAND GMBH + CO KG, D97877 Wertheim
Videoprinter P93DW	Intas Kom- plettsystem	Intas - Science Imaging Instruments GmbH, D-37079 Göttingen
Vortex-Genie (G560E) 2, 230V, 50Hz 0.5 amps	SI-0246	Scientific Industries, New York NY-11716 USA
Wasserbad GFL Anova Winhorst	1085	GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH, D-30938 Burgwedel
Western Blot Imager, CHEMICAM HR 16	Intas Kom- plettsystem	Intas - Science Imaging Instruments GmbH, D-37079 Göttingen

2.5 Puffer und Lösungen

2.5.1 Krebs-Hepes-Puffer (KH)

NaCl	99,01	mM
KCl	4,69	mM
CaCl ₂	2,5	mM
MgSO ₄	1,2	mM
NaHCO ₃	25	mM
K ₂ HPO ₄	1,03	mM
Na-Hepes	20	mM
D-Glukose	11,1	mM

2.5.2 Krebs-Hepes-Puffer mit Inhibitoren (KH-I)

Aprotinin (1,2 mg/ml)	100	µl
Pepstatin (2,5 mg/ml)	40	µl
Leupeptin (5 mg/ml)	10	µl

auf 10 ml Krebs-Hepes Puffer

2.5.3 Organbad-Puffer

NaCl	118,3	mM
KCl	4,69	mM
CaCl ₂	1,87	mM
MgSO ₄	1,2	mM
NaHCO ₃	25,0	mM
K ₂ HPO ₄	1,03	mM
Glukose	11,1	mM

pH 7,4

5 Liter Pufferlösung auf 37°C erwärmen

2.5.4 Counten Membranfraktion: Tris-Puffer

Tris-HCl	50	mM
EDTA free COMPLETE	1	Tablette

auf 50 ml Tris-Puffer; pH 7,4

2.5.5 Counten Membranfraktion: Tris-DTT-Puffer

Membranfraktion Tris-Puffer pH 7,4	10	ml
DTT	1	mM

2.5.6 Counten Mitochondrien: Hepes-Mito

Hepes	45	mM
Sucrose	70	mM
Mannitol	220	mM
EGTA	1	mM
BSA	29	mM

pH 7,4

2.5.7 Counten Mitochondrien: Tris-Mito-Puffer

Sucrose	340	mM	
KCl	100	mM	
Tris-HCl	20	mM	
EDTA	1	mM	pH 7,5

2.5.8 DPP[•] (1,1-Diphenyl-1-picryl-hydrazyl, freies Radikal) Stock Lösung (1 mM)

DPP[•] 1 mM

In Methanol

2.5.9 DPP[•] (1,1-Diphenyl-1-picryl-hydrazyl) Arbeits-Lösung (50 µM)

DPP[•] Stock Lösung 500 µl

ad 10 ml Methanol

2.5.10 Xanthinoxidase Aktivität: Hypoxanthin-Puffer

Hypoxanthin 1 mM

In Dulbecco's PBS (GIBCO), zum Lösen 30 Minuten Ultraschall bei 4° C, danach Zugabe von:

Cytochrom c 50 µM

2.5.11 Xanthinoxidase Aktivität: Background-Puffer

Cytochrom c 50 µM

In Dulbecco's PBS (GIBCO)

2.5.12 Homogenisierungs-Puffer

Tris-HCl 20 mM

Saccharose 250 mM

EGTA 3 mM

EDTA 20 mM

2.5.13 Homogenisierungs-Lösung

Protease Inhibitor Cocktail (P8340) 100 µl

Phosphatase Inhibitor Cocktail (P2850) 100 µl

PMSF (0,1 M in Methanol, final 0,5 mM) 50 µl

Triton X-100 100 µl

Na-Vanadat (0,1 M in H₂O, final 0,5 mM) 50 µl

Na-Fluorid (0,5 M in Methanol, final 2,5 mM) 100 µl

auf 10 ml Homogenisierungs-Puffer

2.5.14 Laemmli-Puffer (3X)

Tris-HCl pH 6,8	125	mM
Glyzerin	17 %	(v/v)
SDS	10%	(w/v)
β-Mercaptoethanol	5%	(v/v)
Bromphenolblau	0,01%	(w/v)

2.5.15 SDS 10 % w/v

SDS	10,0	g
Aqua dest. ad 100 ml		

2.5.16 APS (Ammoniumpersulfat)

APS	10,0	g
Aqua dest. ad 100 ml		

2.5.17 SDS-PAGE: Laufpuffer

Tris-base	25	mM
Glycin	192	mM
SDS	3,5	mM

2.5.18 SDS-PAGE: Trenngel-Puffer

Tris-HCl	1,5	M
pH 8,8		

2.5.19 SDS-PAGE: Sammelgel-Puffer

Tris-HCl	0,5	M
pH 6,8		

2.5.20 SDS-PAGE: Transferpuffer

Tris-base	25	mM
Glycin	192	mM
ad 800 ml Aqua dest.		
+ 200 ml Methanol		

2.5.21 Waschlösung WB (Western Blot): TBS (tris buffered saline) (10X)

Tris base	200	mM
NaCl	1,4	M
pH 7,6		

2.5.22 Waschlösung WB: TBS/T (Tween-20) (10X)

Tween-20 in Waschlösung WB: TBS	1%	(v/v)
---------------------------------	----	-------

2.5.23 Waschlösung WB: PBS (phosphate buffered saline) (10X)

NaCl	1,5	M
Na ₂ HPO ₄	200	mM
NaH ₂ PO ₄	40	mM

2.5.24 Waschlösung WB: PBS/T (Tween-20) (10X)

Tween-20 in Waschlösung WB: PBS	1%	(v/v)
---------------------------------	----	-------

2.5.25 Waschlösung WB: PBS/TT (Tween-20, Triton X-100) (10X)

Tween-20	0,5%	(v/v)
Triton X-100	3%	(v/v)
in Waschlösung WB: PBS		

2.5.26 Blockmedium WB: MLK (Milchpulver)

Milchpulver in TBS/T	5%	(w/v)
----------------------	----	-------

2.5.27 Blockmedium WB: BSA (Bovin Serum Albumin)

BSA in TBS/T	5%	(w/v)
--------------	----	-------

2.5.28 Blockmedium WB: Haem (Haemoglobin)

Haemoglobin PBS/TT	1%	(w/v)
--------------------	----	-------

2.6 Tierzucht / Behandlung

Alle tierexperimentellen Versuche wurden in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki und der Genehmigung des Landesuntersuchungsamtes Mainz durchgeführt (Az 1.5 177-07/051-55 vom 20.10.2005; Az 23 177-07 / G 07-1-018 vom 17.09.2007; Az 23 177-07 / G 07-1-029 vom 30.01.2008). Weiterhin wurden alle Experimente durch das Ethikkomitee der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz überprüft und zugelassen. Alle Lösungen wurden unter sterilen Bedingungen hergestellt und nach Erwärmung auf 37° C injiziert bzw. weiterverarbeitet. Behandelt wurden die Tiere in folgenden Gruppen:

Gruppe	Tierstamm	Verabreichte Substanzen	Dosis	Verabreichungs-Methode	Abkürzung (Versuch)
1	C57BL/6 Maus	NaCl PBS	0,9% Lsg. 200 µl	Osmotische Minipumpe s.c. Injektion	CTR
2	C57BL/6 Maus	Angiotensin II PBS	1 mg/kg/Tag 200 µl	Osmotische Minipumpe s.c. Injektion	AT II
3	C57BL/6 Maus	NaCl AICAR	0,9% Lsg. 200 mg/kg/Tag	Osmotische Minipumpe s.c. Injektion	AICAR
4	C57BL/6 Maus	Angiotensin II AICAR	1 mg/kg/Tag 200 mg/kg/Tag	Osmotische Minipumpe s.c. Injektion	AT II + AICAR
5	FVB/B6J/129 Maus	NaCl	0,9% Lsg.	Osmotische Minipumpe	WT
6	FVB/B6J/129 Maus	Angiotensin II	0,1 mg/kg/Tag	Osmotische Minipumpe	WT + AT II
7	AMPK- α 1 -/- Maus	NaCl	0,9% Lsg.	Osmotische Minipumpe	AMPK -/-

Gruppe	Tierstamm	Verabreichte Substanzen	Dosis	Verabreichungs-Methode	Abkürzung (Versuch)
8	AMPK- α 1 -/- Maus	Angiotensin II	0,1 mg/kg/Tag	Osmotische Minipumpe	AMPK -/- + AT II
9	FVB/B6J/129 Maus	NaCl PBS	0,9% Lsg. 200 μ l	Osmotische Minipumpe	WT
10	FVB/B6J/129 Maus	Lipopolysaccharid PBS	15 mg/kg 200 μ l	Einmalige s.c. Injektion	WT + LPS
11	FVB/B6J/129 Maus	Lipopolysaccharid AICAR	15 mg/kg 200 mg/kg/Tag	Einmalige s.c. Injektion s.c. Injektion	WT + LPS
12	AMPK- α 1 -/- Maus	Lipopolysaccharid AICAR	15 mg/kg 200 mg/kg/Tag	Einmalige s.c. Injektion s.c. Injektion	AMPK -/- + LPS
13	PGC-1 α -/- Maus	NaCl PBS	0,9% Lsg. 200 μ l	Osmotische Minipumpe s.c. Injektion	PGC-1 α -/-
14	PGC-1 α -/- Maus	Angiotensin II PBS	1 mg/kg/Tag 200 μ l	Osmotische Minipumpe s.c. Injektion	PGC-1 α -/- + AT II
15	PGC-1 α -/- Maus	Angiotensin II AICAR	1 mg/kg/Tag 200 mg/kg/Tag	Osmotische Minipumpe s.c. Injektion	PGC-1 α -/- + AT II / AICAR
16	Wistar Ratte	Angiotensin II PBS	1 mg/kg/Tag	Osmotische Minipumpe Osmotische Minipumpe	Telemetrie AT II
17	Wistar Ratte	Angiotensin II AICAR	1 mg/kg/Tag 200 mg/kg/Tag	Osmotische Minipumpe Osmotische Minipumpe	Telemetrie AT II + AICAR

2.7 Genotypisierung der $\alpha 1$ -AMPK knock out Mäuse

Die Mäuse wurden zur Narkotisierung für ca. 20 – 30 Sekunden dem Inhalationsnarkotikum Isofluran (5% Inhalant in Raumluft) ausgesetzt. Den narkotisierten Tieren wurde ein ca. 0,5 cm großes Schwanzstück (Schwanzspitze) mit einer sterilen Schere abgetrennt und sie wurden am Ohr markiert. Die Schwanzspitze wurde in ein vorbereitetes Eppendorf Gefäß überführt und mit 100 μ l der vorher angesetzten Direct-PCR-Lösung (Direct-PCR Lysis Reagent (Tail) peqlab + 1,5% Proteinase K, QIAGEN) eingebettet. Die Inkubation erfolgte über Nacht (höchstens 16 Stunden) bei 55° C in einem Eppendorf Thermoschüttler bei 350 rpm. Die Proben wurden für 45 Minuten bei 85° C im Wasserbad inkubiert, anschließend 30 Sekunden zentrifugiert (Eppendorf mini spin, 14.100 x g). Die so gewonnene genomische DNA konnte ohne weitere Aufreinigung in die Genotypisierungs-Polymerasekettenreaktion eingesetzt werden.

Die Polymerasekettenreaktion, PCR (polymerase chain reaction), ermöglicht die gezielte Amplifikation ausgewählter Sequenzbereiche. Diese Bereiche werden durch synthetische Einzelstrang-Oligonukleotide, sogenannte Primer, flankiert und begrenzt¹⁰⁹. Außerdem stellen die Primer mit ihrem 3'OH Ende die von der DNA-Polymerase benötigten Hydroxylgruppen als Startpunkt einer Verknüpfungsreaktion bereit.¹¹⁰ In diesem Fall wurden unten angegebene Primer verwendet, um den Bereich des murinen $\alpha 1$ -AMPK-Gens zu erfassen.^{111, 112} Die verwendete Taq-Polymerase ist eine thermostabile DNA-Polymerase aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus*.^{109, 110, 113} Zusätzlich zu den einzelsträngigen DNA-Matrizen und den Initiationsstellen, die durch die Primer gebildet werden, benötigt die Taq-Polymerase Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs), die als Bausteine für den neu synthetisierten Strang dienen, und Magnesium für die Aktivität der Polymerase.^{114, 115}

Die PCR besteht prinzipiell aus drei Schritten, die nach einer initialen Denaturierung bei 94° C, wobei die Doppelstränge schmelzen, in ca. 40 – 50 Zyklen wiederholt werden. In Abbildung 10 sind die Schritte schematisch dargestellt.

Beim Start der PCR folgt auf die initiale Denaturierung eine weitere „Denaturierungsphase“ bei 94° C. Dieser Schritt wird in jedem Zyklus wiederholt, während die initiale Denaturierung (4 – 5 Minuten) nur einmal durchgeführt wird.^{109, 116}

Der zweite Schritt, das „Annealing“, besteht aus der Hybridisierung der Primer (Oligonukleotide) bei einer Temperatur zwischen 50 und 60°C für ca. 30 Sekunden. Die Primer dienen dabei als Anlagerungs- und Begrenzungsstelle für die Taq-Polymerase.^{110, 113-115}

Die „Elongation“, der dritte Schritt eines Zyklus, besteht aus der Erhöhung der Temperatur auf ca. 74° C zur Aktivierung der hitzestabilen Taq-DNA-Polymerase. Die optimale Temperatur und auch die Dauer können bei unterschiedlichen Polymerasen und Fragmentgrößen stark differieren. Wird die Taq-Polymerase aktiviert, so heftet sie sich an einen Primer und beginnt die Synthese eines neuen DNA-Strangs, der komplementär zum Matrizenstrang ist.^{110, 113-115}

Durch erneute Temperaturerhöhung auf 94° C und Start eines neuen Zyklus werden die neu synthetisierten Doppelstränge, bestehend aus einem Matrizenstrang und einem synthetisierten Strang, wieder denaturiert. Bei dieser Methode werden DNA-Stränge theoretisch entsprechend der Formel 2^n vervielfacht, wobei n der Zyklenanzahl entspricht.^{110, 113-115}

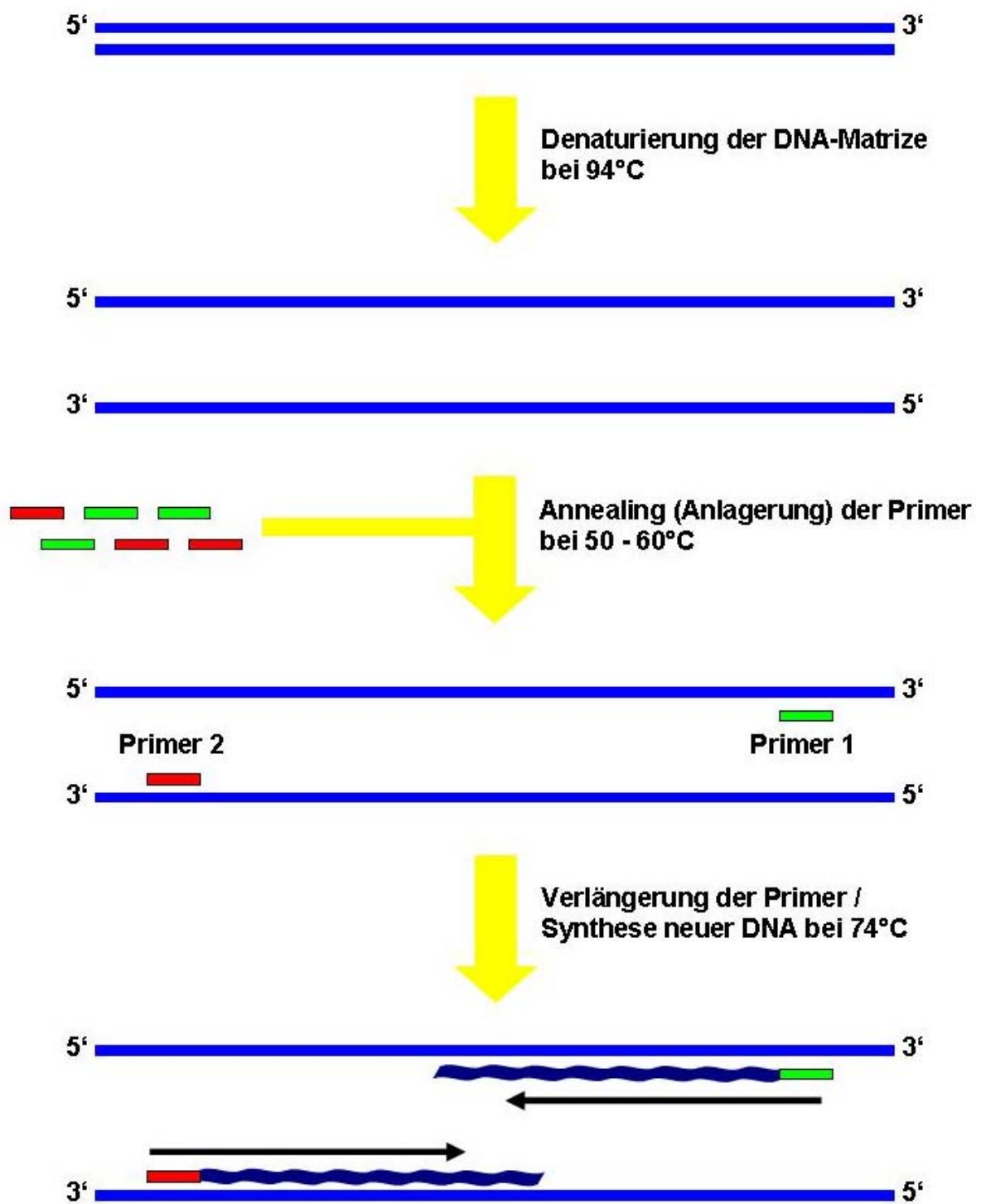


Abbildung 10. Zusammenfassung der drei entscheidenden Schritte der Polymerasenkettenreaktion. 1. Schritt: Denaturierung der DNA-Matrize bei 94°C, 2. Schritt: Anlagerung = Annealing der Primer, 3. Schritt: „Elongation“, die Taq-Polymerase synthetisiert einen neuen DNA-Strang komplementär zum Matrizenstrang. Danach folgt eine erneute Denaturierung der Doppelstränge zum Start einer neuen Syntheserunde (verändert nach²).

Für die PCR wurde das HotStarTaq MasterMix Kit von QIAGEN verwendet, das wie folgt angesetzt wurde:

PCR Ansatz

HotStarTaq Master Mix Kit	12,5	μl
Primer WT forward	2,0	μl
Primer WT reverse	2,0	μl
Primer KO forward	2,0	μl
Primer KO reverse	2,0	μl
RNase free H ₂ O	2,5	μl
Template DNA	2,0	μl
<hr/>		
Totales Volumen	25,0	μl

PCR-Bedingungen

Initiale Denaturierung:	94° C	5 Minuten	
Denaturierung:	94° C	30 Sekunden	} 40 Zyklen
Annealing / Anlagerung:	60° C	30 Sekunden	
Elongation:	72° C	1 Minute	
Finale Elongation:	72° C	5 Minuten	

Verwendet wurden angegebene Primer-Sequenzen.^{111, 112}

IRES Fa 2:	5' GGGCTGCAGGAATTCGATATCAAGC 3'
3.0 Ra 1:	5' CCTTCCTGAAATGACTTCTGGTGC 3'
α-WT forward:	5' AGCCGACTTTGGTAAGGATG 3'
α-WT reverse:	5' CCCACTTTCCATTTTCTCCA 3'

Die PCR wurde in 96-Well Platten (96-Well Plates) in einem Volumen von 25 μ l pro Ansatz durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mittels eines 2%igen Agarose-Gels im Gen-terphoreseTM System mit anschließender Ethidiumbromid-Färbung und UV-Belichtung im Intas-UV System.

Ein typisches Genotypisierungsgel ist hier als Beispiel gezeigt.

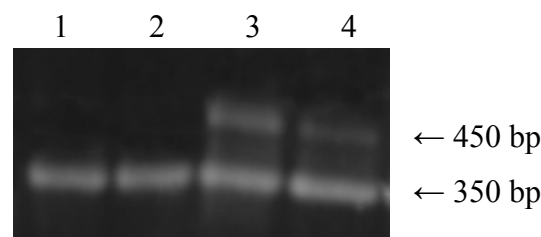


Abbildung 11. Beispiel eines Genotypisierungsergebnisses der α 1-AMPK $-/-$ Zucht: Wildtyp-Allel: 450 bp, Knock out-Allel: 350 bp. Probe 1 und 2 zeigen nur das Knock out-Allel, es handelt sich um Knock out-Tiere. Probe 3 und 4 zeigen sowohl Knock out- als auch Wildtyp-Allel, es handelt sich um heterozygote Tiere.

2.8 Implantation osmotischer Minipumpen

Osmotische Minipumpen arbeiten nach einem „Salztaschen“-Prinzip, welches erlaubt, Tieren über einen gewissen Zeitraum lösliche Substanzen zu applizieren, ohne durch mehrere Injektionen das Tier wiederholt unter Stress zu setzen.^{117, 118} Die gelöste Substanz (hier Angiotensin II in NaCl gelöst) wird in den Innenraum der Pumpe eingefüllt. Dieser Innenraum wird durch eine impermeable Haut (impermeable Layer, Abbildung 13) umgeben, die kollabieren kann. Diese wiederum ist umgeben von einer osmotisch aktiven Schicht („Salztasche“), die durch die äußere, semipermeable Membran von der Umgebung abgetrennt ist. Durch diese semipermeable Membran kann aus der Umgebung der Pumpe Wasser in die Salztasche der Pumpe einfließen. Die Einflussmenge wird durch die semipermeable Membran kontrolliert. Durch den kontrollierten Influx in die osmotisch aktive „Salztasche“ wird hydrostatischer Druck auf das innenliegende kollabierbare Reservoir aufgebaut und die eingefüllte Substanz durch den Fluss-Moderator nach außen gedrückt.^{117, 119}

Die osmotischen Minipumpen wurden subkutan implantiert. Die Maus wurde zunächst mit Isofluran narkotisiert und an der unteren Rückenpartie rasiert. Nach der Hautdesinfektion mit Braunol® wurde mit einer spitzen Schere das Fell ca. 0,5 cm oberhalb des Schwanzes eröffnet (Abbildung 12 a). Mit einer feinen Graefe-Pinzette wurde das Bindegewebe durchstoßen und eine Tasche für das Einführen der Minipumpe geformt (Abbildung 12 b). Die Pumpe konnte in diese Tasche eingeschoben werden (Abbildung 12 c). Anschließend wurden die Wundränder möglichst nahe aneinander gelegt und mit Wundklammern verschlossen (Abbildung 12 d). Zur postoperativen Desinfektion und Wundversorgung wurde erneut Braunol® verwendet. Die Operation erfolgte unter sterilen Bedingungen.

Die Versuchsbedingungen jedes einzelnen Tieres wurden exakt definiert und sehr genau eingehalten, damit mögliche Störfaktoren ausgeschlossen werden konnten. Die Implantation von osmotischen Minipumpen der Firma Alzet wurde immer morgens zwischen 9.30 und 10.30 Uhr durchgeführt.



Abbildung 12. Implantation einer osmotischen Minipumpe: a. Eröffnung des Fells; b. Formung einer subkutanen Tasche; c. Einführung der osmotischen Minipumpe; d. Verschluss der Wunde mit Wundklammer „Michel“.

Da AICAR in einer Dosis von 200 mg/kg/Tag appliziert werden musste und in dieser Konzentration nicht mehr löslich war, konnte hierfür keine osmotische Minipumpe verwendet werden. Dieser pharmakologische AMPK-Aktivator wurde deswegen täglich subkutan injiziert.

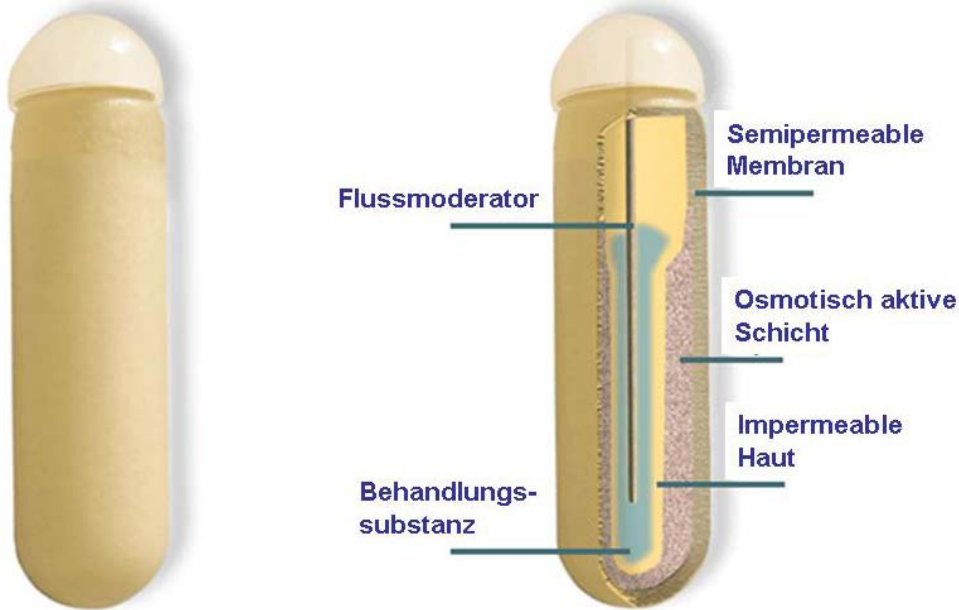


Abbildung 13. Aufbau und Prinzip der osmotischen Minipumpe. Der Innenraum der Pumpe ist in unterschiedliche Kompartimente aufgeteilt. In den Innenraum wird die Substanz eingefüllt, die verabreicht werden soll. Dieser Raum ist durch eine impermeable aber kollabierbare Haut von der osmotisch aktiven Schicht abgetrennt. Durch die äußerste semipermeable Membran kann Wasser in die Pumpe eindringen, was zur Erhöhung des Druckes der osmotischen Schicht führt, (verändert nach¹²⁰).

2.9 Tötung der Maus und Organentnahme

Verwendete Puffer / Lösungen:

Krebs-Hepes-Puffer (siehe 3.5.1)

Auch hier wurden die Versuchsbedingungen jedes einzelnen Tieres, behandelt wie unbehandelt, exakt definiert und eingehalten (vgl. 3.8.).

Die nachfolgend beschriebene Vorgehen bei der Organentnahme ist anhand von Bildern verdeutlicht. Dargestellt wird die beschriebene Organentnahme an einer Ratte, da die Größe des Tieres und seiner Organe die einzelnen Schritte besser makroskopisch darstellbar macht.

Das Tier wurde durch eine hohe Dosis Isofluran (1-Chloro-2,2,2-trifluoroethyl-difluoromethylether) in eine tiefe Narkose versetzt. Anschließend wurde dem Tier mit einer scharfen Schere das Fell im Bauch- und Brustbereich durchgeschnitten (Abbildung 14 a) und das Abdomen eröffnet (Abbildung 14 b). Durch Anheben des Sternums konnte das Zwerchfell am gesamten Rippenbogen eingeschnitten werden (Abbildung 14 c).

Um die stasebedingte Blutkoagulation zu verhindern, wurde an dieser Stelle 200 µl verdünntes Heparin (200 IE) in die linke Kammer des noch schlagenden Herzens injiziert (Abbildung 14 d). Eventuelle Blutentnahmen (0,5 – 1 ml) erfolgten anschließend durch Punktion des rechten Ventrikels. Entsprechend der geplanten Verwendung wurde die Blutprobe entweder direkt in flüssigem Stickstoff schockgefroren (anschließende EPR Messung) oder in eine Serum-Gel-Monovette überführt, zentrifugiert und das Serum in weiteren Versuchsreihen eingesetzt. Mittels einer scharfen Schere wurden die Rippen dorsal eingeschnitten und der komplette Brustkorb eröffnet. Durch Umlagern der abdominalen Organe wie Darm, Leber, Milz etc. zu einer Seite, spannte sich das dorsal gelegene Zwerchfell auf, das durch eine kleine scharfe Schere eingeschnitten wurde (Abbildung 14 e). Dann konnte der linke Lungenflügel angehoben werden, und es wurde ein Dreieck aus Aorta und Vena cava sichtbar, die durch das dünne Bindegewebe des Mediastinums miteinander verbunden waren. Dieses Häutchen wurde eingeschnitten, wodurch anschließend das Herz mit einem Schnitt von den abgehenden Gefäßen getrennt werden (Abbildung 14 f) konnte. Das Herz wurde sofort in ein Gefäß mit eisgekühltem Krebs-Hepes-Puffer überführt. Um zunächst die Zugspannung der Aorta zu minimieren, wurden schonend, durch mehrere steil angesetzte Schnitte, die drei Abgänge der supraaortalen

Gefäße und das angelagerte Binde- / Fettgewebe vom Aortenbogen abgetrennt (Abbildung 14 g). Zur Entnahme der Aorta abdominalis und thoracica wurden zunächst Magen, Pankreas, Leber, Milz, Colon, Jejunum und Ileum entfernt. Die retroperitoneal gelegenen Nieren wurden nach Trennung der Nierenarterien lateral der Aorta herauspräpariert. Die Bifurkation der Aorta abdominalis wurde nach diesem Schritt caudal sichtbar. Die anschließende Entnahme der Aorta wurde durch einen Schnitt distal der Bifurkation eingeleitet (Abbildung 14 i.) und mit einer Rundschere (Vannas) fortgesetzt. Um Gefäßverletzungen zu vermeiden, wurde darauf geachtet, möglichst wenig Zugspannung auf die Aorta auszuüben. Sofort nach der Entnahme wurde die Aorta wie auch das Herz in ein Gefäß mit eisgekühltem Krebs-Hepes-Puffer überführt und im Weiteren nur noch auf Eis bearbeitet.

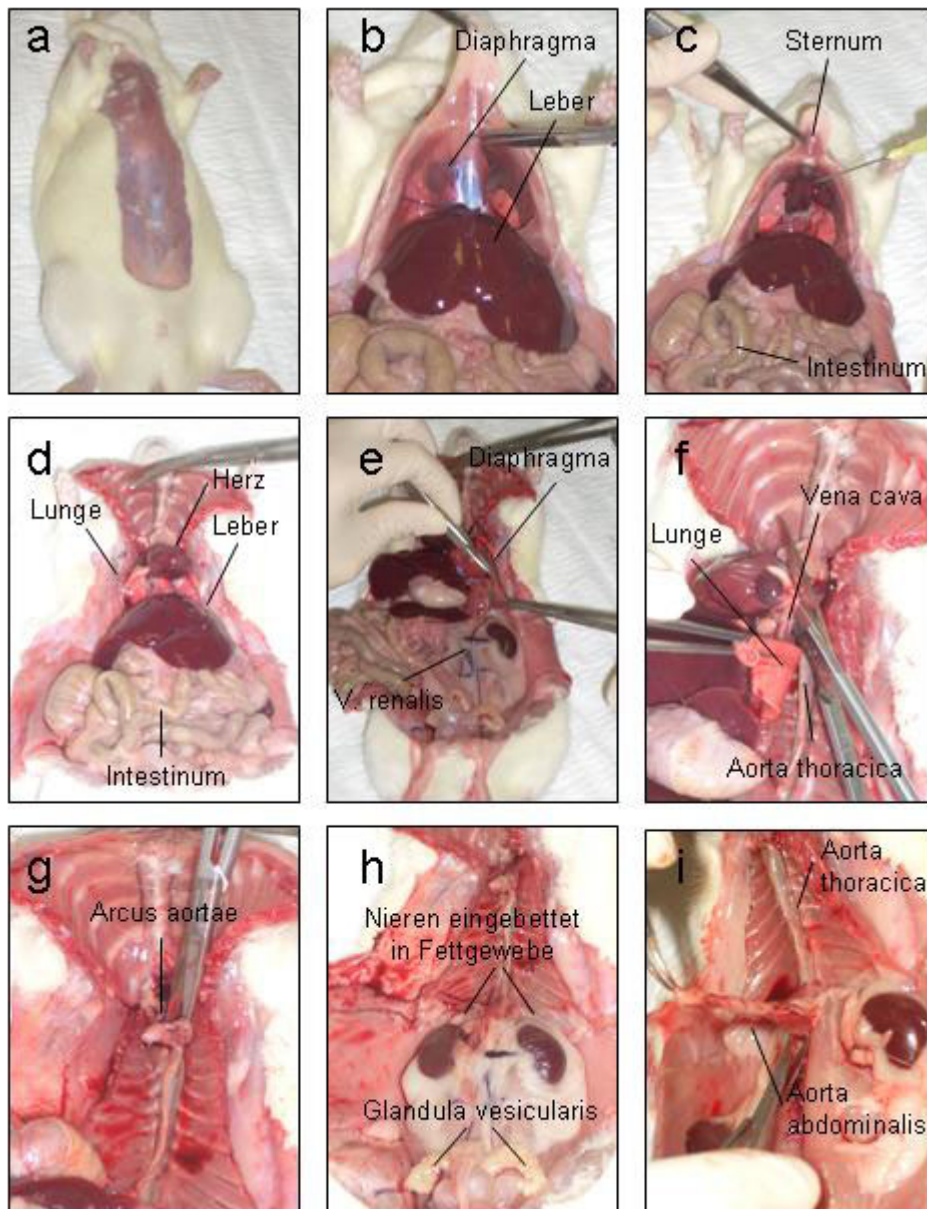


Abbildung 14. Übersicht über die Tötung und Organentnahme am Beispiel einer Ratte. a. Eröffnung des Fells im Bauch- und Brustbereich; b. Eröffnung des Abdomens; c. Anheben des Sternums, wodurch das Zwerchfell am gesamten Rippenbogen eingeschnitten werden konnte; d. Injektion von Heparin (200 IE) ins noch schlagende Herz, d. Dorsaler Einschnitt der Rippen; e. Umlagern der abdominalen Organe wie Darm, Leber, Milz etc. zu einer Seite, Einschneiden des Zwerchfells mit einer kleinen scharfen Schere; f. Trennung des Herzens von den Blutgefäßen mit nur einem Schnitt; g. Abtrennung der Abgänge und des angelagerten Binde- und Fettgewebes vom Aortenbogen; h. Proximale Trennung der Nierenarterien; i. Entnahme der Aorta.

Die Feinpräparation der kompletten Aorta bei Mäusen erfolgte auf Eis und mit größter Vorsicht, damit die einlagige Endothelschicht weder berührt noch anderweitig durch Zug oder

Knicken verletzt werden konnte. Manipulationen erfolgten nur noch unter Verwendung von „Dumont Mini“-Pinzetten und feinchirurgischen Federscheren unter binokularem Lichtmikroskop. Die bei der Entnahme gequetschten und somit verletzten Enden der Aorta wurden unter Verwendung eines frischen, scharfen Skalpells und einer atraumatischen Abrolltechnik entfernt. Mit der gleichen Technik wurden Aortensegmente bzw. -ringe für anschließende Tonusstudien oder Einbettung in entsprechende Lösungen zur Herstellung von Cryo-Schnitten hergestellt.

Alle Gefäßringe bzw. -segmente wurden stets bis zu ihrer Verwendung auf Eis gehalten bzw. eingesetzte Geräte auf 4°C vorgekühlt.

Segmente, die zur Extraktion von Proteinen dienten, wurden in Krebs-Hepes-Puffer mit Inhibitoren (KH-I) zehn Minuten bei 37°C inkubiert. Segmente für eine RNA Isolation wurden direkt nach der Feinpräparation in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

2.10 Implantation von Telemetrie-Kathetern in Ratten

Um Blutdruck, Pulsfrequenz und Aktivität von Labortieren zu messen, wurde in dieser Arbeit die Implantation von Telemetrie-Kathetern der „tail-cuff“ Methode vorgezogen. Bei „tail-cuff“ Messungen werden Tiere eingezwängt und in ihren Bewegungen stark eingeschränkt, wodurch alle genannten Parameter stark beeinflusst wurden. Die invasive Telemetrie-Methode schloss diese Nachteile aus, wodurch die so erhaltenen Daten als physiologischer angesehen wurden.

Die telemetrischen Transmitter (TA11PA-C20) wurden durch eine ventrale Laparotomie intraperitoneal in männliche Wistar Ratten implantiert. Die Tiere wurden vor dem Eingriff durch eine Kombination von Ketamin / Xylazin (1 µl pro g Körpergewicht; erhältlich bei Sigma Aldrich) durch intraperitoneale (i.p.) Injektion anästhesiert, das Abdomen zunächst mit einem Langhaarschneider und anschließend nass rasiert. Zur Prophylaxe einer vagalen Kreislaufdepression durch die Manipulation an der Aorta wurde zusätzlich Atropin (0,2 µl pro g Körpergewicht bei einer Konzentration von 0,5 mg / ml) i.p. gegeben. Nach der Rasur wurde das Tier in ein steriles Operationsfeld überführt und der komplette abdominale Bereich des Tieres durch Braunol® (Providon-Iod) desinfiziert. Durch Auftragung von Bepanthen Augen-

und Nasensalbe auf die Augen konnte während der Narkosedauer das Austrocknen verhindert werden.

Zunächst wurde die Dermis des Tieres mit einer scharfen Schere (7 – 8 cm lange Inzision) und anschließend das Bauchfell entlang der Mittellinie eröffnet. Dabei war darauf zu achten, dass beim Einschneiden der Bauchhöhle weder der Darm noch die Leber verletzt wurden (Abbildung 15 a). Danach wurde eine Seite des Tieres mit sterilen Kompressen, die vorher in steriles 37° C warmes NaCl eingelegt waren, abgedeckt und vorsichtig Dünn- und Dickdarm aus der Bauhöhle nach außen gelagert, um freie Sicht auf den Retroperitonealraum zu ermöglichen (Abbildung 15 b). Zur extraabdominalen Lagerung wurden in NaCl eingelegte sterile Kompressen verwendet, um das Intestinum abzudecken und es damit vor Auskühlung und Austrocknung zu schützen. Diese Vorgehensweise sicherte den freien Zugriff auf die abdominale Aorta zwischen den Abgängen der Aa. renales bis zur iliakalen Bifurkation. Die Aorta musste anschließend sehr vorsichtig mit Hilfe von in NaCl getauchten Wattestäbchen vom umliegenden Bindegewebe und der Vena cava befreit werden, um eine sichere Punktion gewährleisten zu können. Folgende Bereiche der abdominalen Aorta mussten unter Sicht zugänglich gemacht werden:

1. direkt caudal zu den Nierenarterien zur Positionierung der ersten atraumatischen Bulldogklemme,
2. direkt cranial der iliakalen Bifurkation zur Positionierung der zweiten atraumatischen Bulldogklemme,
3. das hiervon eingegrenzte Zentrum zwischen den Klemmenpositionen, um dort die Aorta zu punktieren und den Telemetriekatheter zu platzieren.

Wurde die Präparation abgeschlossen, so musste zunächst der Katheter vorbereitet werden. Die Lage des Katheters wurde so gewählt, dass die Penetration der Katheterspitze in die Aorta möglichst reibungslos verlaufen konnte. Die Katheterspitze wurde mit Gel aufgefüllt, so dass in der Spitze keine Luftblasen mehr sichtbar waren. Die Verwendung des Gels diente dazu, die Pulswelle des Blutes und damit die Druckwerte ohne Verlust auf den Druckdetektor (Piezo-Kristall-Technik) zu übertragen. Anschließend wurden die Bulldogklemmen platziert (Abbildung 15 c), um eine temporäre Blutleere in diesem Bereich der Aorta zu erzielen und den Blutverlust damit zu begrenzen. Die Punktion der Aorta und Insertion des Katheters mussten

nahezu zeitgleich erfolgen. Die vorbereitete um 90°-gebogene Kanüle punktierte die Aorta und diente gleichzeitig als Führungsschiene zum Einführen des Katheters in das Gefäß (Abbildung 15 d). Das ausgetretene Blut wurde anschließend mit sterilen Wattestäbchen entfernt und die Insertionsstelle des Katheters mit 15 – 20 µl VetbondTM-Gewebekleber versiegelt. Zunächst wurde die Klemme an der iliakalen Bifurkation gelöst. Beim anschließenden Öffnen und Entfernen der zweiten cranial gelegenen Klemme, musste darauf geachtet werden, dass aus der Insertionsstelle kein Blut mehr austrat. Weitere Blutungen machten ein erneutes Verkleben der Inzisionsstelle erforderlich. Nachdem beide Bulldogklemmen gelöst waren, konnte der Katheter am parietalen Blatt des Peritoneums durch eine Naht fixiert werden (Abbildung 15 e), ohne ein weiteres Blutgefäß zu verletzen. Zur Befestigung wurde nicht resorbierbares Nahtmaterial der Stärke 5-0 verwendet. Das komplette Intestinum konnte nach Platzierung des Katheters in die Bauchhöhle zurückgeführt werden (Abbildung 15 f). Zur Unterstützung wurde steriles 37° C warmes NaCl in den abdominalen Raum gegeben und die Organe an ihre ursprüngliche Position gebracht.

Um die Operation zu beenden, erfolgte ein schichtweiser Wundverschluss der Bauchdecke mit resorbierbarem Nahtmaterial. Unmittelbar nach der Operation wurden die Tiere erneut mit Braunol® desinfiziert und in einen temperaturkontrollierten Bereich überführt. Die Tiere wurden über mindestens 48 Stunden postoperativ isoliert und standen dabei unter Beobachtung und Kontrolle. Nach dieser Beobachtungsphase wurden sie zur kompletten Regeneration zurück in Gruppenkäfige überführt, wo sie weiterhin unter Beobachtung standen. Messungen an den so behandelten Tieren wurden erst durchgeführt, nachdem sie sich mindestens 14 Tage erholt hatten.

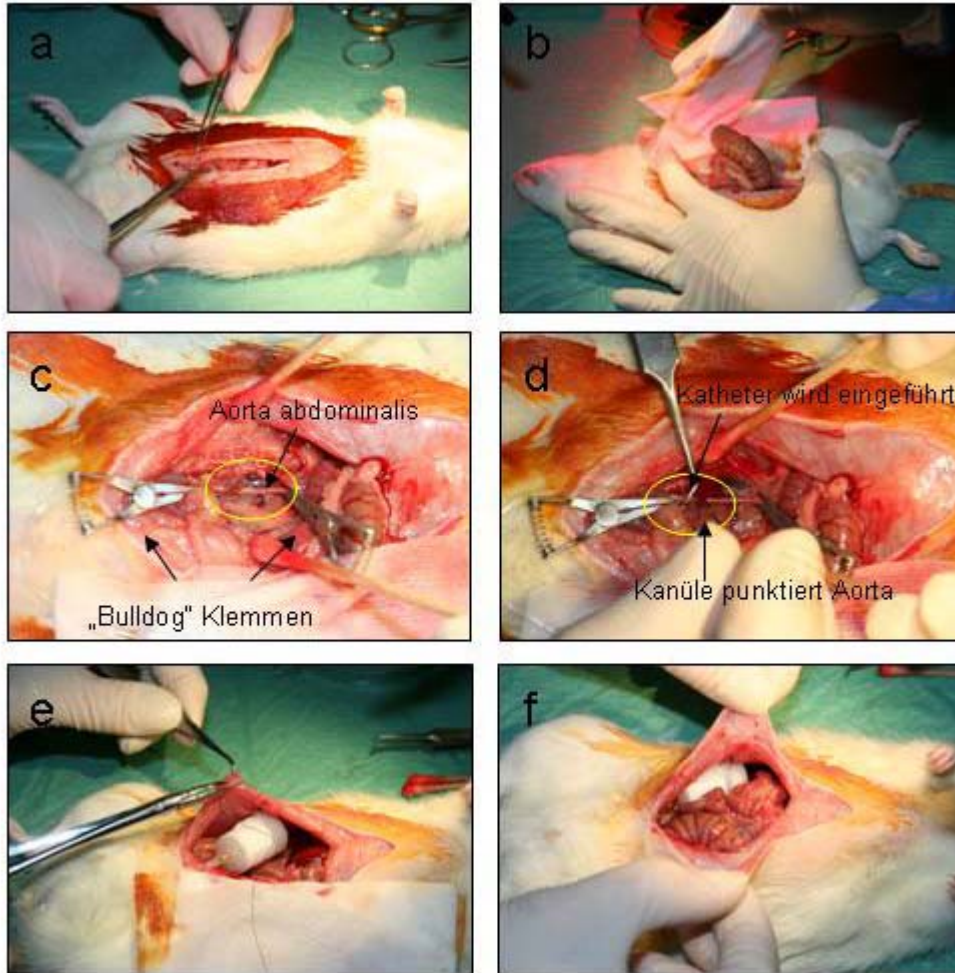
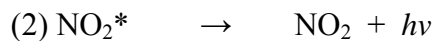
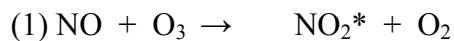


Abbildung 15. Implantation von Telemetrie-Kathetern in Ratten. a. Eröffnung der Bauchhöhle; b. extraabdominale Lagerung des gesamten Intestinums; c. Verschluss der Aorta abdominalis mit „Bulldog“ Klemmen, d. Punktion der Aorta abdominalis mit einer Kanüle und Einführung des Katheters; e. Befestigung des Katheters am parietalen Peritoneum; f. Zurückführung des Intestinums in die Bauchhöhle.

2.11 NO-Analyzer zur Bestimmung von Nitrit

Der NO-Analyzer Model 280 NOATM wurde für die Detektion von NO Metaboliten wie Nitrit (NO₂⁻) und Nitrat (NO₃⁻) als Peroxynitrit-Zerfallsprodukt nach Behandlung mit Nitratreduktase in isoliertem Maus-Serum verwendet. Der NO-Analyzer detektiert höchstsensitiv NO, basierend auf der chemilumineszenten Reaktion von NO und Ozon (O₃) in der Gasphase:



Die Emission von elektronisch angeregtem NO₂* liegt im roten bis nahe infraroten Bereich des Spektrums, die von einem thermoelektrisch gekühltem Photometer detektiert wird.

Ozon (O₃) wird mit einem elektrostatischen Generator und einem Hochspannungstransformator aus Sauerstoff (O₂) gebildet.

In physiologischen Lösungen kann NO mit molekularem Sauerstoff unter Bildung von Nitrit und mit Superoxid (O₂⁻) unter Bildung von Peroxynitrit (ONOO⁻) reagieren. Peroxynitrit isomerisiert zu Nitrat. Weiterhin geht NO auch mit Oxyhämoglobin Reaktionen ein, was zur Bildung von Nitrat (NO₃⁻)¹²² führt. Um NO indirekt im Serum messen zu können, wurde Nitrit (NO₂⁻) und Peroxynitrit (ONOO⁻) mittels Kalium-Iodid (KI) in 80%iger Essigsäure zu NO reduziert.^{123, 124}



Inertes N₂ Gas wurde benutzt, um NO aus der reduzierenden Iodid-Essigsäure-Lösung abzuführen, in die die Serumproben eingespritzt wurden. Wenn NO oder andere NO-Produkte anwesend waren, wurde ein scharfer Peak in der photometrisch aufgenommenen chemilumineszenten Reaktion sichtbar (Reaktion 1 und 2). Das Detektionslimit des NOATM 280 lag bei dieser Methode bei ca. 1pMol NO, NO₂⁻ oder ONOO⁻, was einer 20 nM Konzentration bei einem Injektionsvolumen von 50 µl entsprach.¹²⁵

Die Kalibrierung des Gerätes erfolgte mittels NaNO_2 -Standard-Lösungen in deionisiertem Wasser. Folgende Standard-Lösungen wurden verwendet:

- (1) 20 μM
- (2) 15 μM
- (3) 10 μM
- (4) 7,5 μM
- (5) 5 μM
- (6) 3,75 μM
- (7) 2,5 μM
- (8) 1,25 μM
- (9) 0,5 μM

Es war darauf zu achten, dass während der Herstellung der Standard-Lösungen sowie aller anderen verwendeten Lösungen und Substanzen keine Glaswaren verwendet wurden, sondern ausschließlich sterile 15 ml Falcons bzw. Eppendorf-Gefäße, um eine eventuelle Nitrit- oder Nitrat-Kontamination auszuschließen.¹²⁵ Die Lösung des Entgasungsgefäßes musste während einer Messreihe mehrfach (nach ca. 20 Proben) ausgetauscht werden, damit Artefakte, die durch Schaumbildung und durch Bildung von I_3^- (Gelbfärbung der Lösung) entstehen können, verhindert wurden.

Der Aufbau der wichtigsten Teile des NO-Analyzers ist in Abbildung 16 schematisch dargestellt.

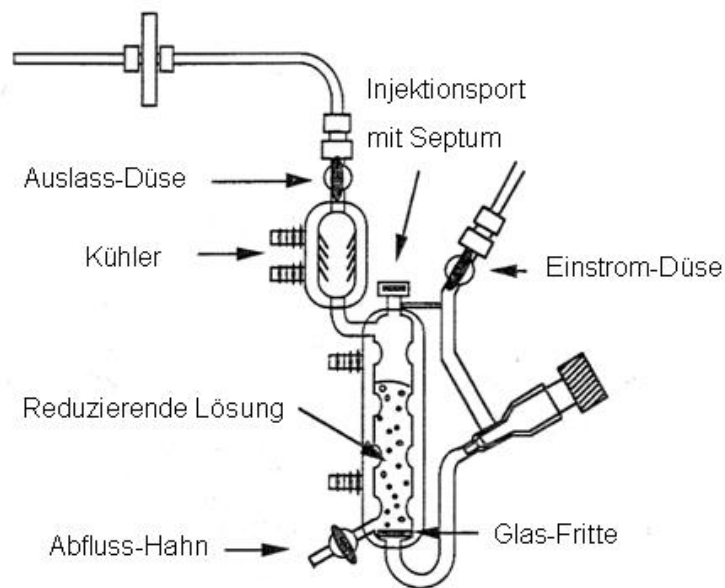


Abbildung 16. Schematischer Aufbau des NO-Analyzers NOA™ Model 280

Die reduzierende Lösung wurde direkt im Entgasungsgefäß hergestellt, damit möglichst wenige Reaktionen mit atmosphärischem Sauerstoff ablaufen konnten. Dabei musste auf die genaue Reihenfolge des Schließens und Öffnens der Abfluss- oder Einstrom-Hähne geachtet werden.

Der Gaseinstrom wurde an einem externen Regulator auf 69 – 138 mbar reguliert, wobei dieser nochmals durch das Nadelventil reguliert werden konnte. Vor Beginn der Messungen wurde der Gaseinstrom für wenige Minuten leicht blubbernd eingestellt, damit die reduzierenden Agenzien einerseits gemischt und gelöster Sauerstoff andererseits aus der Lösung entfernt wurden. Nach Verschließen des Injektionsportes mit dem Septum sollte der Reaktionszellulardruck 8 – 9,5 mbar betragen.

Wurden die Vorbereitungen wie beschrieben abgeschlossen, konnten zunächst die Standards und anschließend die frisch generierten Serumproben gemessen werden.

2.12 DPPH Test

Verwendete Puffer / Lösungen:

DPP (1,1-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) Stock Lösung (1 mM) (siehe 3.5.8)

DPP[•] (1,1-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) Arbeits-Lösung (50 µM) (siehe 3.5.9)

Das 1,1-Diphenyl-1-picrylhydrazyl-Radikal (DPP[•]) ist gelöst in Methanol ein relativ stabiles Radikal mit einem Absorptionsmaximum bei 517 nm.¹²⁷ Wegen eines ungepaarten Valenzelektrons in einer im Molekül vorkommenden Stickstoffbrücke ist eine Reaktion mit vielen verschiedenen Antioxidanzien möglich.¹²⁸ Durch einen Elektronendonator (z.B. Glutathion, Ascorbat oder Tocopherol) kommt es zur Bildung von 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazin und somit zum Verlust der Absorptionsfähigkeit bei 517 nm (Abbildung 17).^{129, 130}

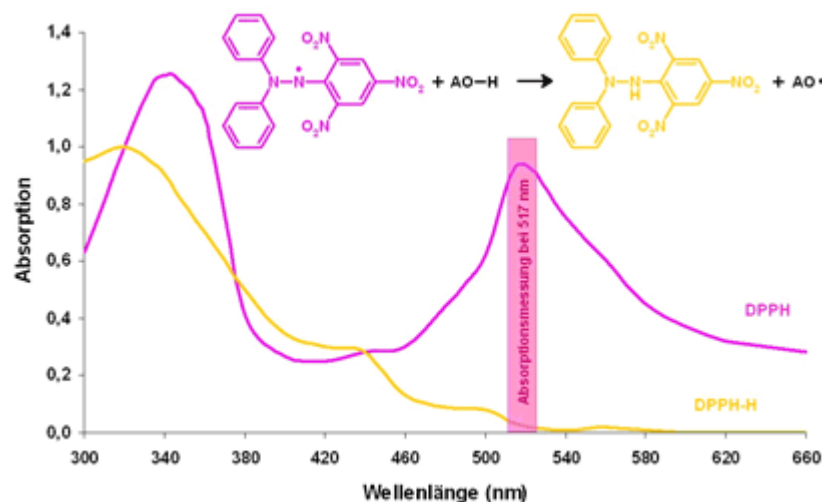


Abbildung 17. Das DPPH Radikal hat in Lösung (Methanol) eine violette Farbe. Die Farbe ändert sich zu gelb, wenn das Radikal durch ein Antioxidanz reduziert wird und verliert so die Absorptionsfähigkeit bei 517 nm (verändert nach¹³¹).

Eine andere Möglichkeit der Reduktion der Absorptionsfähigkeit des DPP-Radikals ist die Bildung eines instabilen, farblosen Adduktes zwischen dem DPP-Radikal und eines Antioxidanz. Diese Dekomposition des Radikals und somit die Reduktion der Absorption stellt eine

langsame Reaktion dar, die photometrisch über einen Zeitraum von bis zu 60 Minuten verfolgt werden kann.¹²⁸ In dieser Arbeit konnte mit Hilfe dieses Assays die Fähigkeit des Serums überprüft werden, die DPP-Radikale abzufangen und somit auch im Organismus dem oxidativen Stress entgegenzuwirken.

Getestet wurden frische Serumproben, welche in Sarstedt Z-Gel Monovetten bei 3600 rpm 10 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert wurden. Anschließend wurde das Serum deproteinisiert durch die Zugabe von einer Volumeneinheit Acetonitril (1:1). Nach vier Minuten Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurde das deproteinisierte Serum 10 Minuten bei 9.500 x g und 4° C zentrifugiert. Erst dann erfolgte die Herstellung der DPP-Lösung. Das Radikal wurde als Vorrat in einer Konzentration von 1 mM in Methanol gelöst. Nachdem die Proben in die Küvetten vorgelegt wurden, konnte die DPP-Arbeitslösung (1:20 in Methanol, 50 µM) hergestellt und zugegeben werden. Inkubationszeiten von zehn bis 60 Minuten wurden bei einer Wellenlänge von 517 nm untersucht.

2.13 Xanthinoxidase Aktivitäts-Assay

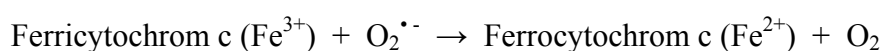
Verwendete Puffer / Lösungen:

Xanthinoxidase Aktivität: Hypoxanthin-Puffer (siehe 3.5.10)

Xanthinoxidase Aktivität: Background-Puffer (siehe 3.5.11)

Die Plasma-Proben zur Messung der Xanthinoxidase Aktivität wurden, wie oben beschrieben, generiert. Es wurde stets darauf geachtet, dass die Proben so frisch wie möglich gemessen wurden, damit die Enzymaktivität nicht durch zu langes Lagern auf Eis oder UV-Strahlung beeinträchtigt werden konnte.

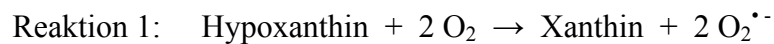
Dieser Assay basiert auf der Umwandlung von Ferricytochrom c zu Ferrocyclochrom c durch Superoxidradikale. Cytochrom c besitzt als prosthetische Gruppe ein Häm c mit einem zentralen Eisen-(III)-Ion (Fe^{3+}), das durch die Reaktion mit einem Sauerstoffradikal zum Eisen-(II)-Ion (Fe^{2+}) reduziert wird.^{69, 132}



Die Reaktion kann photometrisch bei 550 nm verfolgt werden, wobei die Bildung von Ferrocytochrom c die Absorption erhöht.^{69, 132, 133} Da im Serum verschiedene Quellen der Sauerstoffradikalbildung vorliegen, mussten die Bedingungen des Assays so gewählt werden, dass diese Fremdquellen ausgeschlossen werden konnten. Dazu wurde der Assay mit zwei unterschiedlichen Puffern durchgeführt:

- Ansatz 1: mit Hypoxanthin, einem spezifischen Substrat der Xanthinoxidase und
- Ansatz 2: ohne Hypoxanthin.

Durch Verwendung des Hypoxanthin-Puffers wurde folgende Reaktion der Xanthinoxidase begünstigt:



Die Xanthinoxidase katalysiert die Oxidation von Hypoxanthin zum Xanthin, sowie vom Xanthin zur Harnsäure, wobei in jeder Reaktion zwei Sauerstoffradikale gebildet werden. Um hierbei die Bildung von Harnsäure, eines Antioxidanz, zu verhindern, wurde mit großem Überschuss an Hypoxanthin (1 mM) gearbeitet. Im zweiten Ansatz wurde das Hintergrundrauschen der überwiegend nicht von den Reaktionen der Xanthinoxidase stammenden Sauerstoffradikale detektiert. Durch Differenzbildung wurden dann Fremdquellen ausgeschlossen. Über den bekannten Extinktionskoeffizienten ϵ_{550} von Cytochrom c (reduzierte Form; $\epsilon_{550} = 19,5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) kann die genaue Superoxid-Bildungsrate (nM / min) in einem bestimmten Zeitraum berechnet werden.^{19, 133, 134}

2.14 Chemilumineszenztests zur Detektion freier Radikale

Chemilumineszenz ist die Emission von Licht begründet auf dem Übergang eines Elektrons aus einem angeregten in einen energetisch tieferen Zustand.¹³⁵ Der angeregte Zustand des Elektrons wird bei dieser Methode durch eine chemische Reaktion hervorgerufen. Dabei handelt es sich bei der Chemilumineszenz um einen Spin-erlaubten Übergang (z.B. Singulett zu Singulett) im Gegensatz zur Phosphoreszenz, bei der es sich um einen Spin-verbotenen Übergang handelt (z.B. Triplett zu Singulett).

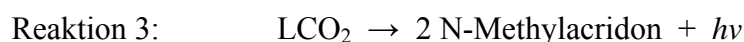
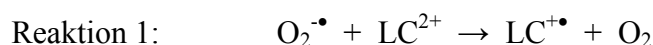
2.14.1 Luzigenin basierte Chemilumineszenz

Verwendete Puffer / Lösungen:

Counten Membranfraktion: Tris-Puffer (siehe 3.5.4)

Counten Membranfraktion: Tris-DTT-Puffer (siehe 3.5.5)

Der klassische Chemilumineszenztest zur Detektion von Superoxidanionen verwendet den Farbstoff Luzigenin (bis-N-Methylacridiniumnitrat), der ausschließlich mit Superoxidanionen zu einem Dioxetan-Intermediat reagiert, welches dann unter Lichtemission zum Acridon-Derivat zerfällt.^{18, 136-138} Folgende Reaktionen zeigen den Ablauf der auf Luzigenin basierenden Chemilumineszenz:¹⁸



In Reaktion 1 wird Luzigenin unter Reaktion mit einem $\text{O}_2^{\bullet-}$ -Radikal zum Luzigenin-Kationen-Radikal ($\text{LC}^{+\bullet}$) reduziert, welches durch die 2. Reaktion mit einem weiteren Superoxid-Radikal zum energiereichen Luzigenin-Dioxetan umgesetzt wird. Unter Lichtemission zerfällt dann in Reaktion 3 das energiereiche Dioxetan-Intermediat zum 2N-Methylacridon (Abbildung 18).

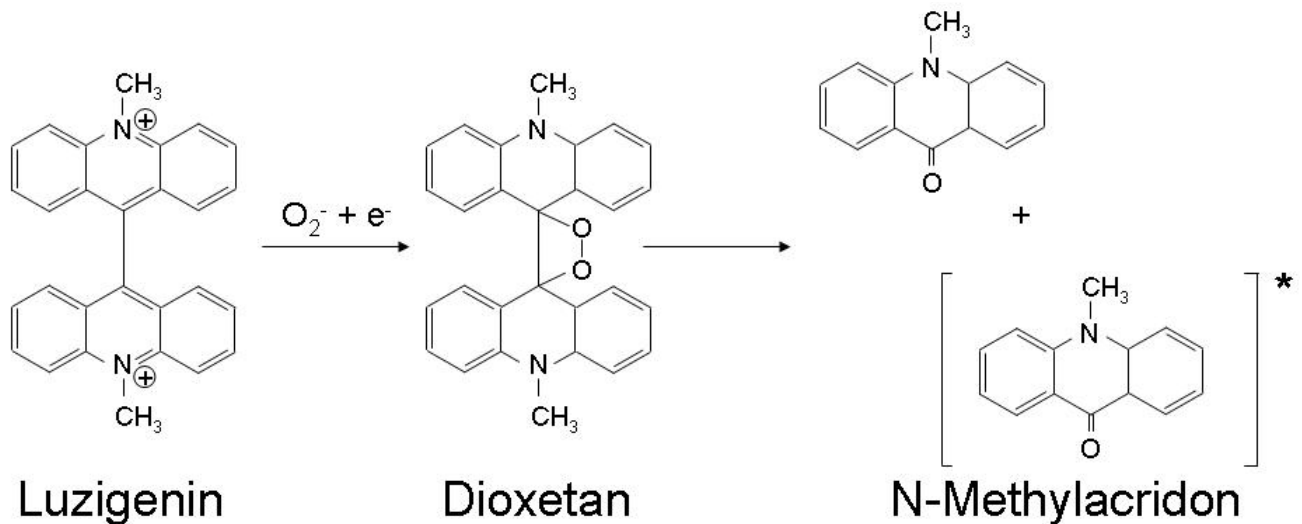


Abbildung 18. Strukturdarstellung der verschiedenen Derivate der auf Luzigenin basierenden Chemilumineszenz (verändert nach¹³⁹).

Inzwischen wurde entdeckt, dass Luzigenin aufgrund seiner „redox-cycling“ Eigenschaften beim Einsatz hoher Konzentrationen ($> 50 \mu\text{M}$) selbst die Bildung von Superoxidationen katalysieren kann. Dies konnte allerdings bei niedrigeren Konzentrationen ($5 \mu\text{M}$) nicht beobachtet werden.^{29, 132, 137,136, 140} Luzigenin wurde in dieser Arbeit verwendet, um in isolierten Herzmembranfraktionen die Aktivität der NADPH-Oxidase über die Bildung von Superoxidationen zu detektieren.

Die Herzmembranfraktionsproben wurden auf eine Proteinkonzentration von $0,2 \text{ mg/ml}$ in $500 \mu\text{l}$ PBS mit $5 \mu\text{M}$ Luzigenin eingestellt. Die Produktion freier Sauerstoffradikale („reactive oxygen species“, ROS) nach Stimulation mit NADPH ($200 \mu\text{M}$) wurde auf einem Lumimeter in Intervallen von 30 Sekunden über einen Gesamtzeitraum von fünf Minuten verfolgt. Die Signale wurden als Counts/mg[Protein]/Minute dargestellt.^{104, 116}

2.14.2 Herstellung der Herzmembranfraktionen

Die frisch entnommenen und direkt in 4°C kalten Krebs-Hepes-Puffer überführten Herzen wurden mit einem scharfen Skalpell zerkleinert und in ein Mörsergefäß überführt. Pro Mausherz wurden $500 \mu\text{l}$ des eiskalten Tris-DTT-Puffers zugegeben und mittels Glas-Glas-Homogenisator homogenisiert. Durch differentielle Zentrifugationsschritte wurde die Membranfraktion der Herzen von den übrigen Zellbestandteilen getrennt.

1. Zentrifugationsschritt: 6 Minuten, 2.000 x g, 4° C
Überstand wurde abgenommen, in neues Eppendorfgefäß überführt und weiter zentrifugiert
2. Zentrifugationsschritt: 20 Minuten, 20.000 x g, 4° C
Überstand wurde abgenommen, in Ultrazentrifugenröhrchen überführt und wiederum zentrifugiert
3. Zentrifugationsschritt: 60 Minuten, 40.000 x g, 4° C
Überstand wurde verworfen, Pellet in Tris-Puffer (ohne DTT) resuspendiert

2.14.3 L-012-vermittelte Chemilumineszenz

Verwendete Puffer / Lösungen:

Counten Mitochondrien: Hepes-Mito (siehe 3.5.6)

Counten Mitochondrien: Tris-Mito-Puffer (siehe 3.5.7)

Ein weiterer hier verwendeter Chemilumineszenz-Farbstoff ist das Luminol-Analogon L-012 (8-Amino-5-Chloro-7-Phenylpyrido[3,4-d]pyridazin-1,4-(2H,3H)Dion), das aufgrund seiner Detektion verschiedener Sauerstoffradikale für die Erfassung des gesamten oxidativen Stresses eingesetzt wurde.^{3, 141, 142} Es detektiert Superoxid und Peroxynitrit ähnlich gut (mit höherer Spezifität für Peroxynitrit), während die Sensitivität für Wasserstoffperoxid geringer ist. Dieser Chemilumineszenz-Farbstoff wurde daher für die Detektion von mitochondrialem Superoxid und Peroxynitrit eingesetzt (Abbildung 19).^{18,143}

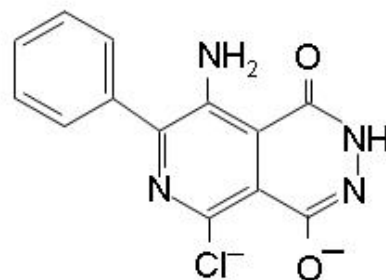


Abbildung 19. Chemische Formel von L-012.

Die Proben der Herzmitochondrienfraktion wurden auf eine Proteinkonzentration von 0,1 mg/ml in 500 µl PBS mit 100 µM L-012 eingestellt. Die ROS- bzw. RNS- (reaktive Sauerstoff- bzw. Stickstoffspezies) Produktion nach Stimulation mit Succinat (5 mM) wurde auf einem Chemiluminometer in Intervallen von 30 Sekunden über einen Gesamtzeitraum von fünf Minuten gemessen. Die Signale wurden als Counts/mg[Protein]/Minute dargestellt.^{144, 145}

2.14.4 Isolation von Mitochondrien

Die frisch entnommenen und in 4°C kalten Krebs-Hepes-Puffer gelagerten Herzen wurden mit einem scharfen Skalpell zerkleinert und in ein Mörsergefäß überführt. Pro Mausherz wurden 500 µl des eiskalten Hepes-Mito-Puffers zugegeben und mittels Glas-Glas-Homogenisator homogenisiert. Durch anschließende differentielle Zentrifugationsschritte wurde die Membranfraktion der Herzen von restlichen Zellbestandteilen getrennt.

1. Zentrifugationsschritt: 6 Minuten, 1.500 x g, 4° C
Überstand wurde abgenommen, in neues Eppendorfgefäß überführt und weiter zentrifugiert
2. Zentrifugationsschritt: 6 Minuten, 2.000 x g, 4 ° C
Überstand wurde abgenommen, in neues Eppendorfgefäß überführt und wiederum zentrifugiert
3. Zentrifugationsschritt: 20 Minuten, 20.050 x g, 4° C
Überstand wurde verworfen, Pellet in Tris-Mito-Puffer resuspendiert

2.14.5 Proteinbestimmung nach Lowry

Die Proteinbestimmung nach Lowry beruht auf zwei hintereinander geschalteten Farbreaktionen.¹⁴⁶ Die erste Farbreaktion ist die Biuretreaktion, bei der Peptidbindungen in wässrig alkalischer Lösung einen farbigen Komplex mit vorhandenen Kupfer(II)-Ionen eingehen.¹⁴⁶ Es erfolgt ein Farbumschlag nach dunkelviolet. Diese Reaktion ist im Vergleich zu anderen Farbreaktionen sehr unempfindlich und bewegt sich in Nachweisgrenzen zwischen 1 und 10 µg/ml Protein. Aus diesem Grund wird eine zweite Farbreaktion angeschlossen, die die Nachweisgrenze deutlich verbessert (0,1 bis 1 µg Protein).^{146, 147}

Die zweite Reaktion ist die Reduktion der Kupfer(II)- zu Kupfer(I)-Ionen, die wiederum die Folin-Ciocalteu Reagenz (Molybdän(VI)- und Wolfram(VI)-Heteropolysäuren) zu Molybdänblau reduzieren. Daraus resultiert eine intensive Blaufärbung der Lösung, die zur Bestimmung der Proteinkonzentration bei einer Wellenlänge von 700 nm verfolgt wurde. Die verwendeten Lösungen wurden von der Firma Biorad bezogen.

Die Herzfraktionsproben (Membran bzw. Mitochondrien) wurden zunächst 1:20 mit 0,1%iger SDS Lösung verdünnt (475 µl 0,1%ig SDS + 25 µl Probe), als Nullabgleich (Blank) wurden 25 µl Tris-Puffer verwendet. Die so hergestellten Verdünnungen wurden dann zehn Minuten bei 37° C inkubiert und anschließend 25 µl davon in Küvetten vorgelegt. Anschließend wurden 125 µl der vorher hergestellten Mischung aus „Reagent A“ und „Reagent S“ (1.000 µl A + 20 µl S) und 1.000 µl „Reagent B“ in die Küvetten gegeben. Mit einem Rührspatel wurden die Proben mit den zugegebenen Reagenzien vermischt und zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Messung der Proben erfolgte photometrisch bei 700 nm.

Nach der Proteinbestimmung wurden alle Proben auf die gleiche Konzentration eingestellt. Der anschließende Chemilumineszenz-Assay lief bei einer Standard-Protein-Konzentration von 0,1 mg/ml bei Mitochondrien und 0,2 mg/ml bei Membranfraktionen ab.

2.14.6 Oxidativer Stress in isolierten Aortensegmenten

Verwendete Puffer / Lösungen:

Krebs-Hepes-Puffer (siehe 3.5.1)

Oxidativer Stress in isolierten Aortensegmenten konnte ebenfalls mittels Chemilumineszenz ermittelt werden. Drei Verfahren wurden dazu angewendet. Der Chemilumineszenz-Farbstoff L-012 (100 µM in PBS) wurde genutzt, um sowohl extra- als auch intrazelluläre reaktive Spezies wie Peroxynitrit, Superoxid und Wasserstoffperoxid zu quantifizieren, wobei die Affinität zu Peroxynitrit am höchsten und die zu Wasserstoffperoxid am geringsten ist.^{3, 141, 142} Luzigenin (5 µM in PBS) wurde herangezogen um extrazelluläres Superoxid zu bestimmen, da dieser Chemilumineszenz-Farbstoff ausschließlich Superoxid detektiert und aufgrund seiner positiven Ladung nicht membrangängig ist. Ein dritter Ansatz, bestehend aus einem Gemisch

von Luminol (200 μM) und Peroxidase aus Meerrettich (HRP, 0,1 μM) in PBS (engl. horseradish peroxidase), wurde eingesetzt, um Wasserstoffperoxid und Peroxynitrit extrazellulär zu bestimmen.

Dazu wurden frisch isolierte Aortenringe der jeweiligen Mäuse (1 cm thorakale Aorta) zunächst in Krebs-Hepes-Puffer 20 Minuten bei 37° C vorinkubiert und anschließend die Messungen für L-012 in einem Chemiluminometer (Berthold Lumat) in Intervallen von 1 Minute über einen Gesamtzeitraum von 20 Minuten detektiert. Diese Ringe wurden daraufhin in PBS gewaschen und nochmals 20 Minuten im Luminol/HRP-Gemisch in einem Chemiluminometer in gleichen Intervallen gemessen. Auf die Luzigenin-verstärkte Chemilumineszenz (Protokoll wie bei L-012) schloss sich eine zweite Untersuchung in frischem Luzigenin an, so dass für jeden Ring ein interpolierter Doppelwert erhalten wurde.

Die Aortenringe wurden nach den Messungen über Nacht getrocknet und das Trockengewicht bestimmt. Die Signale wurden als Counts/Minute/mg TG dargestellt.¹⁴⁸

2.15 Bestimmung der Gefäßfunktion mittels isometrischer Tonusstudien

Verwendete Puffer / Lösungen:

Organbad-Puffer (siehe 3.5.3)

Um die Funktion der Endothelien zu untersuchen, wurden isometrische Tonusstudien an intakten Aortensegmenten (3 – 5 mm) durchgeführt. Diese Methode basiert auf der Tatsache, dass ein dysfunktionelles Endothel die Fähigkeit verliert, den Gefäßtonus auf endogen oder exogen induzierte Veränderungen angemessen zu regulieren. Hämodynamisch äußert sich die endotheliale Dysfunktion durch Abschwächung der endothelabhängigen Relaxation.¹⁴⁹ Diese kann durch den Acetylcholin-Test überprüft werden. Im Lumen eines intakten Gefäßes führt die Zugabe von Acetylcholin zur Stimulation von muskarinergen Rezeptoren im Endothel, was die endotheliale NO-Synthase stimuliert. In glatten Muskelzellen löst die Stimulation der muskarinergen Rezeptoren jedoch eine Vasokonstriktion aus (Abbildung 20).^{149, 150} Die Reaktion der Aorta auf den Acetylcholin-Stimulus hängt somit in erster Linie von der funktionellen Integrität des Endothels ab. Ist die Endothelfunktion intakt, so überwiegt die NO-Bildung im

Gefäßsegment und es wird eine Vasodilatation ausgelöst, während bei endothelialer Dysfunktion die glattmuskulären Effekte überwiegen und eine sogenannte paradoxe Vasokonstriktion ausgelöst wird.¹⁵¹⁻¹⁵³

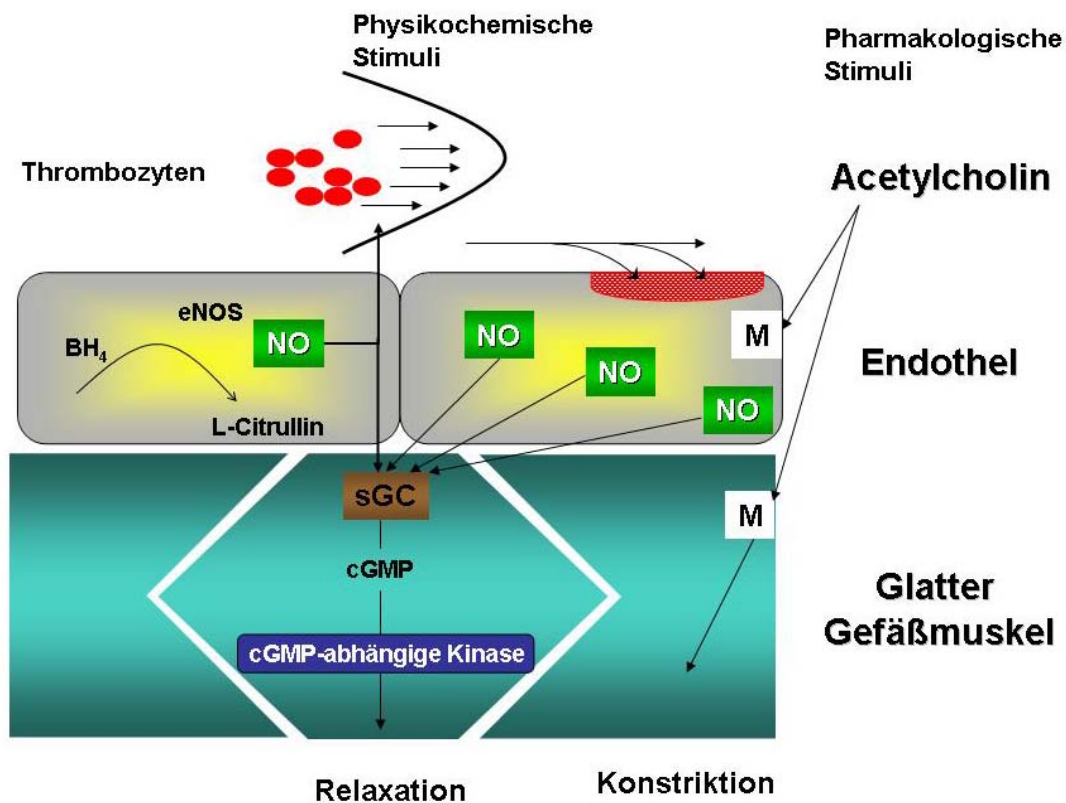


Abbildung 20. Endothelfunktion / -dysfunktion: im intakten Endothel wird durch die Gabe von Acetylcholin die endotheliale NO-Synthase (eNOS) aktiviert, was zur Stimulation der löslichen Guanylatzyklase (sGC) in glatten Muskelzellen führt. Die nachgeschaltete Signal-Kaskade bewirkt eine Vasodilatation. Bei endothelialer Dysfunktion wird im glatten Gefäßmuskel eine Vasokonstriktion ausgelöst (verändert nach¹⁴⁹).

Weiterhin kann auch eine endothelunabhängige Relaxation und somit die Funktion der glattmuskulären Bereiche untersucht werden. Dazu wird statt Acetylcholin ein endothelunabhängiger Vasodilator wie Nitroglyzerin, Natriumnitroprussid oder als NO-Donor Spermin NONOat oder Diethylamin NONOat benutzt.^{154, 155}

Die Aortenringe wurden dazu in einem mit Pufferlösung gefüllten, 25 ml fassenden Behälter (Organbad) an eine Messanlage angeschlossen, mit Vasokonstriktoren auf ca. 50% des maximalen Tonus vorkontrahiert und mit den oben genannten Vasodilatoren kumulativ inkubiert und dabei relaxiert. Über ein zu- bzw. abführendes System war es möglich, den Wirkstoff enthaltenden Puffer nach den einzelnen Messungen mit abzulassen und frische Pufferlösung hinzu zu geben. Diese Waschstritte wurden zwischen den einzelnen Untersuchungen zweimal wiederholt. Abbildung 21 zeigt schematisch das Messprinzip der Anlage.

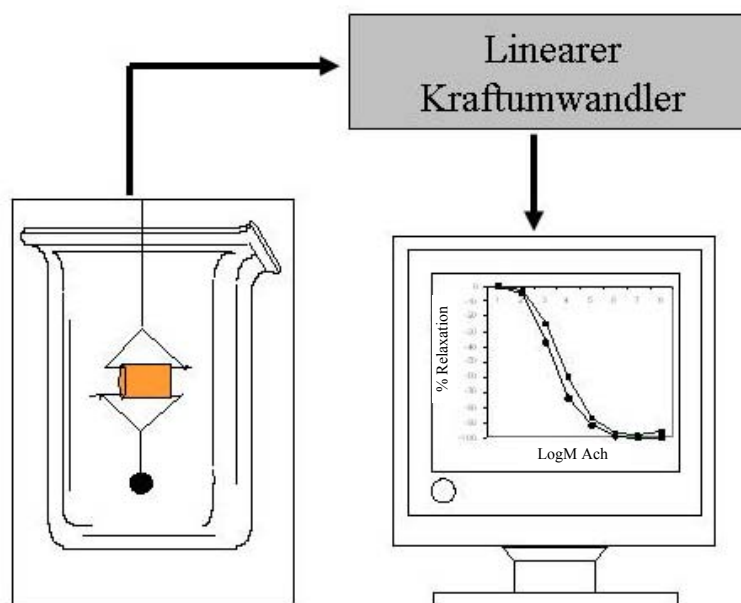


Abbildung 21. Schematische Darstellung der Organbadanlage: der Aortenring ist durch feine Drähte mit dem Kraftwandler verbunden, so kann jede Veränderung des Gefäßtonus registriert werden. Die so gewonnenen Daten werden per EDV weiterverarbeitet.

Vor den Untersuchungen der Aortensegmente wurden die Organbäder mit dem Organbadpuffer befüllt, die Lösung auf 37° C erwärmt und mit 95% O₂ und 5% CO₂ (Carbogen) begast. Über feine, zu Dreiecken gebogene Drähte, die über einen langen Draht mit einem Kraftaufnehmer (Transducer) verbunden waren, wurde jeweils ein Aortenring pro Organbad eingehängt. Dabei wurde jeweils ein Schenkel von zwei Dreiecken durch das Lumen des Gefäßrings geführt und vorsichtig oben und unten in der Anlage befestigt. Der Ring wurde zwischen den Dreiecken manuell gespannt, ohne das Gefäßgewebe zu dehnen. Die isometrischen Spannungsänderungen der glatten Gefäßmuskulatur konnten über den Kraftaufnehmer (mit

dem oberen Dreieck verbunden) gemessen und durch digitale Umwandlung (Mac-Lab/8e) auf dem Computerbildschirm (Apple Macintosh, Power PC, Mac-Lab Programm) graphisch sichtbar gemacht werden. Um die Synthese von Prostaglandinen zu verhindern, wurden die Experimente in Anwesenheit von 10 μM Indomethacin durchgeführt.

Während der folgenden Stunde wurde die Vordehnung schrittweise erhöht, um die Bedingungen für eine Vasokonstriktion zu optimieren. In vorausgegangenen Experimenten wurde eine Optimalspannung von 1,1 g gefunden (die Relaxation wird in der vorliegenden Anlage in Kraft mit der Einheit Gramm verfolgt). Anschließend wurde 80 mM Kaliumchlorid (KCl) zugegeben, bis eine konstante isometrische Kontraktion registriert werden konnte. Schließlich wurde noch eine Dosis-Wirkungs-Kurve mit ansteigenden Konzentrationen KCl durchgeführt (5, 10, 20, 40, 80mM).

Nach diesem KCl-induzierten Maximaltonus wurde gewaschen und das Erreichen des Ausgangstonus von 1,1 g abgewartet. Durch eine Prostaglandintitration ($\text{PGF}_{2\alpha}$, 3 nM final) wurden die Aortensegmente auf einen Tonus von 40 bis 50% des KCl-Maximaltonus vorkontrahiert. Durch kumulative Zugabe von Acetylcholin (1 nM – 3 μM), Nitroglyzerin (1 nM – 30 μM) und DeaNONOat (1 nM – 3 μM) in halblogarithmischen Schritten konnte die endothelabhängige und -unabhängige Vasodilatation gemessen werden. Die Vasodilatationen jeder Dosis wurden als prozentuale Relaxation der maximalen Prostaglandin-Konstriktion ausgedrückt.^{149, 154, 155} Um die unterschiedlichen Gruppen miteinander vergleichen zu können, wurden im Anschluss EC_{50} -Werte (Konzentration für halb-maximalen Effekt, d.h. halb-maximale Relaxation) berechnet. Der EC_{50} -Wert wird abgeleitet als mathematische Modellierung und gab die mittlere effektive Konzentration an, bei der eine halbmaximale Relaxation beobachtet wurde. Mit diesem Wert konnte der pD_2 Wert („potency“) errechnet werden, der dem negativen Logarithmus der EC_{50} Konzentration entspricht ($-\log(\text{EC}_{50})$). Zusätzlich wurde auch die „efficiency“ zum Vergleich herangezogen, die die maximale Relaxation bei der verwendeten Maximalkonzentration des jeweiligen Vasodilators angab.¹⁵⁶⁻¹⁵⁸

2.16 Proteinextraktionen aus Gewebe

Verwendete Puffer / Lösungen:

Homogenisierungs-Puffer (siehe 3.5.12)

Homogenisierungs-Lösung (siehe 3.5.13)

Das Aortengewebe wurde zunächst in einem mit flüssigem Stickstoff gekühlten Mörser zerrieben und in ein gekühltes Eppendorf-Gefäß überführt. Durch Zugabe von eiskalter Homogenisierungs-Lösung (300µl pro 100 mg Gewebe) und leichtes Vortexen wurde erst in diesem Schritt das Gewebe aufgetaut und anschließend mindestens eine Stunde auf Eis inkubiert. Durch zwischenzeitliches Vortexen und die Zugabe von Detergenz wie Triton X-100 (1 %) konnten Zellen lysiert und Proteine aus den Membranen gelöst werden. Die anschließende Zentrifugation (10.000 x g, 10 Minuten, 4°C) sedimentierte den Zelldebris, während sich im Überstand die solubilisierten Proteine befanden. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und bis zur weiteren Verarbeitung auf Eis gehalten bzw. bei -20°C gelagert.

2.17 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Konzentrationsbestimmung der oben hergestellten Proteinextrakte wurde nach der Methode von Bradford durchgeführt.¹⁰⁸ Diese Methode basiert auf den Eigenschaften des Farbstoffs Coomasie Brilliant Blue-G250, der erstmals von Bradford zur Bestimmung von Proteinkonzentrationen benutzt wurde. Der Farbstoff kommt in drei Zuständen vor (Abbildung 22). Durch Bindung an kationische und/oder hydrophobe Seitenketten von Proteinen wird der Farbstoff in seinem anionischen Zustand stabilisiert, und das Absorptionsspektrum erhält ein Absorptionsmaximum bei 595 nm.^{159, 160} Der Farbstoff komplexiert hauptsächlich mit basischen Aminosäuren von Proteinen. Die Messungen wurden auf eine Eichgerade mit BSA (Bovine serum albumin) bezogen, weil BSA viele basische Aminosäuren enthält (z.B. 30 x Lysin, 26 x Arginin und 7 x Histidin).

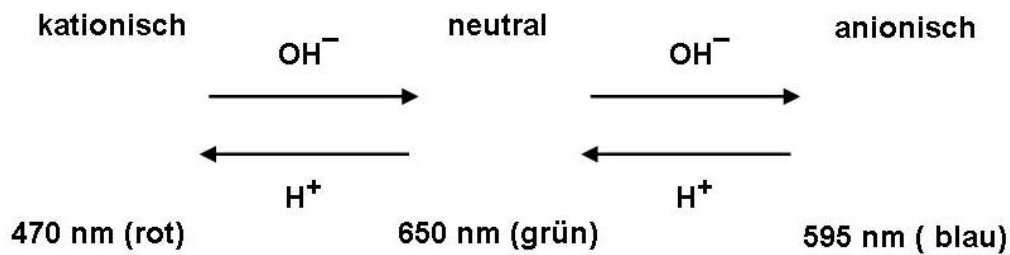


Abbildung 22. Drei absorbierende Zustände von Coomassie Brilliant Blue-G250.

Es wurde eine Standardgerade mit fünf BSA-Standards folgender Konzentrationen erstellt: 1, 5, 10, 20 und 30 ng/ μl . Als Leerprobe (Blank) wurde die entsprechende Menge Wasser (Aqua bidest.) eingesetzt. Zur Bestimmung der unbekannt Proben wurde eine Verdünnung gewählt (Aortengewebe 1 : 100, Herzgewebe 1 : 200), die es erfahrungsgemäß ermöglichte, im Bereich der genannten Standards zu messen. Alle Messungen (sowohl Standards als auch unbekannt Proben) wurden als 4-fach Bestimmung in einer 96-Well Platte durchgeführt.

Die Proben wurden in einem Gesamtvolumen von 200 μl verdünnt. Pro Well wurden anschließend 80 μl der Probe sowie der vorher hergestellten Standards vorgelegt. Als Bradford-Reagenz wurde anschließend 1:5 verdünntes Roti-Quant zugegeben (200 μl per Well). Die Absorption der Proben und der Standards wurde dann in einem Platerreader ausgelesen und mit Hilfe des Programms Revelation ausgewertet (Abbildung 23).

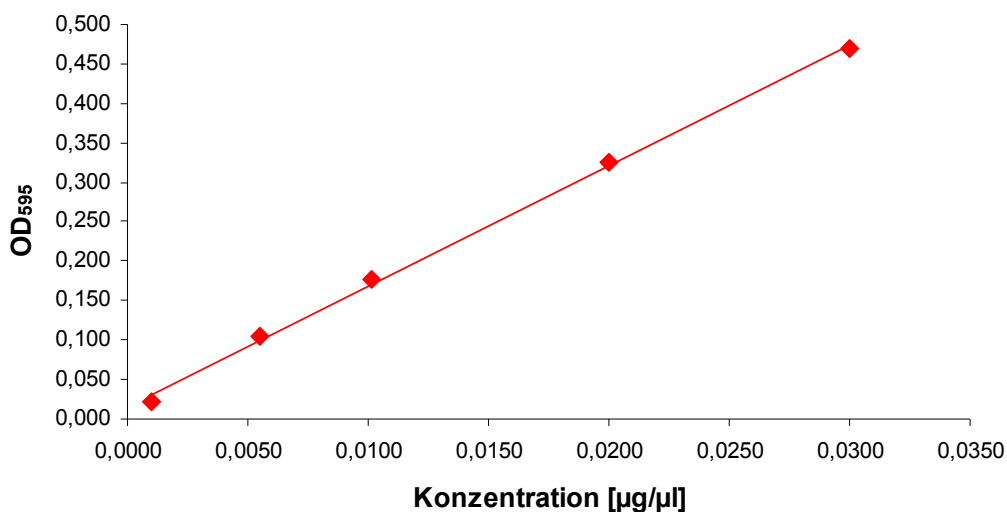


Abbildung 23. Beispiel einer Standardgerade mit BSA-Standards für die Bradford Proteinbestimmung.

2.18 Dot Blot

Verwendete Puffer / Lösungen:

Homogenisierungs-Puffer (siehe 3.5.12)

Homogenisierungs-Lösung (siehe 3.5.13)

Der Dot Blot ist eine vereinfachte Version des Western Blots, die es erlaubt, Protein bzw. Proteinmodifikationen (hier: Nitrotyrosinbildung) mittels spezifischer Antikörper zu quantifizieren. Da Proteingemische hierbei nicht der Größe nach aufgetrennt werden, kann allerdings nicht qualitativ zwischen nitrierten Proteinen unterschieden werden, bzw. es kann, wenn ein nicht spezifischer Antikörper mit signifikanter Kreuzreaktivität verwendet wird, nicht ausgeschlossen werden, dass es zu falsch-positiven Signalen kommt. Der große Vorteil der Dot Blot-Methode ist der hohe Probendurchsatz (im 96-Well-Maßstab) sowie die Detektion von Proteinen mit intakter Tertiärstruktur (einige Antikörper erkennen nur natives aber kein denaturiertes Protein). Für Dot Blots wird ein Proteingemisch direkt auf eine PVDF-Membran aufgetragen, ohne dass vorher eine Auftrennung nach Größe, Ladung oder Struktur durchgeführt wurde. Diese Technik wurde mittels eines Minifold-I-Gerätes der Firma Whatman – Schleicher & Schuell durchgeführt (Abbildung 24). Hierzu wurden Herzhomogenate aufgearbeitet und der Proteingehalt nach Bradford bestimmt. Dann wurde die Probe mit Homogenisierungs-Lösung auf eine Proteinkonzentration von 2,5 µg/µl eingestellt und pro Dot 10 µl (entsprechend 25 µg Protein) aufgetragen.

Das Dot Blot System setzt sich zusammen aus vier Einzelkomponenten:

- (1) einer 96-Well-Platte, auf die die Proben aufgetragen werden,
- (2) einer Filter-Auflageplatte, auf die zwei Filterpapiere und die Membran gelegt werden,
- (3) einer Vakuumkammer, die an einer Wasserstrahlpumpe angeschlossen werden kann, sowie
- (4) einer Spannleiste aus Metall, die das System zusammenpresst.

Das System wird nach dem Aufbau (Filter und Membranen wurden vorher kurz in PBS eingelegt) an eine Wasserstrahlpumpe angeschlossen, die das nötige Vakuum erzeugt. Die aufgetragene Probe wird dadurch auf die Membran gesaugt. Zweimaliges Nachspülen mit PBS sicherte den kompletten Durchsatz der Probe.

Die Membran wurde nach vollständigem Durchsaugen der aufgetragenen Lösungen aus der Vorrichtung entnommen und zwei Tage bei Raumtemperatur (oder eine Stunde bei 60° C) getrocknet. Um die modifizierten Proteine auf der Membran sichtbar zu machen, wurden Antikörperreaktionen durchgeführt, die unter Punkt 3.21 genauer beschrieben werden. Die Auswertung erfolgte wie bei Western Blots.

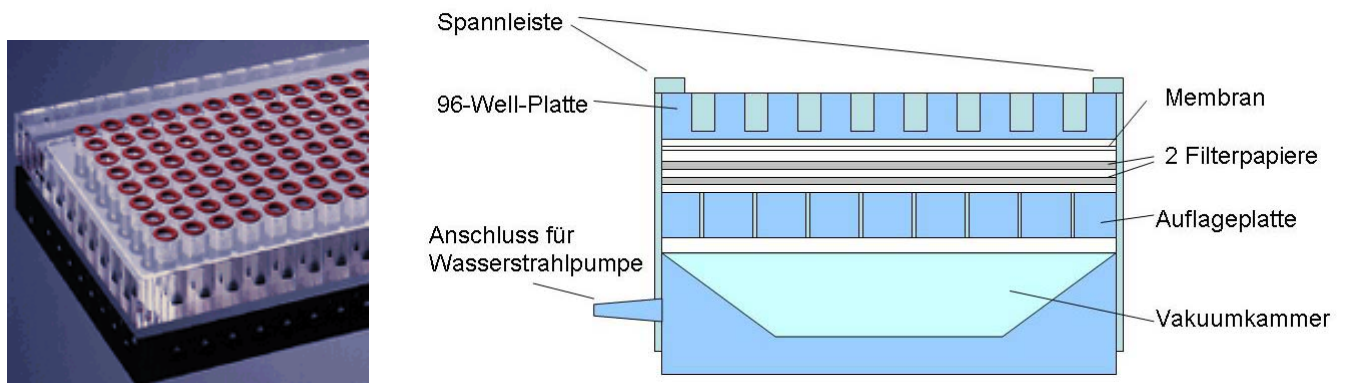


Abbildung 24. 96-Well-Platte eines Standard Minifold I® Systems zur Durchführung eines Dot Blots (links) und schematischer Aufbau der Dot Blot-Apparatur (rechts).

2.19 Protein-Gelelektrophorese (diskontinuierliche SDS-PAGE)

Verwendete Puffer / Lösungen:

SDS 10% (siehe 3.5.15)

APS (Ammoniumpersulfat) (siehe 3.5.16)

SDS-PAGE: Laufpuffer (siehe 3.5.17)

SDS-PAGE: Trenngel-Puffer (siehe 3.5.18)

SDS-PAGE: Sammelgel-Puffer (siehe 3.5.19)

Die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, SDS-PAGE (sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis), diente zur Auftrennung von Proteingemischen. Der Einsatz von SDS (Natriumdodecylsulfat) wurde zur Maskierung der nativen Ladungen der Proteine eingesetzt, so dass diese eine konstante Ladungsverteilung aufzeigten, die mit der Größe korreliert.¹⁶¹ SDS wurde dazu im Überschuss (im Laemmli-Puffer enthalten) zum Proteingemisch gegeben und bei 95° C für fünf Minuten erhitzt. Das Erhitzen des Proteinge-

mischs zerstörte Tertiär- und Sekundärstrukturen (z.B. Aufbruch von Wasserstoffbrückenbindungen in Faltblattstruktur bzw. Helices), wobei Quartärstrukturen wie Disulfidbrücken durch Reduktion gespalten wurden.¹⁶² Diese Reduktion wurde durch β -Mercaptoethanol im Laemmli-Puffer gewährleistet.¹⁶³ Bromphenolblau ermöglichte, die Laufstrecke der Proben im Polyacrylamidgel zu verfolgen.¹⁶⁴

Nach der Proteinbestimmung nach Bradford wurden die Proben zunächst 1:3 mit Laemmli-Puffer (3X) vermischt, danach erfolgte die Protein-Denaturierung bei 95° C für fünf Minuten. Nachfolgend wurden die Proben auf eine Proteinkonzentration von 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ eingestellt. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Proben auf Eis bzw. bei -20° C gelagert.

Die SDS-PAGE wurde in einem Mini-Protean-III-System der Firma BIORAD durchgeführt. Dafür wurden 1 mm starke, ca. 5 cm lange 7,5 – 12 % ige Trenngele angefertigt (Tabelle 1). Zur Herstellung einer gleichmäßigen Gelkante, auf die das Sammelgel gegossen werden konnte, wurde die Trenngellösung mit Isopropanol überschichtet. Nach Polymerisation (ca. 20 Minuten bei Raumtemperatur) wurde die Überschichtung entfernt und ein 4%iges Sammelgel aufgegossen. Die zugehörigen Gelkämme haben eine Breite von 3 – 5 mm (für 15 oder zehn Probentaschen), in die ein Probenvolumen bis zu 40 μl eingefüllt werden konnte (Polymerisation ca. 15 Minuten bei Raumtemperatur). Zusätzlich zu den Proben wurden pro Gel ein Molekulargewichts-Marker (BenchMark™ Protein Ladder) und ein vorgefärbter, schon im Gel sichtbarer Protein-Marker (DualColor) aufgetragen.

Tabelle 1. Zusammensetzung der unterschiedlichen Acrylamid-Gele.

	Trenngel:			Sammelgel:
	7,5%	10%	12%	4%
H₂O	5,4 ml	4,8 ml	4,3 ml	3,2 ml
Trenngel-Puffer (1,5 M Tris pH 8,8)	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	-----
Sammelgel-Puffer (0,5 M Tris pH 6,6)	-----	-----	-----	1,2 ml
Acrylamide/Bis (40 %, BioRad)	1,88 ml	2,5 ml	3 ml	0,5 ml
10% SDS	100 µl	100 µl	100 µl	50 µl
10% APS	100 µl	100 µl	100 µl	50 µl
TEMED	10 µl	10 µl	10 µl	5 µl

Die Elektrophorese wurde nach Auftragen aller Proben in gekühltem (4° C) SDS-PAGE-Laufpuffer zunächst bei 60 V gestartet, bis die Proben aus den Taschen in das Sammelgel eingetreten waren. Die Elektrophorese wurde bei konstant 130 V für ca. zwei bis drei Stunden fortgeführt, bis die entsprechenden Banden das Ende des Trenngels erreicht hatten.

2.20 Western Blot / Protein-Transfer

Verwendete Puffer / Lösungen:

SDS-PAGE: Transferpuffer (siehe 3.5.20)

Der Transfer der Proteine aus dem Gel auf die Nitrozellulose-Membran wurde mit Hilfe des „Mini Trans-Blot Cell“ Systems der Firma BIORAD durchgeführt.¹⁶⁵ Vor dem Zusammenbau der einzelnen Elemente des Systems wurden sowohl die Filterpapiere, die Schwämme als auch die zugeschnittene Nitrozellulose-Membran in eiskalten Transferpuffer eingelegt (ca. 1 Minute). Anschließend wurden nacheinander luftblasenfrei ein Schwamm, ein Filterpapier,

die Membran, das Trenngel, das zweite Filterpapier und der zweite Schwamm in dem Blothalter geschichtet.¹⁶⁶ Der Blothalter wurde so in die mit Transferpuffer gefüllte Transferkammer überführt, dass die Nitrocellulose-Membran zur Anode ausgerichtet war. Der Transfer verlief vier Stunden bei 4° C bei konstantem Stromfluss von 250 mA.

Nach Abbau des Blotsystems konnte der Transfer sofort anhand der Banden des vorgefärbten Markers auf der Nitrozellulose-Membran überprüft werden. Das transferierte Protein und der zweite 10 kDa Molekulargewichts-Marker konnte durch Ponceau-S Färbung (fünf Minuten bei Raumtemperatur) der Membran sichtbar gemacht werden.^{167, 168, 169} Anhand dieses Markers konnte dann die Nitrozellulose-Membran in entsprechende Teile geschnitten werden, damit gleichzeitig mehrere Antikörper verwendet werden konnten.

2.21 Immunologische Nachweise von Proteinen auf Membranen

Verwendete Puffer / Lösungen:

Waschlösungen WB (Western Blot) (siehe 3.5.21 bis 3.5.25)

Blockmedien WB (siehe 3.5.26 bis 3.5.28)

Um die Proteine auf der Membran sichtbar zu machen, wurden (meist monoklonale) Primärantikörper verwendet.^{166, 168} Antikörper sind immunologisch aktive Proteine, die an ein Epitop (bzw. eine antigene Determinante) binden und somit spezifische Nachweise von Proteinen bzw. Proteinmodifikationen erlauben.¹⁷⁰ Das Epitop bzw. die antigene Determinante ist typisch für das auf die PVDF-Membran übertragene Protein. Es kommt also zu einer Antigen-Primärantikörper-Reaktion, wie in Abbildung 25 gezeigt ist.

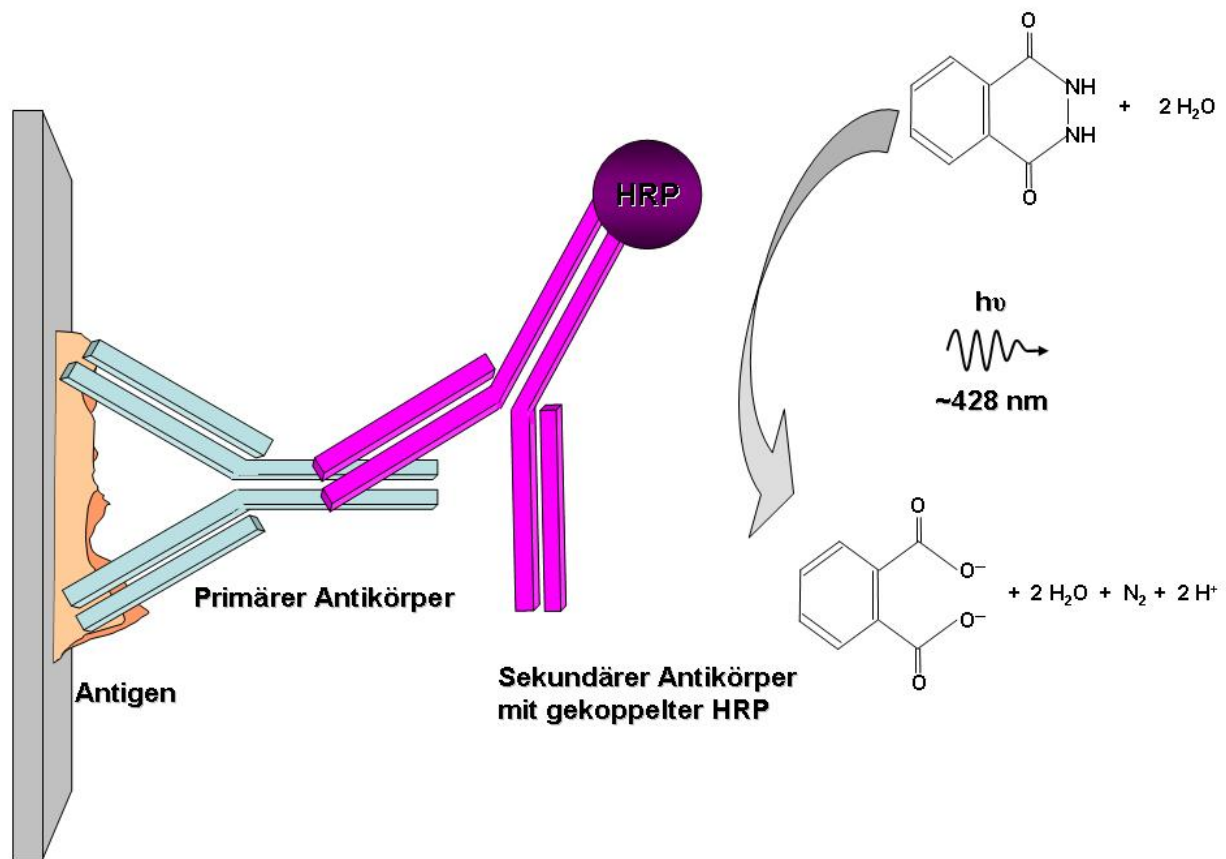


Abbildung 25. Antigen-Antikörper- und Chemilumineszenz-Reaktion der Immundetektion eines Proteins auf einer PVDF-Membran: Am Protein, das durch Blotting oder durch Vakuum auf die Membran gebracht wurde, bindet der spezifische Primärantikörper. Der sekundäre Antikörper mit gekoppelter HRP wiederum kann am Primärantikörper anlagern und das zugegebene Luminol oxidieren, was zu einem Chemilumineszenzsignal führt (verändert nach^{121, 139}).

Durch die Verwendung eines Sekundärantikörpers, der in der Regel mit HRP (horseradish peroxidase) gekoppelt vorlag, ließ sich der Primärantikörper, gebunden an sein spezifisches Antigen, auf der Membran detektieren. Die am Sekundärantikörper gebundene Peroxidase oxidierte dann das zugegebene Luminol (ECL), was zu einem Chemilumineszenzsignal führte. Dieses Signal wurde durch einen Chemilumineszenz-Detektor aufgenommen und quantifiziert.

Die in Teile geschnittene Membran wurde zunächst eine Stunde bei Raumtemperatur in Blockmedium (Milchpulver bzw. BSA) inkubiert, um später unspezifische Bindungen des Antikörpers an anderen Epitopen zu vermeiden. Der Primärantikörper wurde bei einer Ver-

dünnung von 1 : 1.000 (5 µl in 5 ml gelöst) über Nacht bei 4° C inkubiert. Dreimaliges Waschen am Folgetag (je fünf Minuten bei Raumtemperatur) entfernte nicht spezifisch gebundene bzw. überschüssige Primärantikörper von der Membran. Der Sekundärantikörper wurde ebenfalls im Blockmedium des zugehörigen Primärantikörpers (Verdünnung 1 : 10.000) zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Erneutes dreimaliges Waschen (je fünf Minuten bei Raumtemperatur) entfernte die überschüssigen Sekundärantikörper und Blockmedienreste. Die Auftragung des ECL-Chemilumineszenz-Reagenz lieferte das Substrat für die HR-Peroxidase. Mit ECL wurde eine Minute inkubiert, es wurde dann von der Membran gesaugt, die anschließend direkt im Chemilumineszenz-Imager quantifiziert wurde.¹⁷¹ Die densitometrische Auswertung der als JPEG gespeicherten Bilder wurde mit Hilfe des Programms Gel-Pro Analyser 6.0 durchgeführt.

2.22 Isolierung von RNA

Die Isolierung von RNA aus Herz- und Aortengewebe erfolgte mit Hilfe eines gewerblich erhältlichen QIAGEN Kits (RNeasy® Fibrous Tissue Mini Kit). Das gefrorene Gewebe (Mausgewebe: ½ Herz bzw. eine Aorta) wurde zusammen mit einer 5 mm Stahlkugel und 300 µl „RNA Lysis Buffer“ in ein 2 ml Eppendorfgefäß überführt. Die so befüllten Gefäße wurden dann in einem QIAGEN Tissue Lyser überführt und fünf Minuten bei 30 Hz (Herzen sechs Minuten) gerüttelt. Hierbei war darauf zu achten, dass das Gewebe nicht antaute, bis der Homogenisierungspuffer zugegeben wurde. Die nachfolgende Isolierung der RNA ist zusammenfassend in Abbildung 26 graphisch dargestellt.

Die Zugabe von 600 µl Proteinase K-Lösung (Verdünnung von 10 µl Proteinase K 1:60 mit 590 µl „RNase free“ Wasser), mit anschließender Inkubation (zehn Minuten bei 55°C) führte zum Verdau der Proteine im Homogenat. Der erste Zentrifugationsschritt (drei Minuten bei 10.000 x g bei Raumtemperatur) entfernte die zertrümmerten Zellbestandteile. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und das Pellet verworfen. Es schloss sich eine Ethanol-fällung an. Die Probe wurde mit einer halben Volumeneinheit Ethanol (96-100%) versetzt und in eine im Kit enthaltene Rneasy-Mini-Spin-Säule überführt, die 15 Sekunden bei 10.000 x g zentrifugiert wurde. RNA und auch Spuren von DNA banden an der Säule, während alle anderen Zellbestandteile im nächsten Waschschrift (350 µl RW 1) entfernt wurden. Durch Zugabe von DNase I – Lösung (Verdünnung 1:8, d.h. 10 µl DNase I stock + 70 µl

RDD) wurde die an der Silica-Gel-Säule gebundene DNA verdaut (Inkubation 15 Minuten, RT). Der anschließende Waschschrift mit dem Puffer RW 1 mit zugehöriger Zentrifugation (15 Sekunden bei 10.000x g) entfernte die DNA-Fragmente von der Säule. Die Säule wurde dann in ein neues Gefäß überführt und zweimal mit 500µl RPE-Puffer gewaschen (1. Zentrifugation: 15 Sekunden, 10.000x g, 2. Zentrifugation: zwei Minuten, 10.000x g). Eine anschließende Zentrifugation (eine Minute, 20.000x g) sollte die vollständige Trocknung der Säule und Entfernung des RPE Puffers sichern.

Die Elution der RNA in Wasser wurde angeschlossen (Zentrifugation: eine Minute, 10.000x g). Die zugegebene Wassermenge wurde angepasst an das eingesetzte Material: Pro Maus-Aorta wurden 30 µl und pro ½ Maus-Herz 50 µl Wasser (RNase frei) zugegeben.

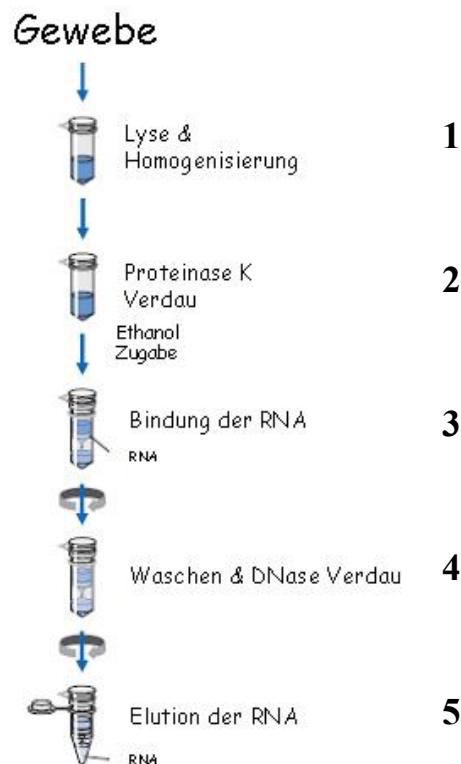


Abbildung 26. Prinzip der RNA-Isolierung nach dem Protokoll von Qiagen. Homogenisierung des Gewebes¹²¹ wurde im Kit enthaltenen Lyse-Puffer im QIAGEN Tissue Lyser durchgeführt. Der nächste Schritt war der Proteinverdau mittels Proteinase K bei 55°C.¹²¹ In Schritt¹²⁶ wurde die Ethanol gefällte RNA an eine RNeasy-Mini-Spin-Säule gebunden, anschließend gewaschen und ein DNase Verdau durchgeführt (4). Nach weiteren Waschschriften wurde die RNA mit Wasser von der Säule eluiert¹²¹. Für Details siehe Text (verändert nach¹⁷²).

2.22 Bestimmung der DNA- und RNA-Konzentration

Mit Hilfe des Gerätes Nanodrop der Firma peqlab konnte nach der Isolation die Konzentration und die Reinheit der präparierten Nukleinsäuren mit nur 2 µl Probenvolumen bestimmt werden. Durch die Bestimmung der optischen Dichte (OD) bei 260 nm (Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren) wurde die RNA Konzentration berechnet. Durch gleichzeitige Messung der optischen Dichte bei 280 nm, also der Bestimmung des Protein- bzw. Phenolgehalts der Probe und Bildung des Quotienten dOD_{260} / OD_{280} konnte die Reinheit der isolierten RNA errechnet werden. War der Koeffizient OD_{260} / OD_{280} geringer als 1,8, so musste davon ausgegangen werden, dass die Probe mit Protein oder aromatischen Verbindungen (z.B. Phenol) verunreinigt war, was eine erneute Aufreinigung erforderlich machte. Lag der Koeffizient zwischen 1,8 und 2, wurde die Konzentration der Probe nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Konzentration der RNA [ng/}\mu\text{l]} = OD_{260} \times \text{Verdünnung} \times 40$$

Alle so bestimmten Proben wurden auf eine Konzentration von 200 ng/µl eingestellt, wovon anschließend immer gleiche Volumina von 2,5 µl pro Well, was 500 ng RNA entsprach, in die PCR eingesetzt werden konnten.

2.24 Reverse Transkription

Um die Transkription von bestimmten Genen zu untersuchen, musste zusätzlich zum Protein auch die zugehörige RNA nachgewiesen werden. Dazu wurde die RNA, aus Aorten- und Herzgewebe isoliert. Da allerdings die benutzte Taq-Polymerase in der Methode der „real time-PCR“ zur Verwendung DNA-Matrizen erfordert, musste die isolierte RNA in cDNA (complementaryDNA) umgeschrieben werden.

Die Methode der „Reversen Transkription“ basiert auf natürlich vorkommenden RNA-abhängigen DNA-Polymerasen^{173, 174} (reverse Transkriptasen), die ein Umschreiben von RNA in DNA ermöglichen.^{175, 176} Auch die reverse Transkriptase benötigt, wie andere DNA-Polymerasen sogenannte Primer. Diese können unspezifisch gewählt werden oder spezifische Bereiche eingrenzen.

Die reverse Transkription und die nachfolgende „real time-PCR“ wurden in dieser Arbeit wie von der Herstellerfirma empfohlen, in einem Schritt (one-Step-Methode) in der so genannten qRT-PCR durchgeführt. Nachfolgend wird die „real time-PCR“ ausführlicher beschrieben.

2.25 Real time-PCR (qRT-PCR)

Die „real time-PCR“ basiert auf der herkömmlichen PCR mit zusätzlicher Möglichkeit zur Quantifizierung der neu gebildeten DNA.¹⁷⁷ Die verwendete Methode der TaqMan®-Sonden macht sich zwei Prinzipien zu Nutze: die FRET-Technologie („Fluorescence Resonance Energy Transfer“)¹⁶⁸ sowie die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der Taq-Polymerase.

Beim Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer¹⁷⁸ wird die Energie eines angeregten Fluoreszenzfarbstoffs (Donor-Fluorophor) strahlungsfrei über Dipol-Dipol-Wechselwirkungen auf einen zweiten Fluoreszenzfarbstoff (Akzeptor-Fluorophor) übertragen.^{168, 177, 179} Dabei ist die Entfernung von Donor- und Akzeptor-Fluorophor von entscheidender Bedeutung.¹⁷⁸ Detektiert werden kann FRET über eine Ab- oder Zunahme der Fluoreszenz¹⁷⁸. Um dieses Prinzip nutzen zu können, stützt sich die TaqMan®-Methode zusätzlich auf die hier essentielle 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der Taq-Polymerase.

Die spezifischen Primer grenzen den Zielbereich auf der DNA ein (Abbildung 27 a)¹⁸⁰. Die TaqMan®-Sonden sind wie folgt aufgebaut: Sie enthalten eine spezifische Zielsequenz (ca. 30 Nukleotide) für die Anlagerung an die Matrize, am 3'-Ende einen nicht-fluoreszierenden niedrigerenergetischen Quencher (Q) und am 5'-Ende den fluoreszierenden höherenergetischen Reporter (R). Basierend auf dem FRET-Prinzip gibt der Reporter seine Energie nichtfluoreszierend an den Quencher in seiner Nähe ab. Dadurch wird bei intakter Sonde das Fluoreszenzsignal unterdrückt (Abbildung 27 b).¹⁸⁰ Erreicht die Taq-Polymerase die TaqMan®-Sonde, wird diese von der Matrize abgehoben (Abbildung 27 c) und durch die 5'-3'-Exonuklease Aktivität der Taq-Polymerase abgeschnitten. Der Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer¹⁷⁸ kann durch die größere Entfernung zwischen Reporter und Quencher nicht mehr stattfinden, wodurch der Reporter die Energie in Form von detektierbarer Fluoreszenz abgibt (Abbildung 27 d).¹⁸⁰ Im weiteren Verlauf wird die TaqMan®-Sonde komplett von der Matrize abgelöst und der Synthesebereich komplettiert (Abbildung 27 e). Bei jedem Zyklus wird also der Reporter von seinem energieaufnehmenden Quencher getrennt, wodurch das Verhältnis der steigenden Fluoreszenz proportional zur synthetisierten Menge des Amplicons ist.

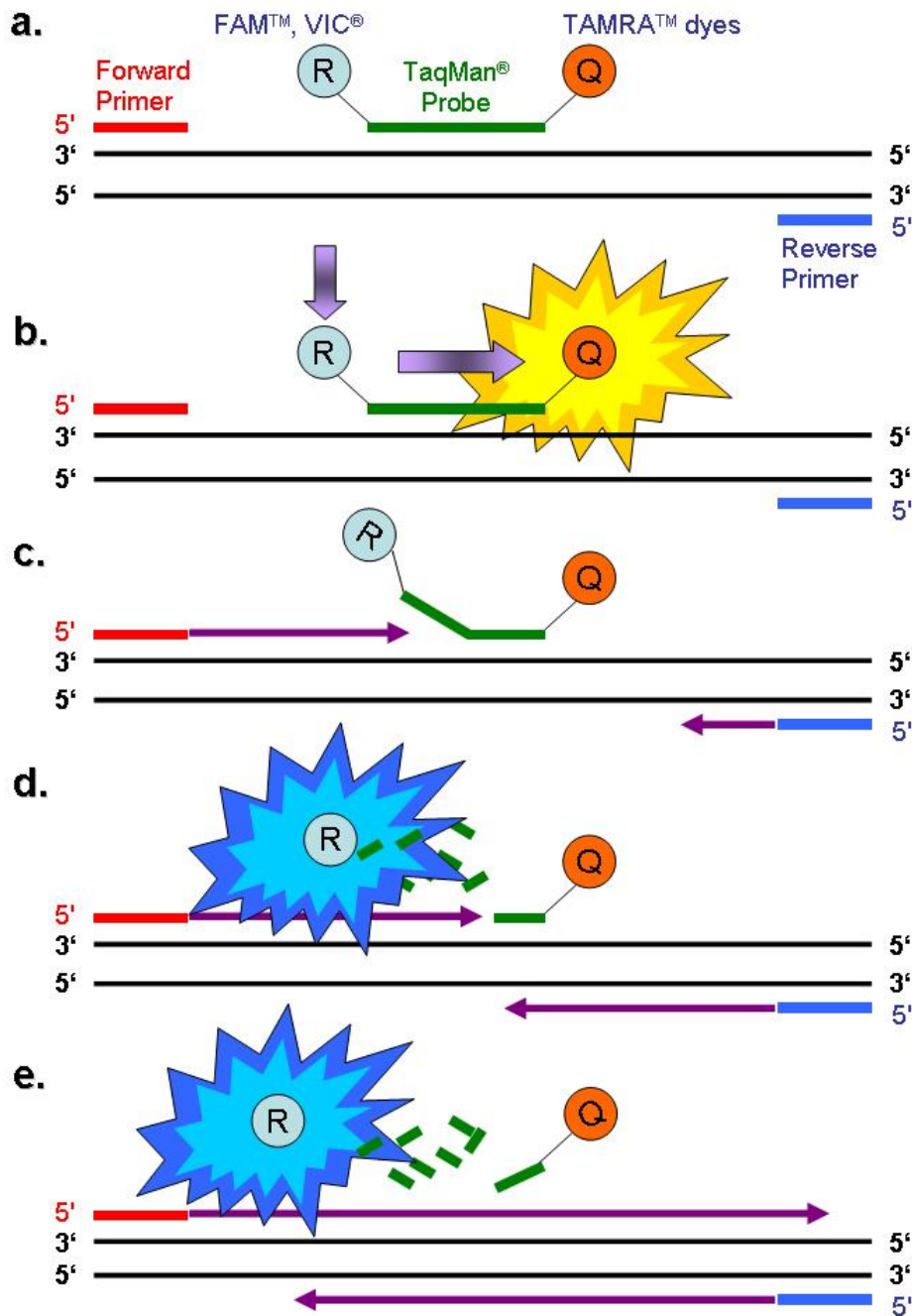


Abbildung 27. Schematische Darstellung des real time-PCR-Prinzips: a. Anlagerung der spezifischen Primer und der TaqMan®-Sonde, die downstream zu einem Primer anlagert; b. Übertragung der Energie durch FRET, vom hochenergetischen Reporter zum niedrigenergetischen Quencher (gelbe Zackenfigur); c. die Taq-Polymerase verdrängt die TaqMan®-Sonde; d. durch die 5'-3'-Exonuklease Aktivität der Taq-Polymerase wird der Reporter von der TaqMan®-Sonde abgetrennt, wodurch FRET blockiert wird, der Reporter sendet ein detektierbares Fluoreszenzsignal (blaue Zackenfigur); e. die Taq-Polymerase trennt den Rest der Sonde von der Matrize ab und komplettiert das Amplicon. Gelbe Wolke = vom Quencher aufgenommene Energie; blaue Wolke = vom Reporter freigesetzte Energie (verändert nach¹⁸⁰).

Benutzt wurde das QuantiTect™ Probe RT-PCR Kit von QIAGEN. Die Primer und Sonden für die qRT-PCR wurden als „TaqMan® Gene Expression Assays“ von der Firma Applied Biosystems (Tabelle 2) bezogen. Es wurden 2,5 µl (500 ng RNA) der aufgereinigten RNA pro Well eingesetzt. Nachfolgend beschrieben der PCR-Ansatz:

2X QuantiTect™ Probe RT-PCR Master Mix	12,5	µl
RNase free H ₂ O	8,5	µl
Primer ABI	1,25	µl
Template RNA	2,5	µl
<hr/>		
Totales Volumen	25,0	µl

Während der PCR erstellte die zugehörige Software des ABI7900HT eine Amplifikationskurve, wobei die Fluoreszenz des Reporterfarbstoffs auf der y-Achse gegen den entsprechenden PCR-Zyklus auf der x-Achse aufgetragen wurde.

Bei der Berechnung der Fluoreszenz wurde ebenfalls vom System ein Basiswert bzw. das „Hintergrundrauschen“ abgezogen. Dieser Wert setzte sich aus den gemessenen Fluoreszenzwerten der ersten Zyklen zusammen, in denen kein Anstieg stattfand.

Als interner Standard wurde ein so genanntes Haushalts-Gen benutzt (z.B. das TataBoxBindingProtein), das eine von der Behandlung des Tieres unabhängige und dem Zielgen ähnliche Expression zeigte.

Auswertung der qRT-PCR

Der C_T-Wert („threshold cycle“) bezeichnet denjenigen PCR-Zyklus innerhalb der exponentiellen Phase der Amplifikation, bei dem die Amplifikationskurve einen Schwellenwert übersteigt. Dieser Schwellenwert bezeichnet den Wert, ab dem ein deutlicher Anstieg der Fluoreszenz detektiert werden kann. Dieser Wert wird vom System sowohl für das standardisierte Haushalts-Gen als auch für das zu untersuchende Zielgen ermittelt.

Zur Auswertung wurde der C_T -Wert des Haushalts-Gens vom C_T -Wert des Zielgens subtrahiert. Um die verschiedenen Behandlungsgruppen miteinander vergleichen zu können, wurden die unterschiedlichen C_T -Werte mit der jeweiligen Kontrollgruppe verglichen¹⁸¹:

$$C_T\text{-Wert Zielgen} - C_T\text{-Werte Haushaltsgen} = \Delta C_T$$

C_T = threshold cycle = Zyklusnummer, bei dem die Fluoreszenzschwelle überschritten wird

$$\Delta C_T \text{ Behandlungsgruppe} - \text{Mittelwert}(\Delta C_T \text{ Kontrollgruppe}) = \Delta \Delta C_T$$

$$\text{Relative Expression} = 2^{-(\Delta \Delta C_T)}$$

PCR-Bedingung

Reverse Transkription:	50° C	30 Minuten
Initiale Aktivierung:	95° C	15 Minuten
Denaturierung	95° C	15 Sekunden
Annealing / Elongation:	60° C	1 Minuten

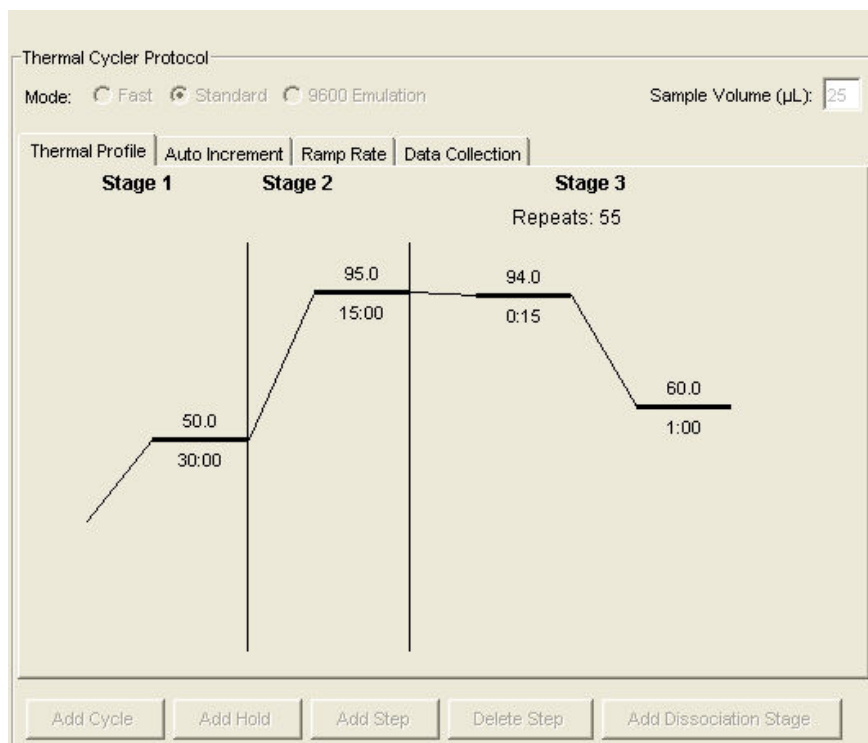


Abbildung 28. PCR-Bedingungen der qRT-PCR: Darstellung des Applied Biosystems System. Graphische Darstellung des Temperaturverlaufs mit Temperatur- (oben) und Zeitangaben (unten). Stage 1 entspricht der reversen Transkription, Stage 2 & 3 der quantitativen PCR.

Tabelle 2. Sequenzspezifische „TaqMan® Gene Expression Assays“ der Firma Applied Biosystems.

Gen Symbol	Assay ID (Applied Biosystems Germany)
VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule 1)	Mm00449197_m1
Nox4 (NADPH oxidase 4)	Mm00479246_m1
Cyba (Cytochrome b-245 alpha, p22phox)	Mm00514478_m1
Cybb (Cytochrome b-245 beta, Nox2)	Mm0043775_m1
Nos2 (inducible NOS)	Mm00440485m1
Ptgs2 (Prostaglandin-endoperoxide synthase 2, COX-2)	Mm00478374_m1

2.26 Detektion von ROS in Aortensegmenten

Dihydroethidin¹⁸² hat sich als Fluoreszenz-Farbstoff für die Messung von Superoxidanio-
nen (aber auch anderen ROS) in biologischen Proben sehr bewährt¹⁴³. Daher ist es möglich,
ROS-Quellen in Gewebe wie Aortensegmenten zu lokalisieren. Abbildung 29 zeigt die Oxi-
dation von DHE unter der Bildung von Ethidium.

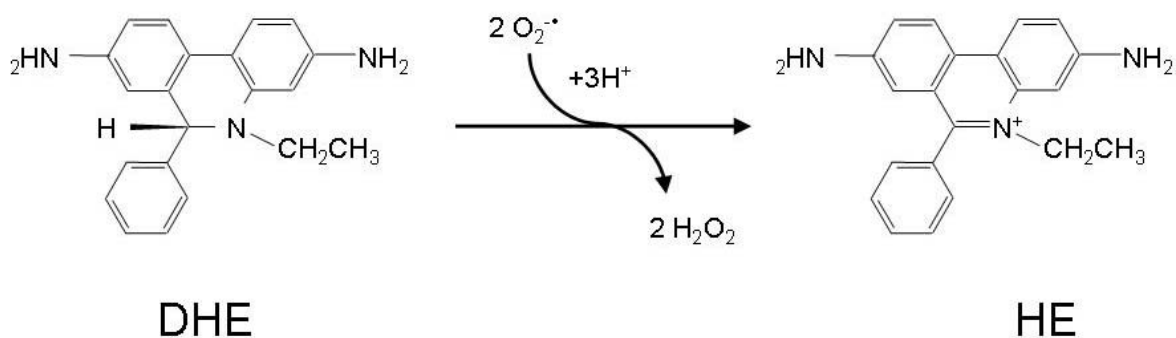


Abbildung 29. Oxidation von Dihydroethidin zu Ethidium.

Die Aortensegmente wurden kurz nach der Entnahme in Tissue-Tek O.C.T.TM-Compound eingebettet und langsam über flüssigem Stickstoff eingefroren. Diese Aortenstücke (3 – 4 mm) wurden dann mit Hilfe eines Cryostaten in 8 µm dicke Segmente geschnitten und auf Objektträger überführt. Diese Objektträger wurden bis zur weiteren Bearbeitung auf Trockeneis transportiert bzw. bei -80° C gelagert. Bei der Färbung wurde der Objektträger direkt aus der -80° C-Lagerung auf einen 37° C warmen Heizblock überführt, die Aortensegmente mit DHE-Lösung (1µM DHE, 0,5% DMSO) beträufelt und 30 Minuten inkubiert. Nach der Inkubation wurde ein Großteil der DHE-Lösung vom Objektträger abgesaugt, dieser mit einem Deckglas (eingefettete Seiten schützen die Aortensegmente vor Austrocknung) abgedeckt und mit einem Fluoreszenzmikroskop bei 400facher Vergrößerung ausgewertet.

2.27 Elektronen-Spin-Resonanz-Spektroskopie (ESR)

Jedes Elektron (e^-) hat ein magnetisches Moment (Elektronenspin) und eine Spinquantenzahl $s = \frac{1}{2}$ mit zugehörigen magnetischen Komponenten $m_s = -\frac{1}{2}$ und $m_s = +\frac{1}{2}$.¹⁸³⁻¹⁸⁵ In einem Magnetfeld der Stärke B_0 richtet sich das magnetische Moment des Elektrons entweder parallel $m_s = -\frac{1}{2}$ oder antiparallel $m_s = +\frac{1}{2}$ zum Magnetfeld aus. Jede dieser Ausrichtungen besitzt ein spezifisches Energieniveau, wobei die parallele Ausrichtung mit dem niedrigeren Energiestatus korrespondiert, während die antiparallele dem höheren Energiestatus entspricht. Die Energiedifferenz (ΔE) des niedrigen zum hohen Energielevel des Elektrons entspricht der folgenden Gleichung und wird als Zeeman-Effekt bezeichnet:

$$\Delta E = g_e \cdot \mu_B \cdot B_0$$

g_e = Elektronen g-Faktor

μ_B = Bohrsches Magneton

B_0 = Feldstärke

Durch die Gleichung wird ersichtlich, dass die Aufspaltung der Energieniveaus direkt proportional zur magnetischen Feldstärke ist. Dargestellt in der Graphik, Abbildung 30.

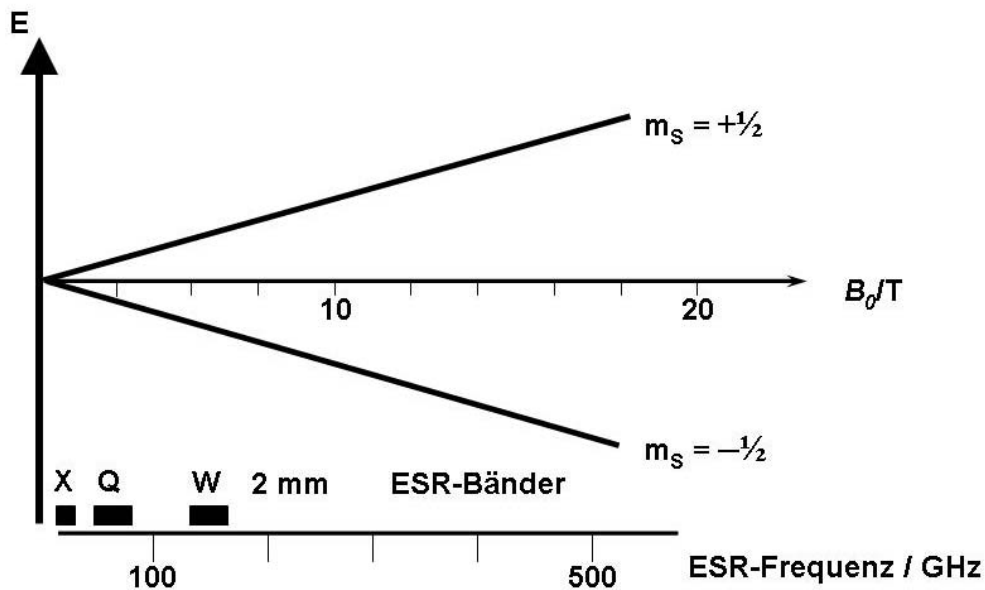


Abbildung 30. Elektronenspin und Energieverteilung im Magnetfeld in Abhängigkeit von der Feldstärke. Die Ausrichtung des magnetischen Moments eines Elektrons im Magnetfeld ist entweder parallel ($m_s = -\frac{1}{2}$) oder antiparallel ($m_s = +\frac{1}{2}$). Dargestellt ist die Proportionalität der Gleichung $\Delta E = g_e \cdot \mu_B \cdot B_0$

Ein freies Elektron kann durch Absorption oder Emission elektromagnetischer Resonanzenergie zwischen den beiden Energieniveaus wechseln. Diese Absorption bzw. Emission der Resonanzenergie kann mit Hilfe eines X-Band-Spektrometer-Miniskops (Firma Magnettech, Berlin; in Kooperation mit Dr. Andrei Kleschyow) detektiert werden.

Der Stickstoffmonoxid-Gehalt in Aortensegmenten wurde in dieser Arbeit mittels eines Spin-Traps, Eisen (II)-Diethyldithiocarbamat ($\text{Fe}(\text{DETC})_2$), untersucht.^{186, 187} Stickstoffmonoxid bildet einen Komplex mit $\text{Fe}(\text{DETC})_2$, wodurch die Detektion im Gewebe möglich wird. Die isolierten Aortensegmente wurden in 24-Well-Platten in Krebs-Hepes-Puffer überführt, Spin-Trap Suspension (250 μM final) zugegeben und 30 Minuten bei 37° C inkubiert.^{116, 188} Nach der Inkubation wurden die Aortensegmente in flüssigem Stickstoff schockgefroren und in einem temperaturkontrollierten Dewar-Gefäß in drei Wiederholungen gemessen.^{186, 187} Die Messungen wurden unter folgenden Voraussetzungen durchgeführt: ESR-Spektren wurden unter flüssigem Stickstoff aufgezeichnet. Die Mikrowellen-Stärke betrug 10 mW, die Amplitudenmodulation 10 mT, die Modulationsfrequenz 100 kHz und die Durchlaufzeit 60 Sekunden. Nicht-stimulierte Aortensegmente zeigten nach der Inkubation mit $\text{Fe}(\text{DETC})_2$ Spin-Trap ein charakteristisches Triplet-ESR-Signal (Abbildung 31), wobei die

Intensität des Signals die absolute Menge des NO-Fe(DECT)₂-Komplexes darstellte, der während der Inkubation der Aorten mit der kolloidalen Suspension von Fe(DECT)₂ gebildet wurde.¹⁸⁷

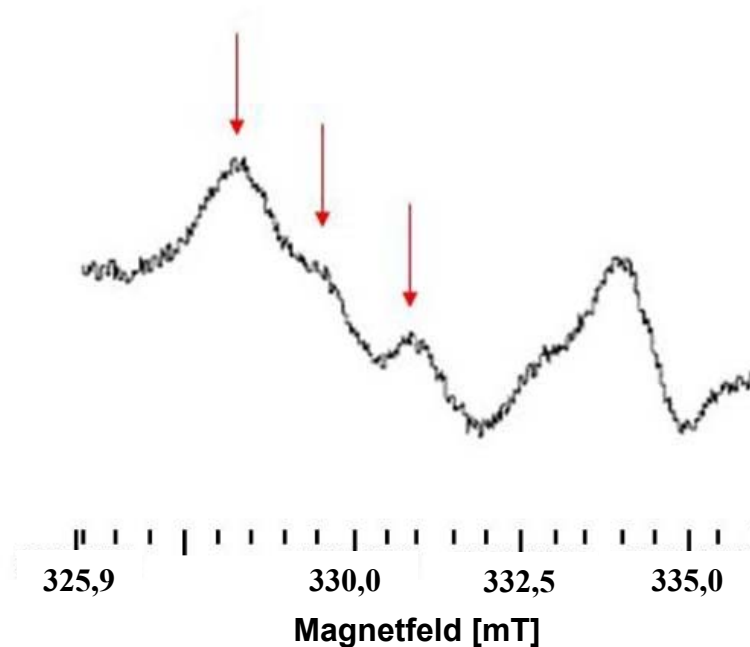


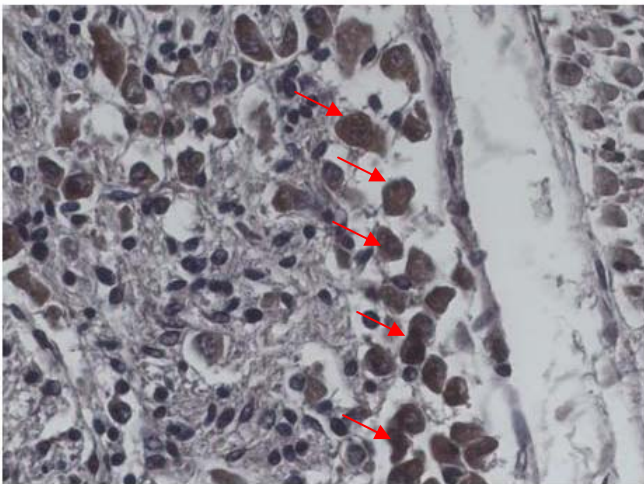
Abbildung 31. Typisches ESR-Signal-Triplet des NO-Fe(DECT)₂ (verändert nach¹⁸⁷). Nach der Komplexierung von Fe(DECT)₂ und NO bei 37° C für 30 Minuten, kann dieses typische Spin-Trap Triplet ESR Signal im Magnetfeld detektiert werden. Die Intensität des Signals entspricht dabei der absoluten Menge des gebildeten Komplexes aus Fe(DECT)₂ und NO.

2.28 Immunhistochemie

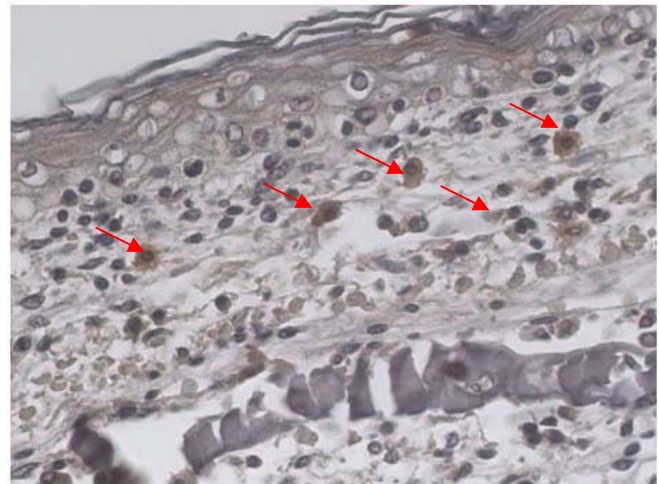
Die Immunhistochemie wurde durchgeführt, um die gp91^{phox} (=NOX-2)-Expression und die Bildung des Peroxynitrits (hier als Surrogat Nitrierung von Tyrosinresten) zu lokalisieren. Dazu wurden intakte Aorten direkt nach der Entnahme in Paraformaldehyd (4%) überführt, in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und nach Xylolbehandlung nach einer standardisierten Methode in Paraffin eingebettet. Das Schneiden erfolgte mit Hilfe eines Mikrotoms der Firma Leica bei einer Schnittdicke von 5 µm. Schnitte wurden auf einen Objektträger überführt und 2 – 3 Tage bei 37° C getrocknet. Nach der Entparaffinierung in einer absteigenden Alkoholreihe und dem Waschen in Wasser erfolgte die histochemische Behandlung der Schnitte. Die beiden oben genannten Antikörper wurden nach der Standardanleitung des VECTOR M.O.M Peroxidase-Kits durchgeführt (Verdünnung des Primärantikörpers 1 : 100).

Zur Antigendemaskierung wurden die Schnitte in einem Dampfgarer mit Target-Retrieval-Solution (pH 9) vorbehandelt. Um falsch positive Ergebnisse ausschließen zu können, wurden zwei Negativkontrollen mitgeführt (PBS bzw. IgG₁ Negativ-Kontrolle statt des Primärantikörpers). Die Gegenfärbung wurde der Behandlung mit den Antikörpern angeschlossen und zeigte die mit Hämatoxylin blau gefärbten Nuklei.

Vor dem Eindecken der Objektträger wurden die Schnitte mit Hilfe einer ansteigenden Alkoholreihe wieder entwässert und mit Entellan® eingedeckt. In Abbildung 32 sind die Positivkontrollen (muriner Embryo) der einzelnen angewandten Antikörper dargestellt.



Probe: Maus-Embryo
Schnittdicke 5 µm
Primärantikörper: Anti-Nitrotyrosin
(Gegenfärbung Hämatoxylin)



Probe: Maus-Embryo
Schnittdicke 5 µm
Primärantikörper: Anti-gp91^{phox} (= NOX-2)
(Gegenfärbung Hämatoxylin)

Abbildung 32. Immunhistochemie von Maus-Embryonen – Ausschnitte eines unbestimmten Bereichs; links Primärantikörper Anti-Nitrotyrosin (braune Färbung entspricht positivem Signal); rechts Primärantikörper Anti-gp91^{phox} (braune Färbung entspricht positivem Signal, markiert durch rote Pfeile); als Gegenfärbung wurde Hämatoxylin verwendet.

3. Ergebnisse

Der Ergebnisteil wird in zwei Hauptbereiche unterteilt. Zunächst werden die Ergebnisse der „Effekte der Aktivierung der AMPK im oxidativen Stress und in endothelialer Dysfunktion“ aufgeführt. Der zweite Schwerpunkt, die „Effekte der Inaktivierung der AMPK durch genetische Deletion der alpha 1 Untereinheit“, wird anschließend behandelt. Für alle statistischen Auswertungen und Vergleiche wurde ein einfacher Bonferroni-Test angewendet.¹⁸⁹

3.1 Effekte der Aktivierung der AMPK

Die durch Angiotensin II induzierten Hypertonie^{35, 104, 105} (AT II-Dosis: 1 mg / kg / d) wurde genutzt, um oxidativen Stress und endotheliale Dysfunktion in Mäusen zu erzeugen. Um die Effekte der AMPK-Aktivierung untersuchen zu können, wurde ein spezifischer AMPK-Aktivator, 5-Aminoimidazol-4-carboxamid-1-beta-d-ribonucleosid (AICAR) durch subkutane Injektion verabreicht (AICAR-Dosis: 200 mg / kg / Tag). Die Untersuchungen wurden an folgenden Tiergruppen durchgeführt:

Tabelle 3. Untersuchte Tiergruppen zur Analyse von Effekten der Aktivierung der AMPK mittels AICAR.

CTR (Kontrolle)	NaCl	0,9% Lsg.
	PBS	200 µl
AICAR	NaCl	0,9% Lsg.
	AICAR	200 mg/kg/Tag
AT II	Angiotensin II	1 mg/kg/Tag
	PBS	200 µl
AT II + AICAR	Angiotensin II	1 mg/kg/Tag
	AICAR	200 mg/kg/Tag

3.1.1 Überprüfung der AMPK-Aktivierung mittels Western Blot

Da die AMPK zur vollständigen Aktivität unter anderem die Phosphorylierung der alpha-Untereinheit an Threonin 172 benötigt, konnte diese spezifische Phosphorylierung als „Aktivierungsmarker“ genutzt werden. Ob AICAR die AMPK-Aktivität beeinflusst, wurde durch Test auf die aktivierungsassoziierte Phosphorylierung mittels Western Blot überprüft (siehe 2.20). Ein Maß für die Effektivität der AICAR-induzierten AMPK-Aktivität ist die Phosphorylierung des AMPK abhängigen Enzyms, Acetyl-CoA-Carboxylase (siehe 2.16 – 2.21).

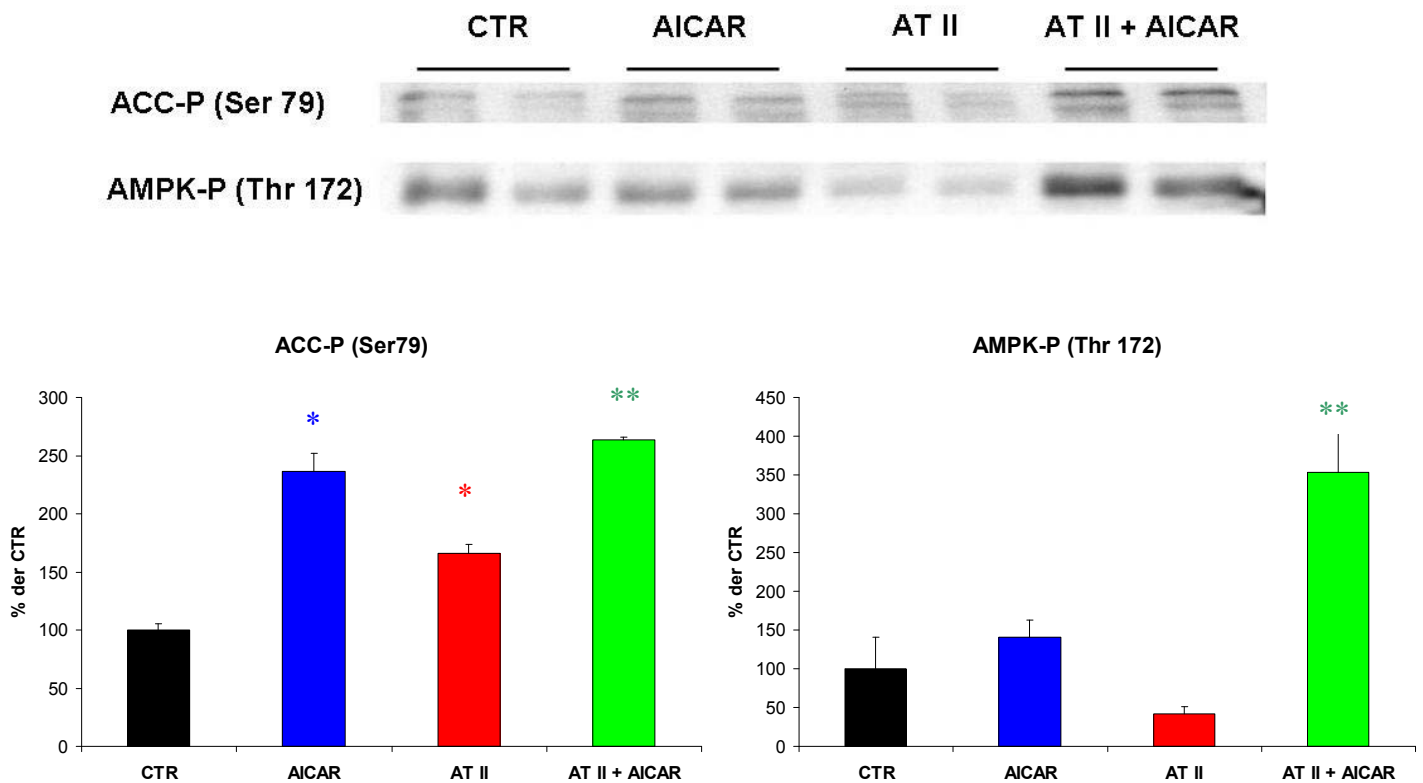


Abbildung 33. Effekte von AICAR auf die Phosphorylierung von AMPK und ACC. Die Western Blots zeigen ACC-Phosphorylierung an Serin 79 und AMPK-Phosphorylierung an Threonin 172. Mittelwerte als % der Kontrolle CTR \pm SEM, CTR = 100% (n = 6). Die Behandlung mit AICAR führte zu einer Steigerung der AMPK- und ACC-Phosphorylierung; die Behandlung mit Angiotensin II plus AICAR führte zu einer signifikant höheren Steigerung der AMPK- und ACC-Phosphorylierung im Vergleich zur Behandlung nur mit Angiotensin II. Für Signifikanzangaben siehe Tabelle 4. * \approx p < 0,05 vs. CTR; ** \approx p < 0,05 vs. AT II.

Tabelle 4: Densitometrische Auswertung der ACC- bzw. AMPK-Phosphorylierung; Mittelwerte in % der CTR \pm SEM; CTR = 100% und Signifikanzangaben ($p < 0,05$ nach Bonferroni-Test).

ACC- Phosphorylierung (Serin 79)	Mittelwert	+/- SEM	* $p < 0,05$ zu CTR ** $p < 0,05$ zu AT II
CTR	100	5,7	
AICAR	237	15,0	*
AT II	166	7,8	*
AT II + AICAR	264	2,2	**
AMPK- Phosphorylierung (Threonin 172)			
CTR	100	40,9	
AICAR	141	22,4	<i>n.s.</i>
AT II	41	10,2	<i>n.s.</i>
AT II + AICAR	354	50,4	**

Abbildung 33 und Tabelle 4 zeigen die Aktivierung der AMPK durch AICAR und den Effekt von Angiotensin II. Die Behandlung mit AICAR erhöhte die Phosphorylierung der AMPK von $100 \pm 40,9$ % der Kontrollgruppe auf $141 \pm 22,4$ %. Die Behandlung mit Angiotensin II reduzierte die Phosphorylierung der AMPK auf nur noch $41 \pm 10,2$ % im Vergleich zur Kontrollgruppe, während die gleichzeitige Behandlung mit Angiotensin II und AICAR die Aktivität signifikant auf das 3fache ($354 \pm 50,4$ %) steigerte.

Die AMPK-abhängige Phosphorylierung der Acetyl-CoA-Carboxylase erhöhte sich nach der Behandlung mit AICAR auf $237 \pm 15,0$ %, aber auch die Behandlung mit Angiotensin II steigerte die inhibierende Phosphorylierung an Serin 79 auf $166 \pm 7,8$ %. Die Co-Therapie mit Angiotensin II plus AICAR führte zu einer signifikanten Steigerung der Phosphorylierung der Acetyl-CoA-Carboxylase auf $264 \pm 2,2$ % (siehe Tabelle 4).

3.1.2 Analyse der Gefäßfunktion mittels isometrischer Tonusstudien

Zur Analyse der Gefäßfunktion wurden isometrische Tonusstudien an isolierten Mauseartrienringen, d.h. *ex vivo* durchgeführt (siehe 2.15). Die Relaxation des Gefäßes wurde sowohl über die maximale Relaxation („efficiency“) als auch über die „potency“, den so genannten pD_2 -Wert angegeben (pD_2 entspricht $-\log(EC_{50})$).¹⁵⁸ Dabei wird die Effizienz als maximale

Relaxation definiert, die mit der höchsten verwendeten Vasodilator-Konzentration erreicht wurde.

Wie in Abbildung 34 (ACh Kurve) dargestellt, zeigte die endothelabhängige Relaxation, die durch kumulative Gaben von Acetylcholin analysiert wird, durch Angiotensin II-Behandlung eine deutliche Reduktion (maximale Relaxation $15 \pm 3,3 \%$ ab, $pD_2: -6,8 \pm 0,200$) im Vergleich zu entsprechenden Kontrolltieren (max. Relaxation bei $59 \pm 4,2 \%$, $pD_2: -7,6 \pm 0,248$). AICAR behandelte Tiere zeigten im Gegensatz dazu keine Abweichung in der Relaxationsfähigkeit (max. Relaxation bei $58 \pm 4,0 \%$) im Vergleich zu den entsprechenden Kontrolltieren.

Durch die gleichzeitige Gabe von Angiotensin II und AICAR konnte die verringerte endothelabhängige max. Relaxation der Angiotensin II-Gruppe ($15 \pm 3,3 \%$) annähernd wieder normalisiert werden und zeigte eine signifikant gesteigerte maximale Relaxationsfähigkeit bei $44\% \pm 5,8 \%$ ($pD_2: -7,4 \pm 0,146$).

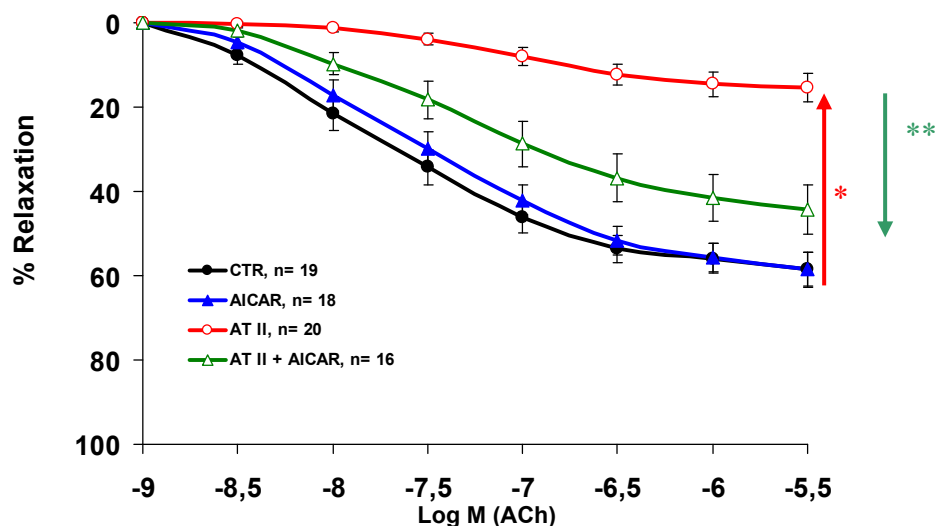


Abbildung 34. Endothelabhängige Relaxation von präparierten Aortensegmenten (4 mm) in Organbadanlagen. Angegeben ist die prozentuale Relaxation nach Acetylcholingabe (Mittelwerte \pm SEM, $n = 16 - 20$). Die Behandlung mit Angiotensin II führte zu einer signifikanten Reduktion der Relaxationsfähigkeit auf Acetylcholingabe, die jedoch durch die gleichzeitige Behandlung mit AICAR wieder signifikant gesteigert werden konnte (siehe Tabelle 5). Für Signifikanzangaben siehe Tabelle 5. * $\approx p < 0,05$ vs. CTR; ** $\approx p < 0,05$ vs. AT II.

Tabelle 5. Relaxation durch Acetylcholin; Darstellung der pD_2 -Werte ($= -\log(EC_{50})$) und Signifikanzwerte ($p < 0,05$ nach Bonferroni-Test).

Acetylcholin-induzierte Relaxation	pD_2	+/- SEM	* $p < 0,05$ zu CTR ** $p < 0,05$ zu AT II
CTR	7,6	0,248	
AICAR	7,6	0,131	<i>n.s.</i>
AT II	6,8	0,200	*
AT II + AICAR	7,4	0,146	**

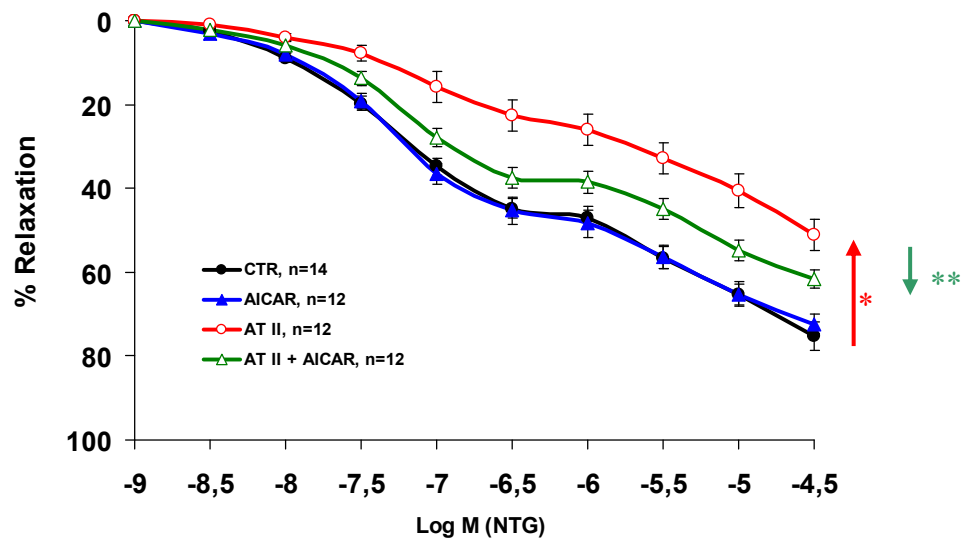


Abbildung 35. Endothelunabhängige Relaxation von präparierten Aortensegmenten (4 mm) in Organbadanlagen (Mittelwerte \pm SEM, $n = 12 - 14$), prozentuale Relaxation auf Nitroglyzeringabe. Die Behandlung mit Angiotensin II führt zu einer signifikanten Reduktion der Relaxationsfähigkeit auf Nitroglyzeringabe, was durch die Co-Behandlung mit AICAR wieder signifikant gesteigert werden kann. Für Signifikanzangaben siehe Tabelle 6. * $\approx p < 0,05$ vs. CTR; ** $\approx p < 0,05$ vs. AT II.

Tabelle 6. Nitroglycerin-Konzentration; Darstellung der pD_2 -Werte und Signifikanzwerte ($p < 0,05$ nach Bonferroni-Test).

Nitroglycerin-induzierte Relaxation	pD_2	+/- SEM	* $p < 0,05$ zu CTR ** $p < 0,05$ zu AT II
CTR	6,9	0,033	
AICAR	7,0	0,810	<i>n.s.</i>
AT II	6,1	0,212	*
AT II + AICAR	6,7	0,109	**

Bei der endothelunabhängigen Relaxation wird die Funktion der Gefäßmuskulatur untersucht. Dazu wird statt des endothelabhängigen Vasodilators Acetylcholin der endothelunabhängige Vasodilator Nitroglycerin eingesetzt. Auch hier zeigte sich (Abbildung 35), dass Angiotensin II-Behandlung eine Reduktion der max. Relaxation auf $51 \pm 3,7\%$ (pD_2 : $-6,1 \pm 0,212$) bewirkte im Vergleich zu Kontrolltieren, deren max. Relaxation bei $70 \pm 5,9\%$ (pD_2 : $-6,9 \pm 0,033$) lag. Durch die AICAR-Behandlung wurde die endothelunabhängige Relaxation bei Kontrolltieren nicht signifikant beeinflusst (max. Relaxation bei $72 \pm 2,3\%$ (pD_2 : $-7,0 \pm 0,810$)). Bei gleichzeitiger Behandlung von Angiotensin II und AICAR wurde die verringerte endothelunabhängige max. Relaxation beinahe wieder auf Normalniveau angehoben ($62 \pm 2,2\%$, pD_2 : $-6,7 \pm 0,109$).

3.1.3 Telemetrische Messung des arteriellen Blutdrucks

Diese Untersuchung wurde an zwei unterschiedlichen Tiergruppen durchgeführt, um festzustellen, ob die günstigen Effekte der AMPK-Aktivierung auf die Senkung des arteriellen Druckes zurückzuführen waren (siehe 2.10). Um stressinduzierte Veränderungen des Blutdruckes zu vermeiden, wurden die Tiere schon 24 Stunden vor der Pumpenimplantation auf die Telemetrie-Plätze überführt und der basale arterielle Blutdruck aufgezeichnet. Die Aufzeichnung wurde durch die Implantationen nicht unterbrochen. Zur Auswertung verwendet wurden die Mittelwerte des arteriellen Druckes von vier Tieren pro Gruppe.

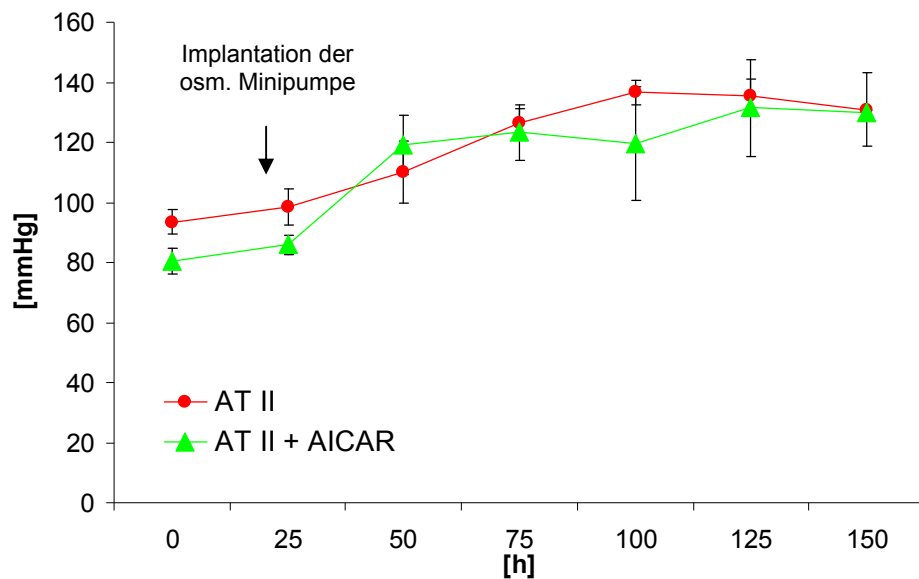


Abbildung 36. Mittlerer arterieller Blutdruck von Ratten, Darstellung der Mittelwerte \pm SEM (n = 4). Aufzeichnung der Werte alle 25 Stunden, Implantation der osmotischen Minipumpe zur kontinuierlichen Angiotensin II Infusion erfolgte 24 Stunden nach der ersten Messung und führte zu einem durchschnittlichen Anstieg des arteriellen Blutdruckes um ca. 30 mmHg. Die Co-Behandlung mit AICAR führte zu keiner Änderung des Blutdruckes.

Die chronische Behandlung mit Angiotensin II führte zu einem durchschnittlichen Anstieg des arteriellen Blutdruckes um ca. 30 mmHg. Die gleichzeitige Behandlung mit dem AMPK-Aktivator AICAR hatte keinen signifikanten Effekt. Damit ist es unwahrscheinlich, dass die positive AICAR-Wirkung auf die Gefäßrelaxation auf eine Normalisierung der arteriellen Hypertonie zurückzuführen sein konnte.

3.1.4 NO-Gehalt

Die Endotheldysfunktion geht in aller Regel mit einer verminderten Bioverfügbarkeit von Stickstoffmonoxid (NO) einher. NO ist der wichtigste endogene Vasodilator. Da eine verminderte NO-Bioverfügbarkeit auf eine verringerte NO-Produktion, auf eine vermehrte NO-Inaktivierung oder einer Kombination beider Faktoren beruhen kann, wurden vaskuläre NO-Mengen mit Hilfe unterschiedlicher Methoden untersucht. Es wurde der Serum-Nitritgehalt (siehe 2.11) gemessen sowie NO mittels Elektronen-Spin-Resonanz-Spektroskopie (siehe 2.27) an intakten Mauseorten bestimmt.^{124, 190}

3.1.4.1 Bestimmung des NO-Gehalts im Serum mittels des NO-Analyzers

Die Behandlung der Mäuse mit AICAR verursachte keine signifikante Veränderung der Nitritkonzentration (siehe 2.11) ($25,00 \pm 0,84$ nM) im Vergleich zur Kontrollgruppe ($23,90 \pm 0,92$ nM). Die chronische Behandlung mit Angiotensin II allerdings resultierte in einem signifikanten Anstieg der Nitritkonzentration auf $31,97 \pm 0,74$ nM im Vergleich zur Kontrollgruppe ($23,90 \pm 0,92$ nM). Die gleichzeitige Behandlung mit AICAR konnte den durch Angiotensin II verursachten Anstieg der Nitritmenge nur tendenziell auf $29,18 \pm 1,92$ nM absenken (Abbildung 37).

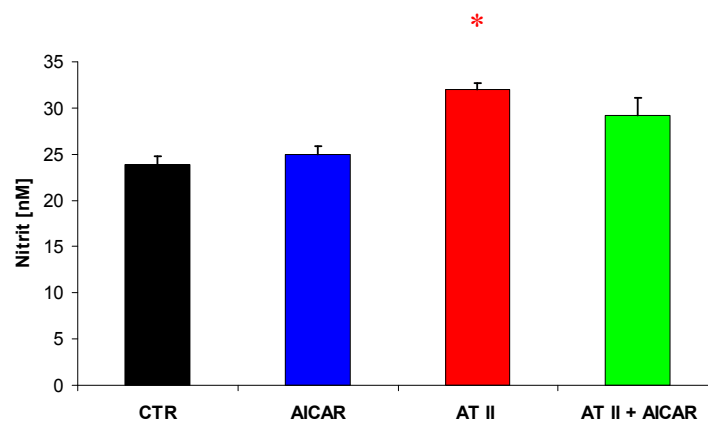


Abbildung 37. Serum-Nitrit in isoliertem Serum in Mäusen in nM. Mittelwerte \pm SEM (n = 6). Die Angiotensin II-Behandlung führte zu einem signifikanten Anstieg des Plasma Nitrits, das durch die Co-Behandlung mit AICAR nur tendenziell reduziert werden konnte. Für Signifikanzangaben siehe Tabelle 7. * $\approx p < 0,05$ vs. CTR; ** $\approx p < 0,05$ vs. AT II.

Tabelle 7. Serum Nitrit Messung; Mittelwerte \pm SEM in nM, aus n = 6 Messungen und Signifikanzangaben ($p < 0,05$ nach Bonferroni-Test).

Plasma Nitrit [nM]	Mittelwert	+/- SEM	* p<0,05 zu CTR ** p<0,05 zu AT II
CTR	23,9	0,919	
AICAR	25,0	0,838	n.s.
AT II	31,9	0,742	*
AT II + AICAR	29,2	1,921	n.s.

3.1.4.2 NO-Bioverfügbarkeit in Aortengewebe

Mit der Elektronen-Spin-Resonanz-Spektroskopie und den Fe(DECT)₂ Spin Traps konnte unter Anleitung von Dr. A Kleschyow der NO-Gehalt in isolierten Maus Aorten bestimmt werden (siehe 2.27). Es zeigte sich, dass durch die Behandlung mit AICAR der NO-Gehalt im Aortengewebe von 3.152 ± 328 AUC/mg TG (Trockengewicht) in der Kontrollgruppe auf 2.297 ± 676 AUC/mg TG gesenkt wurde (AUC ist dabei als „area under the curve“ definiert). Im Gegensatz dazu führte die chronische Behandlung mit Angiotensin II zu einem Anstieg des Signals auf 3.908 ± 409 AUC/mg TG im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die gleichzeitige Gabe von AICAR konnte das Signal tendenziell wieder senken auf 3.160 ± 640 AUC/mg TG (Abbildung 38).

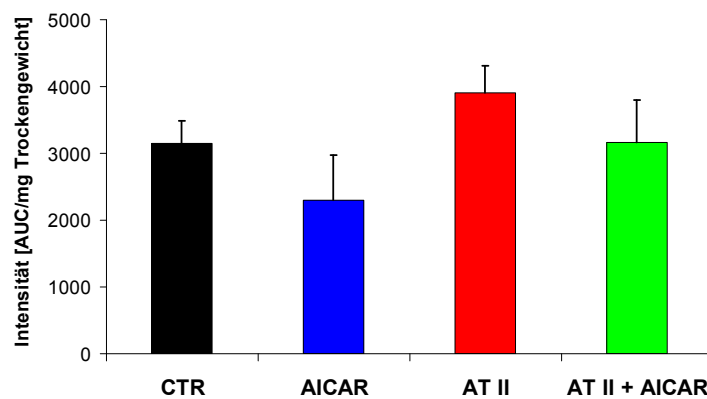


Abbildung 38. NO-Bioverfügbarkeit in Aortengewebe von Mäusen, gemessen mit Elektronen-Spin-Resonanz-Spektroskopie, Darstellung der Mittelwerte \pm SEM (n = 3). Durch die Behandlung mit AICAR wurde der NO-Gehalt im Gewebe im Vergleich zum Kontrolltier tendenziell gesenkt. Die Angiotensin II-Behandlung führte zu einem Anstieg der NO-Bioverfügbarkeit und wurde durch gleichzeitige Behandlung mit AICAR wieder reduziert. Für Signifikanzangaben siehe Tabelle 8.

Tabelle 8. NO-Bioverfügbarkeit (Mittelwerte \pm SEM (n = 3) und Signifikanzangaben (p<0,05 nach Bonferroni-Test).

NO-Bioverfügbarkeit [AUC/mg TG]	Mittelwert	+/- SEM	* p<0,05 zu CTR ** p<0,05 zu AT II
CTR	3.152	328	
AICAR	2.297	676	<i>n.s.</i>
AT II	3.908	409	<i>n.s.</i>
AT II + AICAR	3.160	640	<i>n.s.</i>

Beide Methoden zeigten, dass die Behandlung mit AICAR tendenziell eine Reduktion der vaskulären NO-Gehalte verursachte, was zunächst ungewöhnlich erschien, da AMPK durch Phosphorylierung eNOS aktivieren kann.¹⁹¹ Weiterhin widersprach die Erhöhung der NO-Gehalte in Angiotensin II-behandelten Tieren zunächst der signifikant reduzierten Endothelfunktion. Da freie Sauerstoffradikale, insbesondere Superoxidanionen, sehr schnell mit NO unter der Bildung von Peroxynitrit reagieren können, könnten diese zunächst widersprüchlichen Befunde auf die parallele Produktion von NO und Superoxidanionen zurückzuführen sein.^{192, 193} Die in diesem Fall zu erwartende Bildung von Peroxynitrit wurde daher mit Hilfe der Tyrosinnitrierung von Proteinen überprüft.

3.1.5 Tyrosinnitrierung als Maß der Peroxynitrit-Produktion

Die Endotheldysfunktion durch Angiotensin II-Behandlung der Mäuse könnte also durch verstärkte Inaktivierung von NO durch Superoxidanionen hervorgerufen werden, was eine gesteigerte Bildung von Peroxynitrit und schließlich Nitrierung von Aminosäureresten (Tyrosin) von Proteinen nach sich ziehen würde. Um die Protein-Nitrierung nachzuweisen, wurden hier mit Hilfe der Dot Blot-Technik gleiche Mengen Protein aus Herzhomogenaten auf eine Nitrozellulose-Membran aufgebracht und anschließend mit Hilfe eines monoklonalen Nitrotyrosin-Antikörpers visualisiert (siehe 2.16 – 2.21).

Die densitometrische Auswertung der optischen Dichte ergab, dass die Behandlung mit AICAR eine Reduktion der Protein-Nitrierung von ursprünglich 54.212 ± 6.482 AU (AU entspricht dabei arbitrary units oder freigewählte Einheiten) in der Kontrollgruppe auf 29.227 ± 10.242 AU hervorrief. Die chronische Behandlung mit Angiotensin II resultierte in einem sig-

nifikanten Anstieg auf 74.887 ± 5.110 AU, während die gleichzeitige Gabe von AICAR wiederum in einer Reduktion auf 47.413 ± 8.889 AU resultierte (Abbildung 39).

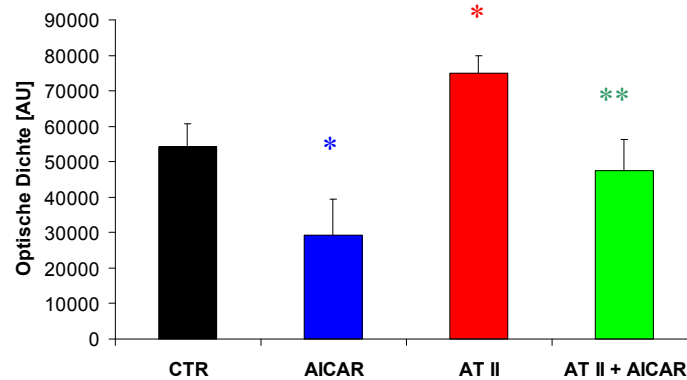


Abbildung 39. Nitrotyrosin-Markierung von Proteinen aus Herzhomogenaten aus Mäusen mittels Dot Blot-Technik und Nitrotyrosin-spezifischem Antikörper, Mittelwerte \pm SEM (n = 18). Die Protein-Nitrierung wurde durch die AICAR-Behandlung signifikant gesenkt, durch Angiotensin II signifikant erhöht. Die Behandlung mit Angiotensin II plus AICAR reduzierte die Protein-Nitrierung wieder signifikant. Für Signifikanzangaben siehe Tabelle 9. * $\approx p < 0,05$ vs. CTR; ** $\approx p < 0,05$ vs. AT II.

Tabelle 9. Nitrotyrosin-Markierung von Proteinen aus Herzhomogenaten aus Mäusen; Mittelwerte \pm SEM und Signifikanzangaben ($p < 0,05$ nach Bonferroni-Test).

Protein-Nitrierung [AU]	Mittelwert	+/- SEM	* $p < 0,05$ zu CTR ** $p < 0,05$ zu AT II
CTR	54.212	6.482	
AICAR	29.227	10.242	*
AT II	74.887	5.110	*
AT II + AICAR	47.413	8.889	**

3.1.6 ROS in intaktem Aortengewebe

Die gesteigerte Bildung von Peroxynitrit in mit Angiotensin II behandelten Tieren und die signifikante Abnahme nach der Behandlung mit AICAR deutete auf erhöhten oxidativen Stress durch die Angiotensin II-Infusion hin. Daher wurde die Superoxidproduktion in intakten Aortensegmenten untersucht (siehe 2.26). Durch die Oxidation von zugegebenem Di-

hydroethidin zu Ethidium konnten reaktive Sauerstoffspezies durch rote Fluoreszenz im Gewebe lokalisiert werden. Die Gefäßlamina fluoresziert grün.

Es zeigte sich (Abbildung 40), dass die Behandlung mit AICAR im Vergleich zu Kontrolltieren keinen erhöhten Gehalt an Superoxidradikalen in der Gefäßwand verursachte. Im Gegensatz dazu führte die chronische Behandlung mit Angiotensin II zu einem deutlich gesteigerten roten Fluoreszenzsignal, was auf erhöhten Gehalt an reaktiven Sauerstoff- & Stickstoffspezies schließen ließ. Wurde zusätzlich zur Angiotensin II-Behandlung die AMPK mittels AICAR aktiviert, konnte der Gehalt an freien Radikalen in der gesamten Gefäßwand nahezu auf Kontrollniveau verringert werden.

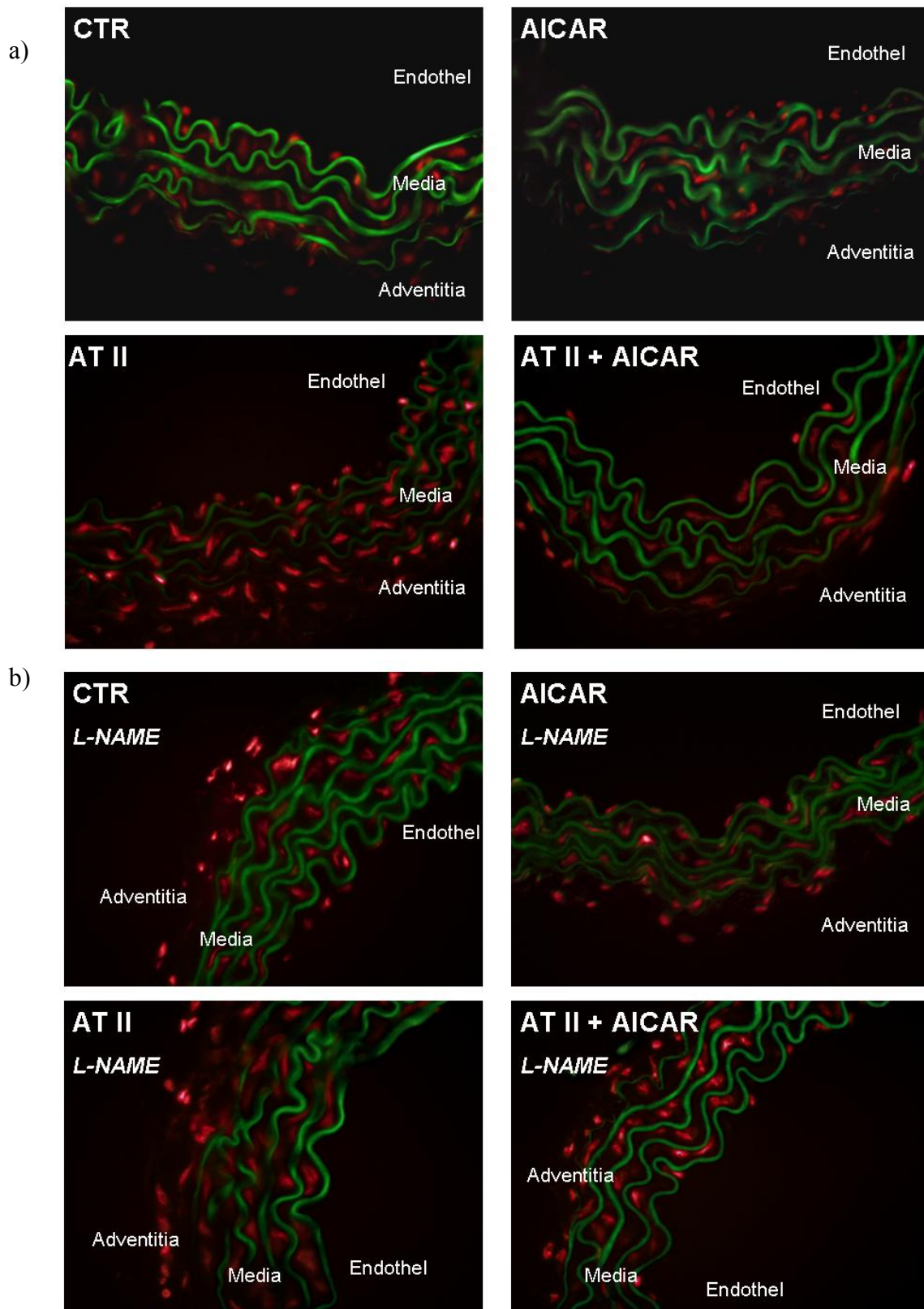


Abbildung 40. Detektion von Superoxid im intakten Aortengewebe von Mäusen, Inkubation der Aortensegmente mit Dihydroethidin, das durch Superoxidradikale zu Ethidium oxidiert wird (rote Fluoreszenz des Ethidiums, grüne Eigenfluoreszenz der Lamina) 400fache Vergrößerung; repräsentative Ergebnisse aus $n = 6$ Experimenten. a) die Aortensegmente wurden in Kontroll-Puffer inkubiert; b) Inkubation der Aortensegmente mit L-NAME, einem NOS-Inhibitor. Beschreibung der Ergebnisse im Text.

Um fest zu stellen, ob eine Entkopplung der endothelialen NO-Synthase (durch Oxidation des Co-Faktors BH₄, siehe 1.2) die Produktion von Superoxidradikalen statt NO forciert, wurden Aortensegmente vor dem Einbetten mit 0,5 mM L-NAME (N^G-Nitro-L-Arginin-methylester) einem Inhibitor der NO-Synthase für 45 Minuten bei 37°C inkubiert. Im Falle einer Entkopplung sollte L-NAME zu einer Verminderung der endothelialen ROS-Produktion (=Fluoreszenz) führen, wohingegen eine Inhibition der intakten NO-Synthase durch die Hemmung der NO-Produktion eine vermehrte endotheliale Fluoreszenz bewirken sollte. Die basal gebildeten Superoxidanionen würden in diesem Fall ja nicht mehr durch NO neutralisiert.

Es konnte gezeigt werden, dass im Endothel von *ex vivo* mit L-NAME inkubierten Aortensegmenten von Kontrolltieren die rote Fluoreszenz leicht zunahm, was für die reduzierte Neutralisation von Sauerstoffradikalen durch NO spricht. Die endotheliale Fluoreszenz der mit Angiotensin II behandelten Tiere, deren Aortensegmente *ex vivo* mit L-NAME inkubiert wurden, nahm deutlich ab und dies ist mit einer Entkopplung der NO-Synthase vereinbar. Die mit AICAR behandelte Gruppe zeigte nach der Inkubation mit L-NAME einen leichten Anstieg der ROS-Produktion in der Gefäßwand im Vergleich zu der entsprechenden *ex vivo* unbehandelten Kontrollgruppe. In der gleichzeitig mit Angiotensin II und AICAR behandelten Gruppe zeigte sich nach der *ex vivo* Inkubation mit dem NO-Synthase-Inhibitor eine deutliche Abnahme der ROS-Produktion im Endothel, was darauf hinweist, dass die AMPK-Aktivierung der NO-Synthase-Entkopplung entgegenwirkt.

3.1.7 Analyse der möglichen Superoxidquellen

Nachdem die Detektion von reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies in Aortensegmenten einen deutlich erhöhten oxidativen Stress durch Behandlung der Mäuse mit Angiotensin II anzeigten, wurden als nächstes die möglichen Superoxidquellen untersucht. Als vaskuläre Vertreter wurden in dieser Arbeit die NADPH-Oxidase, die Xanthinoxidase und die mitochondriale ROS Produktion untersucht.

3.1.7.1 Aktivität von NADPH-Oxidase in Herzmembranfraktionen

Die Behandlung mit Angiotensin II (1 mg / kg / d) verursachte eine Verdopplung der NADPH-Oxidase Aktivität (siehe 2.14), von Kontrollniveau bei 118.444 ± 13.464 Counts / mg [Protein] / Minute auf 222.564 ± 23.903 Counts / mg [Protein] / Minute. Die Behandlung der Kontrolltiere mit AICAR verringerte die NADPH-Oxidase-abhängige ROS-Produktion auf 86.477 ± 5.656 Counts / mg [Protein] / Minute. Die gleichzeitige Behandlung der Angiotensin II behandelten Tiere mit AICAR resultierte in einer signifikant verringerten NADPH-Oxidase Aktivität auf nahezu Kontrolltierniveau (139.766 ± 11.077 Counts / mg [Protein] / Minute).

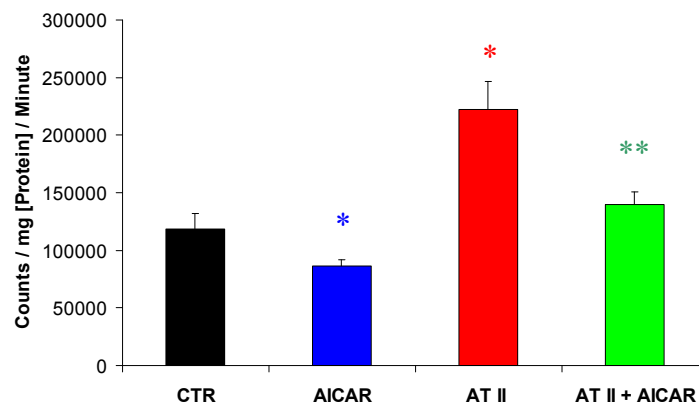


Abbildung 41. Aktivität von NADPH-Oxidase in Herzmembranfraktionen, bezogen auf Protein, Mittelwerte \pm SEM (n = 16). Die Behandlung mit AICAR senkte die NADPH-Oxidase Aktivität signifikant, während die Angiotensin II-Behandlung zu einer signifikanten Steigerung der NADPH-Oxidase Aktivität führte. Die gleichzeitige Behandlung mit AICAR konnte die durch Angiotensin II induzierte NADPH-Oxidase Aktivitätssteigerung fast auf Normalniveau reduzieren. Für Signifikanzangaben siehe Tabelle 10. * $\approx p < 0,05$ vs. CTR; ** $\approx p < 0,05$ vs. AT II.

Tabelle 10: Aktivität von NADPH-Oxidase in Herzmembranfraktionen; Mittelwerte \pm SEM (n = 16) und Signifikanzangaben ($p < 0,05$ nach Bonferroni-Test).

NADPH-Oxidase Aktivität mittels Luzigenin ECL [Counts/mg/Minute]	Mittelwert	+/- SEM	* $p < 0,05$ zu CTR ** $p < 0,05$ zu AT II
CTR	118.444	13.464	
AICAR	86.477	5.656	*
AT II	222.564	23.903	*
AT II + AICAR	139.766	11.077	**

3.1.7.2 Xanthinoxidase Aktivität im Serum

Die Behandlung mit dem AMPK-Aktivator AICAR verringerte die photometrisch gemessene Xanthinoxidase Aktivität (siehe 2.13) im Vergleich zu den Kontrolltieren signifikant senken konnte (Abbildung 42). Im Serum von Kontrolltieren wurde eine Bildungsrate von $150,3 \pm 13,1$ nM / Minute (in 50 μ l Serum) gemessen, im Vergleich dazu war die Bildungsrate durch die Behandlung mit AICAR nur $81,9 \pm 11,3$ nM / Minute. Es konnte ein tendenzieller, jedoch nicht signifikanter Anstieg der Superoxidbildungsrate im Serum von Angiotensin II-behandelten Tieren ($158,6 \pm 14,4$ nM / Minute) gezeigt werden. Die leichte Xanthinoxidase Aktivitätssteigerung konnte durch die Co-Therapie mit AICAR stark reduziert werden ($80,9 \pm 16,5$ nM / Minute).

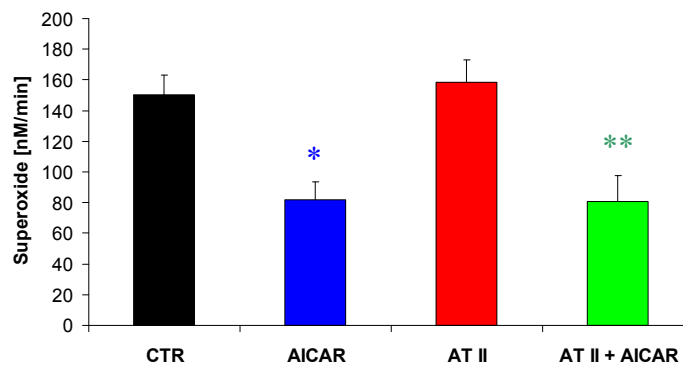


Abbildung 42. Superoxidbildungsrate durch Xanthinoxidase in Maus-Serum, Mittelwerte \pm SEM (n = 12). Die Xanthinoxidase Aktivität wurde durch AICAR signifikant gesenkt, allerdings konnte durch die Behandlung mit Angiotensin II keine Veränderung der Aktivität festgestellt werden. Für Signifikanzangaben siehe Tabelle 11. * $\approx p < 0,05$ vs. CTR; ** $\approx p < 0,05$ vs. AT II.

Tabelle 11. Superoxidbildungsrate durch Xanthinoxidase; Mittelwerte \pm SEM (n = 12) und Signifikanzangaben ($p < 0,05$ nach Bonferroni-Test).

Xanthinoxidase Aktivität [nM / Minute]	Mittelwert	+/- SEM	* $p < 0,05$ zu CTR ** $p < 0,05$ zu AT II
CTR	150,3	13,1	
AICAR	81,9	11,3	*
AT II	158,6	14,4	<i>n.s.</i>
AT II + AICAR	80,9	16,5	**

3.1.7.3 Mitochondriale ROS-Produktion

Die Mitochondrien wurden als dritte mögliche Superoxid-Quelle in dieser Arbeit untersucht (siehe 2.14). Es zeigte sich, dass die mitochondriale ROS-Produktion durch die chronische AICAR-Behandlung von Kontrolltieren signifikant von 10.613 ± 281 Counts / mg [Protein] / Minute auf 7.306 ± 480 Counts / mg [Protein] / Minute gesenkt wurde. Die chronische Behandlung mit Angiotensin II resultierte in einer Verdopplung der mitochondrialen ROS-Produktion auf 23.202 ± 317 Counts / mg [Protein] / Minute im Vergleich zu den jeweiligen Kontrolltieren. Durch die gleichzeitige Behandlung mit AICAR konnte die signifikant erhöhte ROS-Produktion der Angiotensin II-behandelten Tieren wiederum signifikant auf 17.891 ± 486 Counts / mg [Protein] / Minute gesenkt werden.

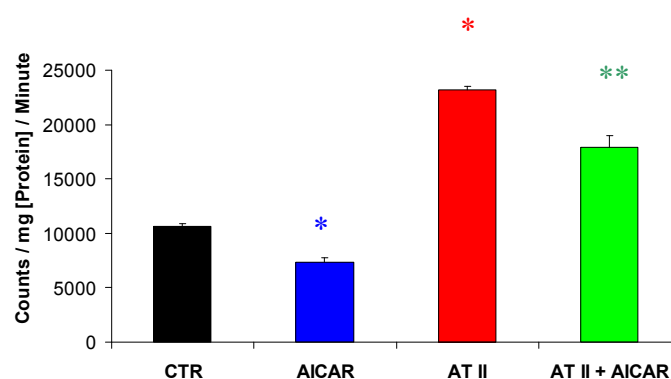


Abbildung 43. Superoxid-Produktion durch isolierte Herzmitochondrien, Mittelwerte \pm SEM (n = 12). Die Behandlung mit AICAR führte zur signifikanten Senkung der mitochondrialen ROS Produktion, Angiotensin II führte zu einer signifikanten Steigerung der ROS Produktion, wobei die Co-Behandlung mit AICAR zur erneuten signifikanten Reduktion führte. Für Signifikanzangaben siehe Tabelle 12. * $\approx p < 0,05$ vs. CTR; ** $\approx p < 0,05$ vs. AT II.

Tabelle 12. Superoxid-Produktion durch isolierte Herzmitochondrien, Mittelwerte \pm SEM (n = 12).und Signifikanzangaben ($p < 0,05$ nach Bonferroni-Test).

Mitochondriale ROS Produktion mittels L-012 ECL [Counts/mg/Minute]	Mittelwert	+/- SEM	* $p < 0,05$ zu CTR ** $p < 0,05$ zu AT II
CTR	10.613	281	
AICAR	7.306	480	*
AT II	23.202	317	*
AT II + AICAR	17.891	486	**

Da in Publikationen die NADPH-Oxidase als Hauptquelle des Angiotensin II-induzierten oxidativen Stresses identifiziert und hier ein positiver Effekt der Co-Therapie mit AICAR festgestellt wurde, lag es nahe, Expressionsstudien von essentiellen NADPH-Oxidase Untereinheiten durchzuführen.^{6, 33, 104} Geprüft wurde, ob die gezeigten Aktivitätsänderungen auf die Genexpression zurückzuführen sind.

3.1.8 mRNA-Expression der NADPH-Oxidase Untereinheiten

Die Expression der NADPH-Oxidase Untereinheiten (siehe 2.22 – 2.25), die als wichtigste vaskuläre Quelle von reaktiven Sauerstoffspezies gelten und andererseits essentiell sind für die phagozytäre NADPH-Oxidase, war bei den mit Angiotensin II behandelten Tieren verstärkt. Tendenziell konnte eine Abnahme der Expression bei gleichzeitiger Behandlung mit AICAR festgestellt werden.

Die Expression der vorwiegend im glatten Gefäßmuskel vorhandenen NOX-1 nahm durch chronische Behandlung mit Angiotensin II (197 ± 29 %) signifikant zu. Die Behandlung mit AICAR beeinflusste die Expression von NOX-1 nicht (118 ± 34 % der Kontrolle), während die gleichzeitige Behandlung mit Angiotensin II und dem AMPK-Aktivator AICAR zu einer tendenziellen, aber nicht signifikanten Steigerung auf 235 ± 38 % führte.

Die Expression von p22^{phox} zeigte ein ähnliches Expressionsverhalten. Der signifikante Anstieg unter Angiotensin II-Behandlung auf 140 ± 3 % im Vergleich zur Kontrollgruppe (100%) wurde durch die gleichzeitige Gabe von AICAR nicht beeinflusst.

Die Expression der NOX-2 Untereinheit, die vorwiegend in Endothelzellen exprimiert wird und zudem Bestandteil der phagozytären NADPH Oxidase ist, wurde durch die Behandlung mit Angiotensin II auf 295 ± 42 % gesteigert. Die Behandlung mit AICAR allein verursachte keine signifikante Änderung der Expression (85 ± 14 %) im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die gleichzeitige Gabe von Angiotensin II und AICAR zeigte eine Reduktion der NOX-2 Expression im Vergleich zur Angiotensin II-Gruppe.

Da die NOX-2 auch eine phagozytär essentielle Untereinheit der NADPH-Oxidase darstellt, konnten diese Daten auf eine erhöhte vaskuläre Inflammation durch Angiotensin II-Behandlung hinweisen. Um dies zu überprüfen, wurden anschließend vaskuläre Inflammationsmarker mittels real time-PCR untersucht.

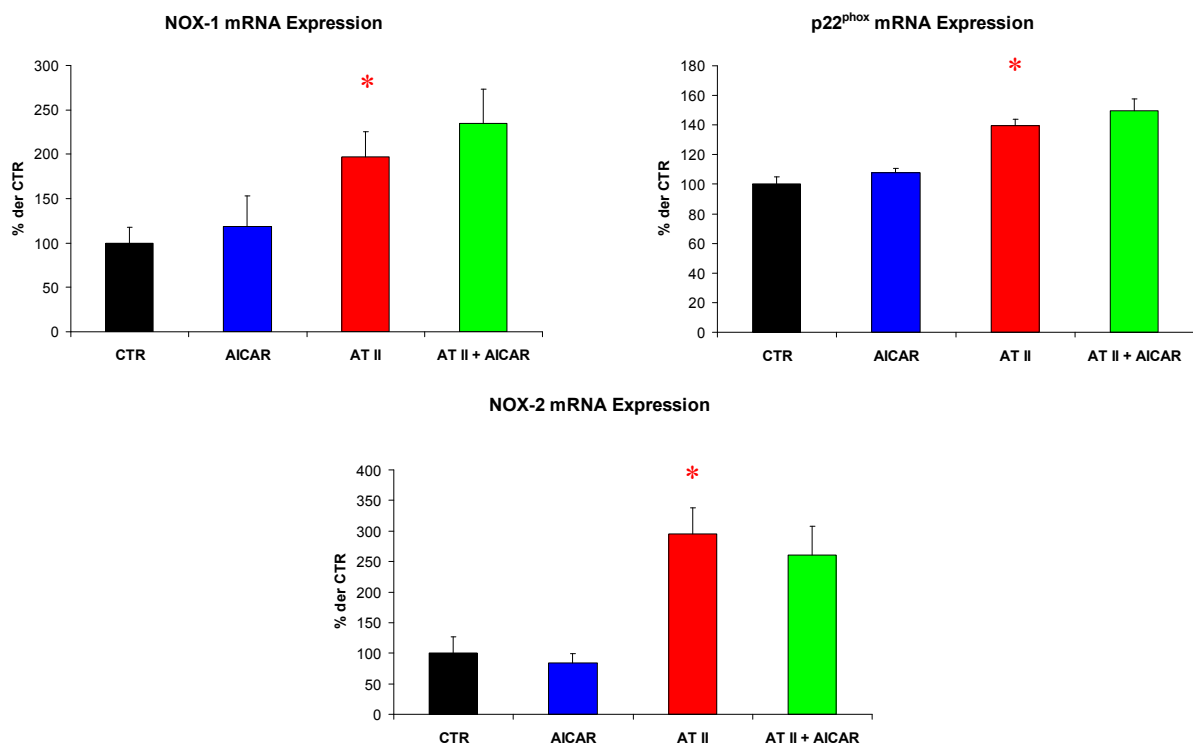


Abbildung 44. mRNA-Expression der NADPH-Oxidase-Untereinheiten NOX-1, p22^{phox} und NOX-2 (n = 5) in Maus-Aorta, Mittelwerte als % der CTR \pm SEM, wobei CTR = 100%. Die mRNA-Expressionen von NOX-1, p22^{phox} und NOX-2 steigen durch die Angiotensin II-Behandlung signifikant an, doch nur die NOX-2 Expression kann durch AICAR tendenziell wieder gesenkt werden. Für Signifikanzangaben siehe Tabelle 13. * \approx p < 0,05 vs. CTR; ** \approx p < 0,05 vs. AT II.

Tabelle 13. mRNA-Expression der NADPH Untereinheiten NOX-1, p22^{phox} und NOX-2 (n = 5), Mittelwerte in % bezogen auf die Kontrollgruppe (CTR ≡ 100%) und Signifikanzangaben (p<0,05 nach Bonferroni-Test).

NOX-1 mRNA-Expression [% der CTR]	Mittelwert	+/- SEM	* p<0,05 zu CTR ** p<0,05 zu AT II
CTR	100	17	
AICAR	118	34	<i>n.s.</i>
AT II	197	29	*
AT II + AICAR	235	38	<i>n.s.</i>
p22^{phox} mRNA-Expression [% der CTR]			
CTR	100	5	
AICAR	108	4	<i>n.s.</i>
AT II	140	3	*
AT II + AICAR	137	3	<i>n.s.</i>
NOX-2 mRNA-Expression [% der CTR]			
CTR	100	27	
AICAR	85	14	<i>n.s.</i>
AT II	295	42	*
AT II + AICAR	261	47	<i>n.s.</i>

3.1.9 Vaskuläre Inflammation

Untersucht wurde die Expression von Genen (siehe 2.22 – 2.25), die für vaskuläre Inflammationsmarker kodieren, wie VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule 1), COX-2 (cyclooxygenase 2) und iNOS (induzierbare NO-Synthase).¹⁹⁴⁻¹⁹⁶ Die Behandlung mit Angiotensin II ergab für alle drei getesteten Marker einen signifikanten Anstieg der Expression und eine signifikante Reduktion der Expression der Marker bei zusätzlicher Behandlung mit dem AMPK-Aktivator AICAR (Abbildung 45).

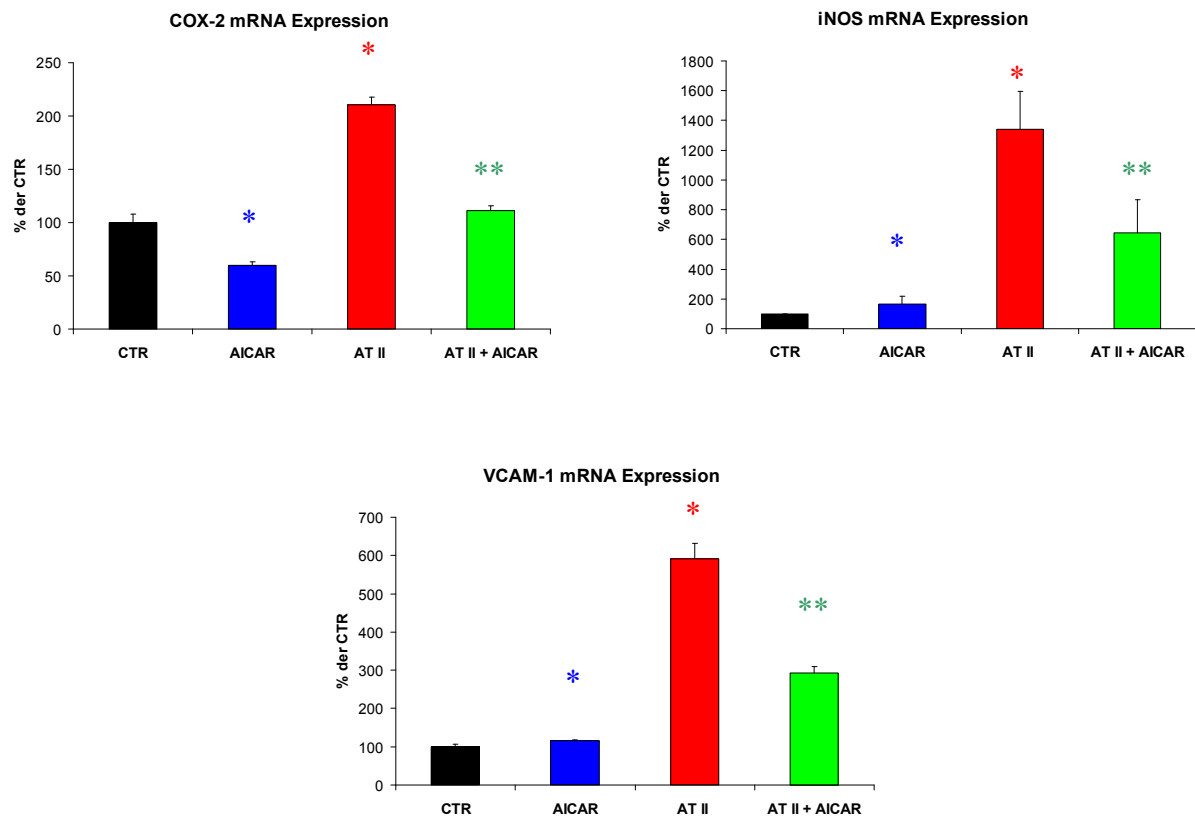


Abbildung 45. mRNA-Expression der Inflammationsmarker VCAM-1, iNOS und COX-2 in Maus-Aorta, Werte als % der CTR (n = 5 - 6), wobei CTR = 100%. Die mRNA-Expressionen von COX-2, iNOS und VCAM-1 werden durch Angiotensin II alle signifikant gesteigert und die Co-Behandlung mit AICAR ist in der Lage diese Steigerung wieder signifikant zu senken. Für Signifikanzangaben siehe Tabelle 14. * $\approx p < 0,05$ vs. CTR; ** $\approx p < 0,05$ vs. AT II.

Tabelle 14. mRNA-Expression der Inflammationsmarker COX-2, iNOS und VCAM-1 in Maus-Aorta; Mittelwerte in % bezogen auf die Kontrollgruppe (CTR = 100%) und Signifikanzangaben ($p < 0,05$ nach Bonferroni-Test).

COX-2 mRNA-Expression [% der CTR]	Mittelwert	+/- SEM	* $p < 0,05$ zu CTR ** $p < 0,05$ zu AT II
CTR	100	8	
AICAR	60	4	*
AT II	210	8	*
AT II + AICAR	111	4	**
iNOS mRNA-Expression [% der CTR]			
CTR	100	0	
AICAR	165	53	*
AT II	1339	257	*
AT II + AICAR	420	113	**
VCAM-1 mRNA-Expression [% der CTR]			
CTR	100	6	
AICAR	116	1	*
AT II	591	41	*
AT II + AICAR	292	17	**

COX-2 zeigte eine Reduktion der Expression im Vergleich zur Kontrolle nach der chronischen Behandlung mit AICAR auf 60 ± 4 %, während die Behandlung mit Angiotensin II eine signifikante Steigerung der COX-2 Expression auf 210 ± 8 % hervorrief. Die gleichzeitige Behandlung mit Angiotensin II und AICAR resultierte in einer signifikanten Reduktion der Expression des Inflammationsmarkers auf 111 ± 4 %.

Der Inflammationsmarker iNOS zeigte eine leichte Expressionssteigerung nach der Behandlung mit AICAR auf 165 ± 53 % im Vergleich zur Kontrollgruppe (100%). Die Behandlung mit Angiotensin II resultierte in einer drastischen (13fachen) Steigerung der Expression auf 1.339 ± 257 % im Vergleich zur Kontrolle, was durch die gleichzeitige Behandlung mit AICAR wiederum signifikant auf 420 ± 113 % reduziert werden konnte.

VCAM-1 zeigte einen leichten Anstieg der Expression nach chronischer AICAR-Behandlung auf 116 ± 1 % im Vergleich zur Kontrollgruppe (100%). Die Behandlung mit Angiotensin II allerdings erzeugte einen signifikanten, beinahe 6fachen Anstieg in der

VCAM-1 Expression auf 591 ± 41 % im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die gleichzeitige Behandlung mit Angiotensin II und AICAR konnte den Anstieg in der Angiotensin II-Gruppe wieder signifikant auf 292 ± 17 % senken.

3.1.10 Modulation der H_2O_2 -induzierten Endothelzellnekrose und des JNK-Signalwegs durch AMPK-Aktivierung

In vorangegangenen Arbeiten unserer Arbeitsgruppe wurde gezeigt, dass durch AMPK-Aktivierung mit AICAR bzw. Metformin in Endothelzellen der H_2O_2 -vermittelte Zelltod verhindert werden kann und dass dies mit einer verminderten Aktivierbarkeit des JNK-Signalwegs einherging. Abbildung 46 zeigt die zugehörigen Western Blot Untersuchungen.

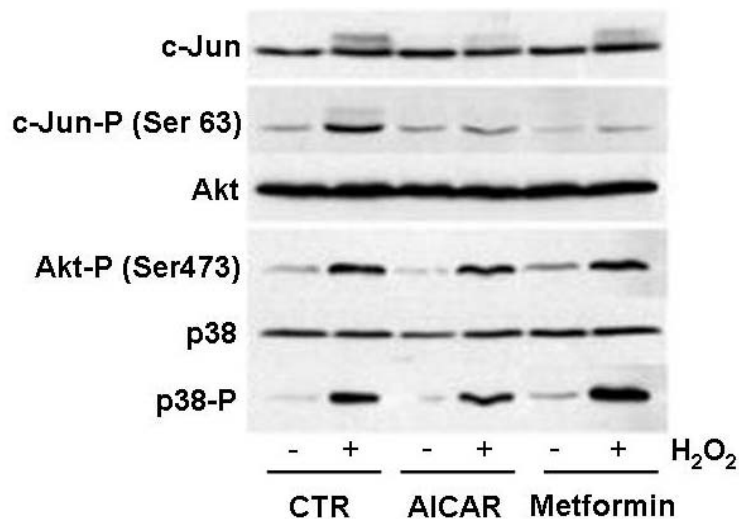


Abbildung 46. Western Blots von Proteinen aus PAECs (pulmonary artery endothelial cells), die mit AICAR oder Metformin vorbehandelt und anschließend oxidativem Stress mittels H_2O_2 ausgesetzt wurden. Die Expression von Akt- und p38MAPK und die Protein-Phosphorylierungen zeigten, dass diese Signalwege nicht von AICAR oder Metformin beeinflusst wurden. Die Aktivierung des JNK-Signalweges durch Phosphorylierung konnte jedoch durch die AICAR und Metformin-Behandlung deutlich reduziert werden (verändert nach Schulz et al.¹⁹⁷).

Da die Zellviabilität von der Balance und der relativen Aktivität von pro- und antiapoptischen Signalwegen bestimmt wird, wurden die Hauptvertreter der relevanten Signalwege untersucht.¹⁹⁸⁻²⁰¹ Es ergab sich, dass AMPK-Aktivierung mit AICAR bzw. mit Metformin die

p38MAPK- bzw. Akt-Signalwege nicht beeinflusst (die basale und die H₂O₂-induzierte Phosphorylierung wurde nicht signifikant geändert). Der JNK-Signalweg, gesteuert durch die Phosphorylierung von c-Jun, zählt zu den klassischen proapoptotischen Signalwegen.²⁰⁰ Die Behandlung von Endothelzellen mit AICAR bzw. Metformin verhinderte die Phosphorylierung und somit die proapoptotische Wirkung (Abbildung 46).¹⁹⁷

Weitere Ergebnisse mit kultivierten Zellen, zeigten, dass die Aktivierung der AMPK mittels AICAR oder Metformin gleiche Resultate erzeugte wie die Einbringung von PGC-1 α -Adenoviren, die zur Überexpression von PGC-1 α führten. Die Induktion von oxidativem Stress mittels H₂O₂ führte in Zellen, die mit Puffer behandelt wurden, zum signifikanten Anstieg der H₂O₂-induzierten LDH-Freisetzung, der sowohl durch AICAR oder Metformin als auch durch PGC-1 α -Überexpression signifikant verringert werden konnte. Gleichzeitig konnte die Zellviabilität (rechtes Schaubild) signifikant gesteigert werden.

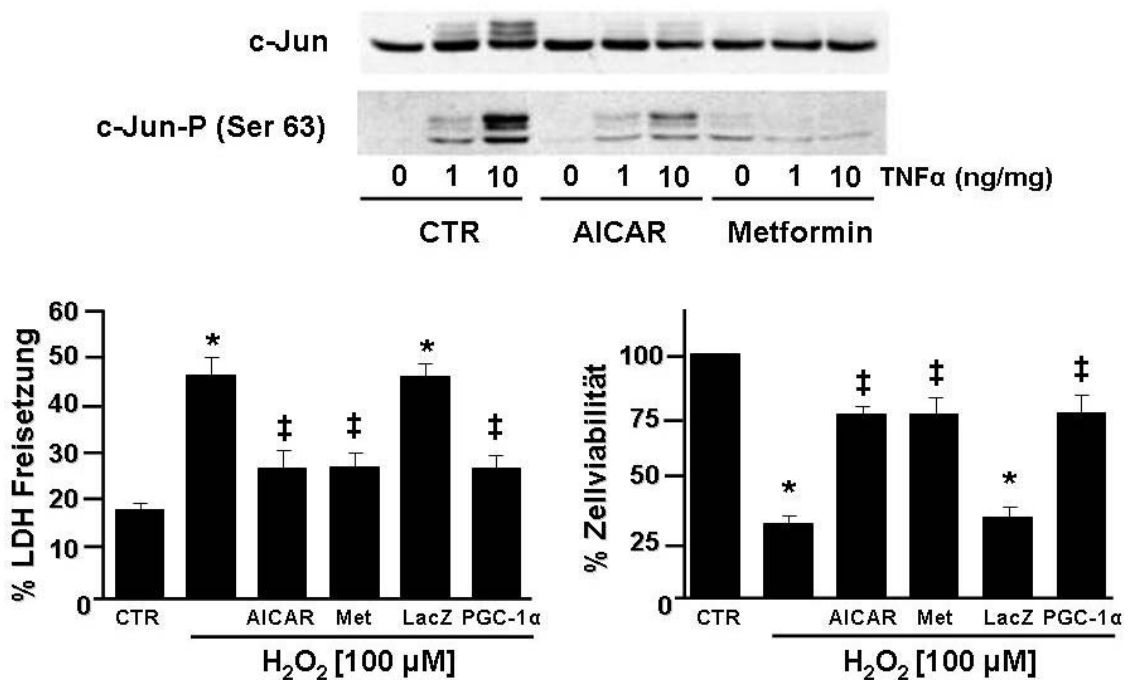


Abbildung 47. Western Blots sowie Zellviabilitätsassay und LDH-Freisetzungssassay von PAECs. PAECs wurden 24 Stunden mit AICAR (1mM) oder Metformin (5mM) behandelt, bevor sie TNF- α ausgesetzt wurden. Oben: Western Blot Analysen der behandelten Zellen; links unten: LDH-Freisetzung; HUVECs (human umbilical vein endothelial cells)- wurden mit AICAR oder Metformin vorbehandelt, wie oben, bzw. mit Kontroll- (Lac Z) bzw. PGC-1 α Adenoviren transfiziert waren; rechts unten: Zellviabilität mittels MTS-Assay von Promega (verändert nach Schulz et al.¹⁹⁷).

Um die Mitochondrienbeteiligung am oxidativen Stress zu verdeutlichen, wurden Zellen (PAEC's) mit einem mitochondrien-gerichteten Antioxidanz (MitoQ) behandelt.^{199, 202} Anschließend wurde H₂O₂ zugegeben, um oxidativen Stress zu induzieren. Es ergab sich (Abbildung 48), dass sowohl die Phosphorylierung von c-Jun als auch der oxidative Stress durch das mitochondriale Antioxidanz verringert werden konnte.

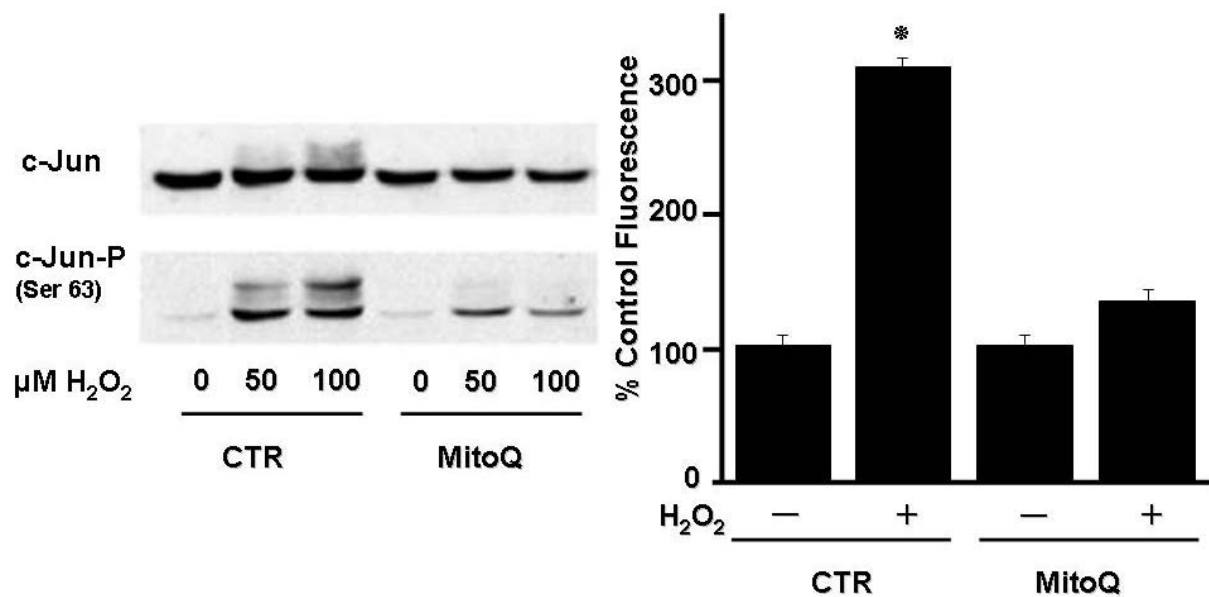


Abbildung 48. Western Blots und oxidativer Stress von PAECs. Inkubation von PAECs mit 1µM MitoQ vor der Zugabe von H₂O₂. Das mitochondriale Antioxidanz, MitoQ reduzierte die Phosphorylierung von c-Jun und den induzierten oxidativen Stress nahezu auf Kontrollniveau (rechts) (verändert nach Schulz et al.¹⁹⁷). * $\approx p < 0,05$ vs. CTR

Nach diesen Resultaten wurden auch in Versuchstieren die Expression und die Phosphorylierung des stressinduzierten c-Jun untersucht. Wie in Abbildung 49 gezeigt, verändert sich die Expression von c-Jun in den Aorten der vier untersuchten Tiergruppen durch die unterschiedlichen Behandlungen nicht signifikant. Die Behandlung mit AICAR ergab keine signifikante Veränderung im Phosphorylierungsgrad des stressinduzierbaren Transkriptionsfaktors ($172 \pm 74,4$ %) im Vergleich zur Kontrollgruppe ($100 \pm 3,5$ %). Die Behandlung mit Angiotensin II resultierte im Gegensatz dazu in einer Steigerung des Phosphorylierungsgrades auf $451 \pm 73,8$ % im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die gleichzeitige Behandlung mit dem AMPK-Aktivator

AICAR konnte den durch Angiotensin II-induzierten Anstieg in der aktivierenden Phosphorylierung auf $152 \pm 9,0$ % reduzieren.

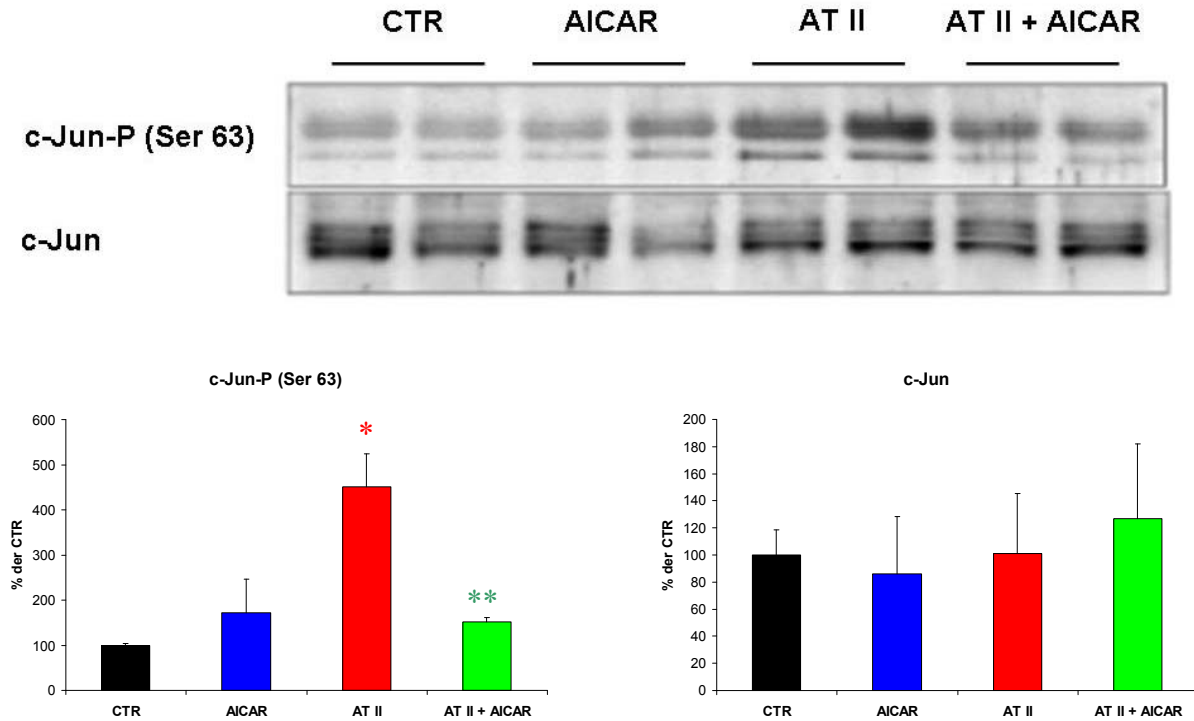


Abbildung 49. Western Blots von Proteinen aus Maus Aorta. c-Jun-Phosphorylierung an Serin 63 sowie c-Jun Expression und densitometrischer Auswertung, Mittelwerte als % der CTR \pm SEM wobei CTR = 100% (n = 6). Die Expression von c-Jun ist innerhalb der Tiergruppen nicht signifikant verschieden. Allerdings steigt der Phosphorylierungsgrad von c-Jun durch die Angiotensin II-Behandlung signifikant an, was durch gleichzeitige Behandlung mit AICAR verhindert werden konnte. Für Signifikanzangaben siehe Tabelle 15. * $\approx p < 0,05$ vs. CTR; ** $\approx p < 0,05$ vs. AT II.

Tabelle 15. Densitometrische Auswertung der c-Jun-Phosphorylierung und c-Jun Expression; Darstellung der Mittelwerte in % der CTR \pm SEM; CTR \equiv 100% (n = 6) und Signifikanzangaben (p<0,05 nach Bonferroni-Test).

c-Jun Phosphorylierung [% der CTR]	Mittelwert	+/- SEM	* p<0,05 zu CTR ** p<0,05 zu AT II
CTR	100	3,5	
AICAR	172	74,4	<i>n.s.</i>
AT II	451	73,8	*
AT II + AICAR	152	9,0	**
c-Jun Protein-Expression [% der CTR]			
CTR	100	18,3	
AICAR	86	42,5	<i>n.s.</i>
AT II	101	44,1	<i>n.s.</i>
AT II + AICAR	127	55,1	<i>n.s.</i>

3.2 Effekte der AMPK-Defizienz durch genetische Manipulation

Der zweite Schwerpunkt dieser Arbeit sind die „Effekte der Deletion der AMPK“ in einem genetisch manipulierten Mausstamm, in dem die alpha1-Isoform der AMPK (siehe Abbildung 11)²⁰³ „ausgeknoct“ war.^{111, 112} Aus früheren Publikationen und eigenen Vorversuchen ist das Vorherrschen der alpha1-Isoform der AMPK in vaskulärem Gewebe bekannt (Abbildung 50).^{107, 204} Auch bei diesen Mäusen wurde eine Angiotensin II-Behandlung^{35, 104, 105} eingesetzt, um oxidativen Stress und endotheliale Dysfunktion zu erzeugen. Die Dosis des Angiotensin II wurde allerdings reduziert (AT II-Dosis: 0,1 mg / kg / d), da keine Erhöhung des arteriellen Blutdruckes induziert werden sollte. Die Untersuchungen wurden an folgenden Tiergruppen durchgeführt:

Tabelle 16. Versuchstiergruppen zur Analyse der AMPK-Defizienz durch knockout der alpha1-Untereinheit.

WT	NaCl	0,9% Lsg.
WT + AT II	Angiotensin II	0,1 mg/kg/Tag
AMPK -/-	NaCl	0,9% Lsg.
AMPK -/- + AT II	Angiotensin II	0,1 mg/kg/Tag

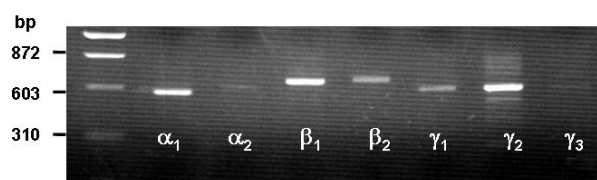


Abbildung 50. Überprüfung der Expression der AMPK-Isoformen in Endothelzellen (HUVEC) (verändert nach²⁰³). Die vorherrschende Isoform in Endothelzellen ist die α_1 AMPK-Isoform.

3.2.1 Analyse des AMPK-knock outs mittels Western Blots

Um sicherzustellen, dass die Aktivität der im kardiovaskulären Gewebe dominierenden AMPK-Isoform alpha 1 deletiert war, wurde sowohl die Expression der verschiedenen Isoformen als auch deren Phosphorylierung an Threonin 172 mittels Western Blot überprüft (siehe 2.16 – 2.21).

Wie in Abbildung 51 dargestellt, konnte durch die genetische Deletion der α 1AMPK-Isoform in den α 1AMPK $-/-$ Tieren die Gesamtexpression der α AMPK (Erfassung der α 1AMPK und der α 2AMPK Isoform) in der Aorta auf durchschnittlich $20 \pm 4,3$ % der Kontrolle reduziert werden. Dementsprechend wurde auch die Phosphorylierung an Threonin 172 und damit die Aktivität der α AMPK auf $5 \pm 2,4$ % bei den α 1AMPK $-/-$ Tieren und auf $15 \pm 3,8$ % bei den α 1AMPK $-/-$ Tieren mit chronischer Angiotensin II-Behandlung reduziert. Weiterhin wurde festgestellt, dass die chronische Behandlung mit Angiotensin II die AMPK-Aktivität im Wildtyp tier enorm steigert (Phosphorylierung an Threonin 172 steigt unter Angiotensin II-Behandlung auf $367 \pm 50,1$ %), was auch der Phosphorylierungsgrad der Acetyl-CoA-Carboxylase an Serin 79 widerspiegelte (WT: $100 \pm 16,6$ %; WT + AT II: $1.086 \pm 361,8$ %). In α 1AMPK $-/-$ Tieren konnte durch Angiotensin II-Behandlung ebenfalls eine Aktivierung der AMPK festgestellt werden (AMPK $-/-$: $5 \pm 2,4$ %; AMPK $-/-$ + AT II: $15 \pm 3,8$ %), die auf die Expression der α 2AMPK Isoform zurückzuführen ist. Diese Aktivierung war in abgeschwächter Form auch im Phosphorylierungsgrad des AMPK-Substrats Acetyl-CoA Carboxylase (ACC) zu finden (AMPK $-/-$: $143 \pm 48,2$ %; AMPK $-/-$ + AT II: $237 \pm 37,3$ %).

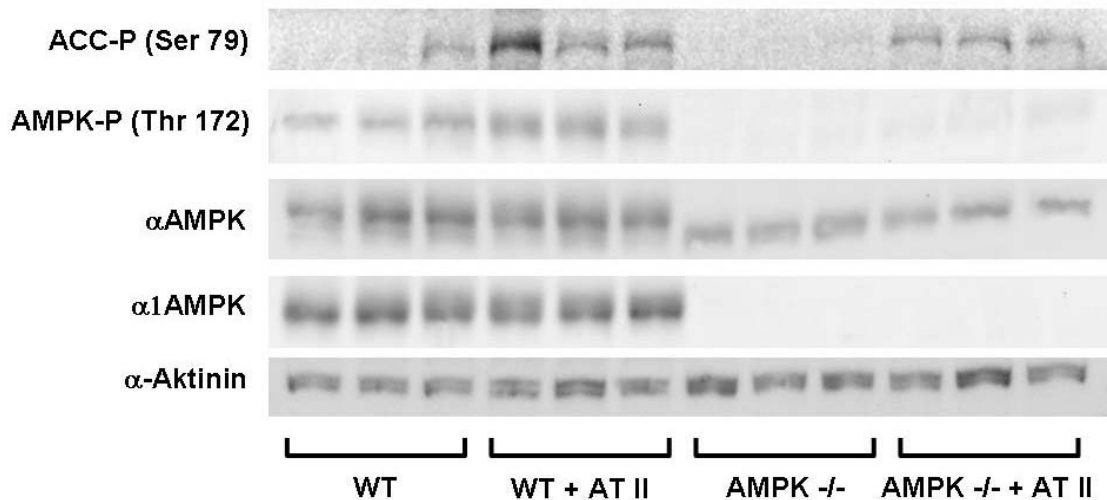


Abbildung 51. Darstellung des Western Blots: AMPK-Phosphorylierung an Threonin 172 und ACC-Phosphorylierung an Serin 79; Expression der αAMPK in Maus Aorta (Antikörper detektiert sowohl die α1- als auch die α2-AMPK Isoform) und der α1AMPK.

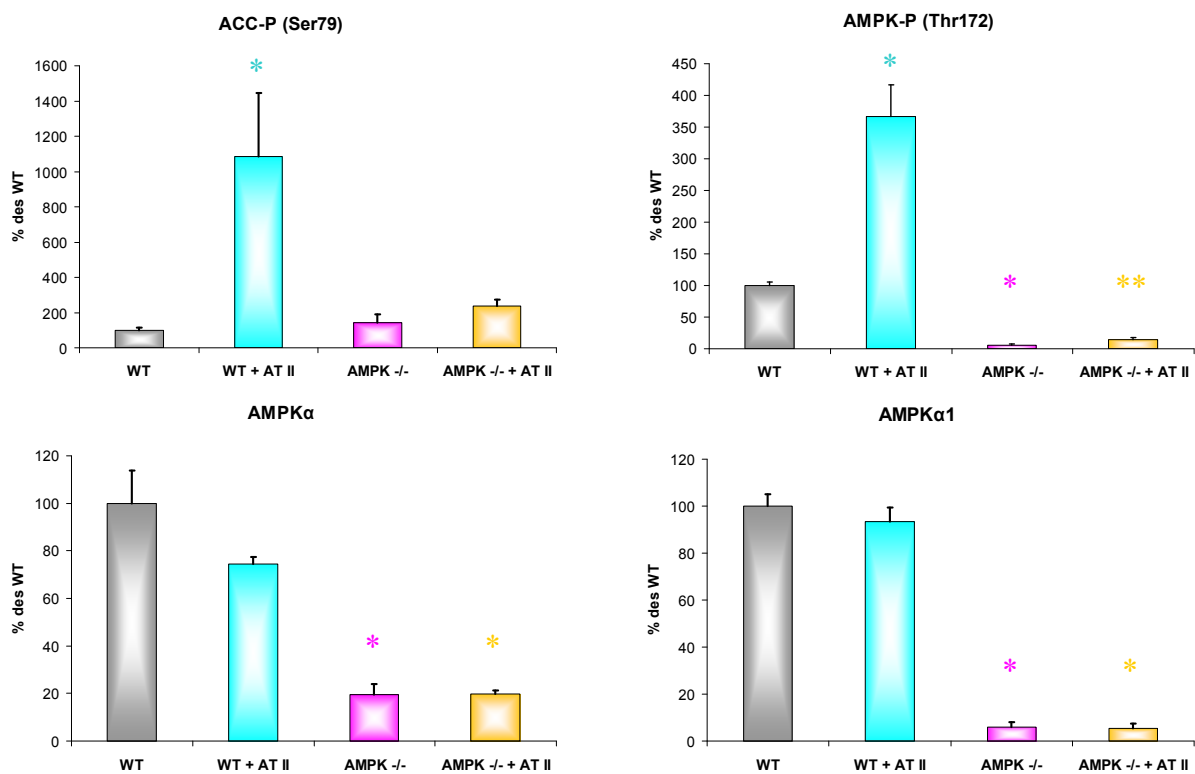


Abbildung 52. Densitometrische Auswertung der ACC- und AMPK-Phosphorylierung sowie der Expression der Untereinheiten αAMPK und α1AMPK. Dargestellt sind Mittelwerte als % des WT ± SEM, wobei WT = 100% (n = 6). Der Phosphorylierungsgrad von ACC und AMPK wird durch die Angiotensin II-Behandlung signifikant gesteigert, was im α1AMPK defizienten Tier nicht festgestellt wurde. Die Gesamtexpression der αAMPK ist im α1AMPK defizienten Tier stark reduziert. Für Signifikanzangaben siehe Tabelle 17. * ≈ p < 0,05 vs. WT; ** ≈ p < 0,05 vs. AMPK-/-.

Tabelle 17. Densitometrische Auswertung der ACC- bzw. AMPK-Phosphorylierung sowie der α AMPK- und α 1AMPK-Expression ; Darstellung der Mittelwerte in % des WT; WT \equiv 100% (n = 6) und Signifikanzangaben (p<0,05 nach Bonferroni-Test).

ACC- Phosphorylierung (Ser79) [% des WT]	Mittelwert	+/- SEM	* p<0,05 zu WT ** p<0,05 zu AMPK -/-
WT	100	14,6	
WT + AT II	1.086	361,8	*
AMPK -/-	143	48,2	n.s.
AMPK -/- + AT II	237	37,3	n.s.
AMPKα- Phosphorylierung (Thr172) [% des WT]			
WT	100	6,7	
WT + AT II	367	50,1	*
AMPK -/-	5	2,4	*
AMPK -/- + AT II	15	3,8	**
AMPKα Protein-Expression [% des WT]			-
WT	100	14,7	
WT + AT II	75	3,0	n.s.
AMPK -/-	20	4,3	*
AMPK -/- + AT II	20	1,5	n.s.
AMPKα1 Protein-Expression [% des WT]			
WT	100	5,1	
WT + AT II	94	6,7	n.s.
AMPK -/-	6	2,2	*
AMPK -/- + AT II	5	2,0	n.s.

3.2.1 Analyse der Gefäßfunktion mittels isometrischer Tonusstudien

Hierbei wurde die endothelabhängige und –unabhängige Relaxation an isolierten Aorten-segmenten getestet (siehe 2.15). Die geringe Angiotensin II-Dosis führte zu einer milden Endotheldysfunktion (Abbildung 53), die maximale Relaxation reduzierte sich signifikant auf $45 \pm 2,8$ % (pD₂: $6,9 \pm 0,067$) im Vergleich zum zugehörigen Wildtyp (max. Rel. $58 \pm 1,9$ % (pD₂: $7,1 \pm 0,062$)). Die maximale Relaxation der α 1AMPK -/- Tiere ($62 \pm 2,5$ % (pD₂: $7,0 \pm 0,109$)) unterschied sich nicht signifikant von der bei Wildtyptieren, während die zusätzliche chronische Angiotensin II-Behandlung in diesen Tieren die endothelabhängige Relaxationsfähigkeit drastisch reduziert (max. Rel. $36 \pm 4,1$ % (pD₂: $6,6 \pm 0,167$)).

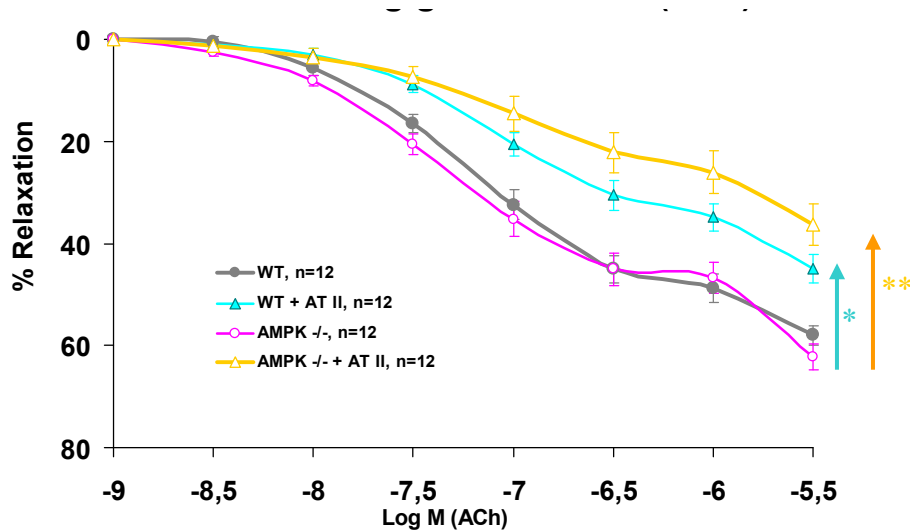


Abbildung 53. Endothelabhängige Relaxation von präparierten Aortensegmenten (4 mm) in Organbadanlagen (Mittelwerte ± SEM, n = 12), prozentuale Relaxation auf Acetylcholingabe. Die α 1AMPK-defizienten Tiere zeigten keine Veränderung in der Relaxationsfähigkeit auf Acetylcholingabe. Die Behandlung mit Angiotensin II resultierte im Wildtyp in einer signifikanten Reduktion der Relaxationsfähigkeit, was bei α 1AMPK-defizienten signifikant verstärkt war. Für Signifikanzangaben siehe Tabelle 18. * \approx p < 0,05 vs. WT; ** \approx p < 0,05 vs. AMPK-/-.

Tabelle 18. Acetylcholin-Relaxation; pD₂-Werte und Signifikanzangaben (p < 0,05 nach Bonferroni-Test), siehe Abbildung 53.

Acetylcholin-induzierte Relaxation	pD₂	+/- SEM	* p < 0,05 zu WT ** p < 0,05 zu AMPK -/-
WT	7,1	0,062	
WT + AT II	6,9	0,067	*
AMPK -/-	7,0	0,109	<i>n.s.</i>
AMPK -/- + AT II	6,6	0,167	**

Die endothelunabhängige Relaxation der Aortensegmente durch Nitroglycerin veränderte sich im Wildtyp (WT max. Rel. 79 ± 3,6 % (pD₂: 6,4 ± 0,211)) durch die chronische Angiotensin II-Behandlung nicht signifikant (WT + AT II max. Rel. 74 ± 4,2 % (pD₂: 6,5 ± 0,195)) (Abbildung 54). Auch in den genetisch manipulierten Tieren wurde die endothelunabhängige Relaxation nicht signifikant beeinflusst (max. Rel. 79 ± 3,7 % (pD₂: 6,6 ± 0,174)). Nur die chronische Behandlung mit Angiotensin II reduzierte die endothelunabhängige Relaxation der α 1AMPK -/- Tieren signifikant auf 62 ± 6,2 % (pD₂: 5,8 ± 0,124).

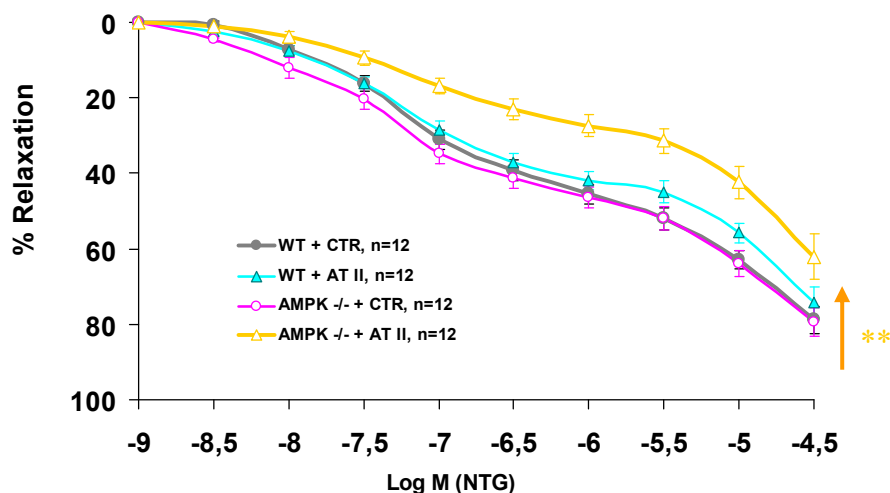


Abbildung 54. Endothelunabhängige Relaxation von präparierten Aortensegmenten (4 mm) in Organbadanlagen (Mittelwerte \pm SEM, n = 12), prozentuale Relaxation auf Nitroglyzeringabe. Die endothelunabhängige Relaxation wurde nur im Angiotensin II-behandelten α 1AMPK defizienten Tier signifikant reduziert. Für Signifikanzangaben siehe Tabelle 19. * \approx p < 0,05 vs. WT; ** \approx p < 0,05 vs. AMPK $^{-/-}$.

Tabelle 19. Nitroglyzerin-Relaxation; pD_2 -Werte und Signifikanzangaben (p < 0,05 nach Bonferroni-Test).

Nitroglyzerin-induzierte Relaxation	pD_2	+/- SEM	* p < 0,05 zu WT ** p < 0,05 zu AMPK$^{-/-}$
WT	6,4	0,211	
WT + AT II	6,5	0,195	<i>n.s.</i>
AMPK $^{-/-}$	6,6	0,174	<i>n.s.</i>
AMPK $^{-/-}$ + AT II	5,8	0,124	**

Da Nitroglyzerin bei seiner Wirkung als Relaxans die Aktivität der Aldehyddehydrogenase-2 (ALDH₂) benötigt, die sehr oxidationsempfindlich ist, wurde als weiterer NO-Donor Dea-NONOat (Diethylamin/NONOat) verwendet. Es zeigte sich, dass die maximalen Relaxationen der einzelnen Tiergruppen nicht signifikant verschieden waren (WT: $95 \pm 1,8$ %; WT + AT II: $96 \pm 1,7$ %; AMPK $^{-/-}$: $94 \pm 2,5$ %; AMPK $^{-/-}$ + AT II: $96 \pm 2,2$ %).

Allerdings zeigten sich signifikante Unterschiede in den Verläufen der Dosis-Wirkungskurven, ausgedrückt in den pD_2 -Werten. Die Angiotensin II-Behandlung des Wildtyps resultierte in einer signifikanten Verschiebung des pD_2 -Wertes von $6,7 \pm 0,046$ auf $6,3 \pm 0,123$.

Auch die α 1AMPK-defizienten Tiere zeigten eine signifikante Verminderung der Reaktion auf DeaNONOat-Gabe (pD_2 -Wert: $6,4 \pm 0,052$), die durch die Angiotensin II-Behandlung nochmals signifikant verschoben wurde (pD_2 -Wert: $5,9 \pm 0,155$).

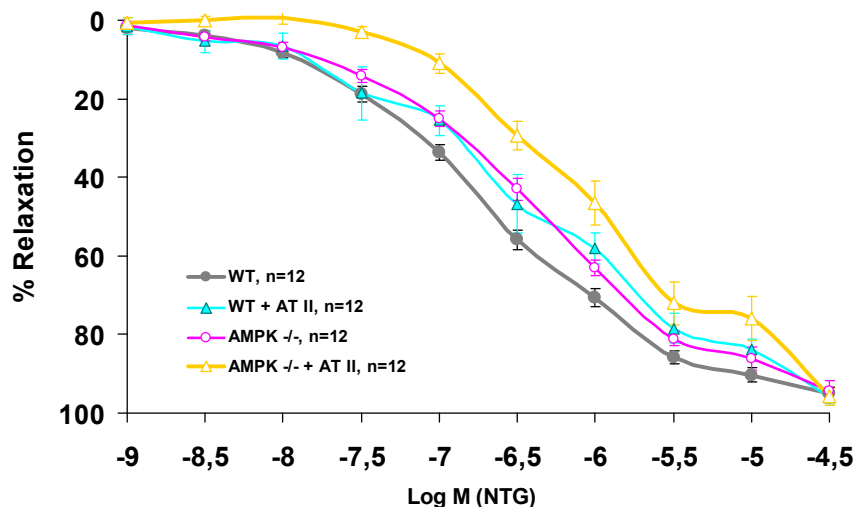


Abbildung 55. Endothelunabhängige Relaxation von präparierten Aortensegmenten (4 mm) in Organbadanlagen (Mittelwerte \pm SEM, n = 12), prozentuale Relaxation auf DeaNONOatgabe. Die Relaxationsfähigkeit auf DeaNONOatgabe war durch die Behandlung mit Angiotensin II im Wildtyp signifikant reduziert. Auch die α 1AMPK-Defizienz wirkte sich signifikant negativ auf die Relaxationsfähigkeit auf DeaNONOatgabe aus, die durch die zusätzliche Behandlung mit Angiotensin II weiter reduziert wurde. Für Signifikanzangaben siehe Tabelle 20.

Tabelle 20. DeaNONOat-Relaxation; Darstellung der pD_2 -Konzentrationen und Signifikanzangaben ($p < 0,05$ nach Bonferroni-Test).

DeaNONOat-induzierte Relaxation	pD_2	+/- SEM	* $p < 0,05$ zu WT ** $p < 0,05$ zu AMPK -/-
WT	6,7	0,046	
WT + AT II	6,3	0,123	*
AMPK -/-	6,4	0,052	*
AMPK -/- + AT II	5,9	0,155	**

3.2.2 NO-Gehalt

Um abschätzen zu können, ob auch in $\alpha 1$ AMPK $-/-$ Tieren die Endotheldysfunktion auf eine verminderte NO-Bioverfügbarkeit zurückzuführen ist, mitunter auch wegen bekannter AMPK-Wirkung auf eNOS, wurden die NO-Spiegel gemessen.^{124, 190, 187}

3.2.2.1 Bestimmung des NO-Gehalts im Serum mittels des NO-Analyzers

Die Angiotensin II-Behandlung des Wildtyps erhöhte die Nitritmenge (siehe 2.11) tendenziell auf 13.780 ± 2.666 nM im Vergleich zum unbehandelten Wildtyp (11.466 ± 1.385 nM). Die Nitritmenge in $\alpha 1$ AMPK $-/-$ Tieren allerdings war signifikant erhöht auf 24.242 ± 1.462 nM im Vergleich zum unbehandelten Wildtyp. Durch die Angiotensin II-Behandlung des $\alpha 1$ AMPK-defizienten Tiers wurde die Plasma Nitritmenge signifikant auf 33.845 ± 1.462 nM erhöht.

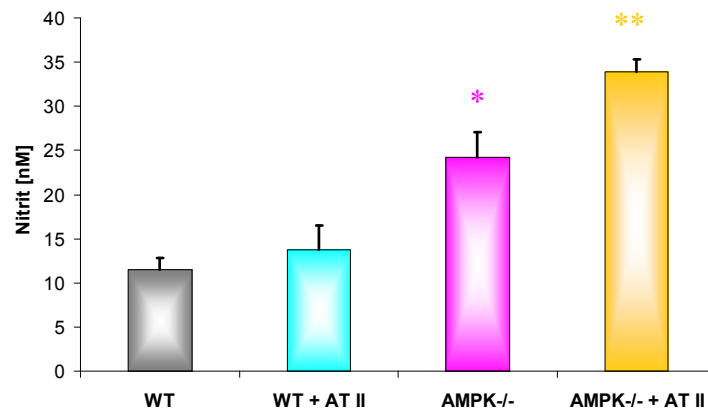


Abbildung 56. Serum-Nitrit in isoliertem Serum von Mäusen in nM, Mittelwerte \pm SEM (n = 6). Die Angiotensin II-Behandlung des Wildtyps zeigte eine nur tendenzielle Erhöhung der Plasma Nitritmenge. Die $\alpha 1$ AMPK-Defizienz resultierte in einer signifikanten Erhöhung der Nitritmenge, die weiter signifikant erhöht wurde durch zusätzliche Angiotensin II-Behandlung. Für Signifikanzangaben siehe Tabelle 21. * $\approx p < 0,05$ vs. WT; ** $\approx p < 0,05$ vs. AMPK $-/-$.

Tabelle 21. Serum-Nitrit Messung; Mittelwerte \pm SEM (n = 6) in nM, aus n = 6 Messungen und Signifikanzangaben (p<0,05 nach Bonferroni-Test).

Plasma Nitrit [nM]	Mittelwert	+/- SEM	* p<0,05 zu WT ** p<0,05 zu AMPK -/-
WT	11.466	1.385	
WT + AT II	13.780	2.666	
AMPK -/-	24.242	2.821	*
AMPK -/- + AT II	33.845	1.462	**

3.2.2.2 NO-Bioverfügbarkeit in Aortengewebe

Die NO-Bestimmung mittels Elektronen-Spin-Resonanz-Spektroskopie (siehe 2.27) bestätigte die Ergebnisse mit dem NO-Analyzer. Die Angiotensin II-Behandlung führte zu keiner signifikanten Änderung der NO-Bioverfügbarkeit (2.230 ± 175 AUC / mg Trockengewicht) im Vergleich zum unbehandelten Wildtyp (1.767 ± 111 AUC / mg Trockengewicht). Die α 1AMPK-Defizienz wirkte sich mit einer signifikanten Steigerung der NO-Bioverfügbarkeit auf 3.454 ± 257 AUC / mg Trockengewicht im Vergleich zum Wildtyp aus. Die Angiotensin II-Behandlung der α 1AMPK -/- Tiere führte zu einer weiteren Steigerung der NO-Bioverfügbarkeit in der intakten Aorta auf 4.371 ± 766 AUC / mg Trockengewicht (siehe Abbildung 57).

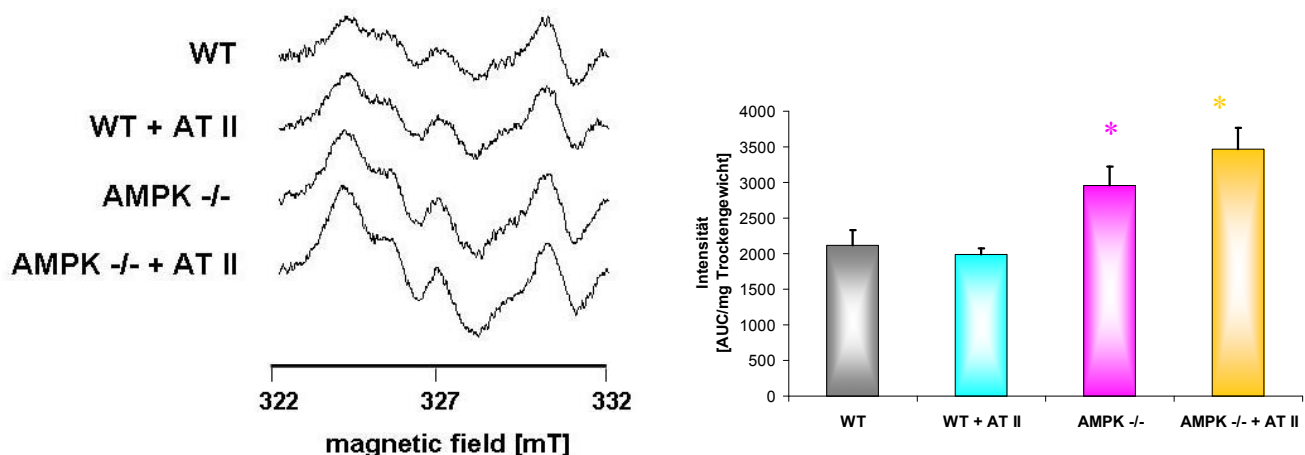


Abbildung 57. NO-Bioverfügbarkeit in Aortengewebe (n = 11 - 13) gemessen mit Elektronen-Spin-Resonanz-Spektroskopie, links repräsentative Spektren, rechts Darstellung der Mittelwerte \pm SEM. Die α 1AMPK-Defizienz führte zu einem signifikanten Anstieg der NO-Bioverfügbarkeit, die tendenziell verstärkt wurde durch die zusätzliche Angiotensin II-Behandlung. Für Signifikanzangaben siehe Tabelle 22. * \approx p < 0,05 vs. WT; ** \approx p < 0,05 vs. AMPK-/-.

Tabelle 22. NO-Bioverfügbarkeit; Mittelwerte \pm SEM (n = 11 - 13) und Signifikanzangaben (p<0,05 nach Bonferroni-Test).

NO-Bioverfügbarkeit [AUC/mg TG]	Mittelwert	+/- SEM	* p<0,05 zu WT ** p<0,05 zu AMPK -/-
WT	2.230	175,6	
WT + AT II	1.767	111,7	<i>n.s.</i>
AMPK -/-	3.454	257,3	*
AMPK -/- + AT II	4.371	766,7	*

Auch hier wurde die Peroxynitritbildung überprüft, da sich die NO-Mengen in α 1AMPK-defizienten Tieren zunächst nicht mit der festgestellten Endotheldysfunktion in Einklang bringen ließen. Wie im ersten Ansatz wurde nun eine verstärkte Superoxidbildung basierend auf der α 1AMPK-Defizienz bzw. der Angiotensin II-Behandlung überprüft.

3.2.3 Tyrosinnitrierung als Maß der Peroxynitrit-Produktion

Die Angiotensin II-Behandlung des Wildtyps führte zu einem leichten Anstieg der Tyrosinnitrierung (siehe 2.18 & 2.21) von $3.861 \pm 244,4$ AU auf $4.292 \pm 182,9$ AU. Diese Nitrierung war im α 1AMPK -/- Tier signifikant auf $5.276 \pm 434,8$ AU erhöht und durch die Angiotensin II-Behandlung nochmals signifikant gesteigert ($6.754 \pm 274,5$ AU) (siehe Abbildung 58).

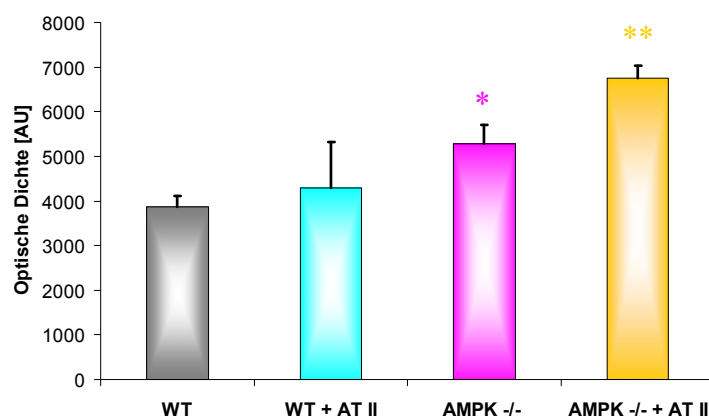


Abbildung 58. Nitrotyrosin-Markierung von Protein aus Herzhomogenaten von Mäusen mittels Dot Blot-Technik und Nitrotyrosin-spezifischem Antikörper, Mittelwerte \pm SEM (n = 18). Die Protein-Nitrierung nahm durch die α 1AMPK-Defizienz signifikant zu und wurde durch zusätzliche Angiotensin II Behandlung weiter signifikant gesteigert. Für Signifikanzangaben siehe Tabelle 23. * \approx p < 0,05 vs. WT; ** \approx p < 0,05 vs. AMPK-/-.

Tabelle 23. Protein-Nitrierung; Darstellung der Mittelwerte \pm SEM (n = 18) und Signifikanzangaben ($p < 0,05$ nach Bonferroni-Test).

Protein-Nitrierung [AU]	Mittelwert	+/- SEM	* $p < 0,05$ zu WT ** $p < 0,05$ zu AMPK -/-
WT	3.861	244,4	
WT + AT II	4.292	182,9	<i>n.s.</i>
AMPK -/-	5.276	434,8	*
AMPK -/- + AT II	6.754	274,5	**

Diese Resultate regten dazu an, zu prüfen, ob bei diesen Experimenten mit $\alpha 1$ AMPK -/- Tieren erhöhter oxidativer Stress im vaskulärem System auftritt, zuerst durch DHE-Färbung intakter Aortensegmente.

3.2.4 ROS-Detektion in intaktem Aortengewebe

Es zeigte sich, dass in Angiotensin II-behandelten Wildtyptieren im Vergleich zu unbehandelten Tieren die Oxidation von Dihydroethidin zu Ethidium (siehe 2.26) und somit das ROS-Vorkommen sowohl im Endothel als auch in der übrigen Gefäßwand erhöhte. Im unbehandelten $\alpha 1$ AMPK -/- Tier konnte im Vergleich zum zugehörigen Wildtyp kein deutlicher Anstieg festgestellt werden, allerdings verursachte die Behandlung des $\alpha 1$ AMPK -/- Tieres mit Angiotensin II einen deutlichen Anstieg des ROS-Gehaltes in der gesamten Gefäßwand.

Wie im ersten Teil dieser Arbeit beschrieben, wurde auch hier die *ex vivo*-Inkubation der Aortensegmente mit dem NO-Synthasen Inhibitor L-NAME durchgeführt. Wie in Abbildung 59 zu sehen ist, stieg das Superoxid-Vorkommen nach *ex vivo*-Inkubation mit L-NAME im unbehandelten Wildtyp leicht an, während in Angiotensin II-behandelten Wildtyp-Mäusen die Superoxid-Produktion als Zeichen der NO-Synthase-Entkopplung durch L-NAME unterbunden wurde (Endothel). Im $\alpha 1$ AMPK -/- Tier wurde durch L-NAME der endotheliale oxidative Stress leicht erhöht. Im mit Angiotensin II-behandelten $\alpha 1$ AMPK -/- allerdings wurde die Superoxid-Produktion durch die *ex-vivo*-L-NAME-Inkubation verringert, vereinbar mit einer Entkopplung des Enzyms.

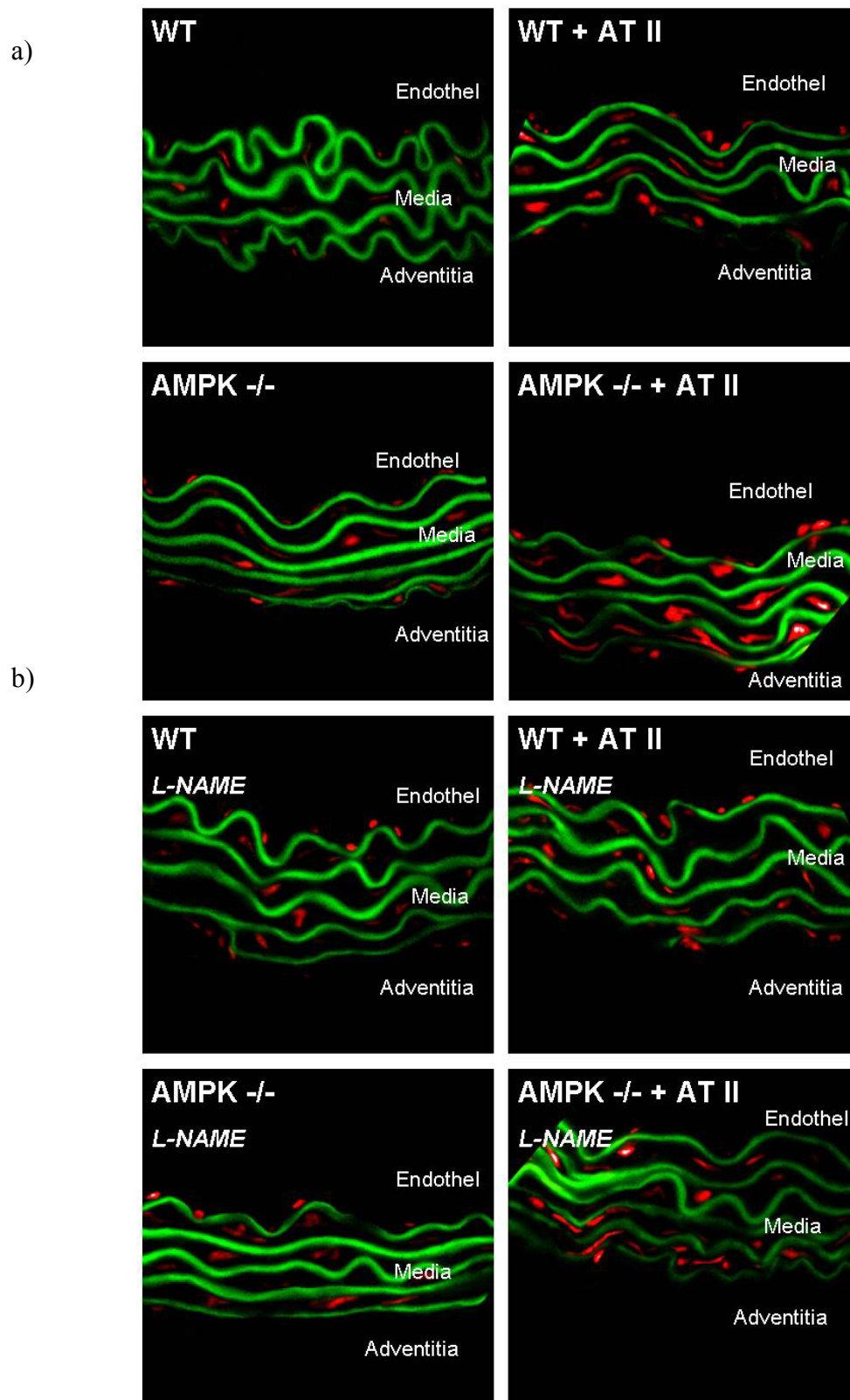


Abbildung 59. Superoxid-Detektion im intakten Aortengewebe, Inkubation der Aortensegmente mit Dihydroethidin, das durch Superoxidradikale zu Ethidium oxidiert wird, rote Fluoreszenz des Ethidiums, grüne Eigenfluoreszenz der Lamina; 400fache Vergrößerung; Darstellung repräsentativer Ergebnisse aus $n = 6$ Experimenten. a) die Aortensegmente wurden in Kontroll-Puffer inkubiert; b) Inkubation der Aortensegmente mit L-NAME, einem NOS-Inhibitor. Für Details siehe Text.

3.2.5 Analyse der möglichen Superoxidquellen

3.2.5.1 NADPH-Oxidase Aktivität in Herzmembranfraktionen

Wie schon in vorangegangenen Studien gezeigt werden konnte,^{5, 6, 34, 35, 104, 186, 205} führte die Behandlung mit Angiotensin II im Wildtyp (0,1 mg / kg / d) zu einer nahezu fünffachen Steigerung der NADPH-Oxidase Aktivität (Wildtyp 4.742 ± 181 Counts / mg [Protein] / Minute vs. Angiotensin II 24.273 ± 940 Counts / mg [Protein] / Minute).^{6, 186} Allein die Defizienz der $\alpha 1$ AMPK-Isoform durch knock out steigerte die NADPH-Oxidase Aktivität schon auf 7.226 ± 372 Counts / mg [Protein] / Minute. Die zusätzliche Behandlung der AMPK-defizienten Tiere mit Angiotensin II resultierte in einer signifikanten weiteren Erhöhung der NADPH-Oxidase Aktivität auf 34.905 ± 1.160 Counts / mg [Protein] / Minute im Vergleich zu den unbehandelten $\alpha 1$ AMPK -/- Tieren. Das Resultat entsprach einer siebenfach erhöhten Oxidase Aktivität im Vergleich zum unbehandelten Wildtyp (siehe 2.14).

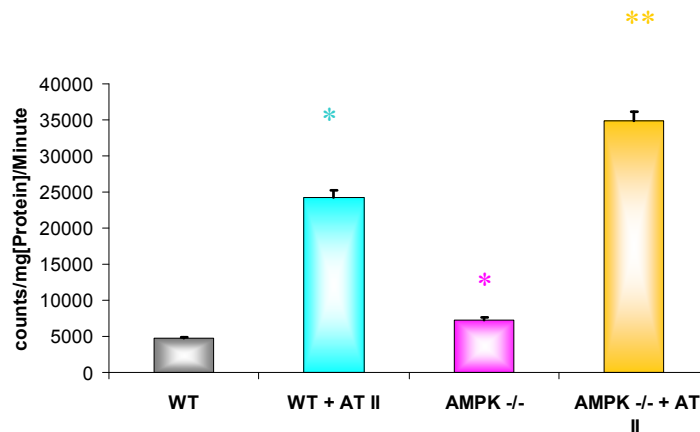


Abbildung 60. Aktivität von NADPH-Oxidase in Herzmembranfraktionen, bezogen auf Protein, Mittelwerte \pm SEM (n = 16). Durch die Angiotensin II-Behandlung stieg die NADPH-Oxidase Aktivität im Wildtyp signifikant an. Auch die $\alpha 1$ AMPK-Defizienz führte zum signifikanten Anstieg der NADPH-Oxidase Aktivität, die durch die Angiotensin II-Behandlung weiter signifikant gesteigert wurde. Für Signifikanzangaben siehe Tabelle 24. * $\approx p < 0,05$ vs. WT; ** $\approx p < 0,05$ vs. AMPK-/-.

Tabelle 24. NADPH-Oxidase Aktivität in Herzmembranfraktionen; Mittelwerte \pm SEM (n = 16) und Signifikanzangaben ($p < 0,05$ nach Bonferroni-Test).

NADPH-Oxidase Aktivität mittels Luzigenin ECL [Counts/mg/Minute]	Mittelwert	+/- SEM	* $p < 0,05$ zu WT ** $p < 0,05$ zu AMPK -/-
WT	4.742	181	
WT + AT II	24.273	940	*
AMPK -/-	7.226	372	*
AMPK -/- + AT II	34.905	1.160	**

3.2.5.2 Xanthinoxidase Aktivität im Serum

Im Wildtyp (WT: $32,2 \pm 17,3$ nM / Minute, immer in 50 μ l gemessen) führte die Behandlung mit der geringen Angiotensin II-Dosis zu einer nicht signifikanten Steigerung der Superoxidbildungsrate der Xanthinoxidase (siehe 2.13) (WT + AT II: $46,9 \pm 16,0$ nM / Minute). Auch die Defizienz der α 1AMPK-Aktivität beeinflusste die Superoxidbildungsrate der Xanthinoxidase nicht signifikant im Vergleich zum Wildtyp (α 1AMPK -/-: $47,9 \pm 12,6$ nM / Minute). Die Behandlung der α 1AMPK -/- Tiere mit Angiotensin II resultierte allerdings in einer signifikanten Steigerung der Superoxidbildungsrate auf $104,8 \pm 17,9$ nM / Minute im Vergleich zu den unbehandelten α 1AMPK -/- Tieren (siehe Abbildung 61).

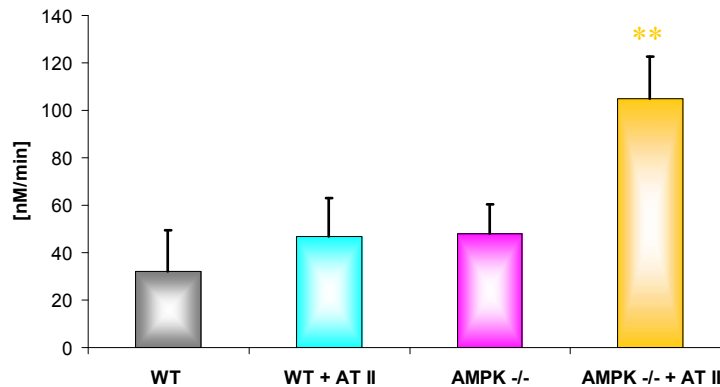


Abbildung 61. Superoxidbildungsrate durch Xanthinoxidase in Maus Serum, Mittelwerte \pm SEM (n = 12). Die Xanthinoxidase Aktivität zeigte einen nur tendenziellen Anstieg durch die Angiotensin II-Behandlung des Wildtyps und auch die α 1AMPK-Defizienz führt nur tendenziell zur Xanthinoxidase Aktivitätserhöhung. Die Behandlung mit Angiotensin II bei α 1AMPK defizienten Tieren führte allerdings zu einem signifikanten Anstieg der Xanthinoxidase Aktivität. Für Signifikanzangaben siehe Tabelle 25. * \approx p < 0,05 vs. WT; ** \approx p < 0,05 vs. AMPK-/-.

Tabelle 25. Superoxidbildungsrate durch Xanthinoxidase; Mittelwerte \pm SEM (n = 12) und Signifikanzangaben (p<0,05 nach Bonferroni-Test).

Xanthinoxidase Aktivität [nM / Minute]	Mittelwert	+/- SEM	* p<0,05 zu WT ** p<0,05 zu AMPK -/-
WT	32,2	17,3	
WT + AT II	46,9	16,0	<i>n.s.</i>
AMPK -/-	47,9	12,6	<i>n.s.</i>
AMPK -/- + AT II	104,8	17,9	**

3.2.5.3 Mitochondriale ROS-Produktion

Als dritte vaskuläre ROS-Quelle erwies sich die mitochondriale Superoxidproduktion (siehe 2.14), die durch die chronische Behandlung von Wildtyptieren (10.752 ± 424 Counts / mg [Protein] / Minute) mit Angiotensin II signifikant erhöht war (WT + AT II: 13.530 ± 1.048 Counts / mg [Protein] / Minute). Durch die Deletion der α 1AMPK wurde die mitochondriale ROS-Produktion im Vergleich zum Wildtyp ebenfalls signifikant gesteigert (α 1AMPK -/-: 14.503 ± 845 Counts / mg [Protein] / Minute). Durch die zusätzliche Behandlung mit Angiotensin II steigerte sich die mitochondriale Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies weiter

signifikant auf 19.583 ± 1.256 Counts / mg [Protein] / Minute im Vergleich zum unbehandelten knock-out-Tier (siehe Abbildung 62).

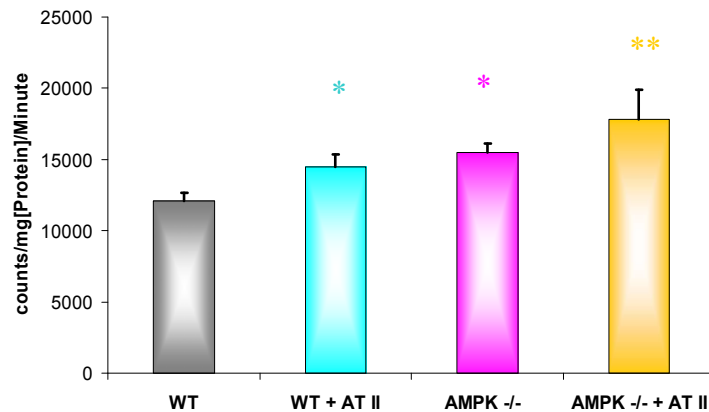


Abbildung 62. Superoxid Produktion durch isolierte Herzmitochondrien, Mittelwerte \pm SEM (n = 10). Sowohl die Angiotensin II-Behandlung im Wildtyp als auch die α 1AMPK-Defizienz führten zu einem signifikanten Anstieg der mitochondrialen ROS im Vergleich zum unbehandelten Wildtyp. Die Angiotensin II-Behandlung im α 1AMPK defizienten Tier führte zur weiteren signifikanten Steigerung der mitochondrialen ROS. Für Signifikanzangaben siehe Tabelle 26. * \approx p < 0,05 vs. WT; ** \approx p < 0,05 vs. AMPK-/-.

Tabelle 26. Superoxid Produktion durch isolierte Herzmitochondrien; Mittelwerte \pm SEM (n = 10) und Signifikanzangaben (p<0,05 nach Bonferroni-Test).

Mitochondriale ROS Produktion mittels L-012 ECL [Counts/mg/Minute]	Mittelwert	+/- SEM	* p<0,05 zu WT ** p<0,05 zu AMPK -/-
WT	12.099	792	
WT + AT II	14.472	1.563	*
AMPK -/-	15.497	1.219	*
AMPK -/- + AT II	17.790	1.974	**

Wie zuvor (siehe 3.1.7.3) wurde auch bei den α 1AMPK -/- Tieren die NADPH-Oxidase als Hauptquelle des durch Angiotensin II-induzierten vaskulären oxidativen Stresses identifiziert, während Mitochondrien und Xanthinoxidase nur in geringem Maße dazu beitragen.

3.2.6 Detektion von oxidativem Stress in Aortensegmenten durch Chemilumineszenz

Die Verwendung von Chemilumineszenzfarbstoffen, die neben der Superoxidbildung auch die Peroxynitritbildung in intakten, frisch isolierten Aortensegmenten detektieren (siehe 2.26), wurden angewendet, um die ROS- bzw. die RNS-Produktion eingehender zu untersuchen (siehe Abbildung 63 und Tabelle 27).

Dabei wurde Luzigenin als erster Chemilumineszenzfarbstoff genutzt, um spezifisch $O_2^{\cdot-}$ Radikale zu detektieren. Es zeigte sich, dass die Superoxid-Produktion durch Angiotensin II-Behandlung im Wildtyp anstieg (WT: $266 \pm 32,9$ Counts/mg (Trockengewicht des Aortensegments); WT + AT II: $378 \pm 82,6$ Counts/mg). Die $O_2^{\cdot-}$ Detektion in Aorten von $\alpha 1$ AMPK-defizienten Tieren im Vergleich zu Wildtyptieren änderte sich nicht. Die Angiotensin II-Behandlung der $\alpha 1$ AMPK $-/-$ Tiere resultierte in einer deutlichen Reduktion der messbaren freien $O_2^{\cdot-}$ Radikale (vermutlich durch vermehrtes Abfangen durch iNOS-gebildetes NO und Reaktion zu Peroxynitrit).

Der zweite Chemilumineszenz Farbstoff, L-012, detektiert neben dem $O_2^{\cdot-}$ Radikal mit höherer Affinität Peroxynitrit und mit der geringsten Affinität Wasserstoffperoxid. Hier konnte ein Anstieg in $\alpha 1$ AMPK $-/-$ Tieren ($20.795 \pm 6.353,1$ Counts/mg) im Vergleich zum korrespondierenden Wildtyp ($15.903 \pm 4.317,1$ Counts/mg) festgestellt werden. Die Angiotensin II-Behandlung der $\alpha 1$ AMPK-defizienten Tiere resultierte in einem deutlich erhöhten L-012 Chemilumineszenzsignal von $35.178 \pm 6.620,7$ Counts/mg). Im Wildtyptier zeigte sich keine Steigerung des L-012 Signals durch die Angiotensin II-Behandlung im Gegensatz zum unbehandelten Wildtyptier (WT + AT II: 15.790 ± 3.473 Counts/mg).

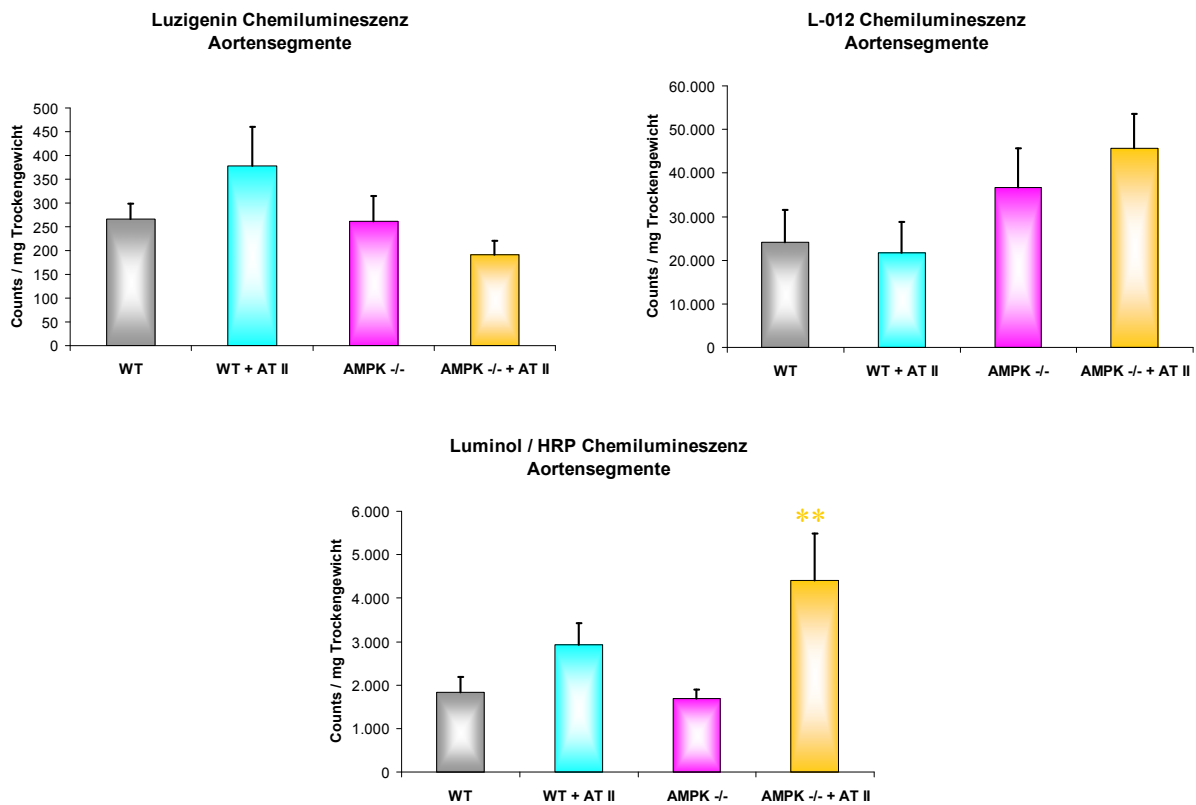


Abbildung 63. Chemilumineszenz von intakten Aortensegmenten mit Luzigenin, L-012 und Luminol/HRP, Mittelwerte \pm SEM (n = 4 - 6). Die durch Luzigenin vermittelte Chemilumineszenz (spezifische Detektion von $O_2^{\cdot -}$ Radikalen) zeigte nur im Angiotensin II-behandelten Wildtyp einen Anstieg des ROS-Signals. Die L-012 vermittelte Chemilumineszenz (Detektion von $O_2^{\cdot -}$, Peroxynitrit und H_2O_2) zeigte einen Anstieg des Signals in Tieren, mit $\alpha 1$ AMPK-Defizienz und einen weiteren Anstieg in $\alpha 1$ AMPK-defizienten Tieren, die mit Angiotensin II behandelt worden waren. Der Ansatz mit Luminol plus HRP (Detektion von extrazellulärem Wasserstoffperoxid und Peroxynitrit) zeigte einen signifikanten Anstieg des Signals in Aorten von $\alpha 1$ AMPK-defizienten Tieren, die mit Angiotensin II behandelt worden waren, aber auch Angiotensin II-behandelte Wildtypen zeigten ein verstärktes ROS-Signal. Für Signifikanzangaben siehe Tabelle 27. * \approx p < 0,05 vs. WT; ** \approx p < 0,05 vs. AMPK-/-.

Tabelle 27. Chemilumineszenz von intakten Aortensegmenten; Mittelwerte \pm SEM (n = 4 - 6) und Signifikanzangaben (p<0,05 nach Bonferroni-Test).

O₂⁻ mittels Luzigenin ECL [Counts / mg]	Mittelwert	+/- SEM	* p<0,05 zu WT ** p<0,05 zu AMPK -/-
WT	266	32,9	
WT + AT II	378	82,6	<i>n.s.</i>
AMPK -/-	262	51,9	<i>n.s.</i>
AMPK -/- + AT II	192	29,1	<i>n.s.</i>
O₂⁻, ONOO⁻, H₂O₂ mittels L-012 ECL [Counts / mg]	Mittelwert	+/- SEM	
WT	15.903	4.317,1	
WT + AT II	15.790	3.473,0	<i>n.s.</i>
AMPK -/-	20.795	6.353,1	<i>n.s.</i>
AMPK -/- + AT II	35.178	6.620,7	<i>n.s.</i>
ONOO⁻, H₂O₂ mittels Luminol / HRP ECL [Counts / mg]	Mittelwert	+/- SEM	
WT	2.038	426,8	
WT + AT II	3.398	641,0	<i>n.s.</i>
AMPK -/-	1.999	339,5	<i>n.s.</i>
AMPK -/- + AT II	3.873	649,1	**

Der dritte Ansatz enthielt ein Gemisch aus HRP und dem Chemilumineszenzfarbstoff Luminol. Dieses System detektiert vor allem extrazelluläres Wasserstoffperoxid und Peroxynitrit. Dabei zeigte sich zunächst ein leichter Anstieg im Angiotensin II-behandelten Wildtyp von $2.038 \pm 426,8$ auf $3.398 \pm 641,0$ Counts/mg. Die α 1AMPK-Defizienz erzeugte keine signifikante Abweichung vom Wildtyp ($1.999 \pm 339,5$ Counts/mg), allerdings resultierte die Angiotensin II-Behandlung dieser Tiere in signifikant höheren Chemilumineszenzsignalen ($3.873 \pm 649,1$ Counts/mg).

3.2.7 mRNA-Expression der NADPH-Oxidase Untereinheiten

Da auch bei den Experimenten mit α 1AMPK defizienten Mäusen die NADPH-Oxidase als Hauptquelle des Angiotensin II-induzierten oxidativen Stresses identifiziert wurde, sollte anschließend die mRNA-Expression der Untereinheiten NOX-1, NOX-2 und p22^{phox} mittels real time-PCR untersucht werden (siehe 2.22 – 2.25).

Die mRNA-Expression von NOX-1 stieg durch die Angiotensin II-Behandlung im Wildtyp-tier von $100 \pm 19,48$ % auf $184 \pm 18,86$ % signifikant an. Im $\alpha 1$ AMPK $-/-$ Tier war schon ohne Behandlung eine gesteigerte Expression bei $180 \pm 17,66$ % festzustellen, die ebenfalls durch die Angiotensin II-Behandlung auf $230 \pm 31,96$ % anstieg.

Die Expression von p22^{phox} wurde im Wildtyp durch die Angiotensin II-Behandlung nicht signifikant gesteigert, während die Behandlung im $\alpha 1$ AMPK $-/-$ Tier von ursprünglich $62 \pm 3,55$ % auf $132 \pm 25,36$ % anstieg.

Die Expression der NOX-2 Untereinheit der NADPH-Oxidase im Wildtyp veränderte sich durch die Angiotensin II-Behandlung nicht signifikant. Im $\alpha 1$ AMPK-defizienten Tier allerdings resultierte die Angiotensin II-Behandlung in einem signifikanten Anstieg der NOX-2-Expression auf $273 \pm 97,92$ %. Da die NOX-2 neben dem Endothel vorwiegend in phagozytären Zellen exprimiert wird, wurde anschließend geprüft, ob die AMPK-Deletion die vaskuläre Inflammation fördert.

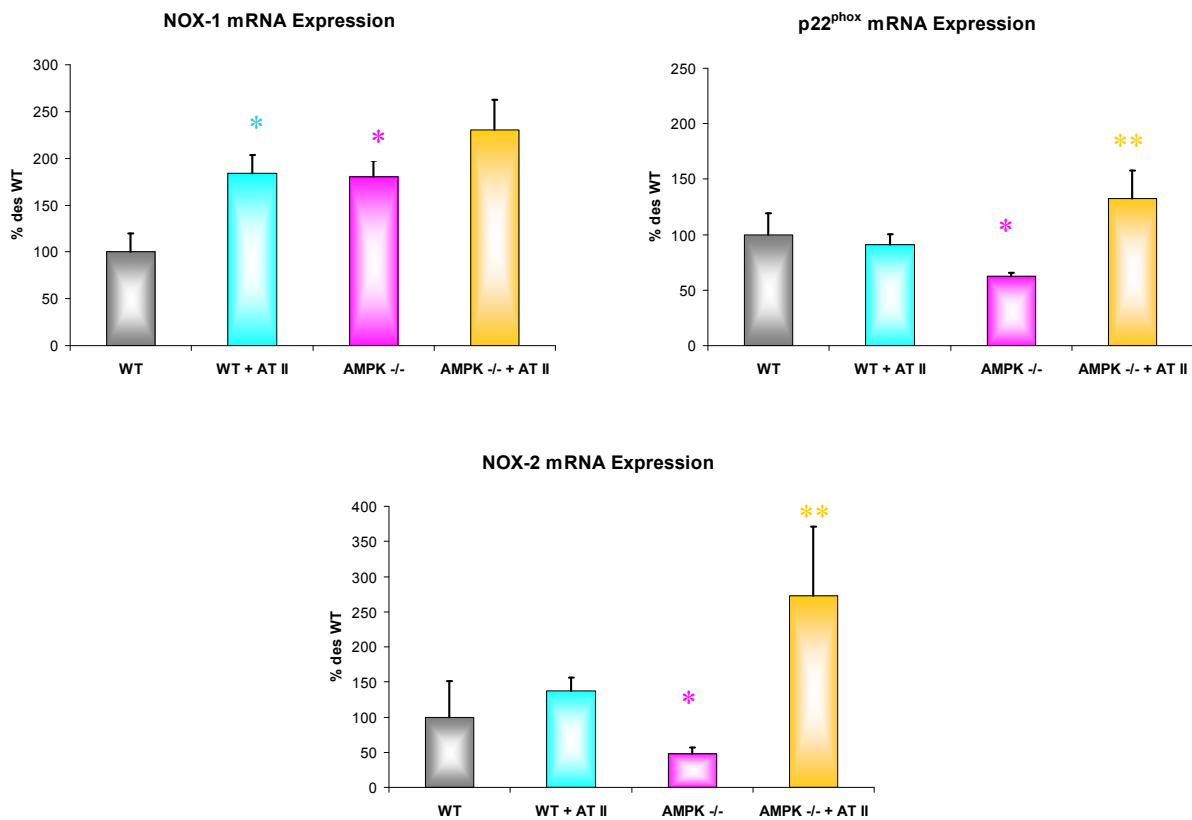


Abbildung 64. mRNA-Expression der NADPH-Oxidase-Untereinheiten NOX-1, p22^{phox} und NOX-2 in Maus Aorta, Mittelwerte als % des WT \pm SEM (n = 6), wobei WT = 100%. Die Expression von NOX-1 mRNA zeigte nach Angiotensin II-Behandlung des Wildtyps einen signifikanten Anstieg, der auch im α 1AMPK-defizienten Tier beobachtet wurde. Die zusätzliche Behandlung des α 1AMPK-defizienten Tiers mit Angiotensin II führte zu einem weiteren Anstieg. Bei der p22^{phox}-Expression führte nur die Angiotensin II-Behandlung des α 1AMPK-defizienten Tiers zu einem signifikanten Anstieg. Die NOX-2 Expression zeigte die deutlichste Expressionssteigerung im α 1AMPK-defizienten Tier, das mit Angiotensin II behandelt wurde. Für Signifikanzangaben siehe Tabelle 28. * \approx p < 0,05 vs. WT; ** \approx p < 0,05 vs. AMPK^{-/-}.

Tabelle 28. mRNA-Expression der NADPH-Oxidase-Untereinheiten NOX-1, p22^{phox} und NOX-2, Mittelwerte \pm SEM in % bezogen auf die Kontrollgruppe (WT \equiv 100%) (n = 6) und Signifikanzangaben ($p < 0,05$ nach Bonferroni-Test).

NOX-1 mRNA-Expression [% des WT]	Mittelwert	+/- SEM	* $p < 0,05$ zu WT ** $p < 0,05$ zu AMPK -/-
WT	100	19,48	
WT + AT II	184	18,86	*
AMPK -/-	180	17,66	*
AMPK -/- + AT II	230	31,96	<i>n.s.</i>
p22^{phox} mRNA-Expression [% des WT]			
WT	100	19,07	
WT + AT II	91	9,19	<i>n.s.</i>
AMPK -/-	62	3,55	*
AMPK -/- + AT II	132	25,36	**
NOX-2 mRNA-Expression [% des WT]			
WT	100	51,07	
WT + AT II	137	18,82	<i>n.s.</i>
AMPK -/-	47	9,35	*
AMPK -/- + AT II	273	97,92	**

3.2.8 Vaskuläre Inflammation

Als Inflammationsmarker wurden hierzu die mRNA-Expression der Gene für iNOS, COX-2 und VCAM-1 analysiert (siehe 2.22 – 2.25). Die α 1AMPK-defizienten Tiere zeigten durch die Angiotensin II-Behandlung durchweg eine stark erhöhte Expression inflammatorischer Marker (siehe Abbildung 65 und Tabelle 29).

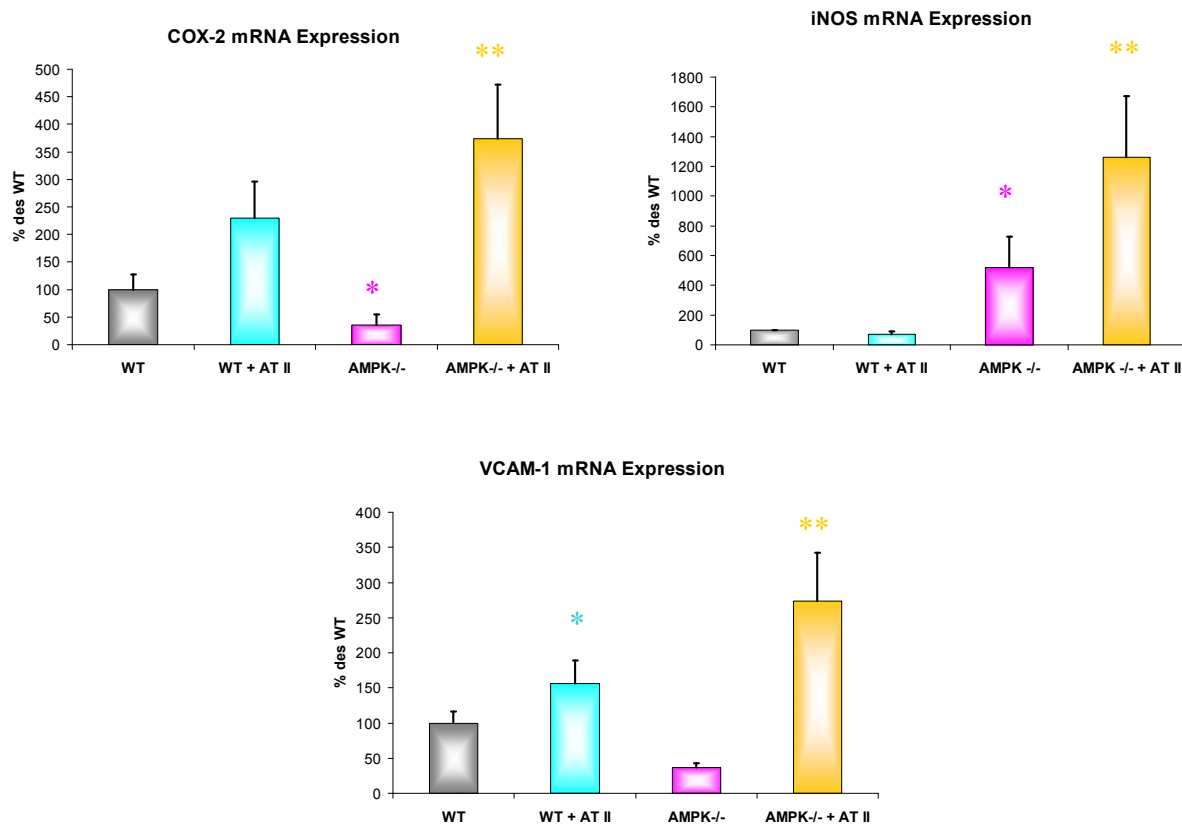


Abbildung 65. mRNA-Expression der Inflammationsmarker VCAM-1, iNOS und COX-2, Mittelwerte als % des WT \pm SEM (n = 5 - 6), wobei WT = 100%. Alle Inflammationsmarker zeigten eine starke Expressionssteigerung ihrer mRNA in α 1AMPK-defizienten Tieren, die mit Angiotensin II behandelt worden waren. Für Signifikanzangaben siehe Tabelle 29. * \approx p < 0,05 vs. WT; ** \approx p < 0,05 vs. AMPK^{-/-}.

Tabelle 29: mRNA-Expression der Inflammationsmarker COX-2, iNOS und VCAM-1; Darstellung der prozentualen Mittelwerte \pm SEM (n = 5 - 6) (WT \equiv 100%) und Signifikanzangaben (p<0,05 nach Bonferroni-Test).

COX-2 mRNA-Expression [% des WT]	Mittelwert	+/- SEM	* p<0,05 zu WT ** p<0,05 zu AMPK -/-
WT	100	27,0	
WT + AT II	230	65,7	*
AMPK -/-	36	19,3	*
AMPK -/- + AT II	374	97,6	**
iNOS mRNA-Expression [% des WT]			
WT	100	0,0	
WT + AT II	73	15,1	<i>n.s.</i>
AMPK -/-	522	204,9	*
AMPK -/- + AT II	1262	411,0	**
VCAM-1 mRNA-Expression [% des WT]			
WT	100	16,1	
WT + AT II	156	32,7	*
AMPK -/-	37	6,2	*
AMPK -/- + AT II	273	68,7	**

Die Expression von COX-2 im Wildtyp (100 \pm 27,0 %) wurde durch die Angiotensin II-Behandlung signifikant gesteigert (230 \pm 65,7 %). Bei der Behandlung mit Angiotensin II der α 1AMPK-defizienten Mäuse (ursprünglich 36 \pm 19,3 % bezogen auf den WT) wurde die Expression mehr als dreifach gesteigert (374 \pm 97,6 %).

Die Expression der induzierbaren NO-Synthase (iNOS) wurde im Wildtyp von 100 % auf 73 \pm 15,1 % durch Angiotensin II nicht signifikant geändert. Einen deutlichen Anstieg auf 522 \pm 204,9 % konnte allerdings im α 1AMPK-defizienten Tier festgestellt werden. Die zusätzliche Behandlung mit Angiotensin II ließ die mRNA Expression der iNOS sogar 12fach (1.262 \pm 411,0 %) steigen.

Der dritte Marker für vaskuläre Inflammation zeigte ein ähnliches Muster. Bei der Behandlung des Wildtyps mit Angiotensin II stieg die Expression von VCAM-1 auf 156 \pm 32,7 % an. Die Behandlung des α 1AMPK -/- Tieres mit Angiotensin II resultierte in einer Expressionssteigerung auf 273 \pm 68,7 %.

Aufgrund dieser Ergebnisse konnte vermutet werden, dass die Inflammationsmarker eine starke Makrophageninfiltration in die Gefäßwand anzeigten. Daher wurde die Makrophageninfiltration mit Hilfe von Immunhistochemie und spezifischem Antikörper gegen CD68 (zeigt Makrophagen an) untersucht, wobei keine merklichen Abweichungen innerhalb der vier untersuchten Tiergruppen sichtbar wurden. Abbildung 66 zeigt repräsentative Ergebnisse (insgesamt 12 Tieren pro Gruppe).

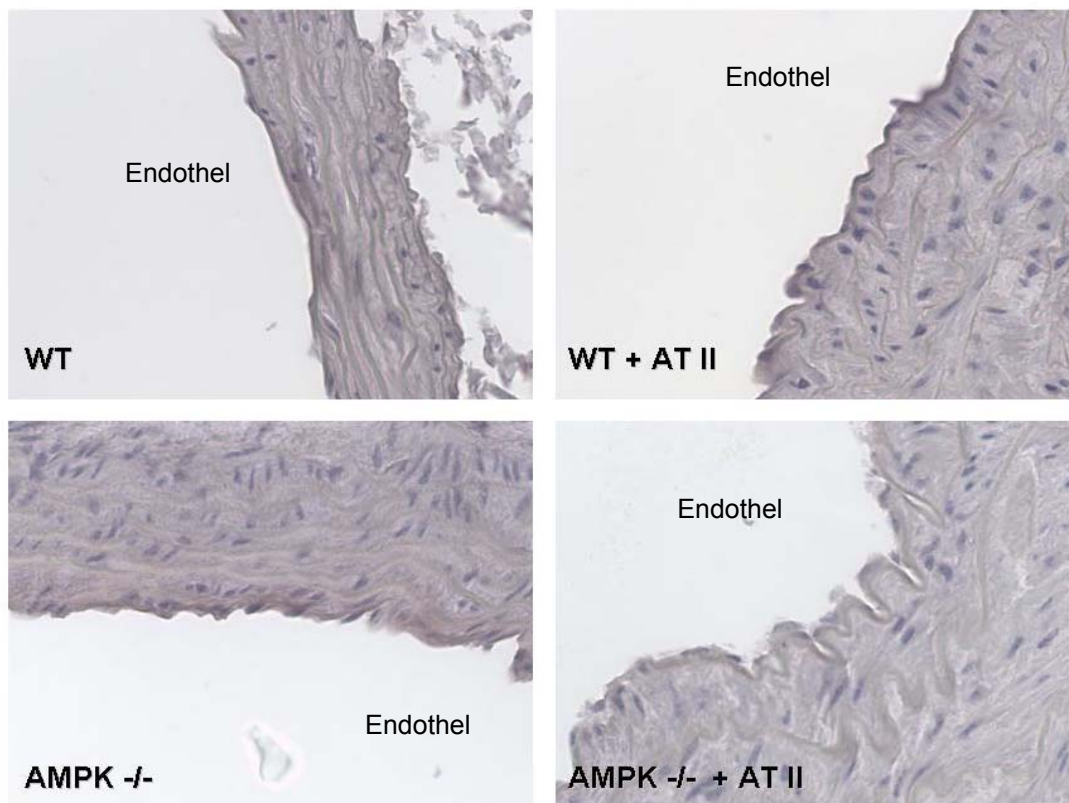


Abbildung 66. Immunhistochemie von in Paraformaldehyd (4%) fixierten Aortensegmenten. Gezeigt sind repräsentative Aufnahmen; blau eingefärbt wurden die Zellkerne durch Gegenfärbung mit Hämatoxylin, braun gefärbt sind spezifische Antikörperbindungen gegen CD68. Orientierung: Endothel nach links bzw. nach unten. Es wurde keine merkliche Änderung der Makrophageninfiltration innerhalb der vier untersuchten Tiergruppen sichtbar.

3.2.10 Proteinexpressionsstudien

Zunächst wurde mittels Western Blot (siehe 2.16 – 2.20) geprüft, ob der oben gezeigte Anstieg in der NO-Bioverfügbarkeit, sowie die erhöhten Serum Nitrit-Konzentrationen auf die Expression bzw. die aktivitätsfördernde Phosphorylierung der endothelialen NO-Synthase zurückzuführen sein könnten. Wie Abbildung 67 zeigt, wurde in mit Angiotensin II-behandelten Wildtyptieren eine signifikante Reduktion der eNOS-Phosphorylierung an Serin 1177 festgestellt (WT: $100 \pm 7,5$ %; WT + AT II: $49 \pm 15,5$ %), was in $\alpha 1$ AMPK $-/-$ Tieren ebenfalls der Fall war (AMPK $-/-$: $78 \pm 12,4$; AMPK $-/-$ + AT II: $51 \pm 12,9$ %). Diese Resultate schlossen eNOS als verantwortliche NO-Quelle in den alpha1AMPK-knock-out-Mäusen aus.

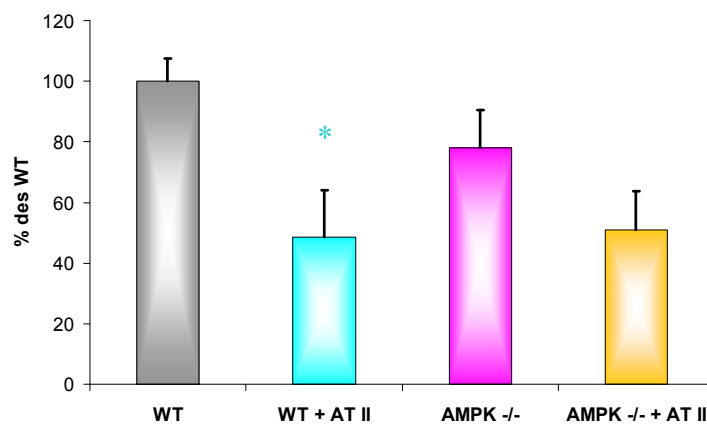


Abbildung 67. Densitometrische Auswertung der Western Blots von Maus Aorten. eNOS-Phosphorylierung: Mittelwerte als % des WT \pm SEM, wobei WT = 100% (n = 6). Durch die Behandlung mit Angiotensin II reduzierte sich die eNOS-Phosphorylierung im Wildtyp signifikant. Die $\alpha 1$ AMPK-Defizienz resultierte in einer tendenziellen Reduktion der Phosphorylierung, die sich durch zusätzliche Angiotensin II-Behandlung verringerte. Für Signifikanzangaben siehe Tabelle 30. * \approx p < 0,05 vs. WT; ** \approx p < 0,05 vs. AMPK $-/-$.

Tabelle 30. Densitometrische Auswertung der Western Blots von Maus Aorten. eNOS-Phosphorylierung: Mittelwerte in % des WT \pm SEM (n = 6); WT = 100% und Signifikanzangaben ($p < 0,05$ nach Bonferroni-Test).

eNOS- Phosphorylierung (Ser1177) [% des WT]	Mittelwert	+/- SEM	* $p < 0,05$ zu WT ** $p < 0,05$ zu AMPK -/-
WT	100	7,5	
WT + AT II	49	15,5	*
AMPK -/-	78	12,4	<i>n.s.</i>
AMPK -/- + AT II	51	12,9	*

Weiterhin wurde die mRNA-Expressionssteigerung der phagozytären NOX-2-Untereinheit auf Proteinebene mittels Western Blot (siehe 2.16 – 2.20) überprüft. Das Resultat der mRNA-Untersuchungen konnte bestätigt werden (Abbildung 68 und Tabelle 31). Im Wildtyp konnte nach Angiotensin II-Behandlung keine signifikante Änderung in der Proteinexpression festgestellt werden (WT $100 \pm 16,2$ % und WT + AT II $140 \pm 44,2$ %). Allerdings führte die Angiotensin II-Behandlung in $\alpha 1$ AMPK-defizienten Tieren zu einer signifikanten Steigerung der NOX-2-Proteinexpression.

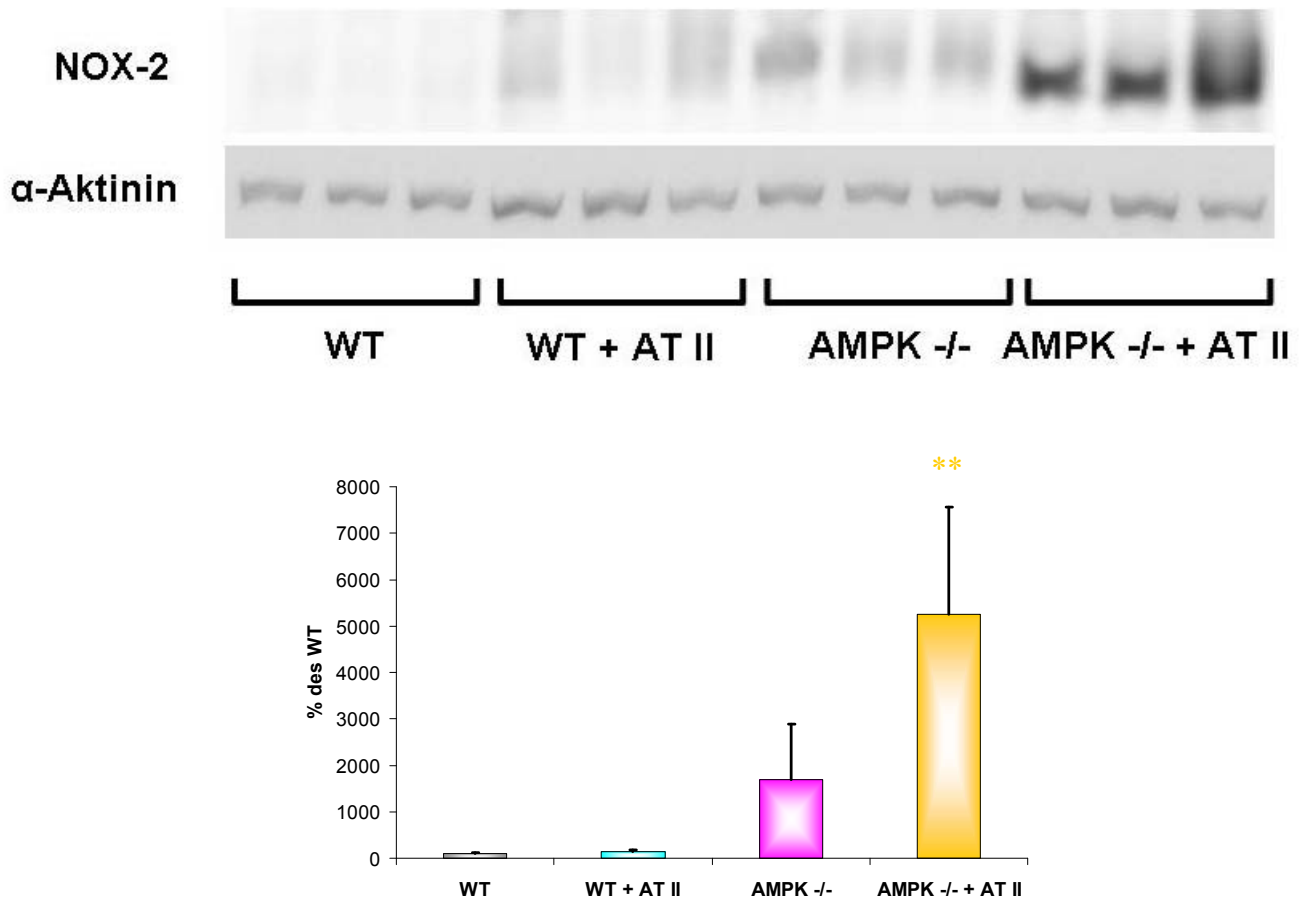


Abbildung 68. Western Blots der NOX-2 Expression und densitometrische Auswertung, Mittelwerte als % des WT \pm SEM, wobei WT = 100% (n = 6). Es war nur bei α 1AMPK-defizienten Tieren, die mit Angiotensin II behandelt worden waren eine signifikante Expressionssteigerung von NOX-2 auf Proteinebene festzustellen. Für Signifikanzangaben siehe Tabelle 31. * \approx p < 0,05 vs. WT; ** \approx p < 0,05 vs. AMPK^{-/-}.

Tabelle 31. Densitometrische Auswertung der NOX-2 Expression ; Mittelwerte in % des WT \pm SEM (n = 6); WT \equiv 100% und Signifikanzangaben (p < 0,05) nach Bonferroni-Test.

NOX-2 Protein-Expression [% des WT]	Mittelwert	+/- SEM	* p < 0,05 zu WT ** p < 0,05 zu AMPK^{-/-}
WT	100	16,2	
WT + AT II	140	44,2	n.s.
AMPK ^{-/-}	1.685	1.210,0	*
AMPK ^{-/-} + AT II	5.257	2.297,1	**

3.2.11 Immunhistochemische Untersuchung in Aortensegmenten

Mit den bisherigen Untersuchungen konnte die Expressionssteigerung von NOX-2 in mit Angiotensin II behandelten α 1AMPK $-/-$ Tieren sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene nachgewiesen werden. Mittels Immunhistochemie (siehe 2.28) mit spezifischen Antikörpern gegen NOX-2 sollte nun die Lokalisation in intakten Gefäßen untersucht werden. Wie mittels Western Blot und real time-PCR gezeigt werden konnte, steigt das NOX-2 Vorkommen in α 1AMPK-defizienten Tieren, die mit Angiotensin II behandelt worden waren, stark an. Dasselbe Ergebnis war in Gefäßen, vor allem in der Adventitia, aber auch im Endothel zu sehen (Abbildung 69). Die Hämatoxylin-Gegenfärbung zeigt Zellkerne in blau, braune Verfärbungen zeigen eine positive Reaktion des spezifischen Antikörpers gegen NOX-2.

Die NOX-2-Expression war in Gefäßen aus unbehandeltem Wildtyp kaum nachweisbar (siehe Abbildung 68). Das änderte sich allerdings durch die Angiotensin II-Behandlung. Die NOX-2-Expression nahm durch die Angiotensin II-Behandlung des Wildtyps leicht zu, was sowohl für Endothel als auch für die Adventitia galt. Die α 1AMPK-Defizienz führte nicht zu einer signifikanten Steigerung der NOX-2-Expression in Endothel oder Adventitia. Aber die Behandlung der α 1AMPK-defizienten Tiere mit Angiotensin II führte zu einem starken Anstieg der Expression der NOX-2 in Endothel und Adventitia.

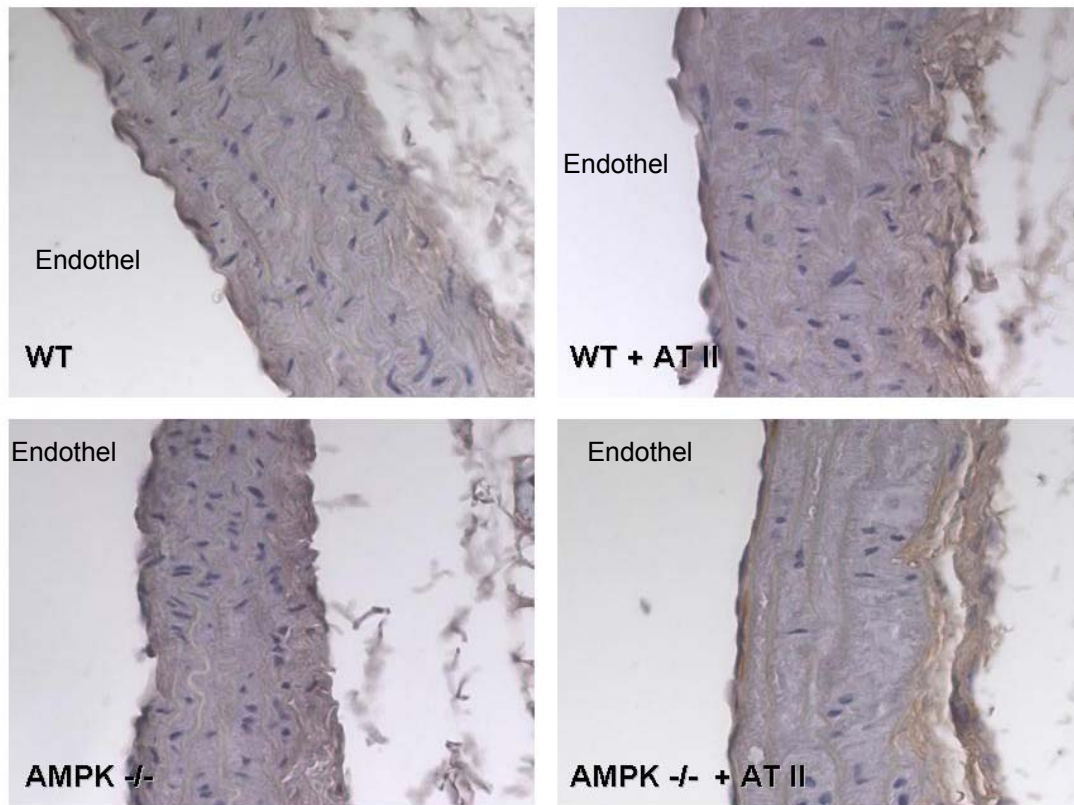


Abbildung 69. Immunhistochemie von in Paraformaldehyd (4%) fixierten Aortensegmenten; gezeigt sind repräsentative Aufnahmen; blau eingefärbt wurden die Zellkerne durch Gegenfärbung mit Hämatoxylin, braun gefärbt sind spezifische Antikörper gegen NOX-2; Orientierung: Endothel links. Vor allem im Angiotensin II-behandelten α 1AMPK-defizienten Tier war die Färbung von NOX-2 im Endothel und in der Adventitia verstärkt.

Weitere immunhistochemische Untersuchungen wurden mit spezifischen Antikörpern gegen Nitrotyrosin durchgeführt, um die oben gezeigten Ergebnisse im Herzgewebe in der Aorta zu überprüfen. Es konnte gezeigt werden, dass die Tyrosinnitrierung in den Gefäßen der Wildtyp-tiere durch die Angiotensin II-Behandlung im adventitialen Gewebe leicht zunahm, was die bisherigen Daten unterstützt. Die α 1AMPK-Defizienz führte zu einem sehr leichten Anstieg der Nitrotyrosinfärbung im Endothelbereich, die durch die Angiotensin II-Behandlung deutlich verstärkt wurde. Durch die Angiotensin II-Behandlung der α 1AMPK-defizienten Tiere wurde die Nitrierung der Tyrosinreste sowohl im Endothel als auch in der Adventitia um ein Vielfaches erhöht (Abbildung 70). Damit konnten die vorher mittels DotBlot erhobenen Daten, die mit Herzhomogenaten durchgeführt wurden, auch in Gefäßen bestätigt werden.

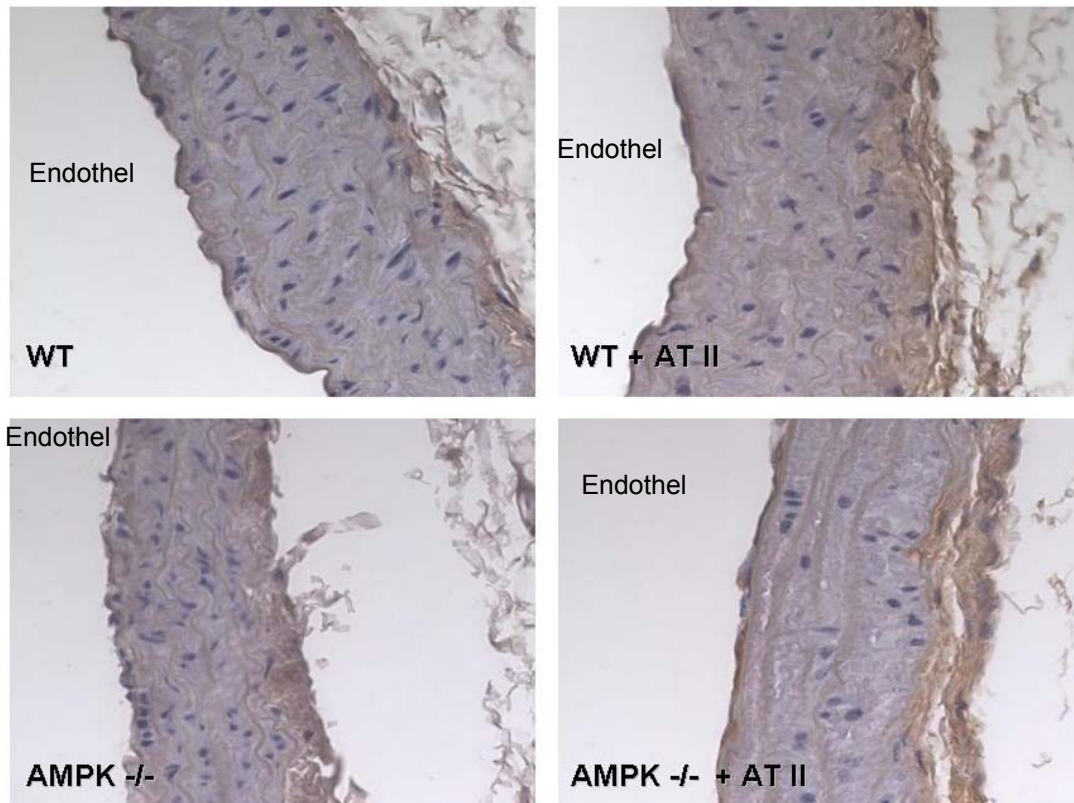


Abbildung 70. Immunhistochemie der in Paraformaldehyd (4%) fixierten Aortensegmente; gezeigt sind repräsentative Aufnahmen; blau eingefärbt wurden die Zellkerne durch die Gegenfärbung mit Hämatoxylin, braun gefärbt sind spezifische Antikörperbindungen an Nitrotyrosin; Orientierung: Endothel links. Eine Steigerung der Protein-Nitrierung konnte bereits im WildtypTier, das mit Angiotensin II behandelt wurde festgestellt werden. Eine weitere Steigerung im Endothel- und Adventitia-Bereich allerdings zeigte sich im α 1AMPK-defizienten Tier, das mit Angiotensin II behandelt wurde.

3.2.12 Antioxidative Kapazität des Serums

Der oxidative Stress in α 1AMPK-defizienten Tieren und die Hinweise auf vaskuläre Inflammation ließen vermuten, dass die antioxidative Kapazität des Serums (siehe 2.12) beeinträchtigt wurde. Unter physiologischen Bedingungen schützt die antioxidative Wirkung des Serums vor kurzzeitig auftretenden ROS-Überproduktionen, was bei andauerndem oxidativem Stress allerdings nicht ausreichend sein könnte.

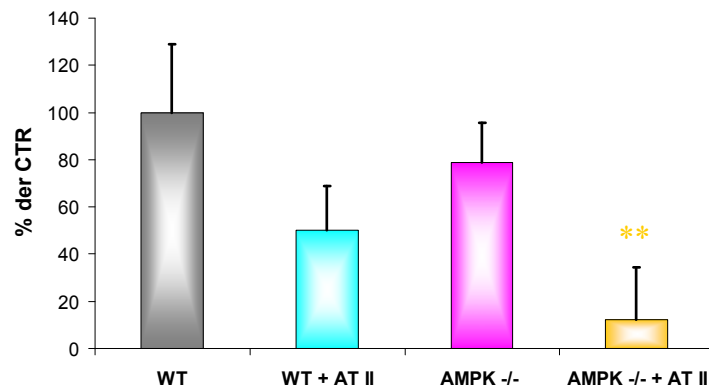


Abbildung 71. DPP• antioxidative Kapazität von Maus Serum, photometrische Messung bei 517 nm; Mittelwerte als % des WT \pm SEM (n = 18 - 24), wobei WT = 100%. Die antioxidative Kapazität wurde bereits im Wildtyp durch die Angiotensin II-Behandlung gesenkt. Durch die zusätzliche α 1AMPK-Defizienz allerdings wurde die antioxidative Kapazität nochmals signifikant reduziert. Für Signifikanzangaben siehe Tabelle 32. * \approx p < 0,05 vs. WT; ** \approx p < 0,05 vs. AMPK-/-.

Tabelle 32. DPP• antioxidative Kapazität von Maus Serum; Mittelwerte als % des WT \pm SEM (n = 18 - 24) (WT = 100 %) und Signifikanzangaben (p<0,05 nach Bonferroni-Test).

Antioxidative Kapazität [% des WT]	Mittelwert	+/- SEM	* p<0,05 zu WT ** p<0,05 zu AMPK -/-
WT	100.0	28.9	
WT + AT II	50.2	18.7	<i>n.s.</i>
AMPK -/-	79.0	16.5	<i>n.s.</i>
AMPK -/- + AT II	12.2	22.3	**

Die Angiotensin II-Behandlung führte im Wildtyp zu einer tendenziellen Reduktion der antioxidativen Kapazität (von ursprünglich $100 \pm 28,9$ % auf $50 \pm 18,7$ %, siehe Abbildung 71 Tabelle 32). Die α 1AMPK-Defizienz verursachte keine signifikante Senkung der antioxidativen Kapazität ($79 \pm 16,5$ %). Die Angiotensin II-Behandlung aber resultierte in einer signifikanten Reduktion der antioxidativen Kapazität auf nur noch $12 \pm 22,3$ % (Abbildung 71, Tabelle 32).

3.3 Zusätzliche Tiermodelle

Um herauszufinden, ob die beobachteten vaskulären Effekte der AMPK spezifisch für eine Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems sind oder generell bei der Endotheldysfunktion und Inflammation eine Rolle spielen, wurden Mäuse mit bakteriellem Endotoxin (LPS = Lipopolysaccharid) behandelt.

3.3.1 Lipopolysaccharid-induzierter oxidativer Stress & Endotheldysfunktion

Es wurden den oben erwähnten Tieren Lipopolysaccharid (LPS 15 mg/kg) durch einmalige subkutane Injektion verabreicht. Die Tiere wurden nach 24 Stunden unter Narkose getötet und die Organe nach Entnahme aufgearbeitet.

3.3.1.1 Bestimmung der Gefäßfunktion mittels isometrischer Tonusstudien

Wie Abbildung 72 zeigt, führte die einmalige LPS-Injektion (15 mg / kg) beim Wildtyp zu einer signifikanten Reduktion der Endothelfunktion (2.15). Die durch Acetylcholin (Ach) ausgelöste maximale Relaxation der Kontrollgruppe von $58 \pm 1,8 \%$ ($pD_2: 6,9 \pm 0,066$) verschob sich kaum auf $58 \pm 2,0 \%$ ($pD_2: 6,5 \pm 0,079$). Durch die Vorbehandlung mit AICAR konnte die Endothelfunktion wieder deutlich gesteigert werden, was sich in einer maximalen Relaxation von $63 \pm 4,1 \%$ ($pD_2: 6,8 \pm 0,094$) zeigte (Abbildung 72). In $\alpha 1$ AMPK $-/-$ Tieren hingegen konnte AICAR keine Verbesserung der durch LPS induzierten endothelialen Dysfunktion erzielt werden, was einen AMPK-unabhängigen, unspezifischen Effekt von AICAR ausschließt (maximale Relaxation $52 \pm 6,8 \%$ ($pD_2: 6,6 \pm 0,107$)).

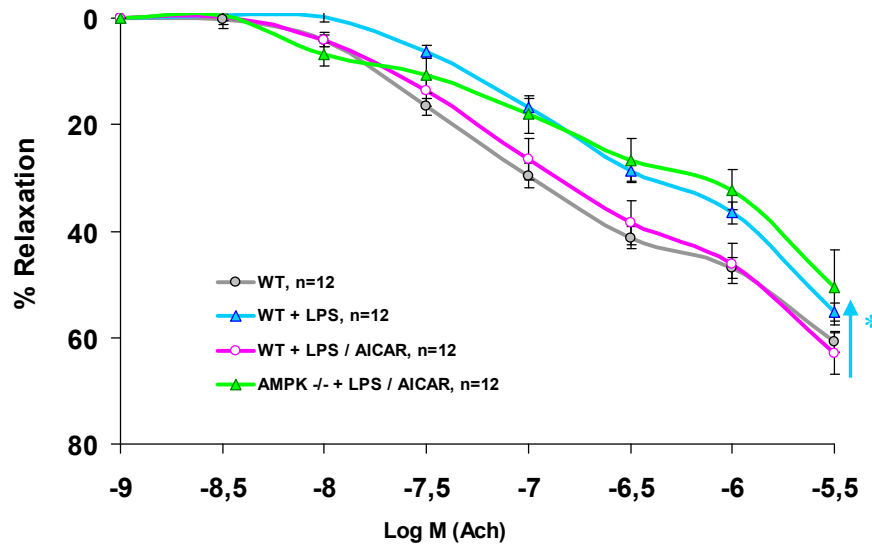


Abbildung 72. Endothelabhängige Relaxation von präparierten Aortensegmenten (4 mm) in Organbadanlagen. Angegeben ist die prozentuale Relaxation nach Acetylcholingabe (Mittelwerte \pm SEM, $n = 12$). Die Relaxationsfähigkeit in LPS-behandelten Wildtypmäußen reduzierte sich signifikant im Vergleich zu unbehandelten Tieren. Durch die gleichzeitige Behandlung mit AICAR konnte die Reduktion fast aufgehoben werden, was bei $\alpha 1$ AMPK-defizienten Tieren nicht möglich war. Für Signifikanzangaben siehe Tabelle 33. * $\approx p < 0,05$ vs. WT; ** $\approx p < 0,05$ vs. WT + LPS / AICAR.

Tabelle 33. Relaxation durch Acetylcholin; Darstellung der pD_2 -Werte und Signifikanzangaben ($p < 0,05$ nach Bonferroni-Test).

Acetylcholin-induzierte Relaxation	pD_2	+/- SEM	* $p < 0,05$ zu WT ** $p < 0,05$ zu WT + LPS / AICAR
WT	6,9	0,066	
WT + LPS	6,5	0,079	*
WT + LPS / AICAR	6,8	0,094	<i>n.s.</i>
AMPK -/- + LPS / AICAR	6,7	0,107	**

3.3.1.2 ROS-Detektion in intaktem Aortengewebe

In diesen Versuchen wurden Superoxidanionen in intaktem Aortengewebe mittels Dihydroethidin dargestellt, indem die Fluoreszenz des entstehenden Ethidiums detektiert wurde (siehe 2.26).

Wie in Abbildung 73 zu sehen ist, steigerte die einmalige Injektion von LPS die Superoxidproduktion in der gesamten Gefäßwand sowie im Endothel erheblich (WT + LPS). Durch die Vorbehandlung der Wildtypiere mit AICAR konnte die durch LPS-induzierte Superoxidproduktion weitgehend verhindert werden (WT + LPS / AICAR). Die LPS-induzierte Superoxidproduktion konnte bei $\alpha 1$ AMPK $-/-$ Tieren durch AICAR-Vorbehandlung kaum reduziert werden.

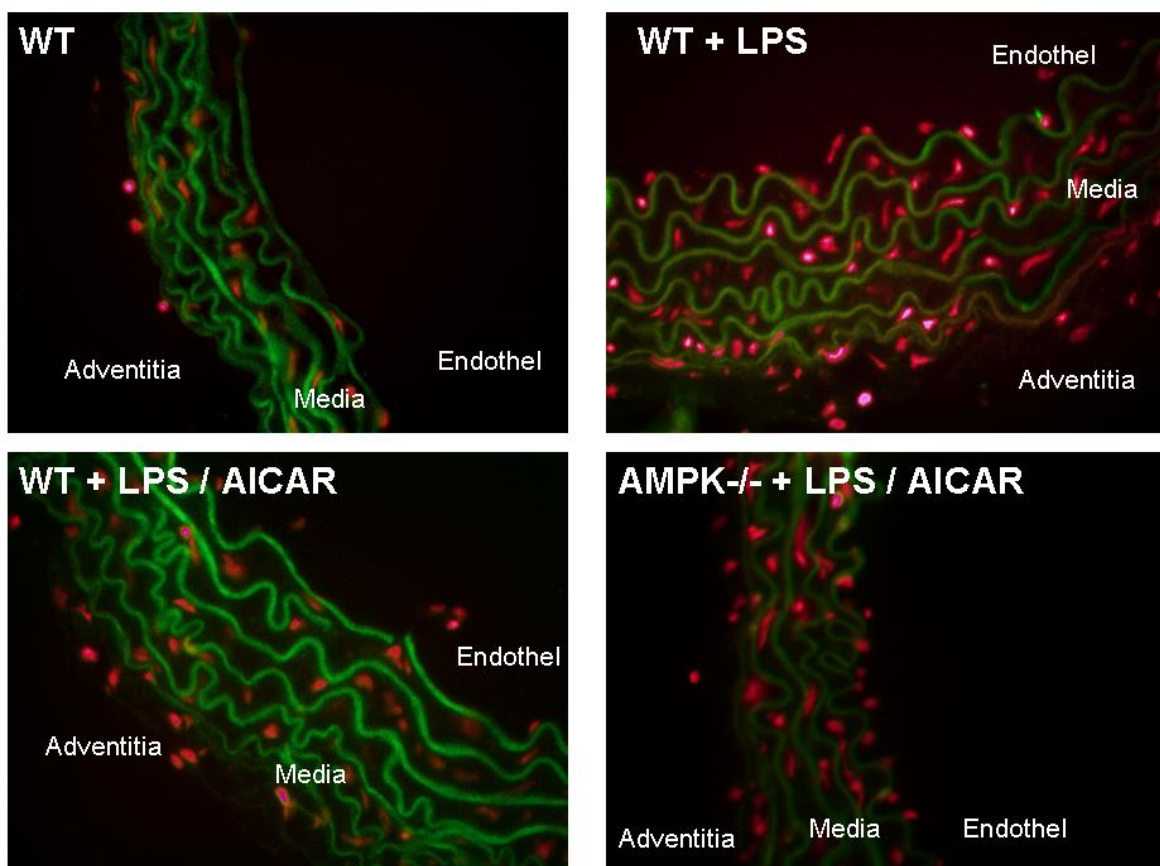


Abbildung 73. Superoxid-Detektion im intakten Aortengewebe, Inkubation der Aortensegmente mit Dihydroethidin, das durch Superoxidradikale zu Ethidium oxidiert, rote Fluoreszenz des Ethidiums, grüne Eigenfluoreszenz der Lamina; 400fache Vergrößerung; Darstellung repräsentativer Ergebnisse aus n = 6 Experimenten. Für Details siehe Text.

3.3.2 Effekte der PGC-1 α Defizienz durch genetische Manipulation

In eigenen Vorexperimenten an Endothelzellen konnte gezeigt werden, dass viele der positiven Effekte einer AMPK-Aktivierung auf das Endothel über eine vermehrte Expression von PGC1-alpha (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha) vermittelt werden (siehe Abbildung 47). Mit PGC-1 α -defizienten Tieren sollte daher die Rolle von PGC1-alpha als nachgeschaltete Komponente des AMPK-Signalwegs überprüft werden.

Isometrische Tonusstudien (siehe 2.15) zeigten, dass die PGC-1 α -Defizienz allein schon zu einer leichten Verminderung der Endothelfunktion führte (Abbildung 74), dargestellt als verringerte maximale Relaxation ($68 \pm 3,4$ %, pD_2 : $-7,1 \pm 0,074$), im Vergleich zum entsprechenden Wildtyp ($86 \pm 5,1$ %, pD_2 : $-7,0 \pm 0,153$). Durch die Behandlung mit Angiotensin II (1 mg / kg / d) zeigte sich eine massive Rechtsverschiebung der Kurve auf nur noch $50 \pm 5,4$ % (pD_2 : $-6,7 \pm 0,060$) der maximalen Relaxation, die auch durch die gleichzeitige Behandlung mit AICAR (200 mg / kg / d) nicht rückgängig gemacht werden konnte ($50 \pm 5,0$ %, pD_2 : $-6,7 \pm 0,142$).

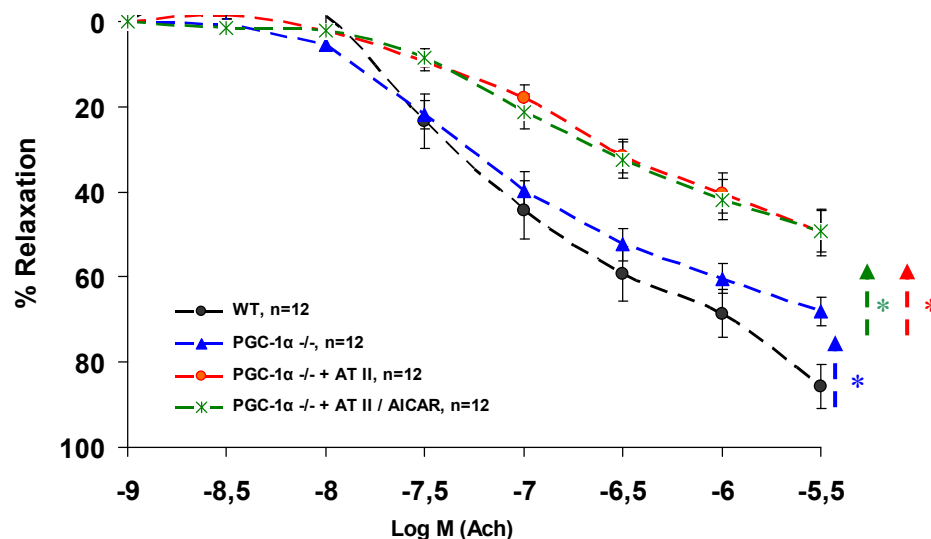


Abbildung 74. Endothelabhängige Relaxation von präparierten Aortensegmenten (4 mm) in Organbadanlagen (Mittelwerte \pm SEM, $n = 12$), prozentuale Relaxation auf Acetylcholingabe. Die PGC-1 α -Defizienz allein resultiert in einer Rechtsverschiebung der Relaxationskurve auf Acetylcholingabe im Vergleich zum Wildtyp. Durch die zusätzliche Angiotensin II-Behandlung wurde die verringerte Relaxation nochmals signifikant reduziert, was durch die Co-Behandlung mit AICAR nicht verhindert werden konnte. Für Signifikanzangaben siehe Tabelle 34. * $\approx p < 0,05$ vs. WT; ** $\approx p < 0,05$ vs. PGC-1 α -/-.

Tabelle 34. Relaxation durch Acetylcholin; Darstellung der pD_2 -Werte und Signifikanzangaben ($p < 0,05$ nach Bonferroni-Test).

Acetylcholin- induzierte Relaxation	pD_2	+/- SEM	* $p < 0,05$ zu WT ** $p < 0,05$ zu PGC-1α -/-
WT	-7,0	0,153	
PGC-1α -/-	-7,1	0,074	*
PGC-1α -/- + AT II	-6,7	0,060	**
PGC-1α -/- + AT II / AICAR	-6,7	0,142	**

4. Diskussion

Die Ergebnisse meiner Arbeit zeigen, dass die AMPK ein wichtiger Faktor beim vaskulären oxidativen Stress, bei der Endothelfunktion und der vaskulären Inflammation ist. Während die AMPK-Aktivierung durch AICAR den durch Angiotensin II-induzierten oxidativen Stress sowie die induzierte Endotheldysfunktion und auch die gesteigerte vaskuläre Inflammation vermindern kann, geht die α 1AMPK-Defizienz unter Angiotensin II-Behandlung mit gesteigertem vaskulärem oxidativem Stress, verstärkter Endotheldysfunktion und gesteigerter vaskulärer Inflammation einher. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass die AMPK die vaskuläre Homöostase unterstützt und bei oxidativen Stress protektiv wirkt.

4.1 AMPK in der Endothelfunktion

Seit 1980 erstmals der „Endothelium derived relaxing factor“ (EDRF) von Furchgott und Zawatzki beschrieben wurde, besteht an der Wichtigkeit des Endothels zur Regulierung der Gefäßweite kein Zweifel mehr.²⁰⁶ 1987 folgte dann der Nachweis, dass es sich bei EDRF um Stickstoffmonoxid, NO, handelt.¹²⁶ NO wird enzymatisch durch NO-Synthasen (NOS) aus der Aminosäure L-Arginin synthetisiert, wobei außerdem Citrullin entsteht.²⁰⁷ Wegen seiner lipophilen Eigenschaften kann NO Zellmembranen passieren und zum glatten Gefäßmuskel diffundieren, wo es durch die Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase (sGC) intrazellulär zu erhöhten cGMP-Spiegeln führt. Diese führen über eine Senkung der intrazellulären Calcium-Spiegel zur Vasorelaxation. Eine Vielzahl von mechanischen, hormonellen und pharmakologischen Stimuli kann zur NO-Freisetzung führen, hierzu zählen beispielsweise die pulsatile Dehnung der Gefäßwand, Acetylcholin oder Calcium-Ionophore A 23187.

Neben der Vasodilatation hat NO noch weitere positive Effekte auf das kardiovaskuläre System, z.B. die Hemmung der Thrombozytenaggregation,^{208, 209} die Hemmung des Wachstums glatter Gefäßmuskelzellen sowie dosisabhängige antiinflammatorische Eigenschaften.²¹⁰

In vielen veröffentlichten Studien wird die Endothelfunktion als entscheidendes Charakteristikum des Frühstadiums kardiovaskulärer Krankheiten, wie der Atherosklerose, dargestellt. Zudem ist bekannt, dass Risikofaktoren für die Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen,

wie arterielle Hypertonie oder Hypercholesterinämie, in aller Regel mit einer Endotheldysfunktion vergesellschaftet sind.^{18, 168, 186} In der vorliegenden Studie wurde die Dilatation isolierter Aortenringe *ex vivo* nach Zugabe von Acetylcholin (Ach) für die Analyse der Endothelfunktion genutzt. Eine abgeschwächte Relaxation wies hierbei auf eine pathologische Veränderung der Endothelfunktion hin.

Dass die Abschwächung der Acetylcholin-abhängigen Relaxation tatsächlich Aussagekraft über das Fortschreiten einer Gefäßkrankheit hat und mit dem Ausmaß bestehender Risikofaktoren korreliert, wurde von Vita et al. bereits 1990 aufgezeigt.^{122, 211} Neuere Studien belegen zudem, dass das Ausmaß einer Endotheldysfunktion auch die Prognose von Patienten mit koronarer Herzerkrankung oder peripherer arterieller Verschlusskrankheit beeinflusst.²¹²⁻²¹⁶

Die Endothelfunktion wird also durch das feine Gleichgewicht zwischen NO-Produktion und dessen Inaktivierung durch freie Sauerstoffradikale bestimmt.^{9, 206, 217, 218} Dabei kann die Analyse der Endothelfunktion nur Aufschlüsse über die NO-Bioverfügbarkeit liefern. Um zwischen einer verminderten Produktion oder vermehrter Inaktivierung differenzieren zu können, wurden neben den isometrischen Tonusstudien sowohl die NO-Bioverfügbarkeit mittels ESR als auch Serum-Nitrit-Mengen mittels eines NO-Analyzers analysiert.^{10, 218}

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung der AMPK mit AICAR die durch Angiotensin II verminderte Endothelfunktion signifikant verbessern konnte (Abbildung 34).¹⁹⁷ Dabei war der AICAR-Effekt vom Vorhandensein der AMPK abhängig, da in α 1AMPK-knock-out-Mäusen nach AICAR-Gabe keine Verbesserung der Endothelfunktion beobachtet wurde (Abbildung 72). Der protektive Effekt der AMPK-Aktivierung ist dabei unabhängig vom gewählten Stressor und von grundsätzlicher Bedeutung, da auch die durch bakterielles Lipopolysaccharid verursachte Endotheldysfunktion durch AICAR gebessert werden konnte. Erstaunlicherweise waren diese Resultate damit verbunden, dass die Serum Nitrit-Spiegel und die NO-Bioverfügbarkeit in AICAR-behandelten Tieren abnahmen (Abbildung 37 & 38), was zunächst früheren Publikationen widersprach, die eine direkte Aktivierung der NO-Synthase durch die AMPK-vermittelte Phosphorylierung an Serin 1177 und eine verstärkte hsp90-Bindung in Endothelzellen nachweisen konnten.^{98, 191, 219} Dieser Mechanismus könnte für die metabolische Vasodilatation von Bedeutung sein, bei der z.B. in einem Organ oder Gewebe aufgrund eines erhöhten ATP-Verbrauchs über eine AMP-Akkumulation

die AMPK aktiviert wird und die dadurch verursachte eNOS-Aktivierung und Vasodilatation auch mehr Sauerstoff und Nährstoffe in das betreffende Gebiet gelangen. Unter den experimentellen Bedingungen der vorliegenden Arbeit scheint die AMPK-induzierte NO-Freisetzung eine untergeordnete Rolle für die Vasodilatation zu spielen, da weder AICAR die Endothelfunktion verbesserte noch eine Deletion der α 1AMPK-Untereinheit diese verschlechterte. Möglicherweise können in diesem Fall andere Signalwege (z.B. Akt = PKB) den Verlust der vaskulären AMPK-Aktivität kompensieren.

Die α 1AMPK-Defizienz resultierte in einer signifikanten Endotheldysfunktion nach kontinuierlicher Behandlung mit einer geringen Angiotensin II-Dosis, die keine Blutdruckwirkung hatte (Abbildung 53). Die Resultate der Endothelfunktionstestung erschienen zunächst nicht mit denen der ESR-Messung und durch den NO-Analyzer vereinbar zu sein (Abbildung 56 & 57). Bei NO-spezifischen Untersuchungen zeigten sich bei der α 1AMPK-Defizienz und der zusätzlichen Angiotensin II-Behandlung erhöhte NO-Spiegel, während die Endothelfunktion stark verschlechtert war. Um abzuklären, ob diese Veränderungen auf die endotheliale NO-Synthase zurückzuführen sind, wurden in diesem Teil der Arbeit die Expression von eNOS und die aktivierungsassoziierte Phosphorylierung an Serin 1177 untersucht. Überraschenderweise zeigten sich in der aktivierungsassoziierten Phosphorylierung der eNOS keine Unterschiede bei α 1AMPK-defizienten Tieren (Abbildung 67), die eine gesteigerten NO-Menge und die starke Endotheldysfunktion aufwiesen.

Die Versuche zur endothelunabhängigen Relaxation durch den Vasodilator Nitroglyzerin (Abbildung 35) bestätigten eine signifikante Verbesserung der glattmuskulären Funktion durch die Co-Behandlung mit AICAR. Die α 1AMPK-Defizienz allein wirkte sich nicht negativ auf die glattmuskuläre Relaxation aus, die Behandlung mit Angiotensin II allerdings führte zu einer signifikanten Reduktion der Relaxationsfähigkeit auf den Vasodilator Nitroglyzerin.^{220,221-223} Nitroglyzerin muss allerdings als Vasodilator beim Vorliegen von oxidativem Stress kritisch betrachtet werden, da seine Wirkung Bioaktivierung durch die mitochondriale Aldehyddehydrogenase (ALDH₂) erfordert. Dieses mitochondriale Enzym zeigte sich extrem oxidationsempfindlich, wodurch seine Funktion beeinträchtigt und daher die Biotransformation von Nitroglyzerin vermindern könnte. Um eine hieraus resultierende Fehlinterpretation zu vermeiden, wurde als weiterer endothelunabhängiger Vasodilator der NO-Donor DeaNONOat verwendet. Es zeigte sich, dass die α 1AMPK-Defizienz auch die durch DeaNONOat induzier-

te Vasodilatation in Angiotensin II-behandelten Tieren negativ beeinflusste (Abbildung 55). Eine mögliche Erklärung für die Verschlechterung könnte zum einen darin liegen, dass der erhöhte oxidative Stress auch exogen zugeführtes NO inaktivieren kann und dadurch die glattmuskuläre Dysfunktion auslösen könnte. Andererseits kann eine chronische Überproduktion von NO (die insbesondere in den mit Angiotensin II behandelten α 1AMPK knock out-Mäusen vorliegt) eine Desensitivierung gegenüber NO-Donatoren auslösen.¹⁴⁵

Eine mögliche NO-Quelle stellt neben der endothelialen NO-Synthase die induzierbare NO-Synthase dar, die anders als die konstitutiv exprimierte eNOS hauptsächlich transkriptionell durch zellulären Stress induziert wird und 10 – 100fach mehr NO produzieren kann als die endotheliale oder neuronale Isoform.^{168, 224} Die Expressionsstudien der induzierbaren NO-Synthase auf mRNA-Ebene waren mit den Resultaten sowohl der Plasma Nitrit-Spiegel als auch der ESR-Messungen vereinbar. Die Angiotensin II-Behandlung im ersten Teil der Arbeit führte zu einer starken Induktion der iNOS (Abbildung 45), was sich in den NO-Vorkommen der unterschiedlichen Messmethoden zeigte. Die Co-Behandlung mit AICAR reduzierte die Expression der iNOS und so auch die NO-Spiegel. In α 1AMPK-defizienten Tieren wurden hingegen nach Angiotensin II-Infusion erhöhte NO-Spiegel festgestellt, die mit einer erhöhten Expression der induzierbaren NO-Synthase einhergingen (Abbildung 65).

Parallel zur Aktivierung der NADPH-Oxidasen, die Superoxidradikale produzieren, führte die gleichzeitige Induktion der induzierbaren NO-Synthase zur Einbringung großer Mengen NO in das System. Durch die rasche Inaktivierung von NO durch die Reaktion mit Superoxidanionen wurden große Mengen Peroxynitrit gebildet, welches ein viel potenteres Oxidanz als Superoxid darstellt und die Funktion von Proteinen, z.B. durch Nitrierung von Aminosäuren, beeinträchtigen kann.^{18, 19} Besonders die Inaktivierung der löslichen Guanylatzyklase, die essentiell ist für die NO-vermittelte glattmuskuläre Relaxation, und die Nitrierung / Inaktivierung der Prostaglandinsynthase, die vasoaktive Prostaglandine synthetisiert, verstärken die Endotheldysfunktion.^{21, 22} Zusätzlich dazu führt eine eNOS-Entkopplung, die durch die Oxidation des essentiellen Cofaktors BH₄ oder Oxidation des Zink-Thiolat-Clusters durch Peroxynitrit vermittelt wird, zu einer weiteren Verschlechterung der Endothelfunktion. Durch diese Entkopplung wird nicht nur die protektive Funktion der NO-Produktion inhibiert, sondern es kommt auch zu einer vermehrten Übertragung der Elektronen auf molekularen Sauerstoff und zu einer weiteren Superoxidradikalbildung (siehe Abbildung 75).³⁵ Peroxynitrit kann dar-

über hinaus ein weiteres antioxidativ wirksames Enzym der Mitochondrien, die Mangan-Superoxiddismutase, inhibieren. Dieses Enzym bewerkstelligt die Entgiftung von Superoxid, das während der Atmungskette im Mitochondrium entsteht. Durch diese Inhibition häufen sich auch im Mitochondrium Superoxidradikale an, wodurch es zu Schädigungen der mitochondrialen DNA und von Komplexen der Atmungskette kommen kann.

Insgesamt führen die genannten Prozesse zu einer Dysregulation des Redoxstatus und können über einen positiven-feedback Mechanismus einen pro-oxidativen Status im Gefäßsystem aufrecht erhalten. Dies beeinträchtigt die Gefäßfunktion und kann zu bleibenden Organschäden führen, die einen Myokardinfarkt oder Schlaganfall auslösen können.

Weitere Aspekte der unterschiedlichen NO-Synthasen, die sowohl für die Endothelfunktion als auch für die vaskuläre Inflammation eine Rolle spielen, sollen anschließend ausführlicher diskutiert werden.²²⁵⁻²²⁸

4.2 AMPK-Aktivität und NO-Produktion

Die Nitrit-Konzentrationsbestimmungen im Serum mit Hilfe des NO-Analyzers erfolgten höchst sensitiv basierend auf der chemilumineszenten Reaktion von NO mit Ozon. Die Emission von elektronisch angeregtem NO_2^* im roten Bereich des Spektrums wurde dann von einem Photometer detektiert. Das Detektionslimit des NO-Analyzers lag bei 1 pMol NO, NO_2^- oder ONOO^- . Die Nitritmessungen wurden als Marker für die vaskuläre NO-Produktion genutzt, da die kurze Halbwertszeit des NO von 3 – 10 Sekunden kaum andere Methoden zuließe.^{133, 229} Das mit dieser Methode gemessene NO konnte allerdings nur als indirekter Indikator der Endothelfunktion angesehen werden, da nur das ins Gefäßlumen abgegebene und somit im Serum detektierbare NO gemessen wurde. Jedoch wird das für die Gefäßrelaxation entscheidende NO abluminal abgegeben und zum Gefäßmuskel diffundieren, wo es durch andere Moleküle, z.B. Superoxidanionen oder Häm-Proteinen, inaktiviert werden könnte, bevor es die zytosolische Guanylatzyklase erreicht. Diese Nitritbestimmung konnte also nicht direkt zur Prüfung der Endothelfunktion herangezogen werden, sondern diene in erster Linie als Marker für die NO-Produktion und somit für die Aktivität der NO-Synthasen.¹³⁵ Um sowohl diese Methode als auch die erhobenen Daten zu verifizieren, wurde eine zweite Möglichkeit der NO-Detektion im Gewebe hinzugezogen. Die Elektronen-Spin-Resonanz-

Spektroskopie detektiert NO mittels $\text{Fe}(\text{DETC})_2$ als Spin Trap in intakten Aorten und kann somit helfen die NO-Spiegel im Gewebe fest zu stellen. Dies bedeutet einen erheblichen Vorteil zur erstgenannten Methode, die lediglich die unterschiedlichen Aktivitäten der NO-Synthasen in verschiedenen Gruppen darstellte.¹⁸⁷ Da das für die ESR genutzte Spin Trap $\text{Fe}(\text{DETC})_2$ eine hohe Affinität zu NO besitzt und rasch freies NO bindet, wird durch diese Methode eher die NO-Produktion als die NO-Bioverfügbarkeit bestimmt.

Die NO-Produktion im vaskulären System obliegt der endothelialen NO-Synthase eNOS, die aus L-Arginin in einer komplexen Reaktion Stickstoffmonoxid abspaltet, wobei L-Citrullin als Endprodukt entsteht.²⁰⁷ NO spielt nicht nur im vaskulären System eine fundamentale Rolle, sondern ist auch als Neurotransmitter und für Abwehrreaktionen des Organismus wichtig. Bei inflammatorischen Reaktionen, die zum Beispiel bei bakterieller Sepsis durch Lipopolysaccharid (LPS, bakterielles Endotoxin) auftreten können, kommt es zu einer Induktion der induzierbaren NO-Synthase (iNOS). Bei entsprechender Stimulation wird diese Form stark exprimiert und kann bis zu 100fach größere Mengen an NO produzieren als die konstitutiv exprimierte eNOS. Dabei kommt es z.B. in der Sepsis durch die systemische Vasodilatation zum septischen Schock, eines klinisch schwer beherrschbaren Zustandes, der durch Minderperfusion wichtiger Organe und häufig den Tod durch Multiorganversagen verursacht.

Wie erläutert, kann NO in bestimmten pathologischen Situationen zur Produktion eines weiteren zellschädigenden Radikals, Peroxynitrit, führen. Peroxynitrit wiederum kann zur Entkopplung der NO-Synthase führen, indem es zur Oxidation des essentiellen Cofaktors BH_4 beiträgt oder zur Oxidation des Zink-Thiolat-Clusters. In beiden Fällen werden durch die NO-Synthase dann die Elektronen auf Sauerstoff (und nicht auf L-Arginin) übertragen und dadurch Superoxidanionen anstelle von NO gebildet. Durch diese Entkopplung entsteht aus einem ursprünglich protektiven, NO-produzierenden Enzym ein schädliches, ROS-generierendes System.^{18, 230, 231} Da auch in der vorliegenden Arbeit in den $\alpha 1$ AMPK-knock-out-Tieren größere Mengen Peroxynitrit gebildet wurden, ist in diesen Tieren eine Entkopplung der NO-Synthase wahrscheinlich.

Die mit unterschiedlichen Methoden gewonnenen Resultate zeigen, dass die basale $\alpha 1$ AMPK-Aktivität eine Hochregulation der induzierbaren NO-Synthase unter proinflammation-

torischen Stimuli verhindern kann. Die Modulation der iNOS-Expression durch die AMPK-Aktivität wurde bisher nur in Zellkultursystemen beschrieben.^{224, 232-234}

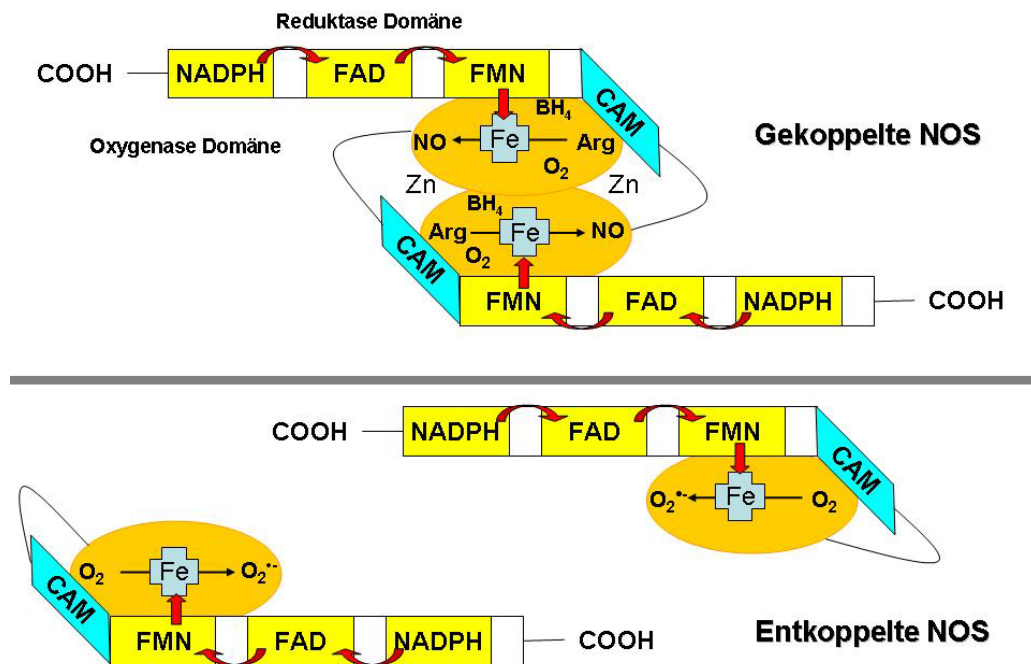


Abbildung 75. Entkopplung der NO-Synthasen durch Oxidation des Tetrahydrobiopterins: in der intakten NO-Synthase (Homodimer, oben) fließen die Elektronen von NADPH über FAD zu FMN, welches die Elektronen jeweils an die Oxygenase Domäne (das Eisenporphyrin) des anderen gekoppelten Monomers weitergibt. Bei der entkoppelten NO-Synthase liegen im schlimmsten Fall Monomere vor bzw. wurde die Bindung des Dimer-Komplexes durch eine Konformationsänderung verändert (z.B. durch Fehlen des Cofaktors BH₄ bzw. Oxidation des Zink-Thiolat-Komplexes), wodurch es zu einer Entkopplung des Elektronenflusses kommt. Die Elektronen werden auf molekularer Sauerstoff übertragen, und es entsteht Superoxid. CAM, Calmodulin; Zn, Zink (verändert nach³).

Neben der Beeinträchtigung des NO-Signalwegs führt die chronische Behandlung mit Angiotensin II auch zur andauernden Bildung von 1,2-Diacylglycerol (DAG), was die chronische Aktivierung der Proteinkinase C und somit der NADPH-Oxidasen zur Folge hat. Diese Aktivierung resultiert in der Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies, die zur Inaktivierung von NO und damit zur endothelialen Dysfunktion führen^{6, 104, 186, 136} Die Rolle der AMPK im oxidativen Stress soll nachfolgend diskutiert werden.

4.3 AMPK und oxidativer Stress

Die Messungen der reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies basierten auf Chemilumineszenz-Farbstoffen wie Luminol, Luzigenin und L-012. Die reaktiven Spezies reduzierten dabei die Luminol-Derivate, wobei Licht emittiert wurde, das mit Hilfe eines Luminometers detektiert werden konnte. Dieser Assay basiert auf einer ursprünglich von Gyllenhammar 1987 ausgearbeiteten Methode zur Detektion von reaktiven Sauerstoffspezies in Leukozyten mittels Luzigenin, der vielfach Verwendung fand bei der Bestimmung von ROS-Bildungsraten in Neutrophilen, kultivierten Zellen und Blutgefäßen.²³⁵ Dabei ist von Bedeutung, dass die Konzentration von Luzigenin so niedrig wie möglich gehalten wird, um ein artifizielles Signal, bedingt durch das sogenannte „redox cycling“, zu verhindern. Hierbei hat sich eine Luzigenin-Konzentration von 5 μ M bewährt.¹³⁶

Mit verschiedenen Chemilumineszenzfarbstoffen konnten sowohl intrazelluläre als auch extrazelluläre reaktive Sauerstoffspezies, aber auch Stickstoffspezies (durch L-012) detektiert werden.¹⁸ Durch die unterschiedliche Selektivität der einzelnen Chemilumineszenz-Farbstoffe konnte daher weitere Information über die gebildeten Radikalspezies erzielt werden.⁶⁷ Weiterhin wurden neben intakten Gefäßsegmenten auch isolierte Mitochondrien bzw. Membranfraktionen eingesetzt, wodurch eine Abschwächung des Chemilumineszenzsignals insbesondere durch zytosolische antioxidativ wirksame Moleküle oder Enzymssysteme wie Ascorbinsäure oder Superoxiddismutase vermieden und die entsprechenden ROS-Quellen isoliert betrachtet werden konnten.

In vaskulären Geweben gelten als Superoxidquellen NADPH-Oxidase, Xanthinoxidase und Atmungskettenkomplexe in Mitochondrien, die unter physiologischen Bedingungen entscheidend zum essentiellen „Redox-Signaling“ beitragen. Oxidativer Stress ist eine pathophysiologische Situation, in der die Produktion an Superoxidradikalen die Produktion von NO übersteigt, so dass überschüssige Superoxidradikale Funktion oder Struktur von Proteinen, Lipiden oder Nukleinsäuren direkt beeinträchtigen können. Diese Situation kann durch verschiedene systemische Einflüsse hervorgerufen werden, was zu einer Überaktivierung der genannten Superoxidquellen führt. In meiner Arbeit wurde dies durch die Gabe von Angiotensin II simuliert. Die AMPK-Aktivierung mit AICAR führte zu einer deutlichen Verringerung der Superoxid-Generation durch NADPH-Oxidase, Xanthinoxidase und Mitochondrien und somit zu einer Reduktion des vaskulären oxidativen Stresses (Abbildungen 41 – 43). Andererseits

fürhte die α 1AMPK-Defizienz unter niedrig dosierter Angiotensin II-Infusion zu erhöhtem vaskulären oxidativem Stress (Abbildungen 60 – 62). Die NADPH-Oxidase konnte als primäre Angiotensin II-induzierte ROS-Quelle identifiziert werden.^{5, 6, 33, 104}

4.3.1 NADPH-Oxidase

Die NADPH-Oxidase ist Hauptquelle des durch Angiotensin II verursachten oxidativen Stresses und sie wird durch komplexe Mechanismen reguliert.^{5, 6} Zum einen wird die Aktivität dieser Oxidase durch die Phosphorylierung von p47^{phox} und der Translokation der zytosolischen Untereinheiten p47^{phox}, p22^{phox}, rac1 an die Zellmembran aktiviert.^{33, 35, 186} Andererseits ist auch die Expression der membranständigen Untereinheiten wie NOX-1, NOX-2 oder NOX-4 wesentlich.^{35, 55} Hier wurde in erster Linie die Expression von Untereinheiten der NADPH-Oxidase bestimmt, es werden aber auch weitere mögliche Mechanismen besprochen.

Die Änderungen der Proteinexpression von NOX-1, NOX-2 und p22^{phox} zeigen einen parallelen Verlauf zur Aktivität der NADPH-Oxidase und können zumindest teilweise die beobachtete Steigerung der Oxidase Aktivität erklären. Änderungen der Genexpression sind jedoch für schnelle Anpassungen der Enzymaktivität ungeeignet. In der vorliegenden Arbeit wurde als Agonist Angiotensin II verwendet, der über eine Stimulation des AT-1 Rezeptors eine Proteinkinase C Aktivierung und somit die Aktivierung der NADPH-Oxidase verursacht. Insofern kann spekuliert werden, dass das Enzym in der vorliegenden Arbeit einerseits durch Expressionsregulation aber auch durch Translokation von Untereinheiten an die Zellmembran aktiviert wird.

Die Unterschiede in der Angiotensin II-induzierten Steigerung der NADPH-Oxidase Aktivität zwischen den unterschiedlichen Mausstämmen C57BL/6 und FVB/B6J/129 sind vermutlich auf den unterschiedlichen genetischen Hintergrund zurückzuführen. Unterschiede im Phänotyp sind durchaus denkbar, da sogenannte „Modifier“-Gene bei gemischtem Hintergrund anders mit kausativen Genen interagieren als es bei einem reinen Hintergrund der Fall wäre.²³⁶⁻²³⁸ Dabei musste in der vorliegenden Arbeit ein gemischter Hintergrund akzeptiert werden, da die α 1AMPK -/- Tiere nur dann lebensfähig waren.^{107, 111}

Die Aktivität und auch die Expression der NADPH-Isoformen (NOX 1-5) werden durch verschiedene Mechanismen reguliert.^{35, 186, 239} In Endothelzellen sind vor allem die Isoformen

NOX-1 und NOX-2 exprimiert, wobei NOX-2 als essentielle Isoform der phagozytären NADPH-Oxidase gilt.^{43-45, 140} Der komplexen Regulation sind neben Transkriptionskontrolle auch Phosphorylierungen von zytosolischen Untereinheiten durch die PKC (z.B. von p47^{phox}), Geranylierungen mit anschließender Rekrutierung an die Membran und Protein-Protein-Wechselwirkungen beteiligt.^{55, 205, 240, 241}

Meine Untersuchungen belegen Effekte der AMPK auf die Aktivität der NADPH-Oxidase, die bisher nicht beschrieben wurden. Ein möglicher mechanistischer Angriffspunkt der AMPK für die Regulation der NADPH-Oxidase Aktivität könnte die HMG-CoA-Reduktase darstellen. Dieses zytosolische Enzym katalysiert die Reduktion von 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA (3-HMG-CoA) zu Mevalonat, die als geschwindigkeitsbestimmende Reaktion der Cholesterinbiosynthese und Isoprenoïdherstellung gilt.²⁴² Rac-1, die für die NADPH-Oxidase-Aktivität essentielle GTPase, erhält erst durch Geranylierung den für die Translokation an die Membran notwendigen Lipidanker. Diese Reaktion ist von der Aktivität der HMG-CoA-Reduktase abhängig, da deren Reaktionsprodukt, Mevalonat, eine Vorstufe der benötigten Isoprenoïde darstellt.

Nach Aktivierung mittels AICAR kann die AMPK, die HMG-CoA-Reduktase direkt über ihre Phosphorylierung inhibieren, so dass die Mevalonatsynthese und die davon abhängige Geranylierung von Rac-1 unterbunden werden.²⁴³⁻²⁴⁵ Diese Vermutung könnte gleichzeitig auch die signifikante Steigerung der NADPH-Oxidase Aktivität während der α 1AMPK-Defizienz erklären. Die fehlende Inhibition der HMG-CoA-Reduktase durch die AMPK könnte zur gesteigerten Geranylierung von Rac-1 und somit zu dessen Translokation an die Membran führen.

Ein weiterer Mechanismus der AMPK-abhängigen Regulation der NADPH-Oxidase wurde durch die Gruppe von A. Avogaro postuliert. Diese Arbeitsgruppe induzierte NADPH-Oxidase abhängigen oxidativen Stress in humanen Endothelzellen durch hohe Glukosekonzentration (10 mM), die eine Hyperglykämie simulierte.^{246, 247} Durch die gleichzeitige Behandlung der Zellen mit Rosiglitazon, einem Thiazolidindion, konnte der NADPH-Oxidase vermittelte oxidative Stress nahezu normalisiert werden. Der postulierte Signalweg ist in Abbildung 76 gezeigt und beschreibt die PKC-Inhibition durch die AMPK-Aktivierung, der auch in den Experimenten meiner Arbeit den vaskulären oxidativen Stress beeinflussen könnte.

Die Erforschung genauer Transduktionswege und die Verbindung von metabolischen und funktionellen Signalwegen sollten Thema weitergehender Arbeiten sein.

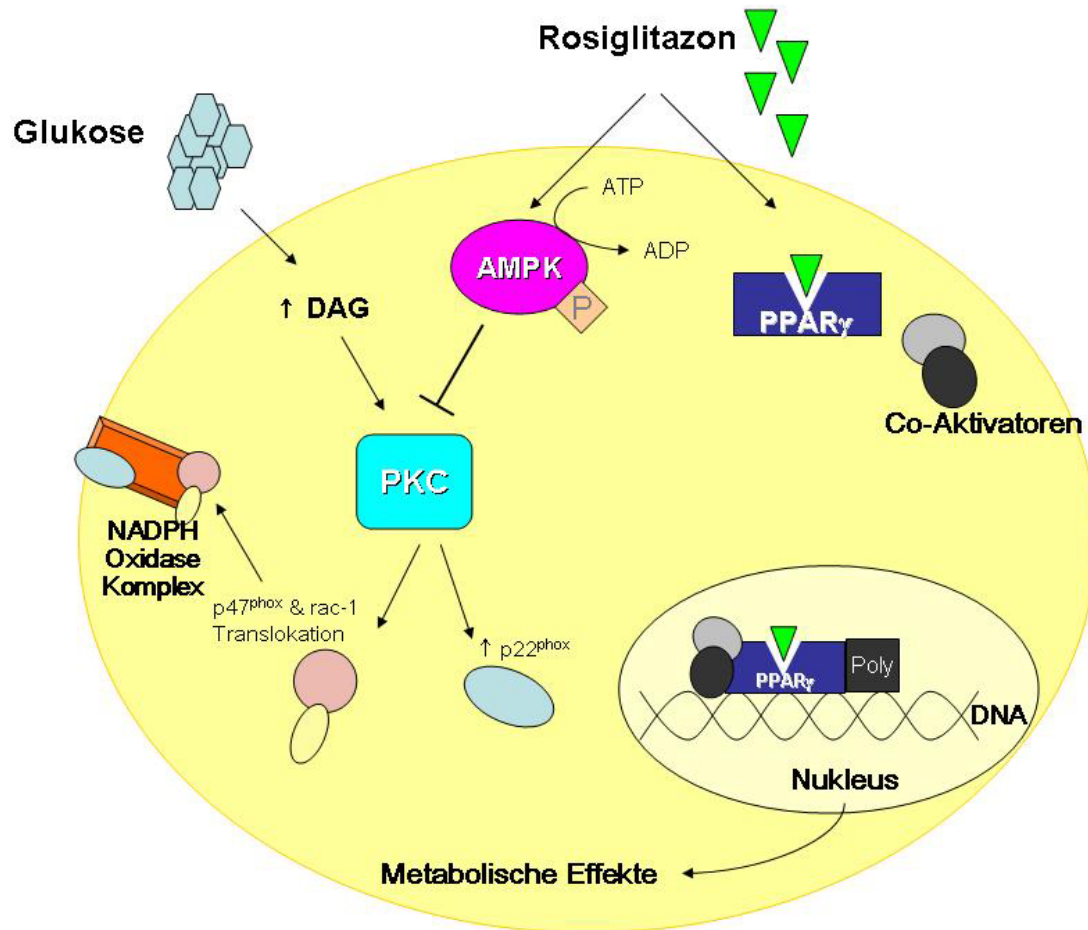


Abbildung 76. Postulierter Rosiglitazon-Signalweg: Aktivierung der AMPK, die ihrerseits die PKC inhibiert, wodurch die Aktivierung der NADPH-Oxidase unterbunden werden kann. Dieser Signalweg ist unabhängig von der PPAR γ Aktivierung (verändert nach²⁴⁶).

4.3.2 Mitochondrien

Mitochondrien produzieren in ihren Atmungskettenkomplexen Superoxidradikale, welche unter physiologischen Bedingungen durch antioxidativ wirkende Enzyme wie die Mangan-Superoxiddismutase und die Katalase inaktiviert werden, so dass keine oxidativen Schäden entstehen.^{54, 248, 249} Zu einer Überproduktion der mitochondrialen ROS kann es durch vielfältige Signale kommen, zum Beispiel durch oxidiertes LDL (low density lipoprotein), freies Cholesterin oder auch Angiotensin II.^{12, 72, 250-253} In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die mitochondriale Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies durch die chronische Angiotensin II-

Infusion signifikant gesteigert wurde. Durch die Co-Therapie mit AICAR konnte die Angiotensin II-induzierte mitochondriale ROS-Produktion wieder gesenkt werden (Abbildung 43). Die α 1AMPK-Defizienz führte basal schon zu einer signifikanten Steigerung der mitochondrialen ROS um etwa 50 %, die durch die chronische Angiotensin II-Behandlung der defizienten Tiere nochmals signifikant gesteigert wurde (Abbildung 62).

Die mitochondriale Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies kann an Komplex I, II und III der Atmungskette stattfinden. Die so produzierten ROS werden hauptsächlich in die Mitochondrienmatrix abgegeben, wo sie durch die Mangan-Superoxiddismutase sehr schnell zu H_2O_2 dismutiert und ins Zytosol abgegeben werden können.^{196, 254} Angiotensin II-Behandlung von Endothelzellen resultiert in einem starken Anstieg der mitochondrialen Superoxidproduktion und somit auch zu einer verstärkten Bildung von H_2O_2 , was einhergeht mit einem verringerten mitochondrialem Membranpotential.^{116, 196} Weiterhin wurde festgestellt, dass sowohl der NADPH-Oxidase-Inhibitor Apocynin als auch der PKC-Inhibitor Chelerythrin die mitochondriale Superoxidproduktion nach Angiotensin II-Behandlung deutlich senken können, was vermuten lässt, dass die mitochondriale ROS-Produktion unter anderem auf gesteigerte NADPH-Oxidase Aktivität zurückzuführen ist.²⁵⁵ Auch die Hemmung des mitochondrialen ATP-abhängigen Kaliumkanals führt zur Verringerung der mitochondrialen H_2O_2 -Produktion, wobei der Mechanismus unklar bleibt.^{47, 251, 252, 256} Auch in unserer Arbeitsgruppe konnte aufgezeigt werden, dass die NADPH-Oxidase Aktivität die ROS Bildung der Mitochondrien steigern kann.⁵⁵

Ein weiterer Signalweg, der durch die mitochondriale Superoxidproduktion beeinflusst wird, ist der stressaktivierte, proapoptotische JNK-Signalweg. Die chronische Angiotensin II-Behandlung führte zu einer signifikanten Steigerung der c-Jun-Phosphorylierung, welche als Indikator der JNK-Aktivität verwendet wurde. Diese Phosphorylierung, also das proapoptotische Signal des JNK-Weges, wurde durch die Co-Therapie mit AICAR verhindert.¹¹⁶ Der molekulare Mechanismus der AMPK-vermittelten-Deaktivierung des JNK-Signalwegs ist noch nicht aufgeklärt, wurde aber schon in anderen Zusammenhängen beschrieben.^{257, 258}

Des Weiteren ist bekannt, dass AMPK in die Biogenese der Mitochondrien eingreift, was über den Transkriptionsfaktor-Co-Aktivator Peroxisomen-Proliferator-aktivierter Rezeptor- γ -Coaktivator-1 α (PGC-1 α) vermittelt wird.^{37, 259-262} Dieser Transkriptions-Cofaktor ist in die

Regulation vieler Transkriptionsfaktoren, wie NRF-Superfamilie (nuclear receptor transcription factor)^{136, 263, 264}, die PPAR-Familie (peroxisome proliferator-activated receptor)^{37, 265-272} oder die ERR-Familie (estrogen receptor related receptor)²⁷³⁻²⁷⁹, involviert, die sowohl physiologische, regulatorische, transkriptionelle als auch antioxidative Gene der Mitochondrien regulieren. Dabei gilt die AMPK als entscheidender übergeordneter Modulator der Expression und Phosphorylierung von PGC-1 α .^{24, 30, 102, 212, 280-284} Es bleibt also zu vermuten, dass die Aktivierung der AMPK mittels AICAR eine Steigerung des PGC-1 α -Transkriptions-Co-Aktivators und damit eine vermehrte mitochondriale Biogenese zur Folge hat.^{24, 259, 261, 272, 282, 284-286}

Die damit gesteigerte Transkription von antioxidativen Genen für mitochondriale Proteine im Mitochondrium führt zur gesteigerten Abwehr reaktiver Sauerstoffspezies und so zum Schutz von mitochondrialen Strukturen vor oxidativen Schädigungen.^{136, 274, 286, 287} Das gegensätzliche Resultat konnte durch die α 1AMPK-Defizienz erzielt werden. Ein Beleg dafür, dass die AMPK über eine PGC-1 α -Aktivierung vor Angiotensin II-induzierten oxidativen Stress schützt, sind die Resultate der Angiotensin II behandelten PGC-1 α -knock-out-Mäuse, bei denen der AMPK-Aktivator AICAR die Endotheldysfunktion nicht mehr positiv beeinflussen konnte.¹¹⁶

4.3.3 Xanthinoxidase

Die Xanthinoxidase gilt als eine weitere wichtige vaskuläre Superoxidquelle, da bei den Reaktionen von Hypoxanthin über Xanthin zur Harnsäure Superoxidanionen freigesetzt werden.^{63, 288} Die Aktivität der Xanthinoxidase wurde durch die Angiotensin II-Infusion nicht signifikant gesteigert, jedoch führte die Behandlung mit AICAR sowohl in der Kontrollgruppe als auch in der mit Angiotensin II behandelten Gruppe zur signifikanten Reduktion der Xanthinoxidase-Aktivität. Bei der *in vivo*-Deletion der α 1AMPK zeigte sich, dass die Behandlung mit Angiotensin II im WildtypTier kaum Auswirkung auf die Xanthinoxidase-Aktivität hat, die α 1AMPK-Defizienz kombiniert mit der Angiotensin II-Behandlung jedoch zu einem signifikanten Anstieg der Superoxidbildung führte. Die Abhängigkeit der Xanthinoxidase von der AMPK wurde bisher in der Literatur nicht beschrieben, es gibt aber Hinweise auf eine NADPH-Oxidase induzierte Regulation, die auch in der vorliegenden Arbeit eine entscheidende Rolle spielen könnte.^{37, 288} So wird beschrieben, dass reaktive Sauerstoffspe-

zies, generiert von der NADPH-Oxidase, in Endothelzellen dazu beitragen, dass die Xanthin-dehydrogenase irreversibel degradiert wird, was zu einem Anstieg in der durch Xanthinoxidase vermittelten Superoxidproduktion führt. Inwieweit die beobachteten Änderungen der XO-Aktivität durch direkte Interaktion mit der AMPK hervorgerufen werden oder sekundär durch die Modulation der NADPH-Oxidase Aktivität stattfinden, muss in weiteren Studien geklärt werden.

Es bleibt anzumerken, dass die Xanthinoxidase in den von mir durchgeführten Versuchen nur mäßig zum Angiotensin II-induzierten oxidativen Stress beitrug. Bemerkenswert aber scheint der starke Einfluss der AMPK auf die Xanthinoxidase Aktivität. Obwohl die Xanthinoxidase im Bezug auf pathologische Situationen wie Hyperurikämie, Ischämie / Reperfusion und bei Endotheldysfunktion Gegenstand zahlreicher Studien war, konnte bisher kein Regulationsmechanismus aufgedeckt werden.^{63, 70, 289-296}

4.4 AMPK und vaskuläre Inflammation

Da der Anstieg der NOX-2 mRNA-Expression möglicherweise Ausdruck einer Infiltration von phagozytären Zellen ist und damit auf eine erhöhte vaskuläre Inflammationsreaktion hinwies, wurde die Expression von iNOS, VCAM-1 und COX-2 als Indikatoren der vaskulären Inflammation untersucht.^{196, 297-301}

Um die Expressionsanalyse auf mRNA-Ebene durchzuführen, wurde ein System von Applied Biosystems verwendet, das auf der Verwendung von TaqMan®-Sonden basiert. Diese Sonden machen sich das Prinzip der FRET-Technologie zu Nutze („Fluorescence Resonance Energy Transfer“) und sind daher hoch spezifisch, was ein deutlicher Vorteil dieser Methode ist. Eine weit kostengünstigere Methode stellt die Verwendung von interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffen, wie SYBR Green I oder Ethidiumbromid, dar.³⁰² Diese Fluoreszenzfarbstoffe lagern sich nur in die doppelsträngige DNA ein, wodurch die Fluoreszenz bei jedem Syntheszyklus ansteigt. Ein deutlicher Nachteil dieser Methode ist aber die geringe Spezifität der Fluoreszenzfarbstoffe, die zwischen unterschiedlichen PCR-Produkten nicht unterscheiden können. So könnten sich die Farbstoffe neben den hergestellten doppelsträngigen Zielsequenzen auch in Bereiche lagern, die durch Primerdimere gebildet werden. Diese Ungenauigkeit müsste anschließend durch Schmelzkurvenanalysen ausgeglichen werden.

VCAM-1 ist als Adhäsionsmolekül an der Zelloberfläche ein Verbindungspol für zirkulierende, mononukleäre Leukozyten, um die Rekrutierung dieser für die arterielle Intima zu vermitteln.^{195, 303, 304} Unter normalen physiologischen Bedingungen wird VCAM-1 nicht exprimiert, erst proinflammatorische Signale induzieren die Expression dieses Adhäsionsmoleküls, vor allem in Bereichen von vaskulären Verletzungen oder in atherosklerotischen Plaques.^{2, 286, 305} Auch die Behandlung von Angiotensin II führt zu einer gesteigerten Expression von VCAM-1.^{306, 307} In Analogie zu den genannten Publikationen konnte ein signifikanter Anstieg der VCAM-1-Expression nach Angiotensin II-Behandlung festgestellt werden. Die gleichzeitige Behandlung mit AICAR reduzierte die Angiotensin II-induzierte Inflammationsreaktion wieder signifikant (Abbildung 45). Umgekehrt wurde bei $\alpha 1$ AMPK $-/-$ Tieren die VCAM-1-Expression durch Angiotensin II-Behandlung signifikant stärker erhöht als im Wildtyp (Abbildung 65). Auch andere Arbeitsgruppen weisen darauf hin, dass die AMPK in inflammatorische Vorgänge eingreift. So konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass in Endothelzellen die Induktion von VCAM-1 und ICAM-1 durch Metformin, also einem Aktivator der AMPK, reduziert werden konnte.³⁰⁸ Weiterhin beschreiben die Autoren, dass AICAR die TNF α -induzierte NF κ B-Aktivierung dosisabhängig inhibieren kann.³⁰⁸

Die Cyclooxygenase-2 (COX-2) wurde als zweiter Parameter der vaskulären Inflammation herangezogen. Die COX-2 gehört zur Familie der pathogeninduzierbaren Oxygenasen, die im Gegensatz zur konstitutiv exprimierten Cyclooxygenase-1 nur nach Aktivierung exprimiert wird.³⁰⁹ Es wurde ein Expressionsanstieg nach erfolgter Angiotensin II-Behandlung festgestellt, der durch die gleichzeitige Behandlung mit AICAR verhindert werden konnte (Abbildung 45).³¹⁰ Im Gegensatz dazu wurde in $\alpha 1$ AMPK-defizienten Tieren ein signifikant stärkerer Anstieg nach Angiotensin II-Behandlung als im Wildtyp beobachtet (Abbildung 65). Diese Resultate weisen auf $\alpha 1$ AMPK-abhängige Effekte in der Regulation der COX-2 hin. Ein ähnliches Regulationsmuster fand eine Arbeitsgruppe in Korea an Brustkrebszellen, bei denen die Aktivierung der AMPK, sowohl durch AICAR als auch durch Quercetin, die Inhibition von COX-2 zur Folge hatte.²⁵⁸ Als möglicher Mechanismus wurde von dieser Arbeitsgruppe eine Beeinflussung von MAPK-Signalwegen und Zellzyklusarrest vermutet.^{129, 252, 311}

Der dritte verwendete Indikator der vaskulären Inflammation ist die induzierbare NO-Synthase. Diese Isoform der NO-Synthase wird rein transkriptionell reguliert und unter physiologischen Bedingungen von vielen Zellen nicht exprimiert.^{168, 224} Unter Bedingungen von

zellulärem Stress, der durch die Infusion von Angiotensin II induziert wurde, kommt es zu einer Expressionssteigerung der iNOS, die 10 – 100fach mehr NO produzieren kann als die beiden konstitutiv exprimierten Isoformen eNOS und nNOS (neuronal NO-Synthase).^{224, 312} Eine Induktion der iNOS war nach der Behandlung mit Angiotensin II zu beobachten und wurde durch die Co-Therapie mit AICAR abgemildert (Abbildung 45). Dabei wurde auch ein signifikanter Anstieg der iNOS-Expression durch die alleinige Gabe von AICAR festgestellt, dessen Ursache aber unklar bleibt. Ein Effekt der basalen AMPK-Aktivität auf die iNOS Expression erscheint sehr wahrscheinlich, da $\alpha 1$ AMPK-Defizienz basal schon starke Auswirkungen auf die iNOS-Expression zeigte (Abbildung 65). In $\alpha 1$ AMPK-knock-out-Mäusen verursachte die zusätzliche Angiotensin II-Infusion eine noch weitere signifikant gesteigerte iNOS-Expression im Vergleich zum korrespondierenden Wildtyp.

Weiterhin kann die starke Bildung von Peroxynitrit ebenfalls auf die gesteigerte iNOS-Expression zurückgeführt werden. Dieses Phänomen wurde sowohl indirekt durch die Untersuchung von nitrierten Tyrosinresten an Proteinen als auch direkt mit den verschiedenen Chemilumineszenzverfahren bestätigt. In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung der AMPK mittels AICAR in primären Makrophagen, in Gliazellen und in Astrozyten die LPS-induzierte iNOS-Expression unterdrücken konnte.^{234, 313, 234} Eine weitere Arbeitsgruppe zeigt, dass die AMPK-induzierte iNOS-Inhibition aus der post-translationalen Modifikation resultierte.³¹⁴ Die genauen Mechanismen werden kontrovers diskutiert.³¹⁵ Es gibt Hinweise, dass die iNOS-Expression durch AICAR aber auf eine AMPK-unabhängige Weise reguliert wird.³¹⁵ Die vorliegende Arbeit zeigt jedoch, dass die AMPK selbst in die Expression der iNOS involviert ist, da nicht nur die Aktivierung der AMPK durch AICAR, sondern auch die genetische Ablation der $\alpha 1$ AMPK-Isoform signifikante Effekte auf die Expression der iNOS und die damit verbundene NO-Produktion hatte. Die Expressionssteigerung im vaskulären Bereich basiert demnach vermutlich auf der Aktivität der $\alpha 1$ AMPK-Isoform, die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen konnten jedoch nicht abschließend aufgeklärt werden.

4.5 AMPK und Endothelzellnekrose und -apoptose

Endothelzellen sind durch ihren ständigen Kontakt mit dem Blutstrom einer Vielzahl von physiologischen und pathologischen Stimuli ausgesetzt. Dabei kommt es insbesondere durch

reaktive Sauerstoffspezies zu einem Absterben von Endothelzellen, die dann durch zirkulierende, endotheliale Progenitorzellen aus dem Knochenmark ersetzt werden müssen. Um die Endothelzellnekrose bzw. -apoptose zu minimieren, ist das Verständnis der zugrunde liegenden molekularen Mechanismen unerlässlich. Die Zellviabilität hängt im Allgemeinen von der Balance und der relativen Aktivität von pro- und antiapoptotischen Signalwegen ab, hierbei spielen neben den mitochondrialen Signalen insbesondere die MAP-Kinasen und die Akt-Kinase (=PKB) eine herausragende Rolle. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Gabe von AMPK-Aktivatoren eine stressinduzierte Induktion des JNK-Signalwegs unterbinden konnte.^{198, 200, 201, 232, 316}

Der JNK-Signalweg ist ein proapoptotischer Signalweg, der die Aktivierung von c-Jun (Phosphorylierung an Serin 63 und 73) einschließt. Durch die Aktivierung dieses Signalweges kommt es zu einer Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien und der Induktion der Apaf-1/Caspase-9-Kaskade, die wiederum die Effektor-Caspase-3 induziert, die endgültig zum kontrollierten Zelltod führt.³¹⁷⁻³²⁰

Die p38 MAPK wird wie der JNK-Signalweg als Antwort auf eine Vielzahl von Stressoren von MAPKK (MAP-KinaseKinase) durch eine duale Phosphorylierung induziert. Diese Kinase kann über die Modulation unterschiedlicher Zielproteine zum programmierten Zelltod führen.^{230, 321, 322} Die Akt-Protein-Familie (auch Proteinkinase B Familie), als spezifische Serin/Threonin-Proteinkinasen, kann zum Beispiel über die Modulation des Bcl-2/Bcl-X-Komplexes über Zellüberleben oder Zelltod entscheiden, wobei Akt als klassischer „survival pathway“ gilt.^{323, 324}

Die Zelltod- bzw. Zellviabilitätsversuche zeigten deutlich, dass die AMPK-Aktivierung den H₂O₂-induzierten Zelltod über die Aktivierung von PGC-1 α und Stabilisierung des mitochondrialen Membranpotentials verhindern konnte (Abbildung 46 – 48).^{103, 325, 326} Daran waren aber nicht die proapoptotischen Signalwege der p38MAP-Kinase oder die Akt-Familie beteiligt. Signalkaskaden nutzen oft die mitochondriale ROS-Produktion und den Verlust des mitochondrialen Membranpotentials, um den programmierten Zelltod zu induzieren.³²⁷ Dies deutet darauf hin, dass die AMPK über den Schutz des mitochondrialen Membranpotentials und die Reduktion der mitochondrialen ROS-Produktion vor Apoptose schützen könnte, was in Zellkulturversuchen mit dem Einsatz von H₂O₂ als Stressor bestätigt werden konnte. Dabei

scheint das mitochondriale Signal der JNK-Aktivierung übergeordnet zu sein, da in Experimenten mit dem mitochondrial-gerichteten Antioxidanz MitoQ, nicht nur das mitochondriale ROS-Signal normalisierte, sondern auch die Aktivierbarkeit des JNK-Signalwegs durch H_2O_2 aufhob.

4.6 AMPK im arteriellen „Hypertoniemodell“

Als arterielle Hypertonie bezeichnet man in der Medizin die Erhöhung des Blutdruckes im arteriellen Schenkel des Gefäßsystems über die Norm hinaus, der langfristig zu Schäden an Gefäßen und Organen führt. Der arterielle Druck wird neben dem Sympathikotonus entscheidend durch das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System gesteuert.^{1, 2} Durch Renin wird aus Angiotensinogen Angiotensin I abgespaltet, welches anschließend durch das Angiotensin-Conversions-Enzym¹⁶ zu Angiotensin II umgewandelt wird. Dieses kann den arteriellen Druck über den AT_1 -Rezeptor steigern. Angiotensin I selbst hat nur sehr wenig biologische Aktivität im Gegensatz zu Angiotensin II, das als stärkster endogener Konstriktor von peripheren und renalen Arteriolen bekannt ist (je nach Gefäß 10 – 40fache Wirksamkeit von Noradrenalin). Obwohl vier verschiedene Angiotensin-Rezeptortypen bekannt sind, wird der Großteil der Angiotensin II-Wirkungen über den AT_1 -Rezeptor vermittelt. Dazu zählen die Vasokonstriktion, die Flüssigkeitsretention und die Hypertrophie und Hyperplasie von Gefäßmuskelzellen und Kardiomyozyten. Durch die Gabe von Angiotensin II wurde der AT_1 -Rezeptor chronisch stimuliert, was unter anderem zu einer chronischen Stimulation der Phospholipase C führte. Das aus Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat gebildete Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP_3) setzt Calcium aus dem endoplasmatischen Retikulum frei, wodurch es in glatten Gefäßmuskelzellen über Calmodulin zu einer Kontraktion kommt. Diese chronische Kontraktion der Gefäßmuskulatur führt zu einem erhöhten peripheren Gefäßwiderstand und damit zur Blutdrucksteigerung, die in dieser Arbeit durch die gleichzeitige Gabe von AICAR nicht verhindert werden konnte (Abbildung 36). Dies scheint zunächst im Widerspruch zu einer Arbeit von Buhl et al. zu stehen, die beschreibt, dass AICAR-Behandlung in Ratten mit Grundzügen des Insulinresistenz-Syndroms den Blutdruck senken kann.³²⁸ In der genannten Arbeit von Buhl et al. wurden die Tiere sieben Wochen lang mit täglichen AICAR-Injektionen von 500 mg / kg Körpergewicht behandelt. In der vorliegenden Arbeit wurden die Tiere mit nur 200 mg AICAR pro kg Körpergewicht über sieben Tage behandelt, was zu keiner Senkung des arteriellen Druckes führte. Die Unterschiede im AICAR-Effekt könnten in

den unterschiedlichen Hypertoniemodellen oder der gewählten AICAR-Dosis begründet sein. Die vorliegenden Ergebnisse belegen jedoch, dass die beobachteten Effekte der AMPK-Modulation nicht auf eine Modulation des AT-1-abhängigen Angiotensin II-Signalweges zurückzuführen sind, da in diesem Fall ein Effekt auf den Blutdruck zu erwarten gewesen wäre.

4.7 AMPK und Diabetes

Diabetes mellitus wird als Sammelbegriff für heterogene Störungen des Stoffwechsels verwendet, deren Leitbefund eine Hyperglykämie ist.³²⁹ Seit 1998 teilt die WHO die verschiedenen Typen des Diabetes mellitus nach der jeweiligen Ursache in vier Gruppen ein.^{12, 186} In den Untergruppen (1a und 1b) des Typ 1 Diabetes mellitus werden die Fälle zusammengefasst, bei denen eine Zerstörung der Betazellen der Langerhans-Inseln des Pankreas zum absoluten Insulinmangel führt. Der Typ 2 Diabetes mellitus fasst im Gegensatz dazu Gruppen des relativen Insulinmangels, von Sekretionsstörungen, Insulinresistenzen bzw. Hyperinsulinismen zusammen.^{186, 329} Die erhöhte Letalität von Diabetikern aller Typen ist unter anderem durch makrovaskuläre Komplikationen bedingt, die beispielsweise zu einem erhöhten Herzinfarktisiko führen. Ursächlich sind direkte Änderungen der Zellfunktionen durch die Einlagerung von Glukose im Rahmen der Hyperglykämie sowie der erhöhte oxidative Stress, der auch zu einer Verschlechterung der Endothelfunktion führt.³³⁰⁻³³³

Die bei Diabetes mellitus entscheidende Dysfunktion liegt im Bereich der Glukosehomöostase, die durch die Balance der Glukoseaufnahme mit der Nahrung, von Glukoseproduktion der Leberzellen und der Glukoseaufnahme in periphere Gewebe (z.B. Muskel und Fettgewebe) bestimmt wird. Unter Normalbedingungen wird durch Nahrungsaufnahme und einen dadurch erhöhten Blutglukosespiegel die Insulinsekretion in den β -Zellen des Pankreas stimuliert. Diese Sekretion führt zu erhöhten Insulinspiegeln im Blutkreislauf, wodurch die peripheren Gewebe und die Leber erreicht werden können. Durch die Anlagerung des Insulins an den Insulinrezeptor werden intrazelluläre Signalkaskaden in Gang gesetzt, die in Muskulatur und Fettgewebe zur Translokation des Glukose-Transporter-Proteins GLUT4 in die Plasmamembran führen, wodurch die Aufnahme von Glukose in die Zellen verstärkt wird. Weitere Wirkungen von Insulin sind die gesteigerte Glukosespeicherung in Leberzellen und die Inhibition der hepatischen Glukoneogenese. Zu einer Störung dieser Homöostase und einer Hyperglykämie führen einerseits ein relativer oder sogar absoluter Insulinmangel und anderer-

seits eine Glukose-Überproduktion der Leber. Die AMPK kann die Glukosehomöostase durch unterschiedliche Effekte beeinflussen. Einerseits forciert die AMPK die Insulin-unabhängige GLUT4-Translokation in die Zellmembran, wodurch die Glukoseaufnahme durch Skelettmuskel und Fettgewebe erhöht wird.^{112, 217, 334, 335} Andererseits wird die Genexpression von Enzymen der Glukoneogenese in der Leber (Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase, Glukose-6-Phosphatase) durch die AMPK-Aktivität inhibiert.^{336, 337} Durch die Entdeckung der parallelen metabolischen Effekte von Insulin und AMPK wurden vermehrt AMPK-Aktivatoren und deren Auswirkungen auf die gestörte Glukosehomöostase getestet und die antidiabetischen Wirkungen der $\alpha 2$ -Isoform der AMPK zugeschrieben.^{115, 338} Die in der vorliegenden Arbeit gezeigten Ergebnisse belegen, dass durch Aktivierung der AMPK die Gefäßfunktion unabhängig von der Glukosehomöostase signifikant verbessert werden konnte. Beim Diabetiker könnte die AMPK-Aktivierung auch sekundär, nämlich durch die Verhinderung der Hyperglykämie, die Gefäßfunktion positiv beeinflussen.

Demnach könnten durch AMPK-Aktivatoren beim Diabetiker gleichzeitig zwei wichtige Ziele erreicht werden:¹²¹ durch AMPK-Aktivierung wird die Glukosehomöostase signifikant verbessert, und¹²¹ im vaskulären System werden die Schädigungen durch Hyperglykämie entscheidend vermindert. Momentan werden zwei Klassen von oralen Antidiabetika, Biguanide (wie Metformin) und Thiazolidindione/PPAR γ -Agonisten (z.B. Pioglitazon oder Rosiglitazon), die AMPK aktivieren, eingesetzt.^{191, 260, 339-342} Diese Mittel erreichen die AMPK-Aktivierung allerdings über die Inhibition der mitochondrialen Atmungskette (Thiazolidindione/PPAR γ -Agonisten) bzw. über unbekannte Mechanismen.²⁶⁰ Die Entwicklung und der Einsatz neuer, direkter AMPK-Aktivatoren wird in der Zukunft zeigen, ob die alleinige Modulation der AMPK in der Therapie von Diabetes mellitus vorteilhaft ist und möglicherweise mit weniger erwünschten Nebeneffekten einhergeht.

4.8 AMPK-Isoformen

Die AMPK ist ein heterotrimerer Komplex, aus einer katalytischen Untereinheit α und zwei regulatorischen Untereinheiten β und γ . Die konventionelle Serin/Threonin-Kinase-Aktivität liegt in der α -Untereinheit, die durch einen Aktivierungsbogen eines Threonin-Restes (Thr 172), der gleichzeitig die aktivierende Phosphorylierungsstelle darstellt, charakterisiert wird.^{74, 87} Homologe dieser drei Untereinheiten wurden in allen Säugern, Fruchtfliegen (Dro-

sophila melanogaster), Würmern (*Caenorhabditis elegans*), Hefen (*Saccharomyces cerevisiae*), Pflanzen (*Arabidopsis thaliana*) und in primitiven Protozoen (*Giardia lamblia*) mit einem hohen Konservierungsgrad identifiziert.¹⁰⁷ In Säugetieren wurden zwei bis drei Isoformen von jeder Untereinheit gefunden ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$, $\beta 2$, $\gamma 1$, $\gamma 2$, $\gamma 3$), die durch unterschiedliche Gene kodiert werden. Diese Variabilität der Untereinheiten hat eine Vielzahl von heterotrimeren Kombinationsmöglichkeiten zur Folge, was zur Diversität entscheidend beiträgt.³⁴³ Zusätzlich wurden Unterschiede in der gewebespezifischen Expression von katalytischen und regulatorischen Untereinheiten berichtet.^{107, 343} So wurde zum Beispiel in Leberzellen eine Verteilung der $\alpha 1$ - zur $\alpha 2$ -Untereinheit von etwa 50% festgestellt, während in Endothelzellen die $\alpha 1$ -Untereinheit deutlich dominiert (siehe Abbildung 50).^{107, 111, 343} Auch die intrazelluläre Lokalisation der unterschiedlichen Isoformen scheint zu divergieren. Während die $\alpha 2$ -Isoform hauptsächlich im Zytoplasma und im Nukleus zu finden ist, sind Komplexe, die die $\alpha 1$ -Isoform beherbergen, sowohl im Zytoplasma als auch an der Plasmamembran lokalisiert.³⁴⁴

³⁴⁸ Die gewebespezifische Expression und auch die intrazelluläre Distribution scheinen die Funktionen der unterschiedlichen katalytischen Untereinheiten zu beeinflussen. Darüber hinaus ist bekannt, dass die $\alpha 1$ - Isoform weniger sensitiv auf AMP reagiert als die $\alpha 2$ - Isoform, was möglicherweise auch die vorwiegend metabolischen Effekte der $\alpha 2$ -enthaltenden AMPK erklärt.³¹⁹ Die dominierende Expression der $\alpha 1$ -Untereinheit in Endothelzellen führte zur Entscheidung, die $\alpha 1$ AMPK-defizienten Mäuse als Modell für eine vaskuläre AMPK-Inhibition zu nutzen. Darüber hinaus eignet sich dieses Modell auch deshalb besser als etwa $\alpha 2$ AMPK-knock out-Mäuse für die Analyse der Gefäßregulation, weil unerwünschte Effekte auf den Glukose- oder Lipidstoffwechsel wegfallen, die möglicherweise indirekt die Gefäßfunktion beeinflussen könnten.^{191, 344} Im Einklang mit der bisherigen Literatur konnten die erhobenen Expressionsdaten mittels Western Blot zeigen, dass die Defizienz der $\alpha 1$ -Untereinheit dazu führte, dass die Expression der gesamten α AMPK auf 20% zurückging, wobei eine kompensatorische Expressionssteigerung der $\alpha 2$ AMPK im vaskulärem Gewebe ausgeschlossen werden konnte. Zu den physiologischen Funktionen, die der endothelialen $\alpha 1$ AMPK zugerechnet werden, zählen der Schutz vor Apoptose,¹⁰³ die eNOS-Aktivierung und Erhaltung der Perfusion³⁴⁹ sowie die Regulation der Inflammation und der Angiogenese.^{101, 102} Inwieweit die in der vorliegenden Arbeit beobachteten Effekte in $\alpha 1$ AMPK-knock out-Mäusen spezifisch auf die $\alpha 1$ -Isoform zurückzuführen oder nur Ausdruck der insgesamt stark verminderten vaskulären AMPK-Aktivität sind, ist nicht bekannt. Da jedoch in $\alpha 1$ AMPK-knock-out-Tieren kein Effekt des AMPK-Aktivators AICAR zu beobachten war, deutet dies auf einen spezifischen

Effekt der $\alpha 1$ -Isoform hin. Dieses Resultat weist übereinstimmend mit vorherigen Publikationen auf die dominierende Expression und Funktion der $\alpha 1$ AMPK im vaskulären Gewebe hin.^{107, 111, 350}

4.9 Phänotyp der $\alpha 1$ -AMPK-Defizienz

Die AMPK hat im Metabolismus die entscheidende Funktion, den Energiestatus der Zellen durch das Verhältnis von AMP zu ATP zu „messen“ und bei sinkenden Energieverfügbarkeit über die Steuerung von Stoffwechselwegen das Überleben der Zelle zu sichern.^{351, 352} Weiterhin wurden der AMPK auch protektive Funktionen beim Zellwachstum und der Apoptose zugeordnet.^{353, 354} Das Überleben von Erythrozyten wird ähnlich wie das Überleben von kernhaltigen Zellen durch programmierten Zelltod (Apoptose) limitiert, und die Eryptose umfasst analog zur Apoptose Vorgänge wie Zellschrumpfen und Vesikelbildung der Zellmembran von Erythrozyten.³⁵⁵⁻³⁵⁹ Da der AMPK in nukleären Zellen protektive Funktionen zugeschrieben wurden, beschäftigte sich eine Tübinger Arbeitsgruppe mit der Expression und den Funktionen der AMPK in Erythrozyten. Es wurde festgestellt, dass die verwendeten $\alpha 1$ AMPK-defizienten Mäuse eine leichte Anämie aufwiesen, die mit einer Splenomegalie verbunden war (siehe Abbildung 77).³⁶⁰

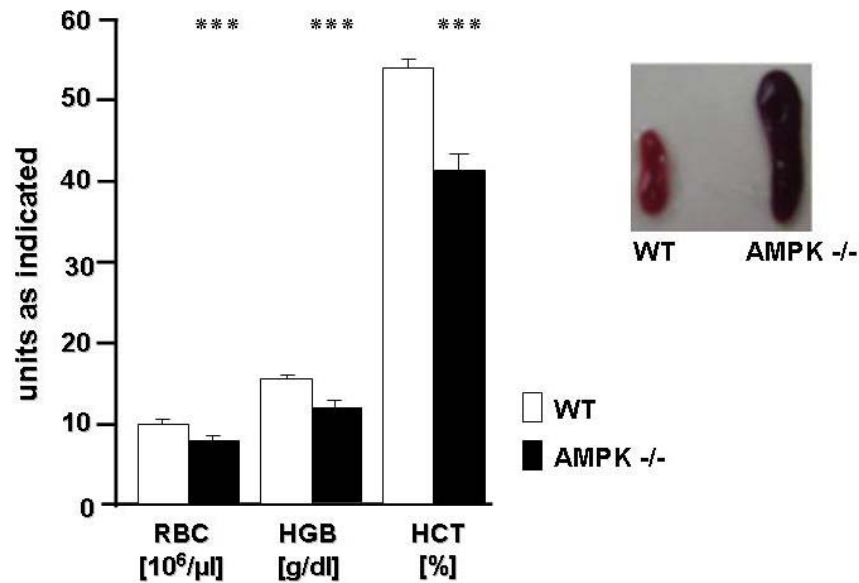


Abbildung 77. Erythrozyten, Hämoglobin und Hämatokritwerte sind in α 1AMPK-defizienten Tieren signifikant reduziert, während die Milz vergrößert ist. Föller et al. 2008.

Bei schwerer Anämie sind auch Veränderungen der Gefäßregulation zu erwarten, da es wegen der Verminderung der Sauerstoffträger im Blut als Kompensationsmechanismus zu einem erhöhten Herzzeitvolumen kommt, das über eine NO-getriggerte Vasodilatation gesteuert wird. Die Korrektur einer solchen schweren Anämie in eine mildere Form (Hb-Wert etwa 20% unterhalb der Norm) war jedoch mit keiner Änderung der NO-Freisetzung mehr verbunden.³⁶¹⁻³⁶³ Da die Ausprägung der Anämie in den α 1AMPK-knock-out-Mäusen ähnlich war (15-20% geringerer Hämoglobinwert als in Wildtyp-tieren), erscheint ein nachhaltiger Einfluss auf die Endothelfunktion unwahrscheinlich. Hierfür spricht auch die Tatsache, dass die α 1AMPK-Deletion per se keinen Einfluss auf die Endothelfunktion hatte.

4.10 Fazit und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die α 1AMPK-Aktivität im Gefäßsystem wichtige regulatorische Funktionen hat, indem sie die Endothelfunktion stabilisiert, den vaskulären oxidativen Stress vermindert und antiinflammatorisch wirkt. Diese protektiven Eigenschaften treten insbesondere bei pathologisch veränderter Gefäßfunktion zu Tage, wie sie hier durch die Infusion von Angiotensin II simuliert wurde. Die Identifizierung der direk-

ten molekularen Angriffspunkte der AMPK im Gefäßsystem gehört sicher zu den Zielen zukünftiger Forschungsprojekte. Insgesamt scheint der Erhalt der AMPK-Aktivität bzw. eine AMPK-Aktivierung in der Therapie kardiovaskulärer Erkrankungen wünschenswert. Dies gilt insbesondere für Diabetiker, da neben den genannten vaskulären Effekten auch eine verbesserte Kontrolle der Blutglukose erzielt und somit zwei wichtige Therapieziele gleichzeitig erreicht werden könnten. In der klinischen Routine finden bereits Antidiabetika mit AMPK-aktivierenden Eigenschaften Anwendung, wobei die AMPK-Aktivierung indirekt durch eine Hemmung der mitochondrialen Atmungskette erzielt wird. Die Entwicklung neuartiger, spezifischer AMPK-Aktivatoren könnte einen zusätzlichen Nutzen bringen. Für die Anwendung der AMPK-Aktivierung als Therapieprinzip spricht auch, dass sich die ischämische Toleranz von Geweben hierdurch verbessern ließe, was z.B. zu einer geringeren Ausdehnung von Myokardinfarkten führt.¹²⁶ Der Einsatz AMPK-aktivierender Substanzen könnte allerdings dadurch limitiert werden, dass sich die Ischämietoleranz in Tumorzellen, und unter Umständen die Tumorinzidenz erhöht werden könnte. Abbildung 78 fasst die protektiven Eigenschaften der AMPK im vaskulären System zusammen.

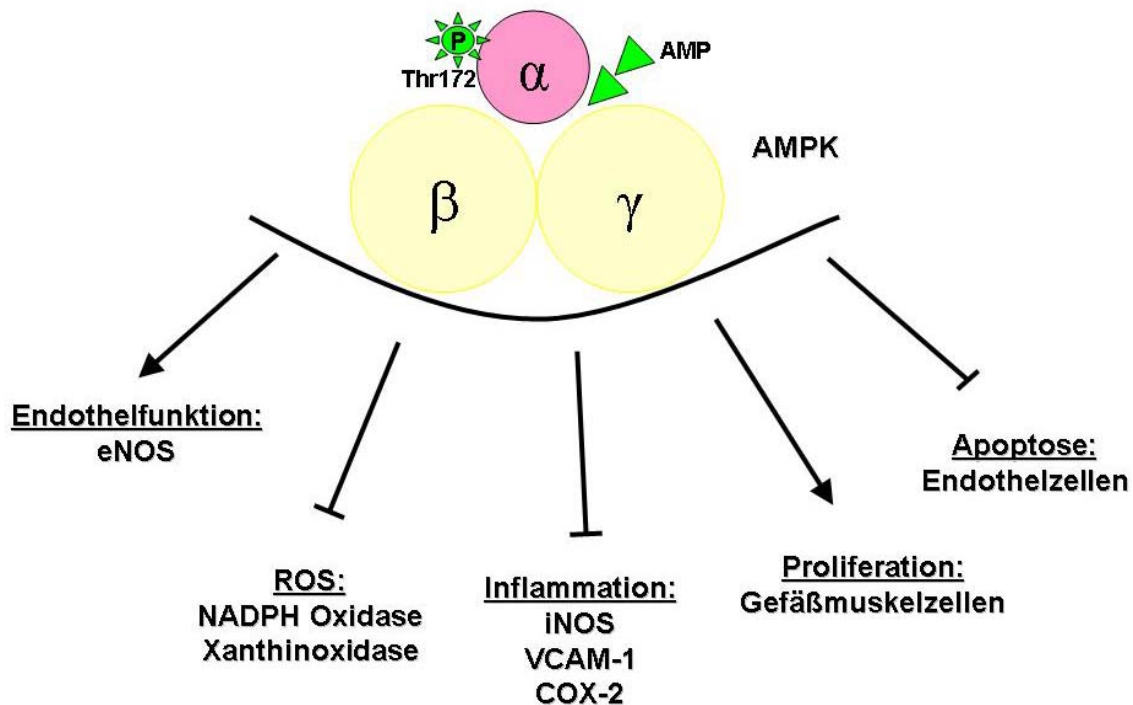


Abbildung 78. Schematische Zusammenfassung der AMPK-Wirkungen im vaskulären System (verändert nach³⁵⁰).

5. Zusammenfassung

Die AMPK ist ein ubiquitär exprimiertes, heterotrimeres Enzym, das als „Energie-Sensor“ fungiert und bei sinkender Energie-(ATP)-Versorgung das Überleben der Zelle sichert. Durch steigende AMP-Spiegel wird das Enzym aktiviert und dadurch werden anabole Reaktionen inhibiert, während gleichzeitig katabole Vorgänge gefördert werden. In Blutgefäßen kann die AMPK die endotheliale NO-Synthase aktivieren, die Angiogenese stimulieren sowie die Endothelzellapoptose und das Wachstum glatter Gefäßmuskelzellen inhibieren. Da alle diese Prozesse fundamental in der Entwicklung kardiovaskulärer Erkrankungen sind, wurde in der vorliegenden Arbeit die Hypothese geprüft, nach der die AMPK-Aktivität eine protektive Funktion im vaskulären System *in vivo* ausübt. Hierzu wurden in zwei verschiedenen „Mausmodellen“ die Effekte einer AMPK-Aktivierung (AICAR-Injektion) und -Inhibition ($\alpha 1$ AMPK-knock-out) auf Endothelfunktion, oxidativen Stress und die vaskuläre Inflammation untersucht. Es wurde gezeigt, dass durch die Aktivierung der AMPK mittels AICAR die Angiotensin II-induzierte Endotheldysfunktion, der oxidative Stress und auch die vaskuläre Inflammation gemildert werden konnten. Im Gegensatz dazu führte die Deletion der vaskulär überwiegenden $\alpha 1$ AMPK-Isoform unter niedrig dosierter Angiotensin II-Infusion zu einer verstärkten Endotheldysfunktion, vermehrtem oxidativen Stress und einem proinflammatorischen Milieu. Dabei war eine niedrige AMPK-Aktivität erstaunlicherweise mit einer erhöhten NO-Produktion gekoppelt, welches aber durch eine erhöhte Superoxidproduktion unter Bildung von Peroxynitrit inaktiviert wurde und daher die Gefäßfunktion insgesamt verschlechterte. Als Hauptquelle des Angiotensin II-induzierten oxidativen Stresses konnte die NADPH-Oxidase identifiziert werden, die durch die basale und stimulierte AMPK-Aktivität inhibiert wurde. Ähnlich wurden Xanthinoxidase Aktivität und die mitochondriale ROS-Produktion durch eine funktionierende AMPK limitiert. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Resistenz von Endothelzellen gegenüber oxidativem Stress AMPK-abhängig erhöht wurde. Die im Rahmen der $\alpha 1$ AMPK-Deletion erhöhte NO-Produktion war auf eine gesteigerte, AT II-induzierte iNOS-Expression zurückzuführen. Als Zeichen der vaskulären Inflammation wurde zudem die Expression von VCAM-1 und COX-2 untersucht, die durch eine Aktivierung der AMPK verringert werden konnte, aber nach $\alpha 1$ AMPK-Deletion stark gesteigert war. Die Ergebnisse belegen eine essentielle Rolle der AMPK für die Erhaltung der Gefäßfunktion. Zukünftige Studien müssen zeigen, ob eine pharmakologische Aktivierung der AMPK klinisch einsetzbar ist und therapeutischen Nutzen bringt.

6. Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1 Essentielle Komponenten des Renin-Angiotensin-Aldosteron-System: Synthese-, Freisetzungs- und Wirkungsorte der einzelnen Substanzen (AT1 = Angiotensin-Rezeptor 1). Für Details siehe Text (verändert nach¹).
- Abbildung 2 Vorgänge bei Vasokonstriktion: Angiotensin II wirkt über den AT1-Rezeptor und führt zu einer Aktivierung der PLC; auch Adrenalin und Vasopressin / ADH wirken über die Aktivierung der PLC, die durch die Bildung von IP₃ und DAG eine Muskelkontraktion und andere Effekte hervorruft. Für Details siehe Text (verändert nach¹).
- Abbildung 3 Wichtige lokale Effektorsysteme, die den peripheren Gefäßtonus regulieren: Der Gefäßtonus wird über die Bildung von NO und über die Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase reguliert. Durch Bildung von cGMP wird die cGMP-abhängige Proteinkinase aktiviert, die durch Phosphorylierungsreaktionen die Vasodilatation einleitet. Für Details siehe Text (verändert nach¹).
- Abbildung 4 Struktur der humanen eNOS, blau: Eisenporphyrin, grün: Substrat L-Arginin, schwarz-gelb: P₄₅₀ bindender, axialer Eisen-Thiolat-Ligand von Cystein, lila: Cofaktor BH₄, rot: Zink-Thiol-Komplex bildende Cysteine, braun: Zn²⁺. Für Details siehe Text (verändert nach³).
- Abbildung 5 Schematisches Diagramm mit Beispielen unterschiedlicher NADPH-Oxidase-Isoformen und Teilreaktionen, sowie die zelluläre Distribution: NOXA1 und NOXO1 sind Homologe zu p67^{phox} und p47^{phox}, die für die Aktivierung der NOX1 benötigt werden; NOX4 benötigt diese Untereinheiten nicht, sondern wird transkriptionell reguliert. VSMC = vascular smooth muscle cell, EC = endothelial cell (verändert nach³⁸).
- Abbildung 6 Schematisches Diagramm der vier Atmungsketten-Komplexe: Komplex I ist die NADH-Dehydrogenase, die Elektronen auf Ubichinon (Q) überträgt und als Protonenpumpe fungiert; Komplex II oxidiert Succinat zu Fumarat und überträgt ebenfalls die Elektronen auf Ubichinon (Q), fungiert dabei aber nicht als Protonenpumpe; Komplex III, die Ubichinol-Cytochrom c-Reduktase übernimmt die Elektronen von Ubichinol und überträgt diese auf Cytochrom c, wobei Protonen gepumpt werden können; die Cytochrom-Oxidase oder Komplex IV übernimmt die Elektronen vom reduzierten Cytochrom c und überträgt diese auf den Endakzeptor, molekula-

ren Sauerstoff (verändert nach⁵⁰).

- Abbildung 7 Reaktionen der Purin-Degradation durch die Xanthinoxidase: die Xanthinoxidase katalysiert die beiden terminalen Reaktionen der Purin-Degradation von Hypoxanthin zum Xanthin zur Harnsäure; die Elektronen werden auf Sauerstoff übertragen, wobei Wasserstoffperoxid gebildet wird. Die physiologische Reaktion wird durch die Xanthindehydrogenase katalysiert, die NAD^+ als Elektronenakzeptor verwendet; (verändert nach⁶³).
- Abbildung 8 Domänenstruktur der drei AMPK-Untereinheiten α , β und γ : Die zwei Isoformen der α - ($\alpha 1$, $\alpha 2$) und β -Untereinheiten ($\beta 1$, $\beta 2$) haben sehr ähnliche Strukturen und sind daher nicht einzeln aufgeführt; die Isoformen der γ -Untereinheit enthalten variable N-Termini mit ungeklärter Funktion (verändert nach^{75,76}).
- Abbildung 9 Mechanismus der AICAR-Wirkung in intakten Zellen: AICAR wird über die Plasmamembran transportiert und im Zytoplasma durch die Adenosinkinase phosphoryliert; entstandenes ZMP (5-Aminoimidazol-4-Carboxamid-Ribonukleosid-Monophosphat) ist in der Lage, die AMPK zu aktivieren, kann aber auch verzögert zu AMP umgebaut werden (verändert nach⁸⁶).
- Abbildung 10 Zusammenfassung der drei entscheidenden Schritte der Polymerasenkettenreaktion. 1. Schritt: Denaturierung der DNA-Matrize bei 94°C , 2. Schritt: Anlagerung = Annealing der Primer, 3. Schritt: „Elongation“, die Taq-Polymerase synthetisiert einen neuen DNA-Strang komplementär zum Matrizenstrang. Danach folgt eine erneute Denaturierung der Doppelstränge zum Start einer neuen Syntheserunde (verändert nach²).
- Abbildung 11 Beispiel eines Genotypisierungsergebnisses der $\alpha 1$ -AMPK $-/-$ Zucht: Wildtyp-Allel: 450 bp, Knock out-Allel: 350 bp. Probe 1 und 2 zeigen nur das Knock out-Allel, es handelt sich um Knock out-Tiere. Probe 3 und 4 zeigen sowohl Knock out- als auch Wildtyp-Allel, es handelt sich um heterozygote Tiere.
- Abbildung 12 Implantation einer osmotischen Minipumpe: a. Eröffnung des Fells; b. Formung einer subkutanen Tasche; c. Einführung der osmotischen Minipumpe; d. Verschluss der Wunde mit Wundklammer „Michel“.
- Abbildung 13 Aufbau und Prinzip der osmotischen Minipumpe. Der Innenraum der Pumpe ist in unterschiedliche Kompartimente aufgeteilt. In den Innenraum wird die Substanz eingefüllt, die verabreicht werden soll. Dieser Raum ist durch eine impermeable

aber kollabierbare Haut von der osmotisch aktiven Schicht abgetrennt. Durch die äußerste semipermeable Membran kann Wasser in die Pumpe eindringen, was zur Erhöhung des Druckes der osmotischen Schicht führt, (verändert nach¹¹⁹).

Abbildung 14 Übersicht über die Tötung und Organentnahme am Beispiel einer Ratte. a. Eröffnung des Fells im Bauch- und Brustbereich; b. Eröffnung des Abdomens; c. Anheben des Sternums, wodurch das Zwerchfell am gesamten Rippenbogen eingeschnitten werden konnte; d. Injektion von Heparin (200 IE) ins noch schlagende Herz, d. Dorsaler Einschnitt der Rippen; e. Umlagern der abdominalen Organe wie Darm, Leber, Milz etc. zu einer Seite, Einschneiden des Zwerchfells mit einer kleinen scharfen Schere; f. Trennung des Herzens von den Blutgefäßen mit nur einem Schnitt; g. Abtrennung der Abgänge und des angelagerten Binde- und Fettgewebes vom Aortenbogen; h. Proximale Trennung der Nierenarterien; i. Entnahme der Aorta.

Abbildung 15 Implantation von Telemetrie-Kathetern in Ratten. a. Eröffnung der Bauchhöhle; b. extraabdominale Lagerung des gesamten Intestinums; c. Verschluss der Aorta abdominalis mit „Bulldog“ Klemmen, d. Punktierung der Aorta abdominalis mit einer Kanüle und Einführung des Katheters; e. Befestigung des Katheters am parietalen Peritoneum; f. Zurückführung des Intestinums in die Bauchhöhle.

Abbildung 16 Schematischer Aufbau des NO-Analyzers NOATM Model 280

Abbildung 17 Das DPPH Radikal hat in Lösung (Methanol) eine violette Farbe. Die Farbe ändert sich zu gelb, wenn das Radikal durch ein Antioxidanz reduziert wird und verliert so die Absorptionsfähigkeit bei 517 nm (verändert nach¹²⁸).

Abbildung 18 Strukturdarstellung der verschiedenen Derivate der auf Luzigenin basierenden Chemilumineszenz (verändert nach¹³⁶).

Abbildung 19 Chemische Formel von L-012.

Abbildung 20 Endothelfunktion / -dysfunktion: im intakten Endothel wird durch die Gabe von Acetylcholin die endotheliale NO-Synthase (eNOS) aktiviert, was zur Stimulation der löslichen Guanylatzyklase (sGC) in glatten Muskelzellen führt. Die nachgeschaltete Signal-Kaskade bewirkt eine Vasodilatation. Bei endothelialer Dysfunktion wird im glatten Gefäßmuskel eine Vasokonstriktion ausgelöst (verändert nach¹⁴⁶).

- Abbildung 21 Schematische Darstellung der Organbadanlage: der Aortenring ist durch feine Dräh-
te mit dem Kraftwandler verbunden, so kann jede Veränderung des Gefäßtonus re-
gistriert werden. Die so gewonnenen Daten werden per EDV weiterverarbeitet.
- Abbildung 22 Drei absorbierende Zustände von Coomassie Brilliant Blue-G250.
- Abbildung 23 Beispiel einer Standardgerade mit BSA-Standards für die Bradford Proteinbestim-
mung.
- Abbildung 24 96-Well-Platte eines Standard Minifold I® Systems zur Durchführung eines Dot
Blots (links) und schematischer Aufbau der Dot Blot-Apparatur (rechts).
- Abbildung 25 Antigen-Antikörper- und Chemilumineszenz-Reaktion der Immundetektion eines
Proteins auf einer PVDF-Membran: Am Protein, das durch Blotting oder durch Va-
kuum auf die Membran gebracht wurde, bindet der spezifische Primärantikörper.
Der sekundäre Antikörper mit gekoppelter HRP wiederum kann am Primärantikör-
per anlagern und das zugegebene Luminol oxidieren, was zu einem Chemilumes-
zenzsignal führt (verändert nach^{136, 169}).
- Abbildung 26 Prinzip der RNA-Isolierung nach dem Protokoll von Qiagen. Homogenisierung des
Gewebes¹²¹ wurde im Kit enthaltenen Lyse-Puffer im QIAGEN Tissue Lyser
durchgeführt. Der nächste Schritt war der Proteinverdau mittels Proteinase K bei
55°C¹²¹. In Schritt¹²⁶ wurde die Ethanol gefällte RNA an eine RNeasy-Mini-Spin-
Säule gebunden, anschließend gewaschen und ein DNase Verdau durchgeführt (4).
Nach weiteren Waschsritten wurde die RNA mit Wasser von der Säule eluiert¹²¹.
Für Details siehe Text (verändert nach¹⁷¹).
- Abbildung 27 Schematische Darstellung des real time-PCR-Prinzips: a. Anlagerung der spezifi-
schen Primer und der TaqMan®-Sonde, die downstream zu einem Primer anlagert;
b. Übertragung der Energie durch FRET, vom hochenergetischen Reporter zum
niedrigenergetischen Quencher (gelbe Zackenfigur); c. die Taq-Polymerase ver-
drängt die TaqMan®-Sonde; d. durch die 5'-3'-Exonuklease Aktivität der Taq-
Polymerase wird der Reporter von der TaqMan®-Sonde abgetrennt, wodurch FRET
blockiert wird, der Reporter sendet ein detektierbares Fluoreszenzsignal (blaue Za-
ckenfigur); e. die Taq-Polymerase trennt den Rest der Sonde von der Matrize ab und
komplettiert das Amplicon. Gelbe Wolke = vom Quencher aufgenommene Energie;
blaue Wolke = vom Reporter freigesetzte Energie (verändert nach¹⁷⁹).
- Abbildung 28 PCR-Bedingungen der qRT-PCR: Darstellung des Applied Biosystems System.

Graphische Darstellung des Temperaturverlaufs mit Temperatur- (oben) und Zeitangaben (unten). Stage 1 entspricht der reversen Transkription, Stage 2 & 3 der quantitativen PCR.

- Abbildung 29 Oxidation von Dihydroethidin zu Ethidium.
- Abbildung 30 Elektronenspins und Energieverteilung im Magnetfeld in Abhängigkeit von der Feldstärke. Die Ausrichtung des magnetischen Moments eines Elektrons im Magnetfeld ist entweder parallel ($m_s = -\frac{1}{2}$) oder antiparallel ($m_s = +\frac{1}{2}$). Dargestellt ist die Proportionalität der Gleichung $\Delta E = g_e \cdot \mu_B \cdot B_0$
- Abbildung 31 Typisches ESR-Signal-Triplet des NO-Fe(DECT)2 (verändert nach¹⁸⁵). Nach der Komplexierung von Fe(DECT)2 und NO bei 37° C für 30 Minuten, kann dieses typische Spin-Trap Triplet ESR Signal im Magnetfeld detektiert werden. Die Intensität des Signals entspricht dabei der absoluten Menge des gebildeten Komplexes aus Fe(DECT)2 und NO.
- Abbildung 32 Immunhistochemie von Maus-Embryonen – Ausschnitte eines unbestimmten Bereichs; links Primärantikörper Anti-Nitrotyrosin (braune Färbung entspricht positivem Signal); rechts Primärantikörper Anti-gp91^{phox} (braune Färbung entspricht positivem Signal, markiert durch rote Pfeile); als Gegenfärbung wurde Hämatoxylin verwendet.
- Abbildung 33 Effekte von AICAR auf die Phosphorylierung von AMPK und ACC. Die Western Blots zeigen ACC-Phosphorylierung an Serin 79 und AMPK-Phosphorylierung an Threonin 172. Mittelwerte als % der Kontrolle CTR \pm SEM, CTR = 100% (n = 6). Die Behandlung mit AICAR führte zu einer Steigerung der AMPK- und ACC-Phosphorylierung; die Behandlung mit Angiotensin II plus AICAR führte zu einer signifikant höheren Steigerung der AMPK- und ACC-Phosphorylierung im Vergleich zur Behandlung nur mit Angiotensin II. Für Signifikanzangaben siehe Tabelle 4. * \approx p < 0,05 vs. CTR; ** \approx p < 0,05 vs. AT II.
- Abbildung 34 Endothelabhängige Relaxation von präparierten Aortensegmenten (4 mm) in Organbadanlagen. Angegeben ist die prozentuale Relaxation nach Acetylcholingabe (Mittelwerte \pm SEM, n = 16 – 20). Die Behandlung mit Angiotensin II führte zu einer signifikanten Reduktion der Relaxationsfähigkeit auf Acetylcholingabe, die jedoch durch die gleichzeitige Behandlung mit AICAR wieder signifikant gesteigert werden konnte (siehe Tabelle 5). Für Signifikanzangaben siehe Tabelle 5. * \approx p <

0,05 vs. CTR; ** $\approx p < 0,05$ vs. AT II.

- Abbildung 35 Endothelunabhängige Relaxation von präparierten Aortensegmenten (4 mm) in Organbadanlagen (Mittelwerte \pm SEM, $n = 12 - 14$), prozentuale Relaxation auf Nitroglyzeringabe. Die Behandlung mit Angiotensin II führt zu einer signifikanten Reduktion der Relaxationsfähigkeit auf Nitroglyzeringabe, was durch die Co-Behandlung mit AICAR wieder signifikant gesteigert werden kann. Für Signifikanzangaben siehe Tabelle 6. * $\approx p < 0,05$ vs. CTR; ** $\approx p < 0,05$ vs. AT II.
- Abbildung 36 Mittlerer arterieller Blutdruck von Ratten, Darstellung der Mittelwerte \pm SEM ($n = 4$). Aufzeichnung der Werte alle 25 Stunden, Implantation der osmotischen Minipumpe zur kontinuierlichen Angiotensin II Infusion erfolgte 24 Stunden nach der ersten Messung und führte zu einem durchschnittlichen Anstieg des arteriellen Blutdruckes um ca. 30 mmHg. Die Co-Behandlung mit AICAR führte zu keiner Änderung des Blutdruckes.
- Abbildung 37 Serum-Nitrit in isoliertem Serum in Mäusen in nM. Mittelwerte \pm SEM ($n = 6$). Die Angiotensin II-Behandlung führte zu einem signifikanten Anstieg des Plasma Nitrits, das durch die Co-Behandlung mit AICAR nur tendenziell reduziert werden konnte. Für Signifikanzangaben siehe Tabelle 7. * $\approx p < 0,05$ vs. CTR; ** $\approx p < 0,05$ vs. AT II.
- Abbildung 38 NO-Bioverfügbarkeit in Aortengewebe von Mäusen, gemessen mit Elektronenspin-Resonanz-Spektroskopie, Darstellung der Mittelwerte \pm SEM ($n = 3$). Durch die Behandlung mit AICAR wurde der NO-Gehalt im Gewebe im Vergleich zum Kontrolltier tendenziell gesenkt. Die Angiotensin II-Behandlung führte zu einem Anstieg der NO-Bioverfügbarkeit und wurde durch gleichzeitige Behandlung mit AICAR wieder reduziert. Für Signifikanzangaben siehe Tabelle 8.
- Abbildung 39 Nitrotyrosin-Markierung von Proteinen aus Herzhomogenaten aus Mäusen mittels Dot Blot-Technik und Nitrotyrosin-spezifischem Antikörper, Mittelwerte \pm SEM ($n = 18$). Die Protein-Nitrierung wurde durch die AICAR-Behandlung signifikant gesenkt, durch Angiotensin II signifikant erhöht. Die Behandlung mit Angiotensin II plus AICAR reduzierte die Protein-Nitrierung wieder signifikant. Für Signifikanzangaben siehe Tabelle 9. * $\approx p < 0,05$ vs. CTR; ** $\approx p < 0,05$ vs. AT II.
- Abbildung 40 Detektion von Superoxid im intakten Aortengewebe von Mäusen, Inkubation der Aortensegmente mit Dihydroethidin, das durch Superoxidradikale zu Ethidium oxi-

diert wird (rote Fluoreszenz des Ethidiums, grüne Eigenfluoreszenz der Lamina) 400fache Vergrößerung; repräsentative Ergebnisse aus $n = 6$ Experimenten. a) die Aortensegmente wurden in Kontroll-Puffer inkubiert; b) Inkubation der Aortensegmente mit L-NAME, einem NOS-Inhibitor. Beschreibung der Ergebnisse im Text.

Abbildung 41 Aktivität von NADPH-Oxidase in Herzmembranfraktionen, bezogen auf Protein, Mittelwerte \pm SEM ($n = 16$). Die Behandlung mit AICAR senkte die NADPH-Oxidase Aktivität signifikant, während die Angiotensin II-Behandlung zu einer signifikanten Steigerung der NADPH-Oxidase Aktivität führte. Die gleichzeitige Behandlung mit AICAR konnte die durch Angiotensin II induzierte NADPH-Oxidase Aktivitätssteigerung fast auf Normalniveau reduzieren. Für Signifikanzangaben siehe Tabelle 10. * $\approx p < 0,05$ vs. CTR; ** $\approx p < 0,05$ vs. AT II.

Abbildung 42 Superoxidbildungsrate durch Xanthinoxidase in Maus-Serum, Mittelwerte \pm SEM ($n = 12$). Die Xanthinoxidase Aktivität wurde durch AICAR signifikant gesenkt, allerdings konnte durch die Behandlung mit Angiotensin II keine Veränderung der Aktivität festgestellt werden. Für Signifikanzangaben siehe Tabelle 11. * $\approx p < 0,05$ vs. CTR; ** $\approx p < 0,05$ vs. AT II.

Abbildung 43 Superoxid-Produktion durch isolierte Herzmitochondrien, Mittelwerte \pm SEM ($n = 12$). Die Behandlung mit AICAR führte zur signifikanten Senkung der mitochondrialen ROS Produktion, Angiotensin II führte zu einer signifikanten Steigerung der ROS Produktion, wobei die Co-Behandlung mit AICAR zur erneuten signifikanten Reduktion führte. Für Signifikanzangaben siehe Tabelle 12. * $\approx p < 0,05$ vs. CTR; ** $\approx p < 0,05$ vs. AT II.

Abbildung 44 mRNA-Expression der NADPH-Oxidase-Untereinheiten NOX-1, p22phox und NOX-2 ($n = 5$) in Maus-Aorta, Mittelwerte als % der CTR \pm SEM, wobei CTR = 100%. Die mRNA-Expressionen von NOX-1, p22phox und NOX-2 steigen durch die Angiotensin II-Behandlung signifikant an, doch nur die NOX-2 Expression kann durch AICAR tendenziell wieder gesenkt werden. Für Signifikanzangaben siehe Tabelle 13. * $\approx p < 0,05$ vs. CTR; ** $\approx p < 0,05$ vs. AT II.

Abbildung 45 mRNA-Expression der Inflammationsmarker VCAM-1, iNOS und COX-2 in Maus-Aorta, Werte als % der CTR ($n = 5 - 6$), wobei CTR = 100%. Die mRNA-Expressionen von COX-2, iNOS und VCAM-1 werden durch Angiotensin II alle signifikant gesteigert und die Co-Behandlung mit AICAR ist in der Lage diese Steigerung wieder signifikant zu senken. Für Signifikanzangaben siehe Tabelle 14. * \approx

$p < 0,05$ vs. CTR; $** \approx p < 0,05$ vs. AT II.

- Abbildung 46 Western Blots von Proteinen aus PAECs (pulmonary artery endothelial cells), die mit AICAR oder Metformin vorbehandelt und anschließend oxidativem Stress mittels H_2O_2 ausgesetzt wurden. Die Expression von Akt- und p38MAPK und die Protein-Phosphorylierungen zeigten, dass diese Signalwege nicht von AICAR oder Metformin beeinflusst wurden. Die Aktivierung des JNK-Signalweges durch Phosphorylierung konnte jedoch durch die AICAR und Metformin-Behandlung deutlich reduziert werden (verändert nach Schulz et al.194).
- Abbildung 47 Western Blots sowie Zellviabilitätsassay und LDH-Freisetzungssassay von PAECs. PAECs wurden 24 Stunden mit AICAR (1mM) oder Metformin (5mM) behandelt, bevor sie $TNF-\alpha$ ausgesetzt wurden. Oben: Western Blot Analysen der behandelten Zellen; links unten: LDH-Freisetzung: HUVECs (human umbilical vein endothelial cells)- wurden mit AICAR oder Metformin vorbehandelt, wie oben, bzw. mit Kontroll- (Lac Z) bzw. PGC-1 α Adenoviren transfiziert waren; rechts unten: Zellviabilität mittels MTS-Assay von Promega (verändert nach Schulz et al.194).
- Abbildung 48 Western Blots und oxidativer Stress von PAECs. Inkubation von PAECs mit 1 μ M MitoQ vor der Zugabe von H_2O_2 . Das mitochondriale Antioxidanz, MitoQ reduzierte die Phosphorylierung von c-Jun und den induzierten oxidativen Stress nahezu auf Kontrollniveau (rechts) (verändert nach Schulz et al.194). $* \approx p < 0,05$ vs. CTR
- Abbildung 49 Western Blots von Proteinen aus Maus Aorta. c-Jun-Phosphorylierung an Serin 63 sowie c-Jun Expression und densitometrischer Auswertung, Mittelwerte als % der CTR \pm SEM wobei CTR = 100% (n = 6). Die Expression von c-Jun ist innerhalb der Tiergruppen nicht signifikant verschieden. Allerdings steigt der Phosphorylierungsgrad von c-Jun durch die Angiotensin II-Behandlung signifikant an, was durch gleichzeitige Behandlung mit AICAR verhindert werden konnte. Für Signifikanzangaben siehe Tabelle 15. $* \approx p < 0,05$ vs. CTR; $** \approx p < 0,05$ vs. AT II.
- Abbildung 50 Überprüfung der Expression der AMPK-Isoformen in Endothelzellen (HUVEC) (verändert nach200). Die vorherrschende Isoform in Endothelzellen ist die $\alpha 1$ AMPK-Isoform.
- Abbildung 51 Darstellung des Western Blots: AMPK-Phosphorylierung an Threonin 172 und ACC-Phosphorylierung an Serin 79; Expression der α AMPK (Antikörper detektiert sowohl die $\alpha 1$ - als auch die $\alpha 2$ -AMPK Isoform) und der $\alpha 1$ AMPK.

- Abbildung 52 Densitometrische Auswertung der ACC- und AMPK-Phosphorylierung sowie der Expression der Untereinheiten α AMPK und α 1AMPK. Dargestellt sind Mittelwerte als % des WT \pm SEM, wobei WT = 100% (n = 6). Der Phosphorylierungsgrad von ACC und AMPK wird durch die Angiotensin II-Behandlung signifikant gesteigert, was im α 1AMPK defizienten Tier nicht festgestellt wurde. Die Gesamtexpression der α AMPK ist im α 1AMPK defizienten Tier stark reduziert. Für Signifikanzangaben siehe Tabelle 17. * \approx p < 0,05 vs. WT; ** \approx p < 0,05 vs. AMPK-/-.
- Abbildung 53 Endothelabhängige Relaxation von präparierten Aortensegmenten (4 mm) in Organbadanlagen (Mittelwerte \pm SEM, n = 12), prozentuale Relaxation auf Acetylcholingabe. Die α 1AMPK-defizienten Tiere zeigten keine Veränderung in der Relaxationsfähigkeit auf Acetylcholingabe. Die Behandlung mit Angiotensin II resultierte im Wildtyp in einer signifikanten Reduktion der Relaxationsfähigkeit, was bei α 1AMPK-defizienten signifikant verstärkt war. Für Signifikanzangaben siehe Tabelle 18. * \approx p < 0,05 vs. WT; ** \approx p < 0,05 vs. AMPK-/-.
- Abbildung 54 Endothelunabhängige Relaxation von präparierten Aortensegmenten (4 mm) in Organbadanlagen (Mittelwerte \pm SEM, n = 12), prozentuale Relaxation auf Nitroglyzeringabe. Die endothelunabhängige Relaxation wurde nur im Angiotensin II-behandelten α 1AMPK defizienten Tier signifikant reduziert. Für Signifikanzangaben siehe Tabelle 19. * \approx p < 0,05 vs. WT; ** \approx p < 0,05 vs. AMPK-/-.
- Abbildung 55 Endothelunabhängige Relaxation von präparierten Aortensegmenten (4 mm) in Organbadanlagen (Mittelwerte \pm SEM, n = 12), prozentuale Relaxation auf DeaNO-NOatgabe. Die Relaxationsfähigkeit auf DeaNONOatgabe war durch die Behandlung mit Angiotensin II im Wildtyp signifikant reduziert. Auch die α 1AMPK-Defizienz wirkte sich signifikant negativ auf die Relaxationsfähigkeit auf DeaNO-NOatgabe aus, die durch die zusätzliche Behandlung mit Angiotensin II weiter reduziert wurde. Für Signifikanzangaben siehe Tabelle 20.
- Abbildung 56 Serum-Nitrit in isoliertem Serum von Mäusen in nM, Mittelwerte \pm SEM (n = 6). Die Angiotensin II-Behandlung des Wildtyps zeigte eine nur tendenzielle Erhöhung der Plasma Nitritmenge. Die α 1AMPK-Defizienz resultierte in einer signifikanten Erhöhung der Nitritmenge, die weiter signifikant erhöht wurde durch zusätzliche Angiotensin II-Behandlung. Für Signifikanzangaben siehe Tabelle 21. * \approx p < 0,05 vs. WT; ** \approx p < 0,05 vs. AMPK-/-.

- Abbildung 57 NO-Bioverfügbarkeit in Aortengewebe (n = 11 - 13) gemessen mit Elektronen-Spin-Resonanz-Spektroskopie, links repräsentative Spektren, rechts Darstellung der Mittelwerte \pm SEM. Die α 1AMPK-Defizienz führte zu einem signifikanten Anstieg der NO-Bioverfügbarkeit, die tendenziell verstärkt wurde durch die zusätzliche Angiotensin II-Behandlung. Für Signifikanzangaben siehe Tabelle 22. * \approx p < 0,05 vs. WT; ** \approx p < 0,05 vs. AMPK-/-.
- Abbildung 58 Nitrotyrosin-Markierung von Protein aus Herzhomogenaten von Mäusen mittels Dot Blot-Technik und Nitrotyrosin-spezifischem Antikörper, Mittelwerte \pm SEM (n = 18). Die Protein-Nitrierung nahm durch die α 1AMPK-Defizienz signifikant zu und wurde durch zusätzliche Angiotensin II Behandlung weiter signifikant gesteigert. Für Signifikanzangaben siehe Tabelle 23. * \approx p < 0,05 vs. WT; ** \approx p < 0,05 vs. AMPK-/-.
- Abbildung 59 Superoxid-Detektion im intakten Aortengewebe, Inkubation der Aortensegmente mit Dihydroethidin, das durch Superoxidradikale zu Ethidium oxidiert wird, rote Fluoreszenz des Ethidiums, grüne Eigenfluoreszenz der Lamina; 400fache Vergrößerung; Darstellung repräsentativer Ergebnisse aus n = 6 Experimenten. a) die Aortensegmente wurden in Kontroll-Puffer inkubiert; b) Inkubation der Aortensegmente mit L-NAME, einem NOS-Inhibitor. Für Details siehe Text.
- Abbildung 60 Aktivität von NADPH-Oxidase in Herzmembranfraktionen, bezogen auf Protein, Mittelwerte \pm SEM (n = 16). Durch die Angiotensin II-Behandlung stieg die NADPH-Oxidase Aktivität im Wildtyp signifikant an. Auch die α 1AMPK-Defizienz führte zum signifikanten Anstieg der NADPH-Oxidase Aktivität, die durch die Angiotensin II-Behandlung weiter signifikant gesteigert wurde. Für Signifikanzangaben siehe Tabelle 24. * \approx p < 0,05 vs. WT; ** \approx p < 0,05 vs. AMPK-/-.
- Abbildung 61 Superoxidbildungsrate durch Xanthinoxidase in Maus Serum, Mittelwerte \pm SEM (n = 12). Die Xanthinoxidase Aktivität zeigte einen nur tendenziellen Anstieg durch die Angiotensin II-Behandlung des Wildtyps und auch die α 1AMPK-Defizienz führt nur tendenziell zur Xanthinoxidase Aktivitätserhöhung. Die Behandlung mit Angiotensin II bei α 1AMPK defizienten Tieren führte allerdings zu einem signifikanten Anstieg der Xanthinoxidase Aktivität. Für Signifikanzangaben siehe Tabelle 25. * \approx p < 0,05 vs. WT; ** \approx p < 0,05 vs. AMPK-/-.
- Abbildung 62 Superoxid Produktion durch isolierte Herzmitochondrien, Mittelwerte \pm SEM (n = 10). Sowohl die Angiotensin II-Behandlung im Wildtyp als auch die α 1AMPK-

Defizienz führten zu einem signifikanten Anstieg der mitochondrialen ROS im Vergleich zum unbehandelten Wildtyp. Die Angiotensin II-Behandlung im α 1AMPK defizienten Tier führte zur weiteren signifikanten Steigerung der mitochondrialen ROS. Für Signifikanzangaben siehe Tabelle 26. * $\approx p < 0,05$ vs. WT; ** $\approx p < 0,05$ vs. AMPK^{-/-}.

Abbildung 63 Chemilumineszenz von intakten Aortensegmenten mit Luzigenin, L-012 und Luminol/HRP, Mittelwerte \pm SEM (n = 4 - 6). Die durch Luzigenin vermittelte Chemilumineszenz (spezifische Detektion von O₂•⁻ Radikalen) zeigte nur im Angiotensin II-behandelten Wildtyp einen Anstieg des ROS-Signals. Die L-012 vermittelte Chemilumineszenz (Detektion von O₂•⁻, Peroxynitrit und H₂O₂) zeigte einen Anstieg des Signals in Tieren, mit α 1AMPK-Defizienz und einen weiteren Anstieg in α 1AMPK-defizienten Tieren, die mit Angiotensin II behandelt worden waren. Der Ansatz mit Luminol plus HRP (Detektion von extrazellulärem Wasserstoffperoxid und Peroxynitrit) zeigte einen signifikanten Anstieg des Signals in Aorten von α 1AMPK-defizienten Tieren, die mit Angiotensin II behandelt worden waren, aber auch Angiotensin II-behandelte Wildtypen zeigten ein verstärktes ROS-Signal. Für Signifikanzangaben siehe Tabelle 27. * $\approx p < 0,05$ vs. WT; ** $\approx p < 0,05$ vs. AMPK^{-/-}.

Abbildung 64 mRNA-Expression der NADPH-Oxidase-Untereinheiten NOX-1, p22phox und NOX-2 in Maus Aorta, Mittelwerte als % des WT \pm SEM (n = 6), wobei WT = 100%. Die Expression von NOX-1 mRNA zeigte nach Angiotensin II-Behandlung des Wildtyps einen signifikanten Anstieg, der auch im α 1AMPK-defizienten Tier beobachtet wurde. Die zusätzliche Behandlung des α 1AMPK-defizienten Tiers mit Angiotensin II führte zu einem weiteren Anstieg. Bei der p22phox-Expression führte nur die Angiotensin II-Behandlung des α 1AMPK-defizienten Tiers zu einem signifikanten Anstieg. Die NOX-2 Expression zeigte die deutlichste Expressionssteigerung im α 1AMPK-defizienten Tier, das mit Angiotensin II behandelt wurde. Für Signifikanzangaben siehe Tabelle 28. * $\approx p < 0,05$ vs. WT; ** $\approx p < 0,05$ vs. AMPK^{-/-}.

Abbildung 65 mRNA-Expression der Inflammationsmarker VCAM-1, iNOS und COX-2, Mittelwerte als % des WT \pm SEM (n = 5 - 6), wobei WT = 100%. Alle Inflammationsmarker zeigten eine starke Expressionssteigerung ihrer mRNA in α 1AMPK-defizienten Tieren, die mit Angiotensin II behandelt worden waren. Für Signifi-

kanzangaben siehe Tabelle 29. * $\approx p < 0,05$ vs. WT; ** $\approx p < 0,05$ vs. AMPK-/.

- Abbildung 66 Immunhistochemie von in Paraformaldehyd (4%) fixierten Aortensegmenten. Gezeigt sind repräsentative Aufnahmen; blau eingefärbt wurden die Zellkerne durch Gegenfärbung mit Hämatoxylin, braun gefärbt sind spezifische Antikörperbindungen gegen CD68. Orientierung: Endothel nach links bzw. nach unten. Es wurde keine merkliche Änderung der Makrophageninfiltration innerhalb der vier untersuchten Tiergruppen sichtbar.
- Abbildung 67 Densitometrische Auswertung der Western Blots von Maus Aorten. eNOS-Phosphorylierung: Mittelwerte als % des WT \pm SEM, wobei WT = 100% (n = 6). Durch die Behandlung mit Angiotensin II reduzierte sich die eNOS-Phosphorylierung im Wildtyp signifikant. Die α 1AMPK-Defizienz resultierte in einer tendenziellen Reduktion der Phosphorylierung, die sich durch zusätzliche Angiotensin II-Behandlung verringerte. Für Signifikanzangaben siehe Tabelle 30. * $\approx p < 0,05$ vs. WT; ** $\approx p < 0,05$ vs. AMPK-/.
- Abbildung 68 Western Blots der NOX-2 Expression und densitometrische Auswertung, Mittelwerte als % des WT \pm SEM, wobei WT = 100% (n = 6). Es war nur bei α 1AMPK-defizienten Tieren, die mit Angiotensin II behandelt worden waren eine signifikante Expressionssteigerung von NOX-2 auf Proteinebene festzustellen. Für Signifikanzangaben siehe Tabelle 31. * $\approx p < 0,05$ vs. WT; ** $\approx p < 0,05$ vs. AMPK-/.
- Abbildung 69 Immunhistochemie von in Paraformaldehyd (4%) fixierten Aortensegmenten; gezeigt sind repräsentative Aufnahmen; blau eingefärbt wurden die Zellkerne durch Gegenfärbung mit Hämatoxylin, braun gefärbt sind spezifische Antikörper gegen NOX-2; Orientierung: Endothel links. Vor allem im Angiotensin II-behandelten α 1AMPK-defizienten Tier war die Färbung von NOX-2 im Endothel und in der Adventitia verstärkt.
- Abbildung 70 Immunhistochemie der in Paraformaldehyd (4%) fixierten Aortensegmente; gezeigt sind repräsentative Aufnahmen; blau eingefärbt wurden die Zellkerne durch die Gegenfärbung mit Hämatoxylin, braun gefärbt sind spezifische Antikörperbindungen an Nitrotyrosin; Orientierung: Endothel links. Eine Steigerung der Protein-Nitrierung konnte bereits im WildtypTier, das mit Angiotensin II behandelt wurde festgestellt werden. Eine weitere Steigerung im Endothel- und Adventitia-Bereich allerdings zeigte sich im α 1AMPK-defizienten Tier, das mit Angiotensin II behan-

delt wurde.

- Abbildung 71 DPP• antioxidative Kapazität von Maus Serum, photometrische Messung bei 517 nm; Mittelwerte als % des WT \pm SEM (n = 18 - 24), wobei WT = 100%. Die antioxidative Kapazität wurde bereits im Wildtyp durch die Angiotensin II-Behandlung gesenkt. Durch die zusätzliche α 1AMPK-Defizienz allerdings wurde die antioxidative Kapazität nochmals signifikant reduziert. Für Signifikanzangaben siehe Tabelle 32. * \approx p < 0,05 vs. WT; ** \approx p < 0,05 vs. AMPK-/-.
- Abbildung 72 Endothelabhängige Relaxation von präparierten Aortensegmenten (4 mm) in Organbadanlagen. Angegeben ist die prozentuale Relaxation nach Acetylcholingabe (Mittelwerte \pm SEM, n = 12). Die Relaxationsfähigkeit in LPS-behandelten Wildtyp-Tieren reduzierte sich signifikant im Vergleich zu unbehandelten Tieren. Durch die gleichzeitige Behandlung mit AICAR konnte die Reduktion fast aufgehoben werden, was bei α 1AMPK-defizienten Tieren nicht möglich war. Für Signifikanzangaben siehe Tabelle 33. * \approx p < 0,05 vs. WT; ** \approx p < 0,05 vs. WT + LPS / AICAR.
- Abbildung 73 Superoxid-Detektion im intakten Aortengewebe, Inkubation der Aortensegmente mit Dihydroethidin, das durch Superoxidradikale zu Ethidium oxidiert, rote Fluoreszenz des Ethidiums, grüne Eigenfluoreszenz der Lamina; 400fache Vergrößerung; Darstellung repräsentativer Ergebnisse aus n = 6 Experimenten. Für Details siehe Text.
- Abbildung 74 Endothelabhängige Relaxation von präparierten Aortensegmenten (4 mm) in Organbadanlagen (Mittelwerte \pm SEM, n = 12), prozentuale Relaxation auf Acetylcholingabe. Die PGC-1 α -Defizienz allein resultiert in einer Rechtsverschiebung der Relaxationskurve auf Acetylcholingabe im Vergleich zum Wildtyp. Durch die zusätzliche Angiotensin II-Behandlung wurde die verringerte Relaxation nochmals signifikant reduziert, was durch die Co-Behandlung mit AICAR nicht verhindert werden konnte. Für Signifikanzangaben siehe Tabelle 34. * \approx p < 0,05 vs. WT; ** \approx p < 0,05 vs. PGC-1 α -/-.
- Abbildung 75 Entkopplung der NO-Synthasen durch Oxidation des Tetrahydrobiopterins: in der intakten NO-Synthase (Homodimer, oben) fließen die Elektronen von NADPH über FAD zu FMN, welches die Elektronen jeweils an die Oxygenase Domäne (das Eisenporphyrin) des anderen gekoppelten Monomers weitergibt. Bei der entkoppelten NO-Synthase liegen im schlimmsten Fall Monomere vor bzw. wurde die Bindung

des Dimer-Komplexes durch eine Konformationsänderung verändert (z.B. durch Fehlen des Cofaktors BH4 bzw. Oxidation des Zink-Thiolat-Komplexes), wodurch es zu einer Entkopplung des Elektronenflusses kommt. Die Elektronen werden auf molekularen Sauerstoff übertragen, und es entsteht Superoxid. CAM, Calmodulin; Zn, Zink (verändert nach³).

- Abbildung 76 Postulierter Rosiglitazon-Signalweg: Aktivierung der AMPK, die ihrerseits die PKC inhibiert, wodurch die Aktivierung der NADPH-Oxidase unterbunden werden kann. Dieser Signalweg ist unabhängig von der PPAR γ Aktivierung (verändert nach²⁴⁴).
- Abbildung 77 Erythrozyten, Hämoglobin und Hämatokritwerte sind in α 1AMPK-defizienten Tieren signifikant reduziert, während die Milz vergrößert ist. Föller et al. 2008.
- Abbildung 78 Schematische Zusammenfassung der AMPK-Wirkungen im vaskulären System (verändert nach³⁴⁸).

7. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Zusammensetzung der unterschiedlichen Acrylamid-Gele.
Tabelle 2	Sequenzspezifische „TaqMan® Gene Expression Assays“ der Firma Applied Biosystems.
Tabelle 3	Untersuchte Tiergruppen zur Analyse von Effekten der Aktivierung der AMPK mittels AICAR.
Tabelle 4	Densitometrische Auswertung der ACC- bzw. AMPK-Phosphorylierung; Mittelwerte in % der CTR \pm SEM; CTR = 100% und Signifikanzangaben ($p < 0,05$ nach Bonferroni-Test).
Tabelle 5	Relaxation durch Acetylcholin; Darstellung der pD_2 -Werte ($= -\log(EC_{50})$) und Signifikanzwerte ($p < 0,05$ nach Bonferroni-Test).
Tabelle 6	Nitroglycerin-Konzentration; Darstellung der pD_2 -Werte und Signifikanzwerte ($p < 0,05$ nach Bonferroni-Test).
Tabelle 7	Serum Nitrit Messung; Mittelwerte \pm SEM in nM, aus $n = 6$ Messungen und Signifikanzangaben ($p < 0,05$ nach Bonferroni-Test).
Tabelle 8	NO-Bioverfügbarkeit (Mittelwerte \pm SEM ($n = 3$) und Signifikanzangaben ($p < 0,05$ nach Bonferroni-Test).
Tabelle 9	Nitrotyrosin-Markierung von Proteinen aus Herzhomogenaten aus Mäusen; Mittelwerte \pm SEM und Signifikanzangaben ($p < 0,05$ nach Bonferroni-Test).
Tabelle 10	Aktivität von NADPH-Oxidase in Herzmembranfraktionen; Mittelwerte \pm SEM ($n = 16$) und Signifikanzangaben ($p < 0,05$ nach Bonferroni-Test).
Tabelle 11	Superoxidbildungsrate durch Xanthinoxidase; Mittelwerte \pm SEM ($n = 12$) und Signifikanzangaben ($p < 0,05$ nach Bonferroni-Test).
Tabelle 12	Superoxid-Produktion durch isolierte Herzmitochondrien, Mittelwerte \pm SEM ($n = 12$).und Signifikanzangaben ($p < 0,05$ nach Bonferroni-Test).
Tabelle 13	mRNA-Expression der NADPH Untereinheiten NOX-1, $p22^{phox}$ und NOX-2 ($n = 5$), Mittelwerte in % bezogen auf die Kontrollgruppe (CTR \equiv 100%) und Signifikanzangaben ($p < 0,05$ nach Bonferroni-Test).
Tabelle 14	mRNA-Expression der Inflammationsmarker COX-2, iNOS und VCAM-1 in Maus-Aorta; Mittelwerte in % bezogen auf die Kontrollgruppe (CTR = 100%) und Signifikanzangaben ($p < 0,05$ nach Bonferroni-Test).
Tabelle 15	Densitometrische Auswertung der c-Jun-Phosphorylierung und c-Jun Expression; Darstellung der Mittelwerte in % der CTR \pm SEM; CTR \equiv 100% ($n = 6$) und Signifikanzangaben ($p < 0,05$ nach Bonferroni-Test).
Tabelle 16	Versuchstiergruppen zur Analyse der AMPK-Defizienz durch knockout der $\alpha 1$ -Untereinheit.
Tabelle 17	Densitometrische Auswertung der ACC- bzw. AMPK-Phosphorylierung sowie der α AMPK- und $\alpha 1$ AMPK-Expression ; Darstellung der Mittelwerte in % des WT; WT \equiv 100% ($n = 6$) und Signifikanzangaben ($p < 0,05$ nach Bonferroni-Test).
Tabelle 18	Acetylcholin-Relaxation; pD_2 -Werte und Signifikanzangaben ($p < 0,05$ nach Bonferroni-Test), siehe Abbildung 53.

Tabelle 19	Nitroglyzerin-Relaxation; pD ₂ -Werte und Signifikanzangaben (p<0,05 nach Bonferroni-Test).
Tabelle 20	DeaNONOat-Relaxation; Darstellung der pD ₂ -Konzentrationen und Signifikanzangaben (p<0,05 nach Bonferroni-Test).
Tabelle 21	Serum-Nitrit Messung; Mittelwerte ± SEM (n = 6) in nM, aus n = 6 Messungen und Signifikanzangaben (p<0,05 nach Bonferroni-Test).
Tabelle 22	NO-Bioverfügbarkeit; Mittelwerte ± SEM (n = 11 - 13) und Signifikanzangaben (p<0,05 nach Bonferroni-Test).
Tabelle 23	Protein-Nitrierung; Darstellung der Mittelwerte ± SEM (n = 18) und Signifikanzangaben (p<0,05 nach Bonferroni-Test).
Tabelle 24	NADPH-Oxidase Aktivität in Herzmembranfraktionen; Mittelwerte ± SEM (n = 16) und Signifikanzangaben (p<0,05 nach Bonferroni-Test).
Tabelle 25	Superoxidbildungsrate durch Xanthinoxidase; Mittelwerte ± SEM (n = 12) und Signifikanzangaben (p<0,05 nach Bonferroni-Test).
Tabelle 26	Superoxid Produktion durch isolierte Herzmitochondrien; Mittelwerte ± SEM (n = 10) und Signifikanzangaben (p<0,05 nach Bonferroni-Test).
Tabelle 27	Chemilumineszenz von intakten Aortensegmenten; Mittelwerte ± SEM (n = 4 - 6) und Signifikanzangaben (p<0,05 nach Bonferroni-Test).
Tabelle 28	mRNA-Expression der NADPH-Oxidase-Untereinheiten NOX-1, p22 ^{phox} und NOX-2, Mittelwerte ± SEM in % bezogen auf die Kontrollgruppe (WT ≡ 100%) (n = 6) und Signifikanzangaben (p<0,05 nach Bonferroni-Test).
Tabelle 29	mRNA-Expression der Inflammationsmarker COX-2, iNOS und VCAM-1; Darstellung der prozentualen Mittelwerte ± SEM (n = 5 - 6) (WT ≡ 100%) und Signifikanzangaben (p<0,05 nach Bonferroni-Test).
Tabelle 30	Densitometrische Auswertung der Western Blots von Maus Aorten. eNOS-Phosphorylierung; Mittelwerte in % des WT ± SEM (n = 6); WT = 100% und Signifikanzangaben (p<0,05 nach Bonferroni-Test).
Tabelle 31	Densitometrische Auswertung der NOX-2 Expression ; Mittelwerte in % des WT ± SEM (n = 6); WT ≡ 100% und Signifikanzangaben (p<0,05) nach Bonferroni-Test.
Tabelle 32	DPP• antioxidative Kapazität von Maus Serum; Mittelwerte als % des WT ± SEM (n = 18 - 24) (WT = 100 %) und Signifikanzangaben (p<0,05 nach Bonferroni-Test).
Tabelle 33	Relaxation durch Acetylcholin; Darstellung der pD ₂ -Werte und Signifikanzangaben (p<0,05 nach Bonferroni-Test).
Tabelle 34	Relaxation durch Acetylcholin; Darstellung der pD ₂ -Werte und Signifikanzangaben (p<0,05 nach Bonferroni-Test).

8. Literaturverzeichnis

1. Aktories KF, Ulrich; Hofmann, Franz; Starke, Klaus. *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. Vol 9. München: Elsevier GmbH München; 2005.
2. Renz-Polster HK, S.; Braun, J. *Basislehrbuch Innere Medizin*. Vol 3. München: Urban und Fischer; 2006.
3. Daiber AM, Thomas. *Pentaerythryltetranitrat - Oxidativer Stress, Redoxregulation und NO-Bioverfügbarkeit - experimentelle und klinische Aspekte*. Vol 1. Darmstadt: Steinkopff Verlag Darmstadt; 2006.
4. Nagata D, Takeda R, Sata M, Satonaka H, Suzuki E, Nagano T, Hirata Y. AMP-activated protein kinase inhibits angiotensin II-stimulated vascular smooth muscle cell proliferation. *Circulation*. 2004;110(4):444-451.
5. Griendling KK, Berk BC, Socorro L, Tsuda T, Delafontaine P, Alexander RW. Secondary signalling mechanisms in angiotensin II-stimulated vascular smooth muscle cells. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 1988;15(2):105-112.
6. Griendling KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD, Alexander RW. Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res*. 1994;74(6):1141-1148.
7. Drexler H. *Endothelfunktion bei kariovaskulären Krankheiten*. Vol 1. Bremen: UNI-MED Verlag AG; 2000.
8. Ignarro LJ, Byrns RE, Wood KS. Endothelium-dependent modulation of cGMP levels and intrinsic smooth muscle tone in isolated bovine intrapulmonary artery and vein. *Circ Res*. 1987;60(1):82-92.
9. Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987;84(24):9265-9269.
10. Turko IV, Murad F. Protein nitration in cardiovascular diseases. *Pharmacol Rev*. 2002;54(4):619-634.
11. Prabhakar P, Thatte HS, Goetz RM, Cho MR, Golan DE, Michel T. Receptor-regulated translocation of endothelial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem*. 1998;273(42):27383-27388.
12. Pueyo ME, Gonzalez W, Nicoletti A, Savoie F, Arnal JF, Michel JB. Angiotensin II stimulates endothelial vascular cell adhesion molecule-1 via nuclear factor-kappaB activation induced by intracellular oxidative stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000;20(3):645-651.
13. Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, Zeiher AM. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature*. 1999;399(6736):601-605.
14. Fisslthaler B, Fleming I, Keseru B, Walsh K, Busse R. Fluid shear stress and NO decrease the activity of the hydroxy-methylglutaryl coenzyme A reductase in endothelial cells via the AMP-activated protein kinase and FoxO1. *Circ Res*. 2007;100(2):e12-21.
15. Traub O, Berk BC. Laminar shear stress: mechanisms by which endothelial cells transduce an atheroprotective force. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1998;18(5):677-685.
16. Wilcox JN, Subramanian RR, Sundell CL, Tracey WR, Pollock JS, Harrison DG, Marsden PA. Expression of multiple isoforms of nitric oxide synthase in normal and atherosclerotic vessels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997;17(11):2479-2488.

17. Alp NJ, Channon KM. Regulation of endothelial nitric oxide synthase by tetrahydrobiopterin in vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24(3):413-420.
18. Daiber A, Bachschmid M, Beckman JS, Munzel T, Ullrich V. The impact of metal catalysis on protein tyrosine nitration by peroxynitrite. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;317(3):873-881.
19. Daiber A, Ullrich V. Peroxynitrite reactions with heme and heme-thiolate (P450) proteins. *Methods Enzymol.* 2002;359:379-389.
20. Ischiropoulos H. Biological tyrosine nitration: a pathophysiological function of nitric oxide and reactive oxygen species. *Arch Biochem Biophys.* 1998;356(1):1-11.
21. Zou M, Martin C, Ullrich V. Tyrosine nitration as a mechanism of selective inactivation of prostacyclin synthase by peroxynitrite. *Biol Chem.* 1997;378(7):707-713.
22. Zou M, Yesilkaya A, Ullrich V. Peroxynitrite inactivates prostacyclin synthase by heme-thiolate-catalyzed tyrosine nitration. *Drug Metab Rev.* 1999;31(2):343-349.
23. Munzel T, Daiber A, Ullrich V, Mulsch A. Vascular consequences of endothelial nitric oxide synthase uncoupling for the activity and expression of the soluble guanylyl cyclase and the cGMP-dependent protein kinase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25(8):1551-1557.
24. http://de.wikipedia.org/wiki/Oxidativer_Stress. Oxidativer Stress. Stand: 05.06.2009.
25. Greenacre SA, Ischiropoulos H. Tyrosine nitration: localisation, quantification, consequences for protein function and signal transduction. *Free Radic Res.* 2001;34(6):541-581.
26. Ischiropoulos H. Living and dying with reactive species. Focus on "peroxynitrite induces apoptosis of HL-60 cells by activation of a caspase-3 family protease". *Am J Physiol.* 1998;274(4 Pt 1):C853-854.
27. Ischiropoulos H. Reactive species and signal transduction. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2001;280(4):L583-584.
28. Ischiropoulos H. Biological selectivity and functional aspects of protein tyrosine nitration. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;305(3):776-783.
29. Ischiropoulos H, Beckman JS. Oxidative stress and nitration in neurodegeneration: cause, effect, or association? *J Clin Invest.* 2003;111(2):163-169.
30. Cave AC, Brewer AC, Narayanapanicker A, Ray R, Grieve DJ, Walker S, Shah AM. NADPH oxidases in cardiovascular health and disease. *Antioxid Redox Signal.* 2006;8(5-6):691-728.
31. Lambeth JD. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat Rev Immunol.* 2004;4(3):181-189.
32. Mahadev K, Motoshima H, Wu X, Ruddy JM, Arnold RS, Cheng G, Lambeth JD, Goldstein BJ. The NAD(P)H oxidase homolog Nox4 modulates insulin-stimulated generation of H₂O₂ and plays an integral role in insulin signal transduction. *Mol Cell Biol.* 2004;24(5):1844-1854.
33. Ushio-Fukai M. VEGF signaling through NADPH oxidase-derived ROS. *Antioxid Redox Signal.* 2007;9(6):731-739.
34. Griending KK. NADPH oxidases: new regulators of old functions. *Antioxid Redox Signal.* 2006;8(9-10):1443-1445.
35. Landmesser U, Dikalov S, Price SR, McCann L, Fukai T, Holland SM, Mitch WE, Harrison DG. Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension. *J Clin Invest.* 2003;111(8):1201-1209.
36. Antoniadou C, Shirodaria C, Warrick N, Cai S, de Bono J, Lee J, Leeson P, Neubauer S, Ratnatunga C, Pillai R, Refsum H, Channon KM. 5-methyltetrahydrofolate rapidly improves endothelial function and decreases superoxide production in human vessels:

- effects on vascular tetrahydrobiopterin availability and endothelial nitric oxide synthase coupling. *Circulation*. 2006;114(11):1193-1201.
37. McNally JS, Davis ME, Giddens DP, Saha A, Hwang J, Dikalov S, Jo H, Harrison DG. Role of xanthine oxidoreductase and NAD(P)H oxidase in endothelial superoxide production in response to oscillatory shear stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003;285(6):H2290-2297.
 38. Dworakowski R, Alom-Ruiz SP, Shah AM. NADPH oxidase-derived reactive oxygen species in the regulation of endothelial phenotype. *Pharmacol Rep*. 2008;60(1):21-28.
 39. Griendling KK, Sorescu D, Lassegue B, Ushio-Fukai M. Modulation of protein kinase activity and gene expression by reactive oxygen species and their role in vascular physiology and pathophysiology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000;20(10):2175-2183.
 40. Bayraktutan U, Blayney L, Shah AM. Molecular characterization and localization of the NAD(P)H oxidase components gp91-phox and p22-phox in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000;20(8):1903-1911.
 41. Pagano PJ, Chanock SJ, Siwik DA, Colucci WS, Clark JK. Angiotensin II induces p67phox mRNA expression and NADPH oxidase superoxide generation in rabbit aortic adventitial fibroblasts. *Hypertension*. 1998;32(2):331-337.
 42. Bendall JK, Cave AC, Heymes C, Gall N, Shah AM. Pivotal role of a gp91(phox)-containing NADPH oxidase in angiotensin II-induced cardiac hypertrophy in mice. *Circulation*. 2002;105(3):293-296.
 43. Ago T, Kitazono T, Ooboshi H, Iyama T, Han YH, Takada J, Wakisaka M, Ibayashi S, Utsumi H, Iida M. Nox4 as the major catalytic component of an endothelial NAD(P)H oxidase. *Circulation*. 2004;109(2):227-233.
 44. BelAiba RS, Djordjevic T, Petry A, Diemer K, Bonello S, Banfi B, Hess J, Pogrebniak A, Bickel C, Gorlach A. NOX5 variants are functionally active in endothelial cells. *Free Radic Biol Med*. 2007;42(4):446-459.
 45. Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res*. 2000;86(5):494-501.
 46. Li JM, Shah AM. Intracellular localization and preassembly of the NADPH oxidase complex in cultured endothelial cells. *J Biol Chem*. 2002;277(22):19952-19960.
 47. Lassegue B, Sorescu D, Szocs K, Yin Q, Akers M, Zhang Y, Grant SL, Lambeth JD, Griendling KK. Novel gp91(phox) homologues in vascular smooth muscle cells : nox1 mediates angiotensin II-induced superoxide formation and redox-sensitive signaling pathways. *Circ Res*. 2001;88(9):888-894.
 48. Wolin MS. Subcellular localization of Nox-containing oxidases provides unique insight into their role in vascular oxidant signaling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24(4):625-627.
 49. Gutierrez J, Ballinger SW, Darley-Usmar VM, Landar A. Free radicals, mitochondria, and oxidized lipids: the emerging role in signal transduction in vascular cells. *Circ Res*. 2006;99(9):924-932.
 50. Zeviani M. Mitochondrial disorders. *Suppl Clin Neurophysiol*. 2004;57:304-312.
 51. Brand MD, Affourtit C, Esteves TC, Green K, Lambert AJ, Miwa S, Pakay JL, Parker N. Mitochondrial superoxide: production, biological effects, and activation of uncoupling proteins. *Free Radic Biol Med*. 2004;37(6):755-767.
 52. Brand MD, Buckingham JA, Esteves TC, Green K, Lambert AJ, Miwa S, Murphy MP, Pakay JL, Talbot DA, Echtay KS. Mitochondrial superoxide and aging: uncoupling-protein activity and superoxide production. *Biochem Soc Symp*. 2004(71):203-213.

53. Adam-Vizi V. Production of reactive oxygen species in brain mitochondria: contribution by electron transport chain and non-electron transport chain sources. *Antioxid Redox Signal.* 2005;7(9-10):1140-1149.
54. Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol.* 2003;552(Pt 2):335-344.
55. Wenzel P, Mollnau H, Oelze M, Schulz E, Wickramanayake JM, Muller J, Schuhmacher S, Hortmann M, Baldus S, Gori T, Brandes RP, Munzel T, Daiber A. First evidence for a crosstalk between mitochondrial and NADPH oxidase-derived reactive oxygen species in nitroglycerin-triggered vascular dysfunction. *Antioxid Redox Signal.* 2008;10(8):1435-1447.
56. Nishikawa T, Edelstein D, Du XL, Yamagishi S, Matsumura T, Kaneda Y, Yorek MA, Beebe D, Oates PJ, Hammes HP, Giardino I, Brownlee M. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature.* 2000;404(6779):787-790.
57. Della Corte E, Gozzetti G, Novello F, Stirpe F. Properties of the xanthine oxidase from human liver. *Biochim Biophys Acta.* 1969;191(1):164-166.
58. Stirpe F, Della Corte E. The regulation of rat liver xanthine oxidase. Conversion in vitro of the enzyme activity from dehydrogenase (type D) to oxidase (type O). *J Biol Chem.* 1969;244(14):3855-3863.
59. Waud WR, Rajagopalan KV. The mechanism of conversion of rat liver xanthine dehydrogenase from an NAD⁺-dependent form (type D) to an O₂-dependent form (type O). *Arch Biochem Biophys.* 1976;172(2):365-379.
60. Waud WR, Rajagopalan KV. Purification and properties of the NAD⁺-dependent (type D) and O₂-dependent (type O) forms of rat liver xanthine dehydrogenase. *Arch Biochem Biophys.* 1976;172(2):354-364.
61. Hille R, Nishino T. Flavoprotein structure and mechanism. 4. Xanthine oxidase and xanthine dehydrogenase. *Faseb J.* 1995;9(11):995-1003.
62. Nishino T, Okamoto K, Eger BT, Pai EF, Nishino T. Mammalian xanthine oxidoreductase - mechanism of transition from xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase. *Febs J.* 2008;275(13):3278-3289.
63. Berry CE, Hare JM. Xanthine oxidoreductase and cardiovascular disease: molecular mechanisms and pathophysiological implications. *J Physiol.* 2004;555(Pt 3):589-606.
64. Granger DN, Rutili G, McCord JM. Superoxide radicals in feline intestinal ischemia. *Gastroenterology.* 1981;81(1):22-29.
65. McCord JM. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med.* 1985;312(3):159-163.
66. McCord JM, Roy RS, Schaffer SW. Free radicals and myocardial ischemia. The role of xanthine oxidase. *Adv Myocardiol.* 1985;5:183-189.
67. Ohara Y, Peterson TE, Harrison DG. Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide anion production. *J Clin Invest.* 1993;91(6):2546-2551.
68. Houston M, Estevez A, Chumley P, Aslan M, Marklund S, Parks DA, Freeman BA. Binding of xanthine oxidase to vascular endothelium. Kinetic characterization and oxidative impairment of nitric oxide-dependent signaling. *J Biol Chem.* 1999;274(8):4985-4994.
69. Butler R, Morris AD, Belch JJ, Hill A, Struthers AD. Allopurinol normalizes endothelial dysfunction in type 2 diabetics with mild hypertension. *Hypertension.* 2000;35(3):746-751.
70. Guthikonda S, Sinkey C, Barenz T, Haynes WG. Xanthine oxidase inhibition reverses endothelial dysfunction in heavy smokers. *Circulation.* 2003;107(3):416-421.

71. Swei A, Lacy F, Delano FA, Parks DA, Schmid-Schonbein GW. A mechanism of oxygen free radical production in the Dahl hypertensive rat. *Microcirculation*. 1999;6(3):179-187.
72. Asmis R, Begley JG. Oxidized LDL promotes peroxide-mediated mitochondrial dysfunction and cell death in human macrophages: a caspase-3-independent pathway. *Circ Res*. 2003;92(1):e20-29.
73. Carlson CA, Kim KH. Regulation of hepatic acetyl coenzyme A carboxylase by phosphorylation and dephosphorylation. *J Biol Chem*. 1973;248(1):378-380.
74. Hardie DG, Carling D. The AMP-activated protein kinase--fuel gauge of the mammalian cell? *Eur J Biochem*. 1997;246(2):259-273.
75. Hardie DG. Minireview: the AMP-activated protein kinase cascade: the key sensor of cellular energy status. *Endocrinology*. 2003;144(12):5179-5183.
76. Hardie DG. The AMP-activated protein kinase pathway--new players upstream and downstream. *Journal of Cell Science*. 2004;117(Pt 23):5479-5487.
77. Crute BE, Seefeld K, Gamble J, Kemp BE, Witters LA. Functional domains of the alpha1 catalytic subunit of the AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem*. 1998;273(52):35347-35354.
78. Jiang R, Carlson M. The Snf1 protein kinase and its activating subunit, Snf4, interact with distinct domains of the Sip1/Sip2/Gal83 component in the kinase complex. *Mol Cell Biol*. 1997;17(4):2099-2106.
79. Hudson ER, Pan DA, James J, Lucocq JM, Hawley SA, Green KA, Baba O, Terashima T, Hardie DG. A novel domain in AMP-activated protein kinase causes glycogen storage bodies similar to those seen in hereditary cardiac arrhythmias. *Curr Biol*. 2003;13(10):861-866.
80. Cheung PC, Salt IP, Davies SP, Hardie DG, Carling D. Characterization of AMP-activated protein kinase gamma-subunit isoforms and their role in AMP binding. *Biochem J*. 2000;346 Pt 3:659-669.
81. Bateman A. The structure of a domain common to archaeobacteria and the homocystinuria disease protein. *Trends Biochem Sci*. 1997;22(1):12-13.
82. Hardie DG. AMP-activated protein kinase: a master switch in glucose and lipid metabolism. *Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders*. 2004;5(2):119-125.
83. Hardie DG, Hawley SA, Scott JW. AMP-activated protein kinase--development of the energy sensor concept. *Journal of Physiology*. 2006;574(Pt 1):7-15.
84. Hardie DG, Sakamoto K. AMPK: a key sensor of fuel and energy status in skeletal muscle. *Physiology*. 2006;21:48-60.
85. Hardie DG, Hawley SA. AMP-activated protein kinase: the energy charge hypothesis revisited. *Bioessays*. 2001;23(12):1112-1119.
86. Corton JM, Gillespie JG, Hawley SA, Hardie DG. 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside. A specific method for activating AMP-activated protein kinase in intact cells? *Eur J Biochem*. 1995;229(2):558-565.
87. Hardie DG, Carling D, Carlson M. The AMP-activated/SNF1 protein kinase subfamily: metabolic sensors of the eukaryotic cell? *Annu Rev Biochem*. 1998;67:821-855.
88. Hardie DG, Salt IP, Hawley SA, Davies SP. AMP-activated protein kinase: an ultrasensitive system for monitoring cellular energy charge. *Biochem J*. 1999;338 (Pt 3):717-722.
89. Hawley SA, Davison M, Woods A, Davies SP, Beri RK, Carling D, Hardie DG. Characterization of the AMP-activated protein kinase kinase from rat liver and identification of threonine 172 as the major site at which it phosphorylates AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem*. 1996;271(44):27879-27887.

90. Davies SP, Helps NR, Cohen PT, Hardie DG. 5'-AMP inhibits dephosphorylation, as well as promoting phosphorylation, of the AMP-activated protein kinase. Studies using bacterially expressed human protein phosphatase-2C alpha and native bovine protein phosphatase-2AC. *FEBS Lett.* 1995;377(3):421-425.
91. Chock PB, Stadtman ER. Superiority of interconvertible enzyme cascades in metabolite regulation: analysis of multicyclic systems. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1977;74(7):2766-2770.
92. Stadtman ER, Chock PB. Superiority of interconvertible enzyme cascades in metabolic regulation: analysis of monocyclic systems. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1977;74(7):2761-2765.
93. Scott JW, Hawley SA, Green KA, Anis M, Stewart G, Scullion GA, Norman DG, Hardie DG. CBS domains form energy-sensing modules whose binding of adenosine ligands is disrupted by disease mutations. *J Clin Invest.* 2004;113(2):274-284.
94. Hardie DG, Scott JW, Pan DA, Hudson ER. Management of cellular energy by the AMP-activated protein kinase system. *FEBS Lett.* 2003;546(1):113-120.
95. Hawley SA, Gadalla AE, Olsen GS, Hardie DG. The antidiabetic drug metformin activates the AMP-activated protein kinase cascade via an adenine nucleotide-independent mechanism. *Diabetes.* 2002;51(8):2420-2425.
96. Marsin AS, Bertrand L, Rider MH, Deprez J, Beauloye C, Vincent MF, Van den Berghe G, Carling D, Hue L. Phosphorylation and activation of heart PFK-2 by AMPK has a role in the stimulation of glycolysis during ischaemia. *Curr Biol.* 2000;10(20):1247-1255.
97. Marsin AS, Bouzin C, Bertrand L, Hue L. The stimulation of glycolysis by hypoxia in activated monocytes is mediated by AMP-activated protein kinase and inducible 6-phosphofructo-2-kinase. *J Biol Chem.* 2002;277(34):30778-30783.
98. Schulz E, Anter E, Zou MH, Keaney JF, Jr. Estradiol-mediated endothelial nitric oxide synthase association with heat shock protein 90 requires adenosine monophosphate-dependent protein kinase. *Circulation.* 2005;111(25):3473-3480.
99. Corton JM, Gillespie JG, Hardie DG. Role of the AMP-activated protein kinase in the cellular stress response. *Curr Biol.* 1994;4(4):315-324.
100. Sabina RL, Patterson D, Holmes EW. 5-Amino-4-imidazolecarboxamide riboside (Z-ribose) metabolism in eukaryotic cells. *J Biol Chem.* 1985;260(10):6107-6114.
101. Nagata D, Mogi M, Walsh K. AMP-activated protein kinase (AMPK) signaling in endothelial cells is essential for angiogenesis in response to hypoxic stress. *J Biol Chem.* 2003;278(33):31000-31006.
102. Ouchi N, Shibata R, Walsh K. AMP-activated protein kinase signaling stimulates VEGF expression and angiogenesis in skeletal muscle. *Circ Res.* 2005;96(8):838-846.
103. Ido Y, Carling D, Ruderman N. Hyperglycemia-induced apoptosis in human umbilical vein endothelial cells: inhibition by the AMP-activated protein kinase activation. *Diabetes.* 2002;51(1):159-167.
104. Rajagopalan S, Kurz S, Munzel T, Tarpey M, Freeman BA, Griending KK, Harrison DG. Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone. *J Clin Invest.* 1996;97(8):1916-1923.
105. Rajagopalan S, Laursen JB, Borthayre A, Kurz S, Keiser J, Haleen S, Giaid A, Harrison DG. Role for endothelin-1 in angiotensin II-mediated hypertension. *Hypertension.* 1997;30(1 Pt 1):29-34.
106. Tummala PE, Chen XL, Sundell CL, Laursen JB, Hammes CP, Alexander RW, Harrison DG, Medford RM. Angiotensin II induces vascular cell adhesion molecule-1 ex-

- pression in rat vasculature: A potential link between the renin-angiotensin system and atherosclerosis. *Circulation*. 1999;100(11):1223-1229.
107. Viollet B, Athesa Y, Mounier R, Guigas B, Zarrinpashneh E, Horman S, Lantier L, Hebrard S, Devin-Leclerc J, Beauloye C, Foretz M, Andreelli F, Ventura-Clapier R, Bertrand L. AMPK: Lessons from transgenic and knockout animals. *Front Biosci*. 2009;14:19-44.
108. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;72:248-254.
109. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*. 1988;239(4839):487-491.
110. Kleppe K, Ohtsuka E, Kleppe R, Molineux I, Khorana HG. Studies on polynucleotides. XCVI. Repair replications of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerases. *J Mol Biol*. 1971;56(2):341-361.
111. Viollet B, Andreelli F, Jorgensen SB, Perrin C, Flamez D, Mu J, Wojtaszewski JF, Schuit FC, Birnbaum M, Richter E, Burcelin R, Vaulont S. Physiological role of AMP-activated protein kinase (AMPK): insights from knockout mouse models. *Biochem Soc Trans*. 2003;31(Pt 1):216-219.
112. Viollet B, Andreelli F, Jorgensen SB, Perrin C, Geloën A, Flamez D, Mu J, Lenzner C, Baud O, Bennoun M, Gomas E, Nicolas G, Wojtaszewski JF, Kahn A, Carling D, Schuit FC, Birnbaum MJ, Richter EA, Burcelin R, Vaulont S. The AMP-activated protein kinase alpha2 catalytic subunit controls whole-body insulin sensitivity. *J Clin Invest*. 2003;111(1):91-98.
113. Lawyer FC, Stoffel S, Saiki RK, Myambo K, Drummond R, Gelfand DH. Isolation, characterization, and expression in *Escherichia coli* of the DNA polymerase gene from *Thermus aquaticus*. *J Biol Chem*. 1989;264(11):6427-6437.
114. Erlich HA, Gelfand D, Sninsky JJ. Recent advances in the polymerase chain reaction. *Science*. 1991;252(5013):1643-1651.
115. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1986;51 Pt 1:263-273.
116. Daiber A, Oelze M, Sulyok S, Coldewey M, Schulz E, Treiber N, Hink U, Mulsch A, Scharffetter-Kochanek K, Munzel T. Heterozygous deficiency of manganese superoxide dismutase in mice (Mn-SOD^{+/-}): a novel approach to assess the role of oxidative stress for the development of nitrate tolerance. *Mol Pharmacol*. 2005;68(3):579-588.
117. Theeuwes F, Yum SI. Principles of the design and operation of generic osmotic pumps for the delivery of semisolid or liquid drug formulations. *Ann Biomed Eng*. 1976;4(4):343-353.
118. Theeuwes F. Elementary osmotic pump. *J Pharm Sci*. 1975;64(12):1987-1991.
119. Theeuwes F, Ashida K, Higuchi T. Programmed diffusional release rate from encapsulated cosolvent system. *J Pharm Sci*. 1976;65(5):648-652.
120. <http://www.alzet.com/products/howdoesitwork.php>.
121. <http://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Datei:ECL.jpg&filetimestamp=20050818094645>.
122. McLenachan JM, Vita J, Fish DR, Treasure CB, Cox DA, Ganz P, Selwyn AP. Early evidence of endothelial vasodilator dysfunction at coronary branch points. *Circulation*. 1990;82(4):1169-1173.

123. Castegnaro M, Walker EA. New data from collaborative studies on analysis of nitrosamines. *IARC Sci Publ.* 1978(19):53-62.
124. Nagababu E, Rifkind JM. Measurement of plasma nitrite by chemiluminescence without interference of S-, N-nitroso and nitrated species. *Free Radic Biol Med.* 2007;42(8):1146-1154.
125. Allaerts W, Koopman WJ, Verlaan BP, Buzzi M, Steerenberg PA. Endogenous production of nitric oxide and effects of nitric oxide and superoxide on melanotrope functioning in the pituitary pars intermedia of *Xenopus laevis*. *Nitric Oxide.* 2000;4(1):15-28.
126. Russell RR, 3rd, Li J, Coven DL, Pypaert M, Zechner C, Palmeri M, Giordano FJ, Mu J, Birnbaum MJ, Young LH. AMP-activated protein kinase mediates ischemic glucose uptake and prevents postischemic cardiac dysfunction, apoptosis, and injury. *J Clin Invest.* 2004;114(4):495-503.
127. Chrzczanowicz J, Gawron A, Zwolinska A, de Graft-Johnson J, Krajewski W, Krol M, Markowski J, Kostka T, Nowak D. Simple method for determining human serum 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl (DPPH) radical scavenging activity - possible application in clinical studies on dietary antioxidants. *Clin Chem Lab Med.* 2008;46(3):342-349.
128. Nishida J, Kawabata J. DPPH radical scavenging reaction of hydroxy- and methoxy-chalcones. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2006;70(1):193-202.
129. Matsuno K, Yamada H, Iwata K, Jin D, Katsuyama M, Matsuki M, Takai S, Yamashiki K, Miyazaki M, Matsubara H, Yabe-Nishimura C. Nox1 is involved in angiotensin II-mediated hypertension: a study in Nox1-deficient mice. *Circulation.* 2005;112(17):2677-2685.
130. Mellors A, Tappel AL. The inhibition of mitochondrial peroxidation by ubiquinone and ubiquinol. *J Biol Chem.* 1966;241(19):4353-4356.
131. <http://www.baltic-analytics.de/index.php?id=40>.
132. Spasojevic I, Liochev SI, Fridovich I. Lucigenin: redox potential in aqueous media and redox cycling with O₂⁻ production. *Arch Biochem Biophys.* 2000;373(2):447-450.
133. Lauer T, Preik M, Rassaf T, Strauer BE, Deussen A, Feelisch M, Kelm M. Plasma nitrite rather than nitrate reflects regional endothelial nitric oxide synthase activity but lacks intrinsic vasodilator action. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(22):12814-12819.
134. Mollnau H, Wendt M, Szocs K, Lassegue B, Schulz E, Oelze M, Li H, Bodenschatz M, August M, Kleschyov AL, Tsilimingas N, Walter U, Forstermann U, Meinertz T, Griendling K, Munzel T. Effects of angiotensin II infusion on the expression and function of NAD(P)H oxidase and components of nitric oxide/cGMP signaling. *Circ Res.* 2002;90(4):E58-65.
135. Gladwin MT, Ognibene FP, Pannell LK, Nichols JS, Pease-Fye ME, Shelhamer JH, Schechter AN. Relative role of heme nitrosylation and beta-cysteine 93 nitrosation in the transport and metabolism of nitric oxide by hemoglobin in the human circulation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(18):9943-9948.
136. Skatchkov MP, Sperling D, Hink U, Mulsch A, Harrison DG, Sindermann I, Meinertz T, Munzel T. Validation of lucigenin as a chemiluminescent probe to monitor vascular superoxide as well as basal vascular nitric oxide production. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999;254(2):319-324.
137. Tarpey MM, White CR, Suarez E, Richardson G, Radi R, Freeman BA. Chemiluminescent detection of oxidants in vascular tissue. Lucigenin but not coelenterazine enhances superoxide formation. *Circ Res.* 1999;84(10):1203-1211.

138. Omar HA, Cherry PD, Mortelliti MP, Burke-Wolin T, Wolin MS. Inhibition of coronary artery superoxide dismutase attenuates endothelium-dependent and -independent nitrovasodilator relaxation. *Circ Res.* 1991;69(3):601-608.
139. Faulkner K, Fridovich I. Luminol and lucigenin as detectors for O₂. *Free Radic Biol Med.* 1993;15(4):447-451.
140. Oelze M, Daiber A, Brandes RP, Hortmann M, Wenzel P, Hink U, Schulz E, Mollnau H, von Sandersleben A, Kleschyov AL, Mulsch A, Li H, Forstermann U, Munzel T. Nebivolol inhibits superoxide formation by NADPH oxidase and endothelial dysfunction in angiotensin II-treated rats. *Hypertension.* 2006;48(4):677-684.
141. Imada I, Sato EF, Miyamoto M, Ichimori Y, Minamiyama Y, Konaka R, Inoue M. Analysis of reactive oxygen species generated by neutrophils using a chemiluminescence probe L-012. *Anal Biochem.* 1999;271(1):53-58.
142. Nishinaka Y, Aramaki Y, Yoshida H, Masuya H, Sugawara T, Ichimori Y. A new sensitive chemiluminescence probe, L-012, for measuring the production of superoxide anion by cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1993;193(2):554-559.
143. Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol.* 2004;142(2):231-255.
144. Zhao X, Zmijewski JW, Lorne E, Liu G, Park YJ, Tsuruta Y, Abraham E. Activation of AMPK attenuates neutrophil proinflammatory activity and decreases the severity of acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2008.
145. Munzel T, Daiber A, Mulsch A. Explaining the phenomenon of nitrate tolerance. *Circ Res.* 2005;97(7):618-628.
146. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951;193(1):265-275.
147. Hartree EF. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Anal Biochem.* 1972;48(2):422-427.
148. Jabs A, Gobel S, Wenzel P, Kleschyov AL, Hortmann M, Oelze M, Daiber A, Munzel T. Sirolimus-induced vascular dysfunction. Increased mitochondrial and nicotinamide adenosine dinucleotide phosphate oxidase-dependent superoxide production and decreased vascular nitric oxide formation. *J Am Coll Cardiol.* 2008;51(22):2130-2138.
149. Daiber A. *Pentaerithryltetranitrat: Oxidativer Stress, Redoxregulation und NO-Bioverfügbarkeit - experimentelle und klinische Aspekte.* Vol 1. Darmstadt: Steinkopff Verlag 2006.
150. Zeiher AM, Schachinger V. Coronary endothelial vasodilator dysfunction: clinical relevance and therapeutic implications. *Z Kardiol.* 1994;83 Suppl 4:7-14.
151. Rosenberger G, Fichtlscherer S. [Analysis of forearm circulation--a substitute for diagnosis of coronary atherosclerosis?]. *Herz.* 1998;23(2):130-134.
152. Schachinger V, Zeiher AM. Quantitative assessment of coronary vasoreactivity in humans in vivo. Importance of baseline vasomotor tone in atherosclerosis. *Circulation.* 1995;92(8):2087-2094.
153. Zeiher AM, Krause T, Schachinger V, Minners J, Moser E. Impaired endothelium-dependent vasodilation of coronary resistance vessels is associated with exercise-induced myocardial ischemia. *Circulation.* 1995;91(9):2345-2352.
154. Munzel T, Giaid A, Kurz S, Stewart DJ, Harrison DG. Evidence for a role of endothelin 1 and protein kinase C in nitroglycerin tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92(11):5244-5248.

155. Munzel T, Sayegh H, Freeman BA, Tarpey MM, Harrison DG. Evidence for enhanced vascular superoxide anion production in nitrate tolerance. A novel mechanism underlying tolerance and cross-tolerance. *J Clin Invest.* 1995;95(1):187-194.
156. Koenig A, Lange K, Konter J, Daiber A, Stalleicken D, Glusa E, Lehmann J. Potency and in vitro tolerance of organic nitrates: partially denitrated metabolites contribute to the tolerance-devoid activity of pentaerythrityl tetranitrate. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2007;50(1):68-74.
157. Koenig A, Roegler C, Lange K, Daiber A, Glusa E, Lehmann J. NO donors. Part 16: investigations on structure-activity relationships of organic mononitrates reveal 2-nitrooxyethylammoniumnitrate as a high potent vasodilator. *Bioorg Med Chem Lett.* 2007;17(21):5881-5885.
158. Schuhmacher S, Schulz E, Oelze M, Konig A, Roegler C, Lange K, Sydow L, Kawamoto T, Wenzel P, Munzel T, Lehmann J, Daiber A. A new class of organic nitrates: investigations on bioactivation, tolerance and cross-tolerance phenomena. *Br J Pharmacol.* 2009;158(2):510-520.
159. Compton SJ, Jones CG. Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. *Anal Biochem.* 1985;151(2):369-374.
160. Pande SV, Murthy MS. A modified micro-Bradford procedure for elimination of interference from sodium dodecyl sulfate, other detergents, and lipids. *Anal Biochem.* 1994;220(2):424-426.
161. Schagger H, von Jagow G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem.* 1987;166(2):368-379.
162. <http://de.wikipedia.org/wiki/SDS-PAGE>.
163. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970;227(5259):680-685.
164. Schagger H, Aquila H, Von Jagow G. Coomassie blue-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for direct visualization of polypeptides during electrophoresis. *Anal Biochem.* 1988;173(1):201-205.
165. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1979;76(9):4350-4354.
166. Renart J, Reiser J, Stark GR. Transfer of proteins from gels to diazobenzyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1979;76(7):3116-3120.
167. McElderry LA, Tarbit IF, Cassells-Smith AJ. Six methods for urinary protein compared. *Clin Chem.* 1982;28(2):356-360.
168. Forstermann U, Closs EI, Pollock JS, Nakane M, Schwarz P, Gath I, Kleinert H. Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. *Hypertension.* 1994;23(6 Pt 2):1121-1131.
169. Yosselson-Superstine S, Sinai Y. Drug interference with urine protein determination. *J Clin Chem Clin Biochem.* 1986;24(1):103-106.
170. Kohler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature.* 1975;256(5517):495-497.
171. Burnette WN. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem.* 1981;112(2):195-203.
172. QIAGEN. *RNeasy® Fibrous Tissue Handbook*; 2006.

173. Temin HM. Malignant transformation of cells by viruses. *Perspect Biol Med.* 1970;14(1):11-26.
174. Temin HM. Control of multiplication of uninfected rat cells and rat cells converted by murine sarcoma virus. *J Cell Physiol.* 1970;75(1):107-119.
175. Baltimore D, Huang AS, Stampfer M. Ribonucleic acid synthesis of vesicular stomatitis virus, II. An RNA polymerase in the virion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1970;66(2):572-576.
176. Baltimore D. RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses. *Nature.* 1970;226(5252):1209-1211.
177. Clegg RM, Murchie AI, Zechel A, Lilley DM. Observing the helical geometry of double-stranded DNA in solution by fluorescence resonance energy transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90(7):2994-2998.
178. <http://de.wikipedia.org/wiki/FRET>.
179. Lakowicz JR. Principles of Fluorescence Spectroscopy. *Plenum Publishing Corporation.* 1999 2.
180. Biosystems A. Basic Real-Time PCR Training Course. 2006.
181. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001;25(4):402-408.
182. Datenbank „Gesundheit für alle“ (GFA-DB) K, WHO-Regionalbüro für Europa, (<http://www.euro.who.int/hfadb>). 2009.
183. Epstein PS. The New Quantum Theory and the Zeeman Effect. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1926;12(11):634-638.
184. Kiess CC, Shortley G. Zeeman Effect and g-Values for Neutral Nitrogen and Oxygen. *Science.* 1948;107(2790):649-650.
185. Reese HM. The Zeeman Effect. *Science.* 1900;12(295):293-297.
186. Mollnau H, Schulz E, Daiber A, Baldus S, Oelze M, August M, Wendt M, Walter U, Geiger C, Agrawal R, Kleschyov AL, Meinertz T, Munzel T. Nebivolol prevents vascular NOS III uncoupling in experimental hyperlipidemia and inhibits NADPH oxidase activity in inflammatory cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23(4):615-621.
187. Kleschyov AL, Oelze M, Daiber A, Huang Y, Mollnau H, Schulz E, Sydow K, Fichtlscherer B, Mulsch A, Munzel T. Does nitric oxide mediate the vasodilator activity of nitroglycerin? *Circ Res.* 2003;93(9):e104-112.
188. Kirima K, Tsuchiya K, Sei H, Hasegawa T, Shikishima M, Motobayashi Y, Morita K, Yoshizumi M, Tamaki T. Evaluation of systemic blood NO dynamics by EPR spectroscopy: HbNO as an endogenous index of NO. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003;285(2):H589-596.
189. Dunnett CW. Multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. *Journal Of The American Statistical Association.* 1955;50:1096-1121.
190. Tsikas D. Methods of quantitative analysis of the nitric oxide metabolites nitrite and nitrate in human biological fluids. *Free Radic Res.* 2005;39(8):797-815.
191. Davis BJ, Xie Z, Viollet B, Zou MH. Activation of the AMP-activated kinase by antidiabetes drug metformin stimulates nitric oxide synthesis in vivo by promoting the association of heat shock protein 90 and endothelial nitric oxide synthase. *Diabetes.* 2006;55(2):496-505.
192. Kissner R, Nauser T, Bugnon P, Lye PG, Koppenol WH. Formation and properties of peroxynitrite as studied by laser flash photolysis, high-pressure stopped-flow technique, and pulse radiolysis. *Chem Res Toxicol.* 1997;10(11):1285-1292.

193. Kissner R, Nauser T, Bugnon P, Lye PG, Koppenol WH. Formation and properties of peroxyxynitrite as studied by laser flash photolysis, high-pressure stopped-flow technique, and pulse radiolysis volume 10, number 11, november 1997, pp 1285-1292. *Chem Res Toxicol.* 1998;11(5):557.
194. Hartge MM, Unger T, Kintscher U. The endothelium and vascular inflammation in diabetes. *Diab Vasc Dis Res.* 2007;4(2):84-88.
195. Iiyama K, Hajra L, Iiyama M, Li H, DiChiara M, Medoff BD, Cybulsky MI. Patterns of vascular cell adhesion molecule-1 and intercellular adhesion molecule-1 expression in rabbit and mouse atherosclerotic lesions and at sites predisposed to lesion formation. *Circ Res.* 1999;85(2):199-207.
196. Panov A, Dikalov S, Shalbuyeva N, Taylor G, Sherer T, Greenamyre JT. Rotenone model of Parkinson disease: multiple brain mitochondria dysfunctions after short term systemic rotenone intoxication. *J Biol Chem.* 2005;280(51):42026-42035.
197. Schulz E, Dopheide J, Schuhmacher S, Thomas SR, Chen K, Daiber A, Wenzel P, Munzel T, Keaney JF, Jr. Suppression of the JNK pathway by induction of a metabolic stress response prevents vascular injury and dysfunction. *Circulation.* 2008;118(13):1347-1357.
198. Chen K, Vita JA, Berk BC, Keaney JF, Jr. c-Jun N-terminal kinase activation by hydrogen peroxide in endothelial cells involves SRC-dependent epidermal growth factor receptor transactivation. *J Biol Chem.* 2001;276(19):16045-16050.
199. Smith RA, Kelso GF, Blaikie FH, Porteous CM, Ledgerwood EC, Hughes G, James AM, Ross MF, Asin-Cayuela J, Cocheme HM, Filipovska A, Murphy MP. Using mitochondria-targeted molecules to study mitochondrial radical production and its consequences. *Biochem Soc Trans.* 2003;31(Pt 6):1295-1299.
200. Tournier C, Hess P, Yang DD, Xu J, Turner TK, Nimnual A, Bar-Sagi D, Jones SN, Flavell RA, Davis RJ. Requirement of JNK for stress-induced activation of the cytochrome c-mediated death pathway. *Science.* 2000;288(5467):870-874.
201. Wang X, McCullough KD, Franke TF, Holbrook NJ. Epidermal growth factor receptor-dependent Akt activation by oxidative stress enhances cell survival. *J Biol Chem.* 2000;275(19):14624-14631.
202. Chen K, Thomas SR, Albano A, Murphy MP, Keaney JF, Jr. Mitochondrial function is required for hydrogen peroxide-induced growth factor receptor transactivation and downstream signaling. *J Biol Chem.* 2004;279(33):35079-35086.
203. Schuhmacher S, Schulz E, Hortmann M, Wenzel P, Oelze M, Daiber A, Munzel T. Knockout of vascular AMPK leads to increased mitochondrial stress and decreased vasodilator sensitivity towards organic nitrates. II. Medizinische Klinik, Molekulare Kardiologie, Universitätsklinikum der Johannes Gutenberg-Universität Mainz; 2007.
204. Goirand F, Solar M, Athea Y, Viollet B, Mateo P, Fortin D, Leclerc J, Hoerter J, Ventura-Clapier R, Garnier A. Activation of AMP kinase alpha1 subunit induces aortic vasorelaxation in mice. *J Physiol.* 2007;581(Pt 3):1163-1171.
205. Seshiah PN, Weber DS, Rocic P, Valppu L, Taniyama Y, Griendling KK. Angiotensin II stimulation of NAD(P)H oxidase activity: upstream mediators. *Circ Res.* 2002;91(5):406-413.
206. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature.* 1980;288(5789):373-376.
207. Moncada S, Higgs EA, Palmer RM. Characterization and biological significance of endothelium-derived relaxing factor. *Biochem Soc Trans.* 1988;16(4):484-486.
208. Radomski MW, Palmer RM, Moncada S. Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium. *Lancet.* 1987;2(8567):1057-1058.

209. Radomski MW, Palmer RM, Moncada S. The role of nitric oxide and cGMP in platelet adhesion to vascular endothelium. *Biochem Biophys Res Commun.* 1987;148(3):1482-1489.
210. Garg UC, Hassid A. Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest.* 1989;83(5):1774-1777.
211. Selwyn AP, Vita JA, Vekshtein VI, Yeung A, Ryan T, Jr., Ganz P. Myocardial ischemia: pathogenic role of disturbed vasomotion and endothelial dysfunction in coronary atherosclerosis. *Adv Cardiol.* 1990;37:42-52.
212. Suwaidi JA, Hamasaki S, Higano ST, Nishimura RA, Holmes DR, Jr., Lerman A. Long-term follow-up of patients with mild coronary artery disease and endothelial dysfunction. *Circulation.* 2000;101(9):948-954.
213. Schachinger V, Zeiher AM. Prognostic implications of endothelial dysfunction: does it mean anything? *Coron Artery Dis.* 2001;12(6):435-443.
214. Schachinger V, Zeiher AM. Atherosclerosis-associated endothelial dysfunction. *Z Kardiol.* 2000;89 Suppl 9:IX/70-74.
215. Schachinger V, Britten MB, Dimmeler S, Zeiher AM. NADH/NADPH oxidase p22 phox gene polymorphism is associated with improved coronary endothelial vasodilator function. *Eur Heart J.* 2001;22(1):96-101.
216. Gokce N, Keaney JF, Jr., Hunter LM, Watkins MT, Menzoian JO, Vita JA. Risk stratification for postoperative cardiovascular events via noninvasive assessment of endothelial function: a prospective study. *Circulation.* 2002;105(13):1567-1572.
217. Kramer HF, Witzak CA, Fujii N, Jessen N, Taylor EB, Arnolds DE, Sakamoto K, Hirshman MF, Goodyear LJ. Distinct signals regulate AS160 phosphorylation in response to insulin, AICAR, and contraction in mouse skeletal muscle. *Diabetes.* 2006;55(7):2067-2076.
218. Rongen GA, Smits P, Thien T. Endothelium and the regulation of vascular tone with emphasis on the role of nitric oxide. Physiology, pathophysiology and clinical implications. *Neth J Med.* 1994;44(1):26-35.
219. Chen Z, Peng IC, Sun W, Su MI, Hsu PH, Fu Y, Zhu Y, DeFea K, Pan S, Tsai MD, Shyy JY. AMP-activated protein kinase functionally phosphorylates endothelial nitric oxide synthase Ser633. *Circ Res.* 2009;104(4):496-505.
220. Somlyo AP, Somlyo AV. Ca²⁺ sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. *Physiol Rev.* 2003;83(4):1325-1358.
221. Rubin LJ, Magliola L, Feng X, Jones AW, Hale CC. Metabolic activation of AMP kinase in vascular smooth muscle. *J Appl Physiol.* 2005;98(1):296-306.
222. Thorne GD, Hilliard GM, Paul RJ. Vascular oxygen sensing: detection of novel candidates by proteomics and organ culture. *J Appl Physiol.* 2004;96(2):802-808; discussion 792.
223. Wardle RL, Gu M, Ishida Y, Paul RJ. Ca²⁺-desensitizing hypoxic vasorelaxation: pivotal role for the myosin binding subunit of myosin phosphatase (MYPT1) in porcine coronary artery. *J Physiol.* 2006;572(Pt 1):259-267.
224. Morris SM, Jr., Billiar TR. New insights into the regulation of inducible nitric oxide synthesis. *Am J Physiol.* 1994;266(6 Pt 1):E829-839.
225. Buttery LD, Springall DR, Chester AH, Evans TJ, Standfield EN, Parums DV, Yacoub MH, Polak JM. Inducible nitric oxide synthase is present within human atherosclerotic lesions and promotes the formation and activity of peroxynitrite. *Lab Invest.* 1996;75(1):77-85.

226. Luoma JS, Stralin P, Marklund SL, Hiltunen TP, Sarkioja T, Yla-Herttuala S. Expression of extracellular SOD and iNOS in macrophages and smooth muscle cells in human and rabbit atherosclerotic lesions: colocalization with epitopes characteristic of oxidized LDL and peroxynitrite-modified proteins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998;18(2):157-167.
227. Radomski MW. Nitric oxide: biological mediator, modulator and effector. *Ann Med.* 1995;27(3):321-329.
228. Radomski MW, Salas E. Nitric oxide--biological mediator, modulator and factor of injury: its role in the pathogenesis of atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 1995;118 Suppl:S69-80.
229. Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature.* 1987;327(6122):524-526.
230. Vasquez-Vivar J, Kalyanaraman B, Martasek P, Hogg N, Masters BS, Karoui H, Tordo P, Pritchard KA, Jr. Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(16):9220-9225.
231. Gori T, Burstein JM, Ahmed S, Miner SE, Al-Hesayen A, Kelly S, Parker JD. Folic acid prevents nitroglycerin-induced nitric oxide synthase dysfunction and nitrate tolerance: a human in vivo study. *Circulation.* 2001;104(10):1119-1123.
232. Chen P, Cai Y, Yang ZG, Zhou R, Zhang GS, Domann F, Fang X. Involvement of PKC, p38 MAPK and AP-2 in IL-1beta-induced expression of cyclooxygenase-2 in human pulmonary epithelial cells. *Respirology.* 2006;11(1):18-23.
233. De Jager J, Kooy A, Lehert P, Bets D, Wulffele MG, Teerlink T, Scheffer PG, Schalkwijk CG, Donker AJ, Stehouwer CD. Effects of short-term treatment with metformin on markers of endothelial function and inflammatory activity in type 2 diabetes mellitus: a randomized, placebo-controlled trial. *J Intern Med.* 2005;257(1):100-109.
234. Rattan R, Giri S, Singh AK, Singh I. 5-Aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-ribofuranoside inhibits cancer cell proliferation in vitro and in vivo via AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem.* 2005;280(47):39582-39593.
235. Gyllenhammar H. Lucigenin chemiluminescence in the assessment of neutrophil superoxide production. *J Immunol Methods.* 1987;97(2):209-213.
236. Haluzik M, Colombo C, Gavrilova O, Chua S, Wolf N, Chen M, Stannard B, Dietz KR, Le Roith D, Reitman ML. Genetic background (C57BL/6J versus FVB/N) strongly influences the severity of diabetes and insulin resistance in ob/ob mice. *Endocrinology.* 2004;145(7):3258-3264.
237. Sanford LP, Kallapur S, Ormsby I, Doetschman T. Influence of genetic background on knockout mouse phenotypes. *Methods Mol Biol.* 2001;158:217-225.
238. Schauwecker PE. Complications associated with genetic background effects in models of experimental epilepsy. *Prog Brain Res.* 2002;135:139-148.
239. Guzik TJ, Griendling K. NADPH oxidases - molecular understanding finally reaching the clinical level? *Antioxid Redox Signal.* 2009.
240. Kou R, Sartoretto J, Michel T. Regulation of Rac1 by simvastatin in endothelial cells: differential roles of AMP-activated protein kinase and calmodulin-dependent kinase kinase-beta. *J Biol Chem.* 2009.
241. Vecchione C, Brandes RP. Withdrawal of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors elicits oxidative stress and induces endothelial dysfunction in mice. *Circ Res.* 2002;91(2):173-179.
242. Stryer L. *Biochemie.* Vol 4. Heidelberg: Akademischer Verlag; 1995.

243. Aguan K, Scott J, See CG, Sarkar NH. Characterization and chromosomal localization of the human homologue of a rat AMP-activated protein kinase-encoding gene: a major regulator of lipid metabolism in mammals. *Gene*. 1994;149(2):345-350.
244. Carling D, Aguan K, Woods A, Verhoeven AJ, Beri RK, Brennan CH, Sidebottom C, Davison MD, Scott J. Mammalian AMP-activated protein kinase is homologous to yeast and plant protein kinases involved in the regulation of carbon metabolism. *J Biol Chem*. 1994;269(15):11442-11448.
245. Sullivan JE, Carey F, Carling D, Beri RK. Characterisation of 5'-AMP-activated protein kinase in human liver using specific peptide substrates and the effects of 5'-AMP analogues on enzyme activity. *Biochem Biophys Res Commun*. 1994;200(3):1551-1556.
246. Ceolotto G, Gallo A, Papparella I, Franco L, Murphy E, Iori E, Pagnin E, Fadini GP, Albiero M, Semplicini A, Avogaro A. Rosiglitazone reduces glucose-induced oxidative stress mediated by NAD(P)H oxidase via AMPK-dependent mechanism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27(12):2627-2633.
247. Gallo A, Ceolotto G, Pinton P, Iori E, Murphy E, Rutter GA, Rizzuto R, Semplicini A, Avogaro A. Metformin prevents glucose-induced protein kinase C-beta2 activation in human umbilical vein endothelial cells through an antioxidant mechanism. *Diabetes*. 2005;54(4):1123-1131.
248. Grivennikova VG, Vinogradov AD. Generation of superoxide by the mitochondrial Complex I. *Biochim Biophys Acta*. 2006;1757(5-6):553-561.
249. Messner KR, Imlay JA. Mechanism of superoxide and hydrogen peroxide formation by fumarate reductase, succinate dehydrogenase, and aspartate oxidase. *J Biol Chem*. 2002;277(45):42563-42571.
250. Ceaser EK, Ramachandran A, Levonen AL, Darley-Usmar VM. Oxidized low-density lipoprotein and 15-deoxy-delta 12,14-PGJ2 increase mitochondrial complex I activity in endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003;285(6):H2298-2308.
251. Kimura S, Zhang GX, Nishiyama A, Shokoji T, Yao L, Fan YY, Rahman M, Abe Y. Mitochondria-derived reactive oxygen species and vascular MAP kinases: comparison of angiotensin II and diazoxide. *Hypertension*. 2005;45(3):438-444.
252. Kimura S, Zhang GX, Nishiyama A, Shokoji T, Yao L, Fan YY, Rahman M, Suzuki T, Maeta H, Abe Y. Role of NAD(P)H oxidase- and mitochondria-derived reactive oxygen species in cardioprotection of ischemic reperfusion injury by angiotensin II. *Hypertension*. 2005;45(5):860-866.
253. Mari M, Caballero F, Colell A, Morales A, Caballeria J, Fernandez A, Enrich C, Fernandez-Checa JC, Garcia-Ruiz C. Mitochondrial free cholesterol loading sensitizes to TNF- and Fas-mediated steatohepatitis. *Cell Metab*. 2006;4(3):185-198.
254. Muller FL, Liu Y, Van Remmen H. Complex III releases superoxide to both sides of the inner mitochondrial membrane. *J Biol Chem*. 2004;279(47):49064-49073.
255. Doughan AK, Harrison DG, Dikalov SI. Molecular mechanisms of angiotensin II-mediated mitochondrial dysfunction: linking mitochondrial oxidative damage and vascular endothelial dysfunction. *Circ Res*. 2008;102(4):488-496.
256. Costa AD, Quinlan CL, Andrukhiv A, West IC, Jaburek M, Garlid KD. The direct physiological effects of mitoK(ATP) opening on heart mitochondria. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006;290(1):H406-415.
257. Ahn J, Lee H, Kim S, Park J, Ha T. The anti-obesity effect of quercetin is mediated by the AMPK and MAPK signaling pathways. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;373(4):545-549.

258. Yun H, Kim HS, Lee S, Kang I, Kim SS, Choe W, Ha J. AMP kinase signaling determines whether c-Jun N-terminal kinase promotes survival or apoptosis during glucose deprivation. *Carcinogenesis*. 2009;30(3):529-537.
259. Canto C, Auwerx J. PGC-1alpha, SIRT1 and AMPK, an energy sensing network that controls energy expenditure. *Curr Opin Lipidol*. 2009;20(2):98-105.
260. Coletta DK, Sriwijitkamol A, Wajcberg E, Tantiwong P, Li M, Prentki M, Madiraju M, Jenkinson CP, Cersosimo E, Musi N, Defronzo RA. Pioglitazone stimulates AMP-activated protein kinase signalling and increases the expression of genes involved in adiponectin signalling, mitochondrial function and fat oxidation in human skeletal muscle in vivo: a randomised trial. *Diabetologia*. 2009;52(4):723-732.
261. Liangpunsakul S, Wou SE, Wineinger KD, Zeng Y, Cyganek I, Jayaram HN, Crabb DW. Effects of WY-14,643 on the phosphorylation and activation of AMP-dependent protein kinase. *Arch Biochem Biophys*. 2009;485(1):10-15.
262. Reznick RM, Shulman GI. The role of AMP-activated protein kinase in mitochondrial biogenesis. *J Physiol*. 2006;574(Pt 1):33-39.
263. Finck BN, Kelly DP. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 (PGC-1) regulatory cascade in cardiac physiology and disease. *Circulation*. 2007;115(19):2540-2548.
264. Soyol S, Krempler F, Oberkofler H, Patsch W. PGC-1alpha: a potent transcriptional cofactor involved in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Diabetologia*. 2006;49(7):1477-1488.
265. Zhang DX, Chen YF, Campbell WB, Zou AP, Gross GJ, Li PL. Characteristics and superoxide-induced activation of reconstituted myocardial mitochondrial ATP-sensitive potassium channels. *Circ Res*. 2001;89(12):1177-1183.
266. Dressel U, Allen TL, Pippal JB, Rohde PR, Lau P, Muscat GE. The peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta agonist, GW501516, regulates the expression of genes involved in lipid catabolism and energy uncoupling in skeletal muscle cells. *Mol Endocrinol*. 2003;17(12):2477-2493.
267. Finck BN, Lehman JJ, Leone TC, Welch MJ, Bennett MJ, Kovacs A, Han X, Gross RW, Kozak R, Lopaschuk GD, Kelly DP. The cardiac phenotype induced by PPARalpha overexpression mimics that caused by diabetes mellitus. *J Clin Invest*. 2002;109(1):121-130.
268. Gilde AJ, Van Bilsen M. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARS): regulators of gene expression in heart and skeletal muscle. *Acta Physiol Scand*. 2003;178(4):425-434.
269. Gilde AJ, van der Lee KA, Willemsen PH, Chinetti G, van der Leij FR, van der Vusse GJ, Staels B, van Bilsen M. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha and PPARbeta/delta, but not PPARgamma, modulate the expression of genes involved in cardiac lipid metabolism. *Circ Res*. 2003;92(5):518-524.
270. Monsalve M, Wu Z, Adelmant G, Puigserver P, Fan M, Spiegelman BM. Direct coupling of transcription and mRNA processing through the thermogenic coactivator PGC-1. *Mol Cell*. 2000;6(2):307-316.
271. Sambandam N, Morabito D, Wagg C, Finck BN, Kelly DP, Lopaschuk GD. Chronic activation of PPARalpha is detrimental to cardiac recovery after ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006;290(1):H87-95.
272. Alba G, El Bekay R, Alvarez-Maqueda M, Chacon P, Vega A, Monteseirin J, Santa Maria C, Pintado E, Bedoya FJ, Bartrons R, Sobrino F. Stimulators of AMP-activated protein kinase inhibit the respiratory burst in human neutrophils. *FEBS Lett*. 2004;573(1-3):219-225.

273. Hentschke M, Susens U, Borgmeyer U. PGC-1 and PERC, coactivators of the estrogen receptor-related receptor gamma. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002;299(5):872-879.
274. Huss JM, Kopp RP, Kelly DP. Peroxisome proliferator-activated receptor coactivator-1alpha (PGC-1alpha) coactivates the cardiac-enriched nuclear receptors estrogen-related receptor-alpha and -gamma. Identification of novel leucine-rich interaction motif within PGC-1alpha. *J Biol Chem.* 2002;277(43):40265-40274.
275. Huss JM, Torra IP, Staels B, Giguere V, Kelly DP. Estrogen-related receptor alpha directs peroxisome proliferator-activated receptor alpha signaling in the transcriptional control of energy metabolism in cardiac and skeletal muscle. *Mol Cell Biol.* 2004;24(20):9079-9091.
276. Kallen J, Schlaeppli JM, Bitsch F, Filipuzzi I, Schilb A, Riou V, Graham A, Strauss A, Geiser M, Fournier B. Evidence for ligand-independent transcriptional activation of the human estrogen-related receptor alpha (ERRalpha): crystal structure of ERRalpha ligand binding domain in complex with peroxisome proliferator-activated receptor coactivator-1alpha. *J Biol Chem.* 2004;279(47):49330-49337.
277. Kamei Y, Ohizumi H, Fujitani Y, Nemoto T, Tanaka T, Takahashi N, Kawada T, Miyoshi M, Ezaki O, Kakizuka A. PPARgamma coactivator 1beta/ERR ligand 1 is an ERR protein ligand, whose expression induces a high-energy expenditure and antagonizes obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(21):12378-12383.
278. Schreiber SN, Knutti D, Brogli K, Uhlmann T, Kralli A. The transcriptional coactivator PGC-1 regulates the expression and activity of the orphan nuclear receptor estrogen-related receptor alpha (ERRalpha). *J Biol Chem.* 2003;278(11):9013-9018.
279. Wende AR, Huss JM, Schaeffer PJ, Giguere V, Kelly DP. PGC-1alpha coactivates PDK4 gene expression via the orphan nuclear receptor ERRalpha: a mechanism for transcriptional control of muscle glucose metabolism. *Mol Cell Biol.* 2005;25(24):10684-10694.
280. Terada S, Goto M, Kato M, Kawanaka K, Shimokawa T, Tabata I. Effects of low-intensity prolonged exercise on PGC-1 mRNA expression in rat epitrochlearis muscle. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002;296(2):350-354.
281. Knutti D, Kressler D, Kralli A. Regulation of the transcriptional coactivator PGC-1 via MAPK-sensitive interaction with a repressor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(17):9713-9718.
282. Puigserver P, Rhee J, Lin J, Wu Z, Yoon JC, Zhang CY, Krauss S, Mootha VK, Lowell BB, Spiegelman BM. Cytokine stimulation of energy expenditure through p38 MAP kinase activation of PPARgamma coactivator-1. *Mol Cell.* 2001;8(5):971-982.
283. Lemieux K, Konrad D, Klip A, Marette A. The AMP-activated protein kinase activator AICAR does not induce GLUT4 translocation to transverse tubules but stimulates glucose uptake and p38 mitogen-activated protein kinases alpha and beta in skeletal muscle. *Faseb J.* 2003;17(12):1658-1665.
284. Weber DS, Rocic P, Mellis AM, Laude K, Lyle AN, Harrison DG, Griendling KK. Angiotensin II-induced hypertrophy is potentiated in mice overexpressing p22phox in vascular smooth muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005;288(1):H37-42.
285. Hwang SL, Yen GC. Modulation of Akt, JNK, and p38 activation is involved in citrus flavonoid-mediated cytoprotection of PC12 cells challenged by hydrogen peroxide. *J Agric Food Chem.* 2009;57(6):2576-2582.
286. O'Brien KD, Allen MD, McDonald TO, Chait A, Harlan JM, Fishbein D, McCarty J, Ferguson M, Hudkins K, Benjamin CD, et al. Vascular cell adhesion molecule-1 is

- expressed in human coronary atherosclerotic plaques. Implications for the mode of progression of advanced coronary atherosclerosis. *J Clin Invest.* 1993;92(2):945-951.
287. Qin W, Haroutunian V, Katsel P, Cardozo CP, Ho L, Buxbaum JD, Pasinetti GM. PGC-1alpha expression decreases in the Alzheimer disease brain as a function of dementia. *Arch Neurol.* 2009;66(3):352-361.
288. McNally JS, Saxena A, Cai H, Dikalov S, Harrison DG. Regulation of xanthine oxidoreductase protein expression by hydrogen peroxide and calcium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25(8):1623-1628.
289. Ferdinandy P, Panas D, Schulz R. Peroxynitrite contributes to spontaneous loss of cardiac efficiency in isolated working rat hearts. *Am J Physiol.* 1999;276(6 Pt 2):H1861-1867.
290. Ferdinandy P, Szilvassy Z, Csont T, Koltai M, Droy-lefaix MT. Cardioprotective effect of enantiomers of cicletanine (BN50417, BN50418) in ischaemic/reperfused isolated working rat hearts: interaction with glibenclamide. *Pharmacol Res.* 1999;39(3):225-231.
291. Weinbroum A, Nielsen VG, Tan S, Gelman S, Matalon S, Skinner KA, Bradley E, Jr., Parks DA. Liver ischemia-reperfusion increases pulmonary permeability in rat: role of circulating xanthine oxidase. *Am J Physiol.* 1995;268(6 Pt 1):G988-996.
292. Zweier JL. Measurement of superoxide-derived free radicals in the reperfused heart. Evidence for a free radical mechanism of reperfusion injury. *J Biol Chem.* 1988;263(3):1353-1357.
293. Zweier JL, Broderick R, Kuppusamy P, Thompson-Gorman S, Luty GA. Determination of the mechanism of free radical generation in human aortic endothelial cells exposed to anoxia and reoxygenation. *J Biol Chem.* 1994;269(39):24156-24162.
294. Zweier JL, Kuppusamy P, Luty GA. Measurement of endothelial cell free radical generation: evidence for a central mechanism of free radical injury in postischemic tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988;85(11):4046-4050.
295. Zweier JL, Kuppusamy P, Thompson-Gorman S, Klunk D, Luty GA. Measurement and characterization of free radical generation in reoxygenated human endothelial cells. *Am J Physiol.* 1994;266(3 Pt 1):C700-708.
296. Zweier JL, Kuppusamy P, Williams R, Rayburn BK, Smith D, Weisfeldt ML, Flaherty JT. Measurement and characterization of postischemic free radical generation in the isolated perfused heart. *J Biol Chem.* 1989;264(32):18890-18895.
297. Guastadisegni MC, Lonoce A, Impera L, Albano F, D'Addabbo P, Caruso S, Vasta I, Panagopoulos I, Leszl A, Basso G, Rocchi M, Storlazzi CT. Bone marrow ectopic expression of a non-coding RNA in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia with a novel t(2;11)(q11.2;p15.1) translocation. *Mol Cancer.* 2008;7:80.
298. Panagopoulos AT, Lancellotti CL, Veiga JC, de Aguiar PH, Colquhoun A. Expression of cell adhesion proteins and proteins related to angiogenesis and fatty acid metabolism in benign, atypical, and anaplastic meningiomas. *J Neurooncol.* 2008;89(1):73-87.
299. Piqueras L, Sanz MJ, Perretti M, Morcillo E, Norling L, Mitchell JA, Li Y, Bishop-Bailey D. Activation of PPAR{beta}/{delta} inhibits leukocyte recruitment, cell adhesion molecule expression, and chemokine release. *J Leukoc Biol.* 2009.
300. Portillo JA, Van Grol J, Zheng L, Okenka G, Gentil K, Garland A, Carlson EC, Kern TS, Subauste CS. CD40 mediates retinal inflammation and neurovascular degeneration. *J Immunol.* 2008;181(12):8719-8726.
301. Zucchetto A, Benedetti D, Tripodo C, Bomben R, Dal Bo M, Marconi D, Bossi F, Lorenzon D, Degan M, Rossi FM, Rossi D, Bulian P, Franco V, Del Poeta G, Deaglio

- S, Gaidano G, Tedesco F, Malavasi F, Gattei V. CD38/CD31, the CCL3 and CCL4 Chemokines, and CD49d/Vascular Cell Adhesion Molecule-1 Are Interchained by Sequential Events Sustaining Chronic Lymphocytic Leukemia Cell Survival. *Cancer Res.* 2009.
302. Zipper H, Brunner H, Bernhagen J, Vitzthum F. Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. *Nucleic Acids Res.* 2004;32(12):e103.
303. Boring L, Gosling J, Cleary M, Charo IF. Decreased lesion formation in CCR2^{-/-} mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature.* 1998;394(6696):894-897.
304. Cybulsky MI, Gimbrone MA, Jr. Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. *Science.* 1991;251(4995):788-791.
305. Preiss DJ, Sattar N. Vascular cell adhesion molecule-1: a viable therapeutic target for atherosclerosis? *Int J Clin Pract.* 2007;61(4):697-701.
306. Marchesi C, Paradis P, Schiffrin EL. Role of the renin-angiotensin system in vascular inflammation. *Trends Pharmacol Sci.* 2008;29(7):367-374.
307. Cianchetti S, Del Fiorentino A, Colognato R, Di Stefano R, Franzoni F, Pedrinelli R. Anti-inflammatory and anti-oxidant properties of telmisartan in cultured human umbilical vein endothelial cells. *Atherosclerosis.* 2008;198(1):22-28.
308. Hattori Y, Suzuki K, Hattori S, Kasai K. Metformin inhibits cytokine-induced nuclear factor kappaB activation via AMP-activated protein kinase activation in vascular endothelial cells. *Hypertension.* 2006;47(6):1183-1188.
309. Simmons DL, Botting RM, Hla T. Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. *Pharmacol Rev.* 2004;56(3):387-437.
310. Morinelli TA, Kendall RT, Luttrell LM, Walker LP, Ullian ME. Angiotensin II-induced Cyclooxygenase 2 Expression in Rat Aorta Vascular Smooth Muscle Cells Does Not Require Heterotrimeric G Protein Activation. *J Pharmacol Exp Ther.* 2009.
311. Hadad SM, Fleming S, Thompson AM. Targeting AMPK: a new therapeutic opportunity in breast cancer. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2008;67(1):1-7.
312. Nathan C, Xie QW. Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. *Cell.* 1994;78(6):915-918.
313. Jhun BS, Jin Q, Oh YT, Kim SS, Kong Y, Cho YH, Ha J, Baik HH, Kang I. 5-Aminoimidazole-4-carboxamide riboside suppresses lipopolysaccharide-induced TNF-alpha production through inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt activation in RAW 264.7 murine macrophages. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;318(2):372-380.
314. Pilon G, Dallaire P, Marette A. Inhibition of inducible nitric-oxide synthase by activators of AMP-activated protein kinase: a new mechanism of action of insulin-sensitizing drugs. *J Biol Chem.* 2004;279(20):20767-20774.
315. Kuo CL, Ho FM, Chang MY, Prakash E, Lin WW. Inhibition of lipopolysaccharide-induced inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 gene expression by 5-aminoimidazole-4-carboxamide riboside is independent of AMP-activated protein kinase. *J Cell Biochem.* 2008;103(3):931-940.
316. Wang Y, Gao E, Tao L, Lau WB, Yuan Y, Goldstein BJ, Lopez BL, Christopher TA, Tian R, Koch W, Ma XL. AMP-activated protein kinase deficiency enhances myocardial ischemia/reperfusion injury but has minimal effect on the antioxidant/antinitrative protection of adiponectin. *Circulation.* 2009;119(6):835-844.
317. Hakem R, Hakem A, Duncan GS, Henderson JT, Woo M, Soengas MS, Elia A, de la Pompa JL, Kagi D, Khoo W, Potter J, Yoshida R, Kaufman SA, Lowe SW, Penninger

- JM, Mak TW. Differential requirement for caspase 9 in apoptotic pathways in vivo. *Cell*. 1998;94(3):339-352.
318. Kuida K, Haydar TF, Kuan CY, Gu Y, Taya C, Karasuyama H, Su MS, Rakic P, Flavell RA. Reduced apoptosis and cytochrome c-mediated caspase activation in mice lacking caspase 9. *Cell*. 1998;94(3):325-337.
319. Salt I, Celler JW, Hawley SA, Prescott A, Woods A, Carling D, Hardie DG. AMP-activated protein kinase: greater AMP dependence, and preferential nuclear localization, of complexes containing the alpha2 isoform. *Biochem J*. 1998;334 (Pt 1):177-187.
320. Yoshida H, Kong YY, Yoshida R, Elia AJ, Hakem A, Hakem R, Penninger JM, Mak TW. Apaf1 is required for mitochondrial pathways of apoptosis and brain development. *Cell*. 1998;94(6):739-750.
321. Pearson HB, Pheasant TJ, Clarke AR. K-ras and Wnt signaling synergize to accelerate prostate tumorigenesis in the mouse. *Cancer Res*. 2009;69(1):94-101.
322. Guo RW, Yang LX, Li MQ, Liu B, Wang XM. Angiotensin II induces NF-kappa B activation in HUVEC via the p38MAPK pathway. *Peptides*. 2006;27(12):3269-3275.
323. Faissner A, Heck N, Dobbertin A, Garwood J. DSD-1-Proteoglycan/Phosphacan and receptor protein tyrosine phosphatase-beta isoforms during development and regeneration of neural tissues. *Adv Exp Med Biol*. 2006;557:25-53.
324. Ramaswamy S, Nakamura N, Vazquez F, Batt DB, Perera S, Roberts TM, Sellers WR. Regulation of G1 progression by the PTEN tumor suppressor protein is linked to inhibition of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(5):2110-2115.
325. Yang Y, Zhu X, Chen Y, Wang X, Chen R. p38 and JNK MAPK, but not ERK1/2 MAPK, play important role in colchicine-induced cortical neurons apoptosis. *European Journal of Pharmacology*. 2007;576(1-3):26-33.
326. Nuntharatanapong N, Chen K, Sinhaseni P, Keaney JF, Jr. EGF receptor-dependent JNK activation is involved in arsenite-induced p21Cip1/Waf1 upregulation and endothelial apoptosis. *American Journal of Physiology - Heart & Circulatory Physiology*. 2005;289(1):H99-H107.
327. Gottlieb E, Vander Heiden MG, Thompson CB. Bcl-x(L) prevents the initial decrease in mitochondrial membrane potential and subsequent reactive oxygen species production during tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis. *Mol Cell Biol*. 2000;20(15):5680-5689.
328. Buhl ES, Jessen N, Pold R, Ledet T, Flyvbjerg A, Pedersen SB, Pedersen O, Schmitz O, Lund S. Long-term AICAR administration reduces metabolic disturbances and lowers blood pressure in rats displaying features of the insulin resistance syndrome. *Diabetes*. 2002;51(7):2199-2206.
329. <http://de.wikipedia.org/wiki/Diabetes>. Diabetes Mellitus. 19.05.09.
330. Bailey DM, Young IS, McEneny J, Lawrenson L, Kim J, Barden J, Richardson RS. Regulation of free radical outflow from an isolated muscle bed in exercising humans. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004;287(4):H1689-1699.
331. Lee WJ, Kim M, Park HS, Kim HS, Jeon MJ, Oh KS, Koh EH, Won JC, Kim MS, Oh GT, Yoon M, Lee KU, Park JY. AMPK activation increases fatty acid oxidation in skeletal muscle by activating PPARalpha and PGC-1. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;340(1):291-295.
332. Nigro J, Osman N, Dart AM, Little PJ. Insulin resistance and atherosclerosis. *Endocr Rev*. 2006;27(3):242-259.

333. Bergeron R, Ren JM, Cadman KS, Moore IK, Perret P, Pypaert M, Young LH, Semenkovich CF, Shulman GI. Chronic activation of AMP kinase results in NRF-1 activation and mitochondrial biogenesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2001;281(6):E1340-1346.
334. Trebak JT, Birk JB, Rose AJ, Kiens B, Richter EA, Wojtaszewski JF. AS160 phosphorylation is associated with activation of alpha2beta2gamma1- but not alpha2beta2gamma3-AMPK trimeric complex in skeletal muscle during exercise in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2007;292(3):E715-722.
335. Trebak JT, Glund S, Deshmukh A, Klein DK, Long YC, Jensen TE, Jorgensen SB, Viollet B, Andersson L, Neumann D, Wallimann T, Richter EA, Chibalin AV, Zierath JR, Wojtaszewski JF. AMPK-mediated AS160 phosphorylation in skeletal muscle is dependent on AMPK catalytic and regulatory subunits. *Diabetes.* 2006;55(7):2051-2058.
336. Koo SH, Flechner L, Qi L, Zhang X, Sreaton RA, Jeffries S, Hedrick S, Xu W, Boussoar F, Brindle P, Takemori H, Montminy M. The CREB coactivator TORC2 is a key regulator of fasting glucose metabolism. *Nature.* 2005;437(7062):1109-1111.
337. Lochhead PA, Salt IP, Walker KS, Hardie DG, Sutherland C. 5-aminoimidazole-4-carboxamide riboside mimics the effects of insulin on the expression of the 2 key gluconeogenic genes PEPCK and glucose-6-phosphatase. *Diabetes.* 2000;49(6):896-903.
338. Giri S, Nath N, Smith B, Viollet B, Singh AK, Singh I. 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-4-ribofuranoside inhibits proinflammatory response in glial cells: a possible role of AMP-activated protein kinase. *J Neurosci.* 2004;24(2):479-487.
339. Brunmair B, Staniek K, Gras F, Scharf N, Althaym A, Clara R, Roden M, Gnaiger E, Nohl H, Waldhausl W, Fornsinn C. Thiazolidinediones, like metformin, inhibit respiratory complex I: a common mechanism contributing to their antidiabetic actions? *Diabetes.* 2004;53(4):1052-1059.
340. Fryer LG, Parbu-Patel A, Carling D. The Anti-diabetic drugs rosiglitazone and metformin stimulate AMP-activated protein kinase through distinct signaling pathways. *J Biol Chem.* 2002;277(28):25226-25232.
341. Hardie DG. AMP-activated protein kinase as a drug target. *Annual Review of Pharmacology & Toxicology.* 2007;47:185-210.
342. Katakam PV, Ujhelyi MR, Hoenig M, Miller AW. Metformin improves vascular function in insulin-resistant rats. *Hypertension.* 2000;35(1 Pt 1):108-112.
343. Kahn BB, Alquier T, Carling D, Hardie DG. AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. *Cell Metab.* 2005;1(1):15-25.
344. Evans AM, Mustard KJ, Wyatt CN, Peers C, Dipp M, Kumar P, Kinnear NP, Hardie DG. Does AMP-activated protein kinase couple inhibition of mitochondrial oxidative phosphorylation by hypoxia to calcium signaling in O₂-sensing cells? *J Biol Chem.* 2005;280(50):41504-41511.
345. Hallows KR, Kobinger GP, Wilson JM, Witters LA, Foskett JK. Physiological modulation of CFTR activity by AMP-activated protein kinase in polarized T84 cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2003;284(5):C1297-1308.
346. Jager S, Handschin C, St-Pierre J, Spiegelman BM. AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(29):12017-12022.
347. Viollet B, Foretz M, Guigas B, Horman S, Dentin R, Bertrand L, Hue L, Andreelli F. Activation of AMP-activated protein kinase in the liver: a new strategy for the management of metabolic hepatic disorders. *J Physiol.* 2006;574(Pt 1):41-53.

348. Warden SM, Richardson C, O'Donnell J, Jr., Stapleton D, Kemp BE, Witters LA. Post-translational modifications of the beta-1 subunit of AMP-activated protein kinase affect enzyme activity and cellular localization. *Biochem J.* 2001;354(Pt 2):275-283.
349. Zhang Y, Lee TS, Kolb EM, Sun K, Lu X, Sladek FM, Kassab GS, Garland T, Jr., Shyy JY. AMP-activated protein kinase is involved in endothelial NO synthase activation in response to shear stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006;26(6):1281-1287.
350. Zou MH, Wu Y. AMP-activated protein kinase activation as a strategy for protecting vascular endothelial function. *Clinical & Experimental Pharmacology & Physiology.* 2008;35(5-6):535-545.
351. Towler MC, Hardie DG. AMP-activated protein kinase in metabolic control and insulin signaling. *Circ Res.* 2007;100(3):328-341.
352. Winder WW, Thomson DM. Cellular energy sensing and signaling by AMP-activated protein kinase. *Cell Biochem Biophys.* 2007;47(3):332-347.
353. Hardie DG. The AMP-activated protein kinase pathway--new players upstream and downstream. *J Cell Sci.* 2004;117(Pt 23):5479-5487.
354. McGee SL, Hargreaves M. AMPK and transcriptional regulation. *Front Biosci.* 2008;13:3022-3033.
355. Berg CP, Engels IH, Rothbart A, Lauber K, Renz A, Schlosser SF, Schulze-Osthoff K, Wesselborg S. Human mature red blood cells express caspase-3 and caspase-8, but are devoid of mitochondrial regulators of apoptosis. *Cell Death Differ.* 2001;8(12):1197-1206.
356. Brand VB, Sandu CD, Durantou C, Tanneur V, Lang KS, Huber SM, Lang F. Dependence of Plasmodium falciparum in vitro growth on the cation permeability of the human host erythrocyte. *Cell Physiol Biochem.* 2003;13(6):347-356.
357. Bratosin D, Estaquier J, Petit F, Arnoult D, Quatannens B, Tissier JP, Slomianny C, Sartiaux C, Alonso C, Huart JJ, Montreuil J, Ameisen JC. Programmed cell death in mature erythrocytes: a model for investigating death effector pathways operating in the absence of mitochondria. *Cell Death Differ.* 2001;8(12):1143-1156.
358. Daugas E, Cande C, Kroemer G. Erythrocytes: death of a mummy. *Cell Death Differ.* 2001;8(12):1131-1133.
359. Lang PA, Warskulat U, Heller-Stilb B, Huang DY, Grenz A, Myssina S, Duszenko M, Lang F, Haussinger D, Vallon V, Wieder T. Blunted apoptosis of erythrocytes from taurine transporter deficient mice. *Cell Physiol Biochem.* 2003;13(6):337-346.
360. Foller M, Sopjani M, Koka S, Gu S, Mahmud H, Wang K, Floride E, Schleicher E, Schulz E, Munzel T, Lang F. Regulation of erythrocyte survival by AMP-activated protein kinase. *Faseb J.* 2009;23(4):1072-1080.
361. Anand IS, Chandrashekhar Y. Reduced inhibition of endothelial-derived relaxing factor causes the hyperdynamic circulation in chronic severe anemia. *Med Hypotheses.* 1993;41(3):225-228.
362. Anand IS, Chandrashekhar Y, Wander GS, Chawla LS. Endothelium-derived relaxing factor is important in mediating the high output state in chronic severe anemia. *J Am Coll Cardiol.* 1995;25(6):1402-1407.
363. Anand IS, Kuskowski MA, Rector TS, Florea VG, Glazer RD, Hester A, Chiang YT, Aknay N, Maggioni AP, Opasich C, Latini R, Cohn JN. Anemia and change in hemoglobin over time related to mortality and morbidity in patients with chronic heart failure: results from Val-HeFT. *Circulation.* 2005;112(8):1121-1127.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Swenja Schuhmacher

Geburtsdatum:

Geburtsort:

Nationalität:

Familienstand:

Schule

Juni 1999

August 1990 bis Juni 1999

August 1986 bis Juli 1990

Studium

November 2005

Dezember 2004 bis Oktober 2005

Oktober 1999 November 2005

Promotion

Februar 2006

Danksagung

Ich danke vor allen anderen Medizinischen Klinik
der Universitätsmedizin Mainz, für die Überlassung des Themas und die Betreuung bei der
Bearbeitung. Seine äusserst wohlwollende Unterstützung bei der experimentellen Durchfüh-
rung und seine stets vorhandene Diskussionsbereitschaft bei der Auswertung meiner Untersu-
chungen haben mich während der gesamten Zeit begleitet. Die stetige Hilfsbereitschaft und
der Rat dieses erfahrenen Wissenschaftlers sind für das Gelingen dieser Arbeit verantwortlich
und dafür gilt mein besonderer Dank!

Mein Dank gilt ebenfalls Medizinischen Klinik der Uni-
versitätsmedizin Mainz – Labor für Molekulare Kardiologie, der mir neben Labor und Gerät-
schaften auch sein außerordentliches methodisches Wissen und seine vollste Unterstützung
während der gesamten Zeit zur Verfügung gestellt hat. Seine Diskussionsbereitschaft, die
Antworten und Vorschläge haben die Durchführung dieses Projektes enorm erleichtert und
vorangetrieben.

Institut für Zoologie, Abteilung II: Molekulare Tierphysio-
logie danke ich für die Unterstützung und Betreuung der Arbeit als Vertreter des Fachbereichs
Biologie. Durch seine Hilfe, Anregungen und Tipps hat er zur Fertigstellung dieser Arbeit
maßgeblich beigetragen.

Als Projektleiter möchte ich für die immer angenehme Zusammenarbeit,
die stetige enorme Unterstützung, die größtmögliche Hilfsbereitschaft, Geduld und Motivati-
on von ganzem Herzen danken. Die hervorragende Betreuung des gesamten Projektes von
seiner Seite, machte die Durchführung und Fertigstellung des Projektes und dieser Arbeit erst
möglich.

Ferner möchte ich mich bei den Mitarbeitern

für eine nette Arbeitsatmosphäre, Hilfestellungen, Vorschläge und Antworten herzlich bedan-
ken. Auch sie haben die Durchführung des Projektes entschieden erleichtert.

Von ganzem Herzen danke ich für die wunderbare Unterstützung während dieser gesamten Zeit! Sie verstanden es, mich auch in schweren Zeiten an meinem Ziel festhalten zu lassen. Für deren Geduld und die andauernde moralische Unterstützung möchte ich mich von ganzem Herzen bedanken!

Molecular Cardiology

Suppression of the JNK Pathway by Induction of a Metabolic Stress Response Prevents Vascular Injury and Dysfunction

Eberhard Schulz, MD*; Jörn Dopheide, MD*; Swenja Schuhmacher, BS; Shane R. Thomas, PhD; Kai Chen, MD, PhD; Andreas Daiber, PhD; Philip Wenzel, MD; Thomas Münzel, MD; John F. Keane, Jr, MD

Background—Oxidative injury and dysfunction of the vascular endothelium are early and causal features of many vascular diseases. Single antioxidant strategies to prevent vascular injury have met with mixed results.

Methods and Results—Here, we report that induction of a metabolic stress response with adenosine monophosphate kinase (AMPK) prevents oxidative endothelial cell injury. This response is characterized by stabilization of the mitochondrion and increased mitochondrial biogenesis, resulting in attenuation of oxidative c-Jun N-terminal kinase (JNK) activation. We report that peroxisome proliferator coactivator 1 α is a key downstream target of AMPK that is both necessary and sufficient for the metabolic stress response and JNK attenuation. Moreover, induction of the metabolic stress response in vivo attenuates reactive oxygen species-mediated JNK activation and endothelial dysfunction in response to angiotensin II in wild-type mice but not in animals lacking either the endothelial isoform of AMPK or peroxisome proliferator coactivator 1 α .

Conclusion—These data highlight AMPK and peroxisome proliferator coactivator 1 α as potential therapeutic targets for the amelioration of endothelial dysfunction and, as a consequence, vascular disease. (*Circulation*. 2008;118:1347-1357.)

Key Words: angiotensin ■ endothelium ■ hypertension ■ metabolism

The vascular endothelium mediates local tissue homeostasis through the regulation of blood flow, coagulation, and trafficking of both macromolecules and inflammatory cells.¹ Dysfunction of the endothelium is an early feature of chronic diseases such as atherosclerosis and diabetes, and the presence of endothelial dysfunction predicts future vascular consequences.^{2,3} These chronic vascular diseases exhibit excess ambient levels of reactive oxygen species (ROS) in the vascular wall that contribute to endothelial injury and dysfunction.⁴ Attempts to limit endothelial injury and vascular disease via exogenous ROS scavengers have not been proven effective in clinical settings,⁵ indicating that the mechanisms of oxidative endothelial injury are not well defined.

Clinical Perspective p 1357

One means of cellular protection against injury is caloric restriction; ample data indicate that this intervention not only extends the lifespan of model organisms but also reduces the risk of chronic degenerative diseases.⁶ However, the exact

mechanisms responsible for these effects have not been fully elucidated. Recent efforts in model systems have uncovered a number of caloric restriction “mimetics” that have proved useful in studying metabolic stress. Among these compounds are 2-deoxy glucose and metformin.⁷ The former is a non-metabolizable form of glucose that inhibits the phosphohexose isomerase enzyme and extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*.⁶ Metformin is a drug for improving insulin resistance that induces changes in metabolism and changes in gene expression that closely parallel caloric restriction.⁶ The specific mechanism(s) whereby caloric restriction and its mimetics provide cellular protection and longevity are not yet clear.

Among the pathways sensitive to nutrient deprivation is the adenosine monophosphate (AMP)-activated protein kinase (AMPK). This ubiquitous kinase is a heterotrimeric enzyme consisting of α , β , and γ subunits that is sensitive to the cellular AMP:ATP ratio and consequently plays a pivotal role in cellular adaptation to energy stress.⁸ Activation of

Received April 8, 2008; accepted July 10, 2008.

From the Department of Cardiology, 2nd Medical Clinic of the University Hospital Mainz, Johannes Gutenberg University, Mainz, Germany (E.S., J.D., S.S., A.D., P.W., T.M.), and Division of Cardiovascular Medicine, Department of Medicine, University of Massachusetts Medical School, Worcester, Mass (S.R.T., K.C., J.F.K.).

*The first 2 authors contributed equally to this work.

Guest Editor for this article was Aruni Bhatnagar, PhD.

The online-only Data Supplement is available with this article at <http://circ.ahajournals.org/cgi/content/full/CIRCULATIONAHA.108.784298/DC1>. Correspondence to Eberhard Schulz, MD, Department of Cardiology, Johannes Gutenberg University, 55101 Mainz, Germany. E-mail dreberhard.schulz@nexgo.de

© 2008 American Heart Association, Inc.

Circulation is available at <http://circ.ahajournals.org>

DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.108.784298

1348 *Circulation* September 23, 2008

AMPK attenuates anabolic processes such as the synthesis of proteins, fatty acids, and cholesterol, and it stimulates ATP-generating catabolic pathways.⁹ Accordingly, downstream targets of AMPK include key enzymes of glucose and lipid metabolism,¹⁰ mitochondrial enzymes,¹¹ and transcriptional coactivators controlling mitochondrial biogenesis.¹² The precise role of AMPK and its molecular targets in more generalized stress responses, however, is not well defined.⁸ Therefore, the purpose of this study was to examine the implications of AMPK in mediating the response to oxidative stress, a key feature of many chronic diseases.

Methods

Materials

Cell culture reagents were obtained from Invitrogen (Carlsbad, Calif) and Cambrex (East Rutherford, NJ). 5-Aminoimidazole-4-carboxamide riboside (AICAR) was obtained from Toronto Research Chemicals (Toronto, Canada). Tumor necrosis factor alpha- α (TNF- α) was purchased from R&D systems (Minneapolis, Minn). Compound C was a kind gift from Merck. Polyclonal antibodies against phospho-AMPK (Thr-172), α -AMPK, and phospho-acetyl CoA carboxylase (ACC; Ser-79) were from Cell Signaling Technology (Beverly, Mass). We obtained antibodies for catalase and mitochondrial transcription factor A from Abcam (Cambridge, Mass) and the heme oxygenase-1 antibody from Stressgen (Victoria, BC, Canada). Antibodies against ACC, α_1 -AMPK, α_2 -AMPK, superoxide dismutase (SOD) 1, and SOD2 were from Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY), as well as the small interfering RNA (siRNA) constructs SMARTPool with controls. [³²P]-ATP (250 μ Ci, 10 mCi/mL) was obtained from Perkin Elmer Life Sciences (Boston, Mass). Dihydrorhodamine, JC-1, nonyl acridine orange (NAO), and MitoTracker Green FM were purchased from Molecular Probes (Eugene, Ore). Lipopolysaccharide (*Escherichia coli* serotype 0128:B12) and all other reagents were obtained from Sigma (St Louis, Mo).

Adenoviruses

The adenoviral vector expressing a dominant-negative α_2 -AMPK mutant was a kind gift of Dr Morris J. Birnbaum (University of Pennsylvania).¹³ The adenoviral vector expressing PGC-1 α was a kind gift by Dr Bruce M. Spiegelman (Dana-Farber Cancer Institute). Cells were typically infected at a multiplicity of infection of 10 to 50, and control adenovirus consisted of a LacZ construct at the same multiplicity of infection.

Cell Culture

Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were cultured in EGM-2 medium (Clonetics) with all supplements and used between passages 3 and 6. Four hours before AMPK activation, HUVECs were cultivated in a reduced-serum medium containing 0.4% FBS with all EGM-2 supplements in a 1:5 dilution. COS-7 cells were cultured in DMEM (Gibco, Invitrogen) supplemented with 10% FBS, 2 mmol/L L-glutamine, 100 U/mL penicillin, and 100 μ g/mL streptomycin. For experiments, confluent cells were used on either 6-well or 12-well plates. Porcine aortic endothelial cells (PAECs) were cultured as described.¹⁴ Overnight, AICAR (1 mmol/L) or metformin (5 mmol/L) treatment was directly added to the cell medium, and before H₂O₂ exposure, cells were washed in HEPES-buffered physiological salt solution (PSS) as described.¹⁴

Cellular ATP Content and AMPK Activity Assay

Measurement of ATP was performed with the bioluminescent somatic cell assay kit (Sigma) according to instructions. Determination of AMPK catalytic activity was performed by incorporation of [³²P] into the specific AMPK target sequence HMRSAMSGHLVKRR (SAMS peptide) as described previously.¹⁵

Mitochondrial ROS Production

Mitochondrial ROS production was assessed by measuring dihydrorhodamine 123 fluorescence. After treatments, PAECs were washed and incubated for 30 minutes with 10 μ mol/L dihydrorhodamine in PSS, washed in PSS, and treated with 200 μ mol/L H₂O₂ for 30 minutes. Cells were then washed, scraped in ice-cold PBS, and dispersed by repeated pipetting, and aliquots were added to either coverslips or 96-well plates. Dihydrorhodamine fluorescence was assessed with a fluorescent plate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, Calif) with excitation at 480 nm and emission at 535 nm.

Mitochondrial Membrane Potential

Mitochondrial membrane potential was estimated by fluorescence of JC-1 aggregates that are formed as a function of inner mitochondrial membrane potential.¹⁶ PAECs were washed twice with PSS, equilibrated for 30 minutes, and then treated with H₂O₂ or vehicle for 1 hour. After treatment, cells were carefully washed 2 times and incubated with 2.5 μ g/mL JC-1 for 15 minutes in PSS, washed 3 times in PSS, and subjected to fluorescence (for red fluorescence: excitation, 550 nm; emission, 600 nm; for green fluorescence: excitation, 485 nm; emission, 535 nm) ratio detection.

Transcriptional Activation Assays and Immunoblotting

All experiments were performed with the Dual Luciferase Reporter Assay (Promega, San Luis Obispo, Calif) with an internal Renilla-luciferase control plasmid to normalize for transfection efficiencies. COS-7 cells were transiently transfected for 40 hours with the human mitochondrial transcription factor A luciferase promoter as described.¹⁷ Immunoblotting was performed as previously described.¹⁴

Cell Death Assays

PAECs in 12-well plates were treated with vehicle, AICAR, or metformin overnight in regular medium. Cells were then kept in HEPES-buffered PSS (30 minutes) and exposed to increasing concentrations of H₂O₂ for 2 hours. For the lactate dehydrogenase (LDH) release assay, we used the cytotoxicity detection kit (Roche Applied Science, Indianapolis, Ind) normalized to 1 well treated with 1% Triton X-100 for maximum LDH release. Cell viability was also assessed by the CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega) following the manufacturer's instructions. Briefly, the tetrazolium compound 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt (MTS) is bio-reduced by metabolically active cells into a formazan product and can be measured by the amount of 490 nm absorbance in the tissue media.

Mitochondrial Mass Determination

Mitochondrial mass was estimated by fluorescence of NAO or MitoTracker Green FM, both mitochondrial specific dyes, independently of the mitochondrial membrane potential.^{18,19} After various treatments, HUVECs were washed twice with PBS and then incubated in full growth medium including 100 nmol/L NAO or MitoTracker Green FM for 30 minutes at 37°C and 5% CO₂. After 3 washes, cells were subjected to fluorescence detection (for MitoTracker Green FM: excitation, 490 nm; emission, 516 nm; for NAO: excitation, 495 nm; emission, 519 nm) as an indicator of mitochondrial mass.

Gene Silencing by siRNA

Double-stranded RNAi was transfected into cells with RNAiFect (Qiagen, Valencia, Calif). After 72 hours of transfection, cells were incubated with 1 mmol/L AICAR overnight for chronic AMPK activation. Then, 100 μ mol/L H₂O₂ for 2 hours was applied to the cells for cell death and cell survival assays. Scrambled RNAi (Upstate Biotechnology Inc, Waltham, Mass) was used as control.

Experimental Animals

Animal experiments were in accordance with the Declaration of Helsinki and National Institutes of Health guidelines and were

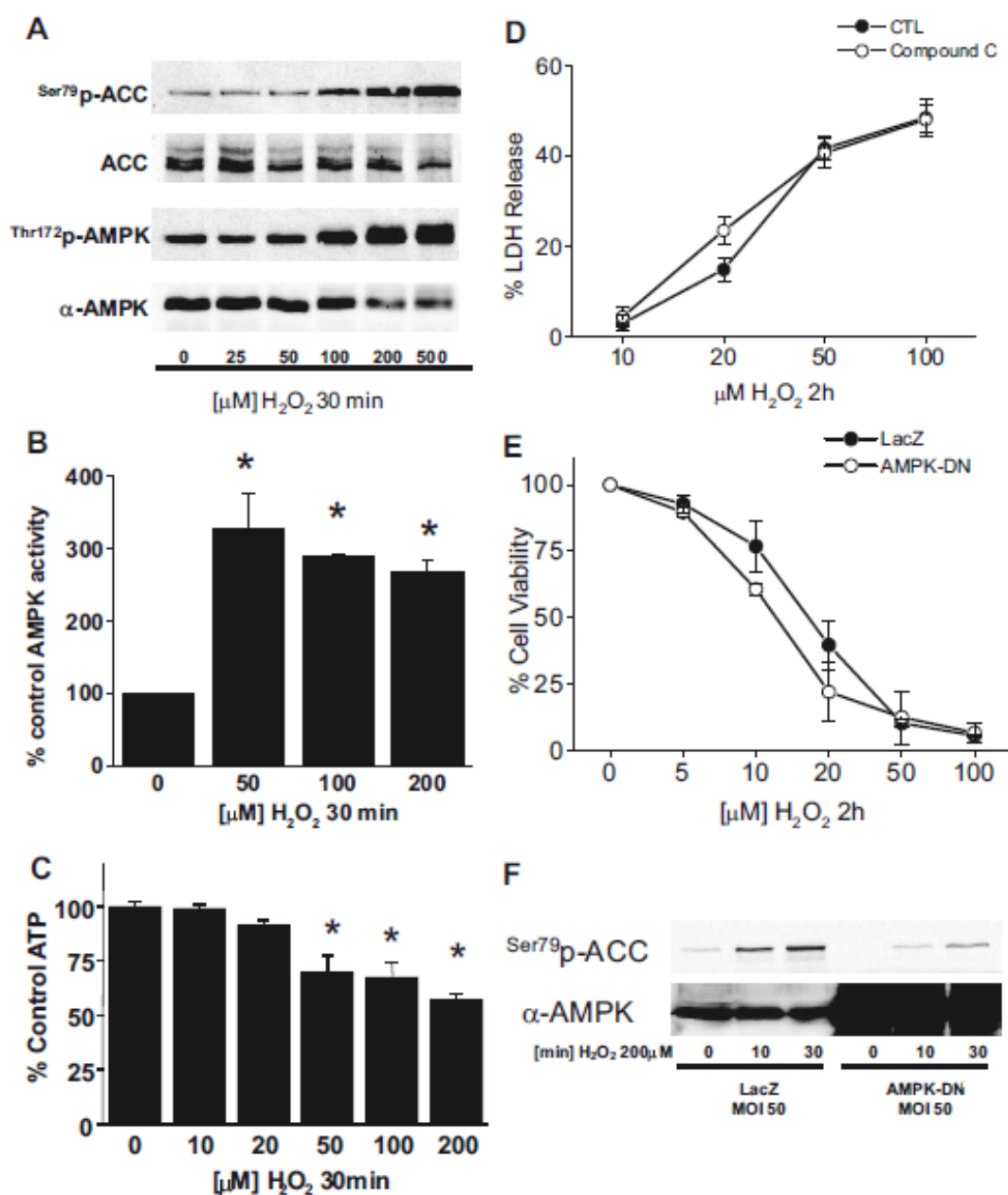


Figure 1. Peroxide induces AMPK activation in endothelium. PAECs in 6-well plates were exposed to H₂O₂ as indicated and lysed, and the lysates were probed for (A) phosphorylation (p-) of AMPK and ACC, (B) AMPK activity, and (C) ATP content as described in Methods. PAECs were then treated with H₂O₂ as indicated after treatment with either the AMPK inhibitor compound C (20 μmol; D) or dominant-negative AMPK (AMPK-DN) adenovirus (E), and cell death or viability was determined by LDH release and MTS assay, respectively, as described in Methods. F, PAECs were treated with dominant-negative AMPK adenovirus and AMPK activation assessed after H₂O₂ exposure by phosphorylation of the AMPK target ACC. CTL indicates control.

performed with approval of the Ethics Committee of the University Hospital Mainz. To study in vivo AMPK activation by AICAR, we used male C57Bl6 mice. The mice were anesthetized by isoflurane inhalation and treated with a subcutaneous osmotic minipump (Alzet model 1007) containing either angiotensin II or solvent (NaCl 0.9%) for 7 days. Angiotensin infusion rate averaged 1 mg · kg⁻¹ · d⁻¹. Animals from both groups were randomized to receive either AICAR (200 mg · kg⁻¹ · d⁻¹) or vehicle (NaCl 0.9%) via subcutaneous injection once daily, starting at the time of the angiotensin II-containing minipump implantation. To probe the role of AMPK, we used 100 α1-AMPK knockout mice²⁰ and corresponding littermate wild-type mice (C57Bl6/129Sv/FVB-N background) as controls. To probe the role of PGC-1α, we used animals with severely diminished PGC-1α levels as described previously.²¹ In a second approach,

endothelial dysfunction was induced in wild-type mice by a single intraperitoneal injection of lipopolysaccharide (15 mg/kg), and the mice were killed 24 hours later. Mice were randomized to receive either AICAR (200 mg · kg⁻¹ · d⁻¹) or vehicle (NaCl 0.9%) via subcutaneous injection once daily, starting 2 days before lipopolysaccharide treatment. To dissect the role of AMPK, lipopolysaccharide/AICAR injections also were performed in α1-AMPK knockout mice. After all treatment protocols, animals were killed, and tissues were removed and subjected to further analysis.

Assessment of Endothelial Function and Superoxide

Endothelial function was assayed as endothelium-dependent arterial relaxation in segments of thoracic aorta as described previously.²²

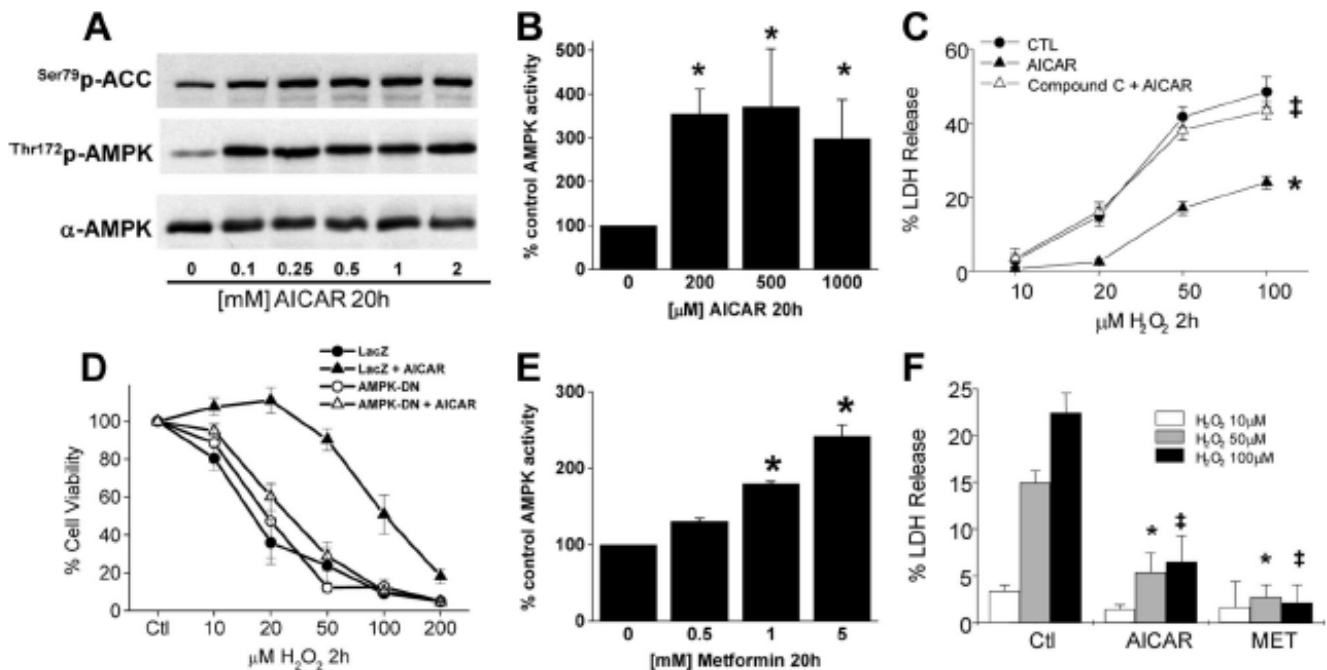


Figure 2. Chronic AMPK activation induces stress adaptation in endothelium. PAECs in 6-well plates were exposed to AICAR as indicated and lysed, and the lysates were probed for (A) phosphorylation (p-) of AMPK and ACC and (B) AMPK activity. * $P < 0.05$ vs 0 $\mu\text{mol/L}$ by 1-way ANOVA and Dunnett's test. PAECs were treated with either 20 $\mu\text{mol/L}$ compound C (C) or dominant-negative AMPK (AMPK-DN) adenovirus (D) before a 20-hour exposure to 1 mmol/L AICAR. * $P < 0.05$ vs control, † $P < 0.05$ vs AICAR by 2-way ANOVA. Cells were then treated with H_2O_2 , and either cell death or viability was determined as indicated by LDH release or MTS assay, respectively. E, PAECs were treated with metformin as indicated, and AMPK activity was determined in cell lysates as ^{32}P incorporation into the SAMS peptide as described in Methods. * $P < 0.05$ vs 0 mmol/L by 1-way ANOVA with a posthoc Dunnett test. F, PAECs were treated with 1 mmol/L metformin or AICAR before a 2-hour exposure to H_2O_2 as indicated, and cell death was determined by LDH release. * $P < 0.05$ vs control (CTL) 50 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 ; † $P < 0.05$ vs control 100 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 both by 1-way ANOVA with a posthoc Dunnett test.

Vascular superoxide was estimated with dihydroethidium staining,²³ and NADPH-oxidase activity was estimated in heart membrane fractions as described.²²

Statistical Analysis

All immunoblots are representative of 3 to 4 independent experiments. Numerical data are presented as mean \pm SEM. Comparisons among treatment groups were performed with 1-way ANOVA and an appropriate posthoc Dunnett or Tukey comparison. Statistical significance was accepted if the null hypothesis was rejected with values of $P < 0.05$.

All authors had full access to and take full responsibility for the integrity of the data. All authors have read and agree to the manuscript as written.

Results

Peroxide Induces AMPK Activation in the Endothelium

Because AMPK isoform composition is known to affect its function in various cell types,^{24,25} we used reverse-transcriptase polymerase chain reaction and immunoblotting to determine that endothelial cells almost exclusively harbor the α_1 catalytic isoform (Figures 1A and 1B of the online Data Supplement). There is also a predominance of the β_1 and γ_2 isoforms (Figure 1A). We then treated endothelial cells with H_2O_2 and observed concentration-dependent AMPK activation as assessed by Western blot and AMPK activity assay (Figure 1A and 1B). Inhibitors targeting phosphoinositide 3-kinase, protein kinase C, src-family kinases, general tyrosine kinases, mitogen-activated protein kinases, or intracel-

lular calcium transients did not block H_2O_2 -induced AMPK activation (data not shown). We next examined cellular energy status and found that endothelial ATP levels decline rapidly after H_2O_2 exposure (Figure 1C), suggesting that AMPK activation is, at least in part, mediated by the resulting rise in cellular AMP that can allosterically activate AMPK.²⁶

To determine whether AMPK activation promotes survival, we inhibited H_2O_2 -mediated AMPK activation with compound C but observed no impact on cell death (Figure 1D). Similarly, overexpression of a dominant-negative AMPK mutant had no impact on H_2O_2 -mediated cell death (Figure 1E) despite significant inhibition of AMPK activation (Figure 1F). These data indicate that acute AMPK activation has limited implications for endothelial cell death in response to H_2O_2 .

Chronic AMPK Activation Induces Stress Adaptation in Endothelium

We were able to elicit sustained endothelial cell AMPK activation with AICAR treatment over 20 hours on the basis of AMPK activity and phosphorylation of its downstream target, ACC (Figure 2A and 2B). This chronic AMPK activation before H_2O_2 challenge produced a significant attenuation in the response to H_2O_2 that was reversed by either pharmacological (Figure 2C) or molecular (Figure 2D) inhibition of AMPK. Shorter AICAR treatment for 30 minutes or 4 hours did not mimic the effects observed with a 20-hour treatment period (supplementary Figure II). To

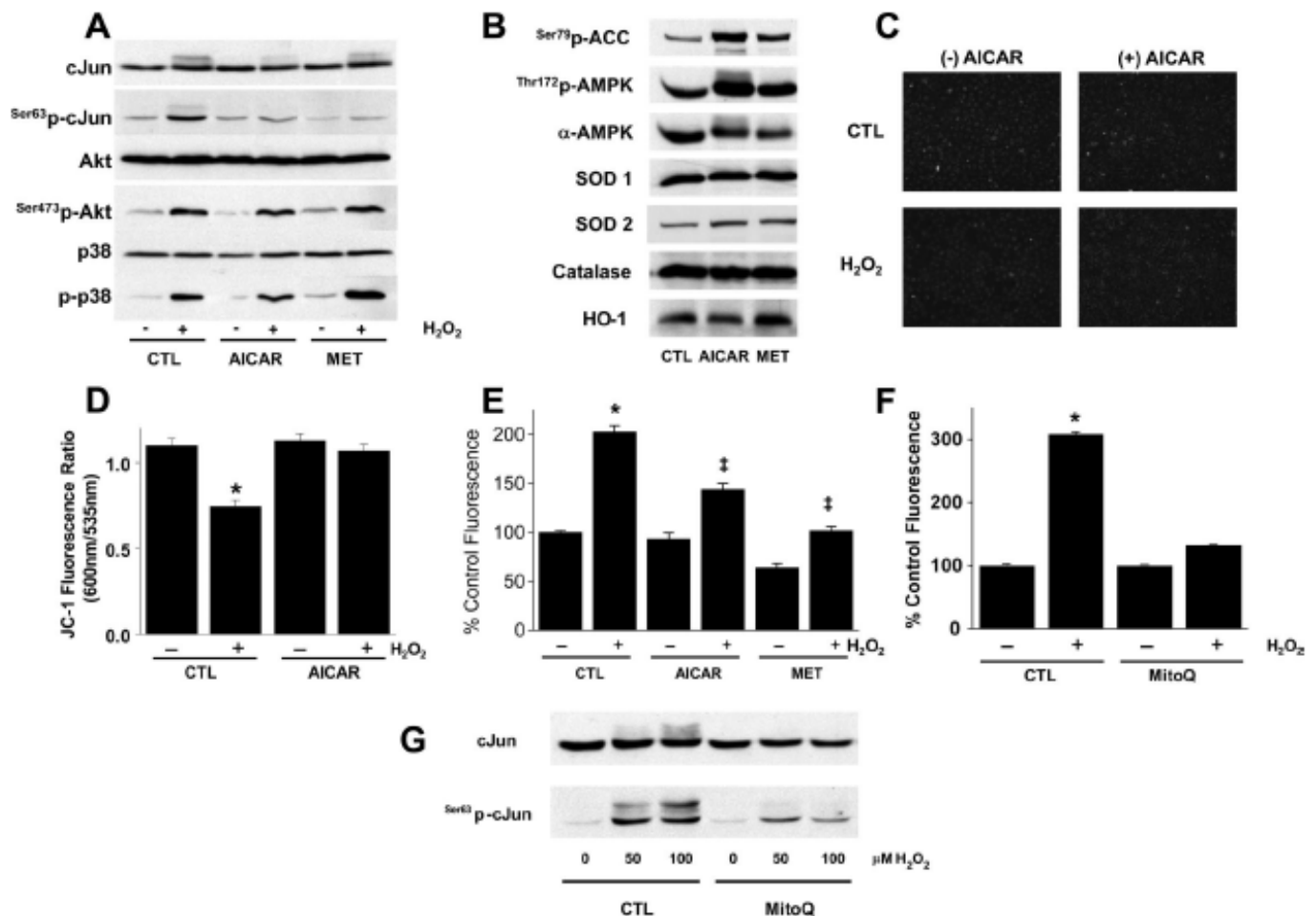


Figure 3. AMPK-mediated adaptation involves the mitochondrion. **A**, PAECs in 6-well plates were exposed to AICAR, metformin (MET), or buffer alone (CTL) as in Figure 2, followed by assessment of JNK, Akt, and p38 MAP kinase activation (p-) as described.²⁹ **B**, PAECs treated as in **A** were lysed, and the content of the indicated proteins was determined by immunoblotting. **C**, PAECs treated with AICAR as in **A** were washed and exposed to 100 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 (60 minutes) before loading with 2.5 $\mu\text{g/mL}$ JC-1 (final concentration) and then examined either qualitatively by microscopy (**C**) or quantitatively in a plate reader (**D**) for red (excitation, 550 nm; emission, 600 nm) and green (excitation, 485 nm; emission, 535 nm) fluorescence. Images are representative of 3 independent experiments, and quantitative analysis represents mean \pm SEM of 3 independent experiments. * $P < 0.05$ vs without H_2O_2 by 2-way ANOVA and a Tukey posthoc test. **E**, PAECs were treated as in **A** and loaded with 10 $\mu\text{mol/L}$ dihydrorhodamine before H_2O_2 treatment and fluorescence (excitation, 480 nm; emission, 535 nm) detection ($n=5$). † $P < 0.05$ vs control H_2O_2 treated by 2-way ANOVA and a Tukey test. **F**, PAECs were incubated with 1 μmol MitoQ as described¹⁴ before assessment of H_2O_2 -induced mitochondrial ROS (**F**) or H_2O_2 -induced JNK activation (**G**). Images are representative of $n=4$, * $P < 0.05$ vs no H_2O_2 .

determine the general nature of these findings, we chronically activated AMPK with the drug metformin (Figure 2E)²⁷ and observed a significant inhibition of H_2O_2 -induced cell death that was quantitatively similar to that observed with AICAR (Figure 2F). Thus, chronic AMPK activation attenuates H_2O_2 -induced endothelial cell death.

AMPK-Mediated Stress Adaptation Involves the Mitochondrion

Cell viability after H_2O_2 exposure is, in part, dictated by the relative activity of death versus survival pathways.²⁸ We probed Akt and mitogen-activated protein (MAP) kinase activation and found that AICAR and metformin had no impact on H_2O_2 -induced Akt or P38 MAP kinase activation (Figure 3A), whereas c-Jun N-terminal kinase (JNK) activation determined as c-Jun phosphorylation was abrogated by AMPK (Figure 3A).²⁹ We did not find any change in cytosolic antioxidant enzymes with AICAR or metformin;

however, we did detect a 30% to 40% increase in mitochondrial SOD (Figure 3B and supplementary Figure III).

Because JNK is a downstream component of mitochondrial death signals³⁰ and AMPK activation increased mitochondrial SOD, we explored the implications of chronic AMPK activation for mitochondrial response(s) to toxic stimuli. Endothelial cell H_2O_2 treatment reduced mitochondrial membrane potential, and chronic AMPK activation with AICAR (Figure 3C and 3D) or metformin (not shown) prevented this effect. Similarly, the H_2O_2 -induced mitochondrial ROS signal determined by dihydrorhodamine fluorescence was attenuated by chronic AMPK activation with either metformin or AICAR (Figure 3E). We also could mimic the effect of AICAR to suppress the mitochondrial ROS signal and JNK activation in response to H_2O_2 using the mitochondria-targeted antioxidant MitoQ^{14,31} (Figure 3F and 3G). Collectively, these data indicate that chronic AMPK activation modifies mitochondrial responses to H_2O_2 .

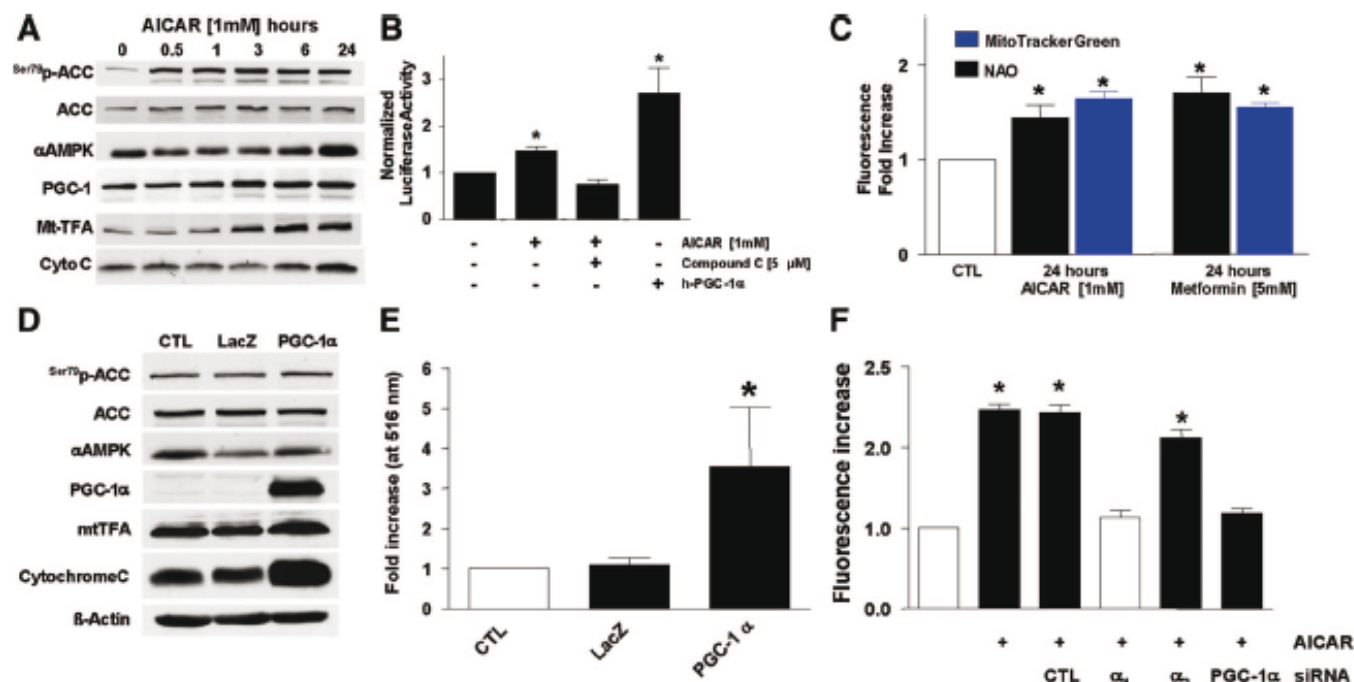


Figure 4. AMPK activation in endothelial cells induces PGC-1 α -dependent mitochondrial biogenesis. **A**, PAECs were exposed to AICAR as indicated, lysed, and subjected to immunoblotting for assessment of AMPK activation (p-ACC) and the levels of PGC-1 α and mitochondrial transcription factor A (Mt-TFA). **B**, BAECs were transfected with the Mt-TFA promoter linked to a luciferase reporter³² before incubation with AICAR with or without compound C, followed by assessment of luciferase activity. Adenoviral transfection of human PGC-1 α served as positive control (CTL). **C**, PAECs were incubated with AICAR or metformin as indicated, and mitochondrial mass was determined fluorometrically with MitoTracker Green or NAO as indicated (* P <0.05 vs control by 2-way ANOVA and Dunnett's test). HUVECs were transfected with adenoviral vectors expressing either β -galactosidase (LacZ) or human PGC-1 α . Cells were then lysed and assessed for the indicated proteins (**D**) or mitochondrial mass using MitoTracker (**E**; * P <0.05 vs control by 1-way ANOVA and Dunnett's test). **F**, HUVECs were treated with the indicated siRNA or buffer control for 72 hours before a 24-hour incubation with AICAR. Mitochondrial mass was then determined using MitoTracker Green. * P <0.05 vs no AICAR exposure.

Chronic AMPK Activation Induces PGC-1 α -Dependent Mitochondrial Biogenesis

One recognized link between AMPK and the mitochondrion is mitochondrial biogenesis¹² that appears dependent on PGC-1 α in many tissues.³² In agreement with these data, AICAR treatment increased the abundance of markers associated with mitochondrial biogenesis such as PGC-1 α , mitochondrial transcription factor A, and cytochrome c (Figure 4A and supplementary Figure IV). Consistent with this observation, AICAR treatment produced PGC-1 α -driven gene transcription assessed by the mitochondrial transcription factor A promoter linked to luciferase (Figure 4B).³² Similarly, chronic AMPK activation produced an increase in endothelial cell mitochondrial mass (Figure 4C), and this effect was recapitulated with adenoviral overexpression of PGC-1 α (Figure 4D and 4E). Finally, AICAR stimulation increased mitochondrial mass in an α_1 -AMPK- and PGC-1 α -dependent manner (Figure 4F). Collectively, these data indicate that chronic AMPK activation increases endothelial cell mitochondrial biogenesis and mass.

Stimulation of Mitochondrial Biogenesis Enhances Endothelial Cell Resistance to H₂O₂

The endothelial cell resistance to H₂O₂-induced death and dysfunction afforded by AMPK extended beyond H₂O₂ because TNF- α -induced cell death (measured as JNK activation; Figure 5A) also was inhibited by AMPK. Because we believed that the action of AICAR and metformin involved

the mitochondrion (Figure 3) and that AMPK facilitates mitochondrial biogenesis (Figure 4), we examined the link between mitochondrial biogenesis and endothelial cell resistance to stress. We found that AMPK activation reduced H₂O₂-induced cell death, and this response was recapitulated with PGC-1 α overexpression via adenoviral transfection (Figure 5B and 5C). The effect of AICAR against H₂O₂-mediated cell death was lost by siRNA-mediated suppression of either α_1 -AMPK or PGC-1 α (Figure 5D and 5E). We also found that overexpression of PGC-1 α selectively attenuates H₂O₂-induced JNK activation with preserved p38 MAP kinase activation (Figure 5F). In total, these data link stimulation of mitochondrial biogenesis to endothelial cell protection from cell death and indicate that PGC-1 α overexpression is both necessary and sufficient for this response.

In Vivo AMPK Activation Prevents Endothelial Dysfunction in a PGC-1 α -Dependent Manner

To determine whether our cell culture data are operative in vivo, we used a model of angiotensin infusion that produces vascular dysfunction, in part, through increased vascular oxidative stress via ROS production.³³ Accordingly, we induced endothelial dysfunction in mice with a 7-day infusion of angiotensin II. Aortas were harvested and examined for endothelial function as acetylcholine-induced endothelium-dependent arterial relaxation. We found that angiotensin II-induced endothelial dysfunction (Figure 6A) was characterized by an increased superoxide signal in media of the

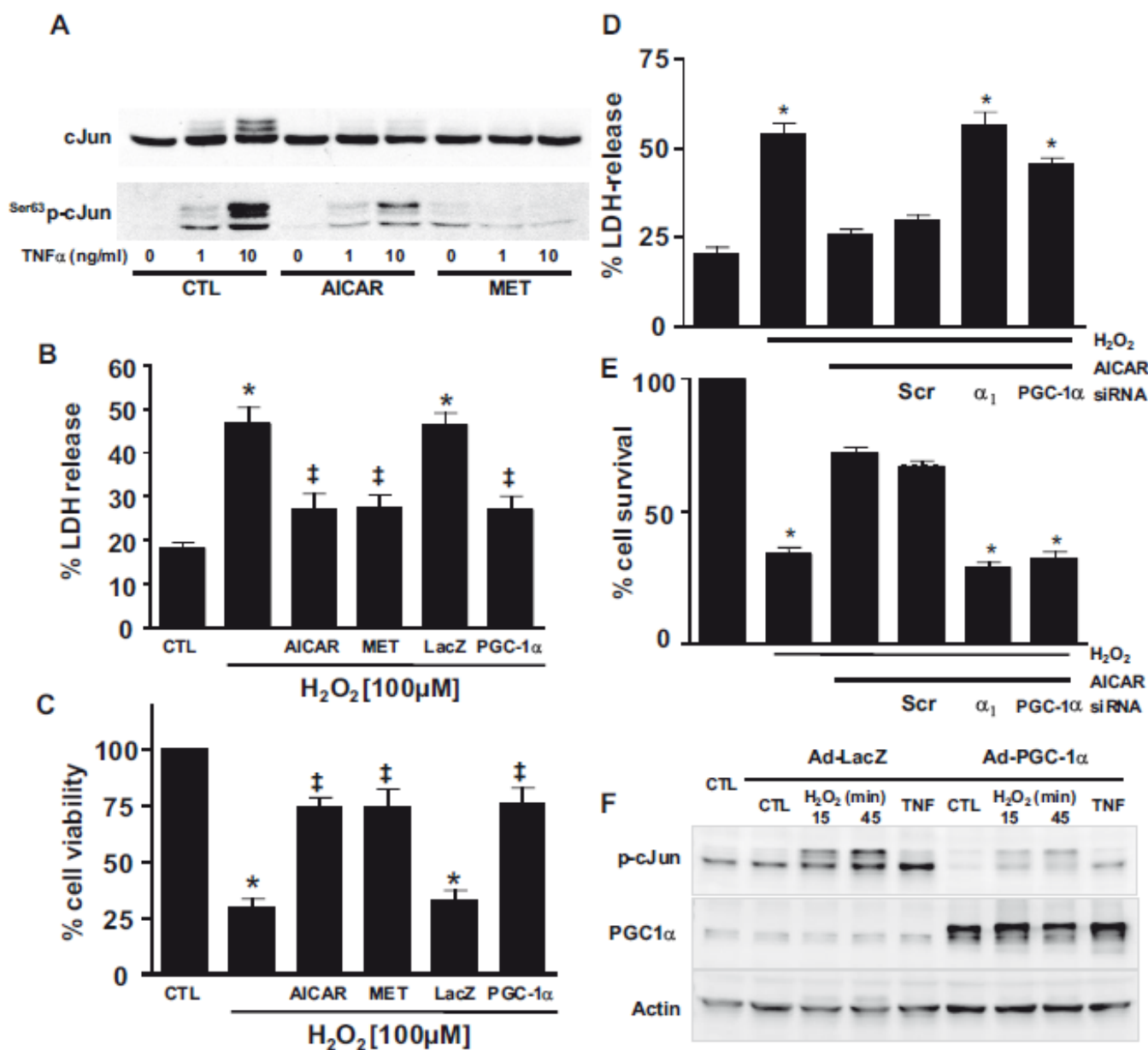


Figure 5. Mitochondrial biogenesis protects endothelial cells from H_2O_2 -mediated toxicity. **A**, PAECs were incubated with AICAR or metformin (MET) for 24 hours before exposure to $TNF-\alpha$ as indicated. Cells were lysed and immunoblotted for c-Jun or its phosphorylated (p-) form. **B**, **C**, HUVECs were treated with 24 hours of AICAR (1 mmol/L) or metformin (5 mmol/L) or transfected with control (LacZ) or PGC-1 α adenovirus. Cells were then treated with H_2O_2 as indicated for 2 hours, and cell death or viability was determined by LDH release or MTS assay, respectively ($*P < 0.05$ vs CTL, $\ddagger P < 0.05$ vs H_2O_2 alone by 1-way ANOVA with Tukey test; $n = 5$). **D**, **E**, HUVECs were incubated (72 hours) in media alone or media with siRNA against α_1 -AMPK, PGC-1 α , or scrambled control (Scr) before incubation with or without AICAR for 24 hours. After incubation, cells were treated with H_2O_2 , and LDH release or cell survival was assessed as in **B** and **C**, respectively ($*P < 0.05$ vs no additions by 1-way ANOVA with Dunnett's test). **F**, HUVECs were incubated with control (Ad-LacZ) or PGC-1 α adenovirus (Ad-PGC-1 α) for 48 hours before exposure to H_2O_2 or $TNF-\alpha$ (10 ng/mL) as indicated. Cells were lysed and immunoblotted for phosphorylated c-Jun, total PGC-1 α , and actin.

thoracic aorta (Figure 6B), increased myocardial NADPH oxidase activity (Figure 6C),³³ and JNK activation (Figure 6D). In this model, chronic AMPK activation with AICAR attenuated endothelial dysfunction (Figure 6A) and NADPH oxidase activation (Figure 6B and 6C) without material alteration in the blood pressure response (supplementary Figure V). Moreover, AICAR was ineffective in preserving endothelial function in mice lacking either the α_1 -AMPK isoform (Figure 6E) or PGC-1 α (Figure 6F), validating our paradigm in vivo.

To determine whether chronic AMPK activation was generally protective, we used a lipopolysaccharide-induced model of endothelial dysfunction.³⁴ Treatment of mice with lipopolysaccharide induced both endothelial dysfunction (Figure 7A) and an increased vascular superoxide signal (Figure 7B) that were prevented by chronic AMPK activation in wild-type but not α_1 -AMPK-null mice. Thus, taken together, these data indicate that chronic AMPK activation in vivo also protects the endothelium against the injurious actions of angiotensin II and lipopolysaccharide.

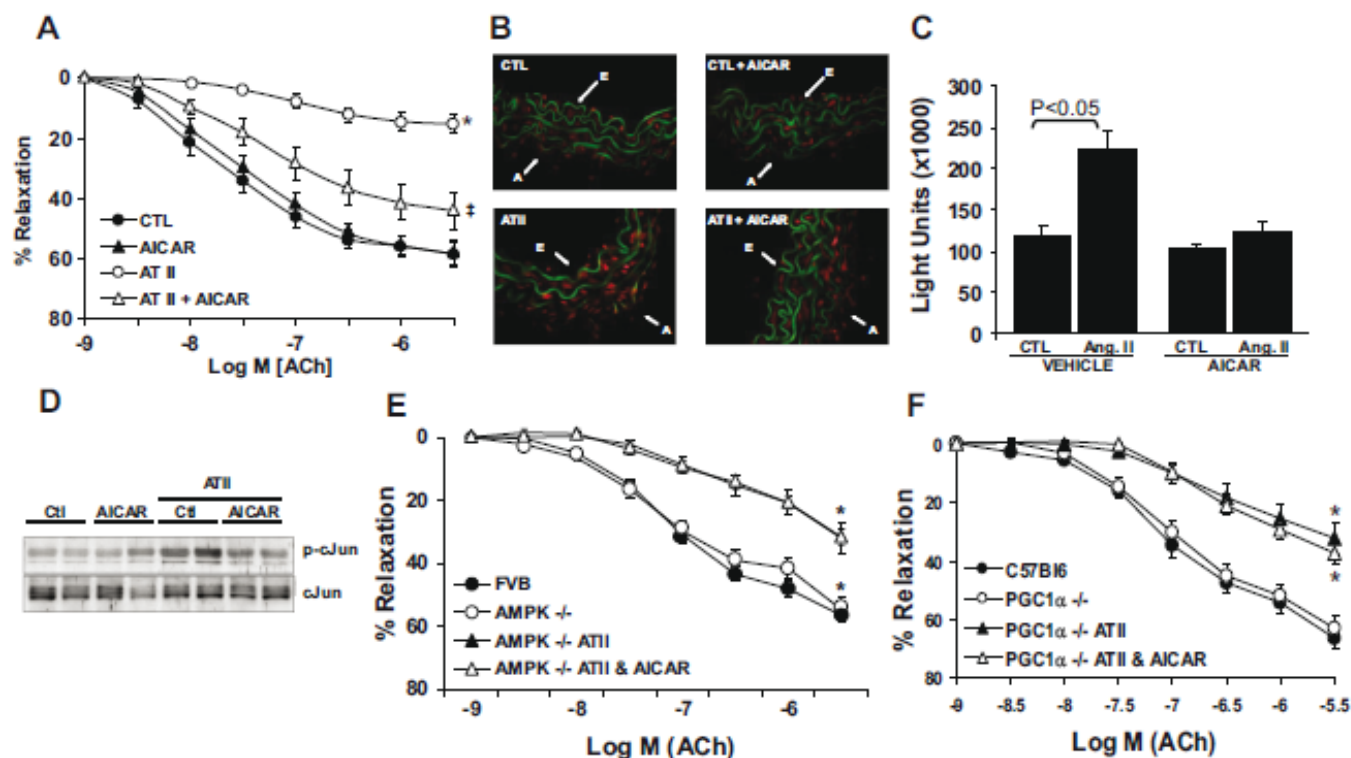


Figure 6. Metabolic stress protects the endothelium from angiotensin II-mediated dysfunction. Mice (C57Bl6) were infused with angiotensin II (ATII; $1.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) or vehicle (CTL) via osmotic minipumps for 7 days, and each group was also treated with AICAR ($200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) or vehicle by subcutaneous injection once daily. Aortas were harvested and assessed for (A) endothelium-dependent relaxation to acetylcholine (ACh), (B) superoxide by dihydroethidium staining, and (D) JNK activation as c-Jun phosphorylation ($*P < 0.05$ vs vehicle alone, $\pm P < 0.05$ vs angiotensin II alone both by 2-way ANOVA interaction term). C, Hearts were also harvested for NADPH oxidase activity with NADPH-driven lucigenin chemiluminescence as described.²² Mice lacking $\alpha 1$ -AMPK (E) and littermate controls were infused with angiotensin II or vehicle, and each group also was treated with either AICAR or vehicle as in A ($*P < 0.05$ vs vehicle infusion). E indicates endothelium; A, adventitia.

Discussion

In this study, we found that induction of metabolic stress in the form of chronic AMPK activation was highly effective in protecting endothelial cells against both H_2O_2 and $\text{TNF-}\alpha$. This stress resistance was related to AMPK-mediated modulation of the mitochondrial redox state that was dependent on the transcriptional coactivator PGC-1 α . Indeed, PGC-1 α was sufficient for this response as determined by overexpression of PGC-1 α , and the redox modulation was mimicked by a mitochondria-targeted antioxidant. We also found that the AMPK-PGC-1 α pathway selectively attenuated stress-related JNK activation, an effect one might expect to suppress stress-related cellular injury and death. Our findings were

physiologically relevant because metabolic stress induction via AICAR *in vivo* prevented angiotensin II-mediated JNK activation and endothelial injury, a process dependent on oxidative stress and vascular ROS production.³⁵ Moreover, lipopolysaccharide-induced endothelial dysfunction also was prevented by chronic AMPK activation. This protective effect of AICAR was lost in mice lacking $\alpha 1$ -AMPK (the isoform that predominates in the endothelium) and PGC-1 α . Thus, these data indicate that AMPK can direct adaptive changes in the mitochondrion via PGC-1 α , which enhances mitochondrial biogenesis and cellular resistance to stress.

Previous studies addressing the role of AMPK in cell death have yielded equivocal results.³⁶⁻³⁸ Some of these previous

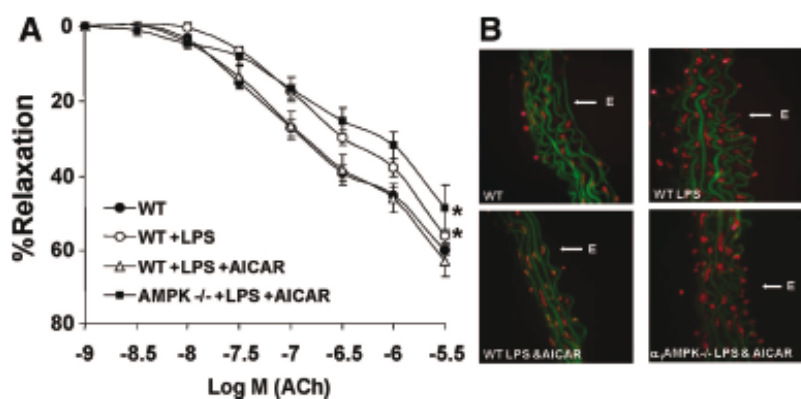


Figure 7. Metabolic stress protects the endothelium from lipopolysaccharide (LPS)-induced dysfunction. Wild-type (WT; C57Bl6/129Sv/FVB-N) or $\alpha 1$ -AMPK-null mice were injected with intravenous lipopolysaccharide ($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) or vehicle (CTL) via tail vein as indicated. The indicated groups also were pretreated (2 days) with AICAR ($200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) by subcutaneous injection once daily. Aortas were harvested and assessed for (A) endothelium-dependent relaxation to acetylcholine or (B) superoxide by dihydroethidium staining as in Figure 6. $*P < 0.05$ vs vehicle alone by 2-way ANOVA interaction term.

negative studies relied solely on AICAR as the means to increase AMPK activity.^{36,38} However, AICAR may affect other AMP-dependent enzymes, and long-term AICAR treatment might increase cellular nucleotide levels.³⁹ In this study, we used metformin as a complementary means of AMPK activation and found comparable effects on endothelial cell survival. Because the mechanism of metformin-mediated AMPK activation differs from that of AICAR,⁴⁰ there is confidence that the results with AICAR are indeed due to AMPK activation. This contention is supported by our observations that both genetic and pharmacological approaches to block AICAR-mediated AMPK activation reversed the protective effects of AICAR *in vitro* and *in vivo*.

It is now clear that different AMPK isoform compositions may dictate distinct sequelae of AMPK activation. For example, metabolic consequences of AMPK activation such as insulin sensitivity²⁵ have largely been attributed to the $\alpha 2$ isoform. The AMP dependency of AMPK is also greater in $\alpha 2$ -bearing enzyme complexes.⁴¹ Moreover, differences in substrate specificity have been observed for the 2 α -subunits *in vitro*.²⁴ Thus, the fact that endothelial cells exclusively harbor the $\alpha 1$ -AMPK isoform may indicate a functional role distinct from the well-characterized metabolic features of AMPK. For example, one could speculate that the $\alpha 1$ -AMPK enzyme is protective against cell death, whereas $\alpha 2$ -containing enzymes might promote it. In this regard, studies in neuronal or pancreatic cells (with a preponderance of the $\alpha 2$ isoform) exhibit increased cell death on AMPK activation,⁴² whereas data presented here and another study in endothelial cells (with the $\alpha 1$ isoform) show that AMPK activation is cytoprotective.³⁷

In the present study, we found that AMPK activation induced mitochondrial biogenesis in the endothelium, consistent with reports from skeletal muscle.¹² A previous report suggests that modulation of nitric oxide levels in endothelium parallel PGC-1 α -dependent mitochondrial biogenesis.⁴³ Because previous *in vivo* data implicate endothelial nitric oxide synthase-derived nitric oxide in mitochondrial biogenesis,⁴⁴ it is tempting to speculate that our effects with AICAR are due to endothelial nitric oxide synthase activation. Such speculation would be consistent with reports that AMPK is responsible for vascular endothelial growth factor-mediated endothelial nitric oxide synthase activation.⁴⁵ However, recent data that AMPK directly phosphorylates PGC-1 α ⁴⁶ would seem to refute the requirement for nitric oxide production. Understanding the precise details of AMPK-mediated PGC-1 α activation in the endothelium requires further investigation.

Signaling cascades that lead to cell death often require mitochondrial ROS production and a loss of mitochondrial membrane potential.⁴⁷ We have implicated stabilization of the mitochondrial membrane potential and reduced mitochondrial ROS as key targets for metabolic stress-mediated prevention of endothelial cell death. Our findings implicate PGC-1 α in this process and provide a mechanism whereby the observed contribution of PGC-1 α to cellular oxidant defense leads to attenuation of cell death.⁴⁸ Indeed, the fact that a mitochondria-targeted antioxidant (MitoQ) also limits stress-induced mitochondrial ROS and cell death supports our

contention that the mitochondrion is a key component of AMPK-mediated protection.

Our data indicate that metabolic stress provides cellular protection, at least in part, through the attenuation of JNK activation. It is well known that JNK mediates apoptosis and cell death in response to environmental stress;⁴⁹ thus, it is plausible that the salutary effects of metabolic stress stem from JNK inhibition. However, the specific means whereby AMPK and PGC-1 α signaling impact JNK is not yet clear. One possibility relates to observations that prolonged JNK activation requires intracellular ROS, which inactivates JNK phosphatases.⁵⁰ In our study, we found that AMPK activation attenuated intracellular and mitochondrial ROS signals, perhaps preventing the phosphatase inhibition needed for JNK activation. Published data indicate that manganese SOD prevents TNF- α -induced JNK activation,⁵⁰ consistent with our findings that AMPK increases endothelial cell manganese SOD content. Thus, suppression of intracellular ROS appears to be a plausible explanation for our findings that AMPK and PGC-1 α attenuate endothelial JNK activation and injury.

The present study has important implications for endothelial cell biology. Oxidative stress is a common feature of many vascular diseases and is known to impair endothelial function. Indeed, endothelial damage and reendothelialization are important factors that determine endothelial function. In this context, the endothelium has emerged as a target for the development of new therapies for vascular disease. However, the implications of increased oxidative stress on endothelial cell viability have garnered surprisingly little attention. We show here that moderate levels of oxidative stress ($\approx 10 \mu\text{mol/L H}_2\text{O}_2$) lead to significant endothelial cell necrosis; thus, it seems reasonable that finding new molecular targets to limit endothelial cell death should favorably affect vascular disease. Our study identifies PGC-1 α , a key regulator of mitochondrial biogenesis, as a potential molecular target to improve endothelial cell viability and function in vascular disease.

Acknowledgments

We thank Ana Sharma and Nikhail Rau for excellent technical assistance.

Sources of Funding

This work was supported by National Institutes of Health grants HL081587, HL68758, and HL67206 (to Dr Keaney) and Deutsche Forschungsgemeinschaft grants SCHU 1486/1-1 and SCHU 1486/2-1 (to Dr Schulz).

Disclosures

None.

References

1. Pober JS, Sessa WC. Evolving functions of endothelial cells in inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2007;7:803-815.
2. Widlansky ME, Gokce N, Keaney JF Jr, Vita JA. The clinical implications of endothelial dysfunction. *J Am Coll Cardiol*. 2003;42:1149-1160.
3. Gokce N, Keaney JF Jr, Hunter LM, Watkins MT, Nedeljkovic ZS, Menzoian JO, Vita JA. Predictive value of noninvasively determined endothelial dysfunction for long-term cardiovascular events inpatients with peripheral vascular disease. *J Am Coll Cardiol*. 2003;41:1769-1775.

4. Ohara Y, Peterson TE, Harrison DG. Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide anion production. *J Clin Invest.* 1993;91:2546-2651.
5. Yusuf S, Dagenais G, Pogue J, Bosch J, Sleight P. Vitamin E supplementation and cardiovascular events in high-risk patients: the Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med.* 2000;342:154-160.
6. Sinclair DA. Toward a unified theory of caloric restriction and longevity regulation. *Mech Ageing Dev.* 2005;126:987-1002.
7. Ingram DK, Anson RM, de Cabo R, Mamczarz J, Zhu M, Mattison J, Lane MA, Roth GS. Development of caloric restriction mimetics as a longevity strategy. *Ann NY Acad Sci.* 2004;1019:412-423.
8. Hardie DG. Minireview: the AMP-activated protein kinase cascade: the key sensor of cellular energy status. *Endocrinology.* 2003;144:5179-5183.
9. Hardie DG. AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007;8:774-785.
10. Carling D, Hardie DG. The substrate and sequence specificity of the AMP-activated protein kinase: phosphorylation of glycogen synthase and phosphorylase kinase. *Biochim Biophys Acta.* 1989;1012:81-86.
11. Winder WW, Holmes BF, Rubink DS, Jensen EB, Chen M, Holloszy JO. Activation of AMP-activated protein kinase increases mitochondrial enzymes in skeletal muscle. *J Appl Physiol.* 2000;88:2219-2226.
12. Zong H, Ren JM, Young LH, Pypaert M, Mu J, Birnbaum MJ, Shulman GI. AMP kinase is required for mitochondrial biogenesis in skeletal muscle in response to chronic energy deprivation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99:15983-15987.
13. Mu J, Brozinick JT Jr, Valladares O, Bucan M, Birnbaum MJ. A role for AMP-activated protein kinase in contraction- and hypoxia-regulated glucose transport in skeletal muscle. *Mol Cell.* 2001;7:1085-1094.
14. Chen K, Thomas SR, Albano A, Murphy MP, Keaney JF Jr. Mitochondrial function is required for hydrogen peroxide-induced growth factor receptor transactivation and downstream signaling. *J Biol Chem.* 2004;279:35079-35086.
15. Schulz E, Anter E, Zou MH, Keaney JF Jr. Estradiol-mediated endothelial nitric oxide synthase association with heat shock protein 90 requires adenosine monophosphate-dependent protein kinase. *Circulation.* 2005;111:3473-3480.
16. Smiley ST, Reers M, Mottola-Hartshorn C, Lin M, Chen A, Smith TW, Steele GD Jr, Chen LB. Intracellular heterogeneity in mitochondrial membrane potentials revealed by a J-aggregate-forming lipophilic cation JC-1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991;88:3671-3675.
17. Gleyzer N, Vercauteren K, Scarpulla RC. Control of mitochondrial transcription specificity factors (TFB1M and TFB2M) by nuclear respiratory factors (NRF-1 and NRF-2) and PGC-1 family coactivators. *Mol Cell Biol.* 2005;25:1354-1366.
18. Maftah A, Petit JM, Ratinaud MH, Julien R. 10-N nonyl-acridine orange: a fluorescent probe which stains mitochondria independently of their energetic state. *Biochem Biophys Res Commun.* 1989;164:185-190.
19. Metivier D, Dallaporta B, Zamzami N, Larochette N, Susin SA, Marzo I, Kroemer G. Cytofluorometric detection of mitochondrial alterations in early CD95/Fas/APO-1-triggered apoptosis of Jurkat T lymphoma cells. Comparison of seven mitochondrion-specific fluorochromes. *Immunol Lett.* 1998;61:157-163.
20. Viollet B, Andreelli F, Jorgensen SB, Perrin C, Flamez D, Mu J, Wojtaszewski JF, Schuit FC, Birnbaum M, Richter E, Burcelin R, Vaulont S. Physiological role of AMP-activated protein kinase (AMPK): insights from knockout mouse models. *Biochem Soc Trans.* 2003;31(pt 1):216-219.
21. Leone TC, Lehman JJ, Finck BN, Schaeffer PJ, Wende AR, Boudina S, Courtois M, Wozniak DF, Sambandam N, Bernal-Mizrachi C, Chen Z, Holloszy JO, Medeiros DM, Schmidt RE, Saffitz JE, Abel ED, Semenkovich CF, Kelly DP. PGC-1 α deficiency causes multi-system energy metabolic derangements: muscle dysfunction, abnormal weight control and hepatic steatosis. *PLoS Biol.* 2005;3:e101.
22. Sydow K, Daiber A, Oelze M, Chen Z, August M, Wendt M, Ullrich V, Mulsch A, Schulz E, Keaney JF Jr, Stamler JS, Münzel T. Central role of mitochondrial aldehyde dehydrogenase and reactive oxygen species in nitroglycerin tolerance and cross-tolerance. *J Clin Invest.* 2004;113:482-489.
23. Chen Z, Keaney JF Jr, Schulz E, Levison B, Shan L, Sakuma M, Zhang X, Shi C, Hazen SL, Simon DI. Decreased neointimal formation in Nox2-deficient mice reveals a direct role for NADPH oxidase in the response to arterial injury. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101:13014-13019.
24. Woods A, Salt I, Scott J, Hardie DG, Carling D. The α 1 and α 2 isoforms of the AMP-activated protein kinase have similar activities in rat liver but exhibit differences in substrate specificity in vitro. *FEBS Lett.* 1996;397:347-351.
25. Viollet B, Andreelli F, Jorgensen SB, Perrin C, Geloan A, Flamez D, Mu J, Lenzner C, Baud O, Bennoun M, Gomas E, Nicolas G, Wojtaszewski JF, Kahn A, Carling D, Schuit FC, Birnbaum MJ, Richter EA, Burcelin R, Vaulont S. The AMP-activated protein kinase α 2 catalytic subunit controls whole-body insulin sensitivity. *J Clin Invest.* 2003;111:91-98.
26. Carling D, Clarke PR, Zammit VA, Hardie DG. Purification and characterization of the AMP-activated protein kinase: copurification of acetyl-CoA carboxylase kinase and 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase kinase activities. *Eur J Biochem.* 1989;186:129-136.
27. Zhou G, Myers R, Li Y, Chen Y, Shen X, Fenyk-Melody J, Wu M, Ventre J, Doebber T, Fujii N, Musi N, Hirshman MF, Goodyear LJ, Moller DE. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest.* 2001;108:1167-1174.
28. Wang X, McCullough KD, Franke TF, Holbrook NJ. Epidermal growth factor receptor-dependent Akt activation by oxidative stress enhances cell survival. *J Biol Chem.* 2000;275:14624-14631.
29. Chen K, Vita JA, Berk BC, Keaney JF Jr. c-Jun N-terminal kinase activation by hydrogen peroxide in endothelial cells involves SRC-dependent EGF receptor transactivation. *J Biol Chem.* 2001;276:16045-16050.
30. Tournier C, Hess P, Yang DD, Xu J, Turner TK, Nimmual A, Bar-Sagi D, Jones SN, Flavell RA, Davis RJ. Requirement of JNK for stress-induced activation of the cytochrome c-mediated death pathway. *Science.* 2000;288:870-874.
31. Smith RA, Kelso GF, Blaikie FH, Porteous CM, Ledgerwood EC, Hughes G, James AM, Ross MF, Asin-Cayuela J, Cocheme HM, Filipovska A, Murphy MP. Using mitochondria-targeted molecules to study mitochondrial radical production and its consequences. *Biochem Soc Trans.* 2003;31(pt 6):1295-1299.
32. Wu Z, Puigserver P, Andersson U, Zhang C, Adelmant G, Mootha V, Troy A, Cinti S, Lowell B, Scarpulla RC, Spiegelman BM. Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell.* 1999;98:115-124.
33. Rajagopalan S, Kurz S, Münzel T, Tarpey M, Freeman BA, Griending KK, Harrison DG. Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/HADPH oxidase activation: contribution to alterations of vasomotor tone. *J Clin Invest.* 1996;97:1916-1923.
34. Bachschmid M, Thureau S, Zou MH, Ullrich V. Endothelial cell activation by endotoxin involves superoxide/NO-mediated nitration of prostacyclin synthase and thromboxane receptor stimulation. *FASEB J.* 2003;17:914-916.
35. Keaney JF Jr. Oxidative stress and the vascular wall: NADPH oxidases take center stage. *Circulation.* 2005;112:2585-2588.
36. Campas C, Lopez JM, Santidrian AF, Barragan M, Bellosillo B, Colomer D, Gil J. Acadesine activates AMPK and induces apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells but not in T lymphocytes. *Blood.* 2003;101:3674-3680.
37. Ido Y, Carling D, Ruderman N. Hyperglycemia-induced apoptosis in human umbilical vein endothelial cells: inhibition by the AMP-activated protein kinase activation. *Diabetes.* 2002;51:159-167.
38. Suzuki A, Kusaka G, Kishimoto A, Lu J, Ogura T, Esumi H. ARK5 suppresses the cell death induced by nutrient starvation and death receptors via inhibition of caspase 8 activation, but not by chemotherapeutic agents or UV irradiation. *Oncogene.* 2003;22:6177-6182.
39. Longnus SL, Wambolt RB, Parsons HL, Brownsey RW, Allard MF. 5-Aminoimidazole-4-carboxamide 1- β -D-ribofuranoside (AICAR) stimulates myocardial glycogenolysis by allosteric mechanisms. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2003;284:R936-R944.
40. Hawley SA, Gadalla AE, Olsen GS, Hardie DG. The antidiabetic drug metformin activates the AMP-activated protein kinase cascade via an adenine nucleotide-independent mechanism. *Diabetes.* 2002;51:2420-2425.
41. Salt I, Celler JW, Hawley SA, Prescott A, Woods A, Carling D, Hardie DG. AMP-activated protein kinase: greater AMP dependence, and preferential nuclear localization, of complexes containing the α 2 isoform. *Biochem J.* 1998;334(pt 1):177-187.
42. Jung JE, Lee J, Ha J, Kim SS, Cho YH, Baik HH, Kang I. 5-Aminoimidazole-4-carboxamide-ribonucleoside enhances oxidative stress-induced apoptosis through activation of nuclear factor- κ B in mouse Neuro 2a neuroblastoma cells. *Neurosci Lett.* 2004;354:197-200.

43. Borniquel S, Valle I, Cadenas S, Lamas S, Monsalve M. Nitric oxide regulates mitochondrial oxidative stress protection via the transcriptional coactivator PGC-1alpha. *FASEB J*. 2006;20:1889–1891.
44. Nisoli E, Clementi E, Paolucci C, Cozzi V, Tonello C, Sciorati C, Bracale R, Valerio A, Francolini M, Moncada S, Carruba MO. Mitochondrial biogenesis in mammals: the role of endogenous nitric oxide. *Science*. 2003;299:896–899.
45. Reihill JA, Ewart MA, Hardie DG, Salt IP. AMP-activated protein kinase mediates VEGF-stimulated endothelial NO production. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007;354:1084–1088.
46. Jager S, Handschin C, St-Pierre J, Spiegelman BM. AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104:12017–12022.
47. Gottlieb E, Vander Heiden MG, Thompson CB. Bcl-x(L) prevents the initial decrease in mitochondrial membrane potential and subsequent reactive oxygen species production during tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis. *Mol Cell Biol*. 2000;20:5680–5689.
48. St-Pierre J, Drori S, Uldry M, Silvaggi JM, Rhee J, Jager S, Handschin C, Zheng K, Lin J, Yang W, Simon DK, Bachoo R, Spiegelman BM. Suppression of reactive oxygen species and neurodegeneration by the PGC-1 transcriptional coactivators. *Cell*. 2006;127:397–408.
49. Davis RJ. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell*. 2000;103:239–252.
50. Kamata H, Honda S, Maeda S, Chang L, Hirata H, Karin M. Reactive oxygen species promote TNFalpha-induced death and sustained JNK activation by inhibiting MAP kinase phosphatases. *Cell*. 2005;120:649–661.

CLINICAL PERSPECTIVE

Experimental and clinical studies defined endothelial dysfunction as an early marker of atherosclerotic vascular disease. Therefore, preservation of endothelial function is an important goal to avoid vascular disease and to improve prognosis. In the present study, we establish the activation of adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK), a key enzyme in the adaptation to metabolic stress, as a way to prevent endothelial injury and finally vascular disease. Interestingly, antidiabetic drugs (metformin, glitazones) and statins have AMPK-activating properties, which may, at least in part, contribute to their desired metabolic effects. Our study also suggests that these drugs will exert beneficial effects on the vasculature through AMPK activation apart from those secondary to improved metabolic control. Because cardiovascular events largely determine the prognosis of patients with metabolic disorders, the choice of a drug with AMPK-activating properties seems reasonable because it will improve both endothelial function and metabolic control.

Erklärung

Hiermit bestätige ich, Swenja Schuhmacher, dass ich die Arbeit selbständig angefertigt und nur die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe. Ich habe keinen anderen Promotionsversuch unternommen.

Mainz, August 2010