Aus dem Zentrum für Kardiologie

der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg - Universität Mainz

Die Prävention von Fluglärm-induzierter vaskulärer endothelialer Dysfunktion und Bildung von oxidativem Stress durch die Aktivierung der endothelialen AMPK α1 mittels Ausdauertrainings

-

Molekulare Mechanismen im Mausmodell

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

der Universitätsmedizin

der Johannes Gutenberg - Universität Mainz

vorgelegt von

Isabella Dorothea Schmal

aus Hildesheim

Mainz, 2022

Wissenschaftlicher Vorstand:

1.Gutachter:

2.Gutachter:

Tag der Promotion: 18. April 2023

Meiner Familie

„Das Spiel Wissenschaft hat grundsätzlich kein Ende: wer eines Tages beschließt, die wissenschaftlichen Sätze nicht weiter zu überprüfen, sondern sie etwa als endgültig verifiziert zu betrachten, der tritt aus dem Spiel aus.“

Karl R. Popper (1)

Inhaltsverzeichnis

I. Abkürzungsverzeichnis *I*

II. Tabellenverzeichnis *III*

III. Abbildungsverzeichnis *IV*

1 Einleitung *1*

1.1 Fluglärm als kardiovaskulärer Risikofaktor 2

1.1.1 Generelle Auswirkungen von Fluglärm auf das kardiovaskuläre System 2
1.1.2 Nächtlicher Fluglärm 5

1.2 Oxidativer Stress 7

1.2.1 Wichtige Vertreter der reaktiven Sauerstoffspezies 8
1.2.2 Die NAD(P)H-Oxidase 9
1.2.3 Mitochondriale Atmungskette und oxidativer Stress 10

1.3 Das Endothel - seine regulatorischen Funktionen 13

1.3.1 Der Gefäßtonus - nervale und hormonelle Modulation 13
1.3.2 Schlüsselrolle des Endothels und Stickstoffmonoxid bei der Modulation des Gefäßtonus und vaskulären Protektion 14
1.3.3 Die endotheliale NO-Synthase 17
1.3.4 Die Entkopplung der endothelialen NO-Synthase 19

1.4 Der Zusammenhang zwischen endothelialer Dysfunktion und kardiovaskulären Erkrankungen 21

1.4.1 Die Dysfunktion des Endothels 21
1.4.2 Die Rolle von oxidativem Stress bei der Entstehung der endothelialen Dysfunktion 23
1.4.3 Entstehung der Atherosklerose 24
1.4.4 Arterielle Hypertonie 25
1.4.5 Ausdauertraining als Modulator des kardiovaskulären Risikoprofils 26

1.5 PRMT-1/DDAH-2/ADMA - Signalweg 27

1.6 Die AMP-abhängige Kinase: AMPK 30

1.6.1 Historische Einordnung 31
1.6.2 Aufbau und Strukturanalyse 32
1.6.3 Regulation der AMPK-Aktivität und Mechanismen der intrazellulären Energiemessung 34
1.6.4 Der Einfluss der AMPK auf die Bildung von vaskulärem oxidativem Stress sowie die endotheliale Funktion 35
1.6.5 AMPK und Ausdauersport 37

1.7 Stand der Forschung 38

2 Zielsetzung *39*

3 Material *40*

3.1 Chemikalien und Reagenzien **40**

3.2 Puffer und Lösungen **43**

3.3 Antikörper **48**

3.3.1 Primäre Antikörper 48
3.3.2 Sekundäre Antikörper 48

3.4 Verbrauchsmaterialien **49**

3.5 Laborgeräte und Detektionskameras **50**

3.6 Software **52**

4 Methoden *52*

4.1 Tiermodell, Behandlung und Tierpräparation **52**

4.1.1 Tiermodell 52
4.1.2 Studienprotokoll sowie Lärmexposition 54

4.2 Transgene Mäuse: endothelialer AMPK α1 Knockout **55**

4.2.1 Genotypisierung aus Ohrlochstanzung 56
4.2.2 Polymerase- Kettenreaktion 56
4.2.3 Gelelektrophorese 58

4.3 Tier- sowie Aortenpräparation **59**

4.3.1 Tötung der Tiere und Organentnahme 59
4.3.2 Gefäßpräparation 60

4.4 Detektion der Endothelfunktion durch isometrische Tonusstudien **60**

4.4.1 Organbad 61
4.4.2 Multi Wire Myograph System 63

4.5 Nicht- invasive Blutdruckmessungen **64**

4.6 Next Generation Sequencing: RNA- Sequenzierung **65**

4.7 mRNA-Expression mittels RT-PCR **65**

4.8 Detektion von oxidativem Stress **67**

4.8.1 HPLC-Methode 68
4.8.2 HPLC: ROS-Messungen in Aorta sowie Gehirn 69
4.8.3 Detektion von Superoxidbildung in Mitochondrien des Herzens 69
4.8.4 Isolierung von Mitochondrien aus dem Herzen 70
4.8.5 Proteinbestimmung nach Lowry 70
4.8.6 MitoSOX HPLC 71

4.9 Protein Expression in Plasma sowie Aorta 72

4.9.1 Gewebevorbereitung 72
4.9.2 Proteinbestimmung nach Bradford 73
4.9.3 SDS-PAGE 74
4.9.4 Western Blot 74
4.9.5 Immunologischer Nachweis von Proteinen sowie densitometrische Auswertung 75
4.9.6 Dot Blot Analyse 76

4.10 Statistische Analyse 76

5 Ergebnisse 78

5.1 Vaskuläre Funktion 78

5.1.1 Die endothelabhängige Relaxation der Arteria thoracalis und Arteria mesenterica 78

5.2 Arterielle Hypertonie 80

5.2.1 Verhalten des systolischen Blutdrucks 80

5.3 NGS: Einfluss von Fluglärmexposition und Ausdauersport 81

5.3.1 Redox-Homöostase, zirkadianer Rhythmus und AMPK- Transduktion, NO-Bildung und Inflammation 81

5.4 Oxidative Stressbildung 84

5.4.1 Oxidative Stressbildung in der Aorta 84
5.4.2 Oxidative Stressbildung im Gehirn 85
5.4.3 Mitochondriale oxidative Stressbildung 87

5.5 PRMT-1/DDAH-2/ADMA - Signalweg 88

5.6 „Proof of concept" Studie: Knockout der endothelialen AMPK α1 90

5.6.1 AMPK α1 -Expression und Aktivierung 90
5.6.2 Vaskuläre Funktion der endothelialen AMPK α1 92
5.6.3 Die endothelabhängige Relaxation der Aorta thoracalis und A. mesenterica 92
5.6.4 Arterielle Hypertonie 94
5.6.5 Verhalten des systolischen Blutdrucks 94
5.6.6 PRMT-1/DDAH-2/ADMA - Signalweg bei Deletion der endothelspezifischen AMPK α1 95
5.6.7 Oxidative Stressbildung bei Deletion der endothelspezifischen AMPK α1 97
5.6.7.1 Oxidative Stressbildung in der Aorta 97
5.6.7.2 Oxidative Stressbildung im Gehirn 98
5.6.7.3 Mitochondriale oxidative Stressbildung 99

6 Diskussion 101

6.1 Ausdauersport als Modulator der Fluglärm-induzierten Gefäßschäden 102

6.1.1 Effekte von Fluglärm auf die Endothelfunktion, den systolischen Blutdruck und auf die Bildung von oxidativem Stress 102
6.1.2 Auswirkungen auf den PRMT-1/DDAH-2/ADMA - Signalweg 107

6.1.3 Auswirkungen auf die Genexpression, vorwiegend des Transkriptionsfaktors FOXO 3 111

6.2 Deletion der endothelialen AMPK α1: Folgen für das kardiovaskuläre System 112

6.3 Ausdauersport - eine effektive Prävention für das kardiovaskuläre System? 117

6.4 Methoden 121

6.5 Limitationen 122

7 Klinischer Ausblick 124

8 Zusammenfassung 125

9 Literaturverzeichnis 126

10 Anhang 137

I. Abkürzungsverzeichnis

A.	Arteria
Abb.	Abbildung
ACC	Acetyl-CoA Carboxylase
ACE	Angiotensin Converting Enzyme
Ach	Acetylcholin
ADMA	Asymmetrisches Dimethylarginin
AICAR	5-Aminoimidazol-4-Carboxymidribonucleosid
AMP	Adenosinmonophosphat
AMPK	AMP-abhängige Kinase
AMPK α1 EC KO	Knockout der endothelialen AMPK α1
ANP	Atriales natriuretisches Peptid
AT-II	Angiotensin II
ATP	Adenosintriphosphat
BH_4	Tetrahydrobiopterin
bidest.	bidestilliert
BNP	B-Typ natriuretisches Peptid
BSA	Bovines Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
$CaCl_2$	Calciumchlorid
CaMKK 2	Calcium/Calmodulin- abhängige Protein Kinase Kinase 2
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat (Guanosin-3′,5′-monophosphat)
Cu	Kupfer
DAG	1,2-Diacylglycerin
DDAH	Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase
dest.	destilliert
DHE	Dihydroethidium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetat
eNOS	endotheliale NO-Synthase
EDFR	Endothelium derived relaxing factor
et al.	und weitere
ET-1	Endothelin 1
FMD	Flow-mediated vasodilatation=Flussvermittelte Vasodilatation
FOXO	Forkhead Box O Protein

GCH-I	GTP Cyclohydrolase I
GDP	Guanosindiphosphat
GMP	Guanosinmonophosphat
GTP	Guanosintriphosphat
HCl	Salzsäure
Hepes	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HPLC	high performance liquid chromatography = Hochleistungsflüssigkeits-chromatographie
IOD	integrierte optische Dichten
IP3	Inositol-1,4,5-triphosphat
KCL	Kaliumchlorid
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
KH	Krebs-Hepes
LDL	Low densitiy Lipoprotein
LKB 1	Leber Kinase B 1
MLP	Milchpulver
Mn	Mangan
mRNA	Massenger Ribonukleinsäure
Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NGS	Next Generation Sequencing
nNOS	neuronale NO-Synthase
•NO	Stickstoffmonoxid
Nox	NAD(P)H-Oxidase
Nrf-2	Nuclear Factor Erythroid 2-related Factor 2 (Transkriptionsfaktor)
$•O_2^-$	Superoxid
$•OH^-$	Hydroxylradikal
$ONOO^-$	Peroxynitrit
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKG	cGMP-abhängige Proteinkinase (cGK)
PLC	(Phosphoinositid- spezifische) Phospholipase C
PRMT	Protein-Arginin-Methyltransferase
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reactive oxygen species=reaktive Sauerstoffspezies
RT-PCR	Real Time- Polymerase Kettenreaktion
SDS	sodium dodecyl sulfate=Natriumdodecylsulfat
SOD	Superoxiddismutase

s.u.	siehe unten
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Vs.	versus
WT	Wildtyp
Zn	Zink

Einheiten

dB(A)	Dezibel-Bewertungskurve A, genormt nach der internationalen Frequenzbewertungskurve A (angepasst an das menschliche Hörvermögen)
l	Liter
M	Mol
mM	Millimol
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
V_{max}	maximale Geschwindigkeit
mmHg	Millimeter-Quecksilbersäule
rcf	relative Zentrifugalbeschleunigung
rpm	Rounds per minute=Umdrehungen pro Minute

II. Tabellenverzeichnis

Tabelle 3-1 Primäre Antikörper für Western Blot und Dot Blot

Tabelle 3-2 Sekundäre Antikörper für Western Blot und Dot Blot

Tabelle 4-1 Mauslinien mit entsprechender Exposition

Tabelle 4-2 Phasen eines Zyklus der PCR. [Übersetzt und modifiziert aus (2)]

Tabelle 4-3 TaqMan RT-PCR Assays für die gesuchten mRNA-Sequenzen

Anhang

Tabelle A-1 Die wichtigsten Genänderungen in der Aorta nach viertägiger Fluglärmexposition (WT vs. Noise)

Tabelle A-2 Die wichtigsten Genänderungen in der Aorta nach viertägiger Fluglärmexposition und vorheriger Ausführung von Ausdauersport für sieben Wochen (Noise vs. Noise+Exercise)

III. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1 Lärmeffekte auf das kardiovaskuläre System, [Abbildung übersetzt und modifiziert aus (3)], bearbeitet mit https://biorender.com

Abbildung 1-2 Funktionsprinzip der phagozytären NAD(P)H-Oxidase, [Abbildung aus (4)]

Abbildung 1-3 Wechselwirkung der mitochondrialen ROS-Bildung und der NAD(P)H-Oxidase, [Abbildung aus (5)]

Abbildung 1-4 Endotheliale Mechanismen der Vasodilatation und -konstriktion, [Abbildung modifiziert aus (6)], bearbeitet mit https://biorender.com

Abbildung 1-5 Bildung von Stickstoffmonoxid, [Abbildung modifiziert aus (7)], bearbeitet mit https://biorender.com

Abbildung 1-6 Redox-Schalter der endothelialen NO-Synthase, [Abbildung aus (5)]

Abbildung 1-7 Mechanismus der Vasokonstriktion nach Gabe von Acetylcholin bei endothelialer Dysfunktion, [Abbildung modifiziert aus (4)], bearbeitet mit https://biorender.com

Abbildung 1-8 Die Wechselwirkung zwischen •NO, $ONOO^-$ und •O2-, [Abbildung modifiziert aus (8)], bearbeitet mit https://biorender.com

Abbildung 1-9 Die Entstehungskette kardiovaskulärer Erkrankungen [Abbildung modifiziert aus (9)]

Abbildung 1-10 Strukturformeln von L-Arginin und N^G-N^G-Dimethyl-L-Arginin, erstellt mit https://biorender.com

Abbildung 1-11 Biochemische Stoffwechselwege von ADMA [Abbildung übersetzt und modifiziert aus (10)], bearbeitet mit https://biorender.com

Abbildung 1-12 Physiologische Funktionen der vaskulären AMPK [Abbildung aus (11)]

Abbildung 1-13 Kristallstruktur der heterotrimeren AMPK, [Abbildung aus (12) mit Zustimmung von Grahame Hardie] Copyright © 2014 Elsevier Inc. Alle Rechte vorbehalten.

Abbildung 1-14 Dreifache Aktivierung der AMPK [Abbildung aus (13)]

Abbildung 4-1 Studienprotokoll, erstellt mit https://biorender.com

Abbildung 4-2 Schematische Darstellung der Gelelektrophorese [Abbildung modifiziert aus (14)], erstellt mit https://biorender.com

Abbildung 4-3 Schematische Darstellung einer Organbadkammer, erstellt mit https://biorender.com

Abbildung 4-4 Multi Wire Myograph System 620 M

Abbildung 4-5	Oxidation von DHE [Abbildung modifiziert aus (15)], erstellt mit https://biorender.com
Abbildung 4-6	Strukturen von MitoSOX sowie seine Oxidationsprodukte MitoE+ und 2-OH-MitoE^{+}. [Abbildung aus (16)]
Abbildung 4-7	Darstellung der Farbreaktion von Coomassie brilliant Blue [Abbildung modifiziert aus (17)], erstellt mit https://biorender.com
Abbildung 5-1	Effekte der endothelabhängigen Vasodilatation in der Aorta thoracalis
Abbildung 5-2	Effekte der endothelabhängigen Vasodilatation in der Arteria mesenterica superior
Abbildung 5-3	Systolischer Blutdruck
Abbildung 5-4	Zusammenfassende Übersicht der signifikanten Veränderungen von Signalwegen durch Lärmexposition sowie Ausdauersport plus Lärmexposition
Abbildung 5-5	Next Generation Sequencing Daten zur Veränderung der Genexpression durch AMPK-Aktivierung (Noise vs. Exercise + Noise)
Abbildung 5-6	Bildung von 2-Hydroxyethidium in der Aorta
Abbildung 5-7	Zerebrale Bildung von oxidativem Stress und Aktivierung des antioxidativen Systems mittels FOXO3-Expression
Abbildung 5-8	MitoSOX HPLC-Analyse der kardial isolierten Mitochondrien
Abbildung 5-9	PRMT-1/DDAH-2/ADMA Protein- bzw. mRNA-Expression
Abbildung 5-10	Aktivierung und Expression der AMPK α1 in Wildtypmäusen und endothelspezifischen Knockoutmäusen
Abbildung 5-11	Effekte der endothelabhängigen Vasodilatation in der Aorta thoracalis bei endothelspezifischem Knockout der AMPK α1
Abbildung 5-12	Effekte der endothelabhängigen Vasodilatation in der Arteria mesenterica superior bei endothelspezifischem Knockout der AMPK α1
Abbildung 5-13	Systolischer Blutdruck bei endothelspezifischem AMPK α1 Knockout
Abbildung 5-14	PRMT-1/DDAH-2/ADMA Expressionsmuster bei endothelialem AMPK α1 Knockout
Abbildung 5-15	Bildung von 2-Hydroxyethidium in der Aorta bei genetischer Deletion der endothelialen AMPK α1
Abbildung 5-16	Zerebrale Bildung von oxidativem Stress bei genetischer Deletion der endothelialen AMPK α1

Abbildung 5-17 MitoSOX HPLC-Analyse der kardial isolierten Mitochondrien bei Defizienz der endothelialen AMPK α1

Abbildung 6-1 Negative kardiovaskuläre Effekte durch Fluglärmexposition in experimentellen Mausstudien, [Abbildung: A und B aus (18) mit Ergebnissen der Originalpublikation (19), C und D aus (20)]

Abbildung 6-2 A Gleichgewicht von kardiovaskulären Schäden sowie Protektion, erstellt mit https://biorender.com

Abbildung 6-2 B Protektiven Effekte von Ausdauersport vermittelt durch die endotheliale AMPK α1 als Modulator der schädlichen Auswirkungen von Fluglärmexposition auf das Gefäßsystem, erstellt mit https://biorender.com

Abbildung 6-3 AMPK-abhängige Effekte auf das Gefäßsystem, [Abbildung aus (21)]

Abbildung 6-4 Die AMPK α1 als Modulator der Angiotensin II vermittelten Wirkungen auf die Endothelfunktion und die ROS-Bildung, [Abbildung mit Ergebnissen aus (22)]

Abbildung 6-5 Auswirkungen der endothelialen Deletion der AMPK α1 auf die Endothelfunktion, NO-Bioverfügbarkeit sowie Bildung von oxidativem Stress, [Abbildung mit Ergebnissen aus (23)]

1 Einleitung

Bereits vor über 100 Jahren soll der Nobelpreisträger Robert Koch gesagt haben:

„Eines Tages wird der Mensch den Lärm ebenso unerbittlich bekämpfen müssen wie Pest und Cholera“ (24).

In diesem Zitat wird deutlich, dass es im vergangenen Jahrhundert zu einer Veränderung des Krankheitsspektrums gekommen ist. Eine erhebliche Relevanz für die Bevölkerung in Deutschland haben heutzutage chronische Krankheiten. Umwelteinflüsse wie Fluglärm oder Feinstaubbelastung spielen seit den letzten Jahrzehnten mit steigender internationaler Mobilität eine immer größere Rolle im täglichen Leben unserer Gesellschaft. Die Weltgesundheitsorganisation WHO sieht in Lärmbelastung einen Umweltstressor, welcher negative Einflüsse auf das kardiovaskuläre System mit sich bringt (25, 26). Die WHO geht davon aus, dass in Westeuropa jedes Jahr mindestens eine Million gesunde Lebensjahre aufgrund von Umgebungslärm verloren gehen (26-28).
Herz-Kreislauf-Erkrankungen stellen die Todesursache Nummer eins in Deutschland dar und fordern aus diesem Grund eine überaus wichtige Beachtung in der medizinischen Forschung (29, 30). Es ist von entscheidender Bedeutung aus gesundheitlicher, aber auch ökonomischer Perspektive, die molekularen Grundlagen der Entstehung pathologischer Veränderungen im kardiovaskulären System und damit einhergehende Risikofaktoren zu identifizieren und zu verstehen. Denn somit hat man die Möglichkeit, bestmögliche Therapiestrategien zu entwickeln, präventiv vorzugehen und im Idealfall, diese Ereignisse und Erkrankungen gänzlich zu verhindern. Die amerikanische Heart Association ist der Meinung, dass über 80% aller kardiovaskulären Ereignisse durch Lebensstilveränderungen vermeidbar seien und sieht darin eine wesentliche Stellschraube bei der Primärprävention (31).

Die AMP-aktivierte Proteinkinase (AMPK) hat sich als Schüsselenzym für die Vermittlung protektiver Effekte auf das kardiovaskuläre System herausgestellt (21, 32).

Die vorliegende Arbeit befasst sich auf molekularer Ebene mit dem Umweltstressor Fluglärm, seine Auswirkung auf das kardiovaskuläre System sowie die Möglichkeit der Prävention mithilfe der Aktivierung der endothelialen AMPK α1 durch Ausdauertraining.

1.1 Fluglärm als kardiovaskulärer Risikofaktor

1.1.1 Generelle Auswirkungen von Fluglärm auf das kardiovaskuläre System

Umweltstressoren wie Lärmexposition werden immer mehr als Risiko für die Gesundheit des Menschen angesehen (33). Bei Untersuchungen der Entstehung kardiovaskulärer Krankheiten geht man mittlerweile davon aus, dass neben sogenannten klassischen Risikofaktoren wie Raucherstatus, Alter, genetischer Prädisposition oder biologisches Geschlecht auch umweltbedingte Faktoren einen relevanten Einfluss haben (18, 34, 35).

Epidemiologische Studien konnten zeigen, dass Lärm mit einer erhöhten Inzidenz für kardiovaskuläre Ereignisse wie Bluthochdruck, Schlaganfall und Myokardinfarkt einhergeht, welche wiederum mit einer hohen Mortalität zusammenhängen (3, 36, 37). Miedema et. al (38) verglichen verschiedene Arten von Verkehrslärm und fanden dabei heraus, dass Fluglärm im Vergleich zu Straßen- oder Eisenbahnlärm am störendsten empfunden wurde. Die Gutenberg-Gesundheitsstudie der Universitätsmedizin Mainz bestätigte diese Daten ebenfalls. Subjektive Lärmbelastung stellt jedoch ein komplexes Konstrukt dar, welches nicht eindimensional betrachtet werden darf (39).

Die HYENA Studie inkludierte knapp 5000 Menschen in sechs verschiedenen europäischen Ländern, welche in der Umgebung von Flughäfen wohnten, darunter unter anderem der ehemalige Flughafen Tegel in Berlin. Ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung von arterieller Hypertonie konnte mit Fluglärm in Zusammenhang gebracht werden (40). Auch die Wahrscheinlichkeit, einen Schlaganfall zu erleiden, stieg, wenn man Fluglärmbelastung ausgesetzt war. Dies untersuchte eine Studie in der Umgebung von London Heathrow (41). Die Wahrscheinlichkeit für kardiovaskuläre Erkrankungen stieg nachweislich durch die Exposition von Fluglärm, dennoch ist die Anzahl an Studien dazu bisher begrenzt (42).

Stetige Lärmbelastung führt erwiesenermaßen zu einer Ausschüttung von Stresshormonen wie Katecholaminen (43) und Cortisol (44). Dabei kommt es zu erhöhten Plasmaspiegeln von Adrenalin und Noradrenalin, welche als Vasokonstriktoren einen Anstieg des Blutdrucks erwirken. Diesen negativen Einfluss konnte man bei jungen Menschen im Durchschnittsalter von 26 Jahren nach nur einer Nacht Fluglärm nachweisen, welche keinerlei kardialen Vorerkrankungen aufwiesen (26). Auch Patientinnen und Patienten, welche an kardiovaskulären Vorerkrankungen litten, zeigten erhöhte Blutdruckwerte durch eine nächtliche Lärmbelastung trotz optimal medikamentös eingestellter Therapie (45).

Auffallend ist zudem, dass ein sogenannter Priming-Effekt beobachtet werden konnte. Wurden Probandinnen und Probanden bereits Lärm ausgesetzt, ist die Auswirkung wesentlich stärker, was auf einer Sensitivierung anstatt einer Präkonditionierung hindeutete (26, 45). In einer Studie, bei der Patientinnen und Patienten mit erhöhtem kardiovaskulärem Risiko beziehungsweise bereits vorliegenden kardiovaskulären Erkrankungen Fluglärm exponiert wurden, konnte ein Anstieg des systolischen Blutdrucks beobachtet werden, unabhängig vom subjektiv empfundenen Störfaktor (45).

Babisch beschrieb ein Modell (46), in dem Lärm auf zwei Wegen im Körper wirken kann: einem direkten und einem indirekten Weg (siehe *Abb. 1-1*). Der direkte Weg führt vor allem zum Hörverlust bei hohen Schallpegeln, aber auch zu Schlafstörungen, die bekanntermaßen mit einem erhöhten kardiovaskulären Risiko assoziiert sind. Niedrige, vorwiegend chronische Lärmbelastung aktiviert den indirekten Weg. Der Körper registriert den Lärm als Geräusch, bewertet ihn und es folgt eine physiologische Reaktion. Das Resultat ist eine kortikale Aktivierung mit einer kognitiven und emotionalen Stressreaktion als Folge. Der indirekte Weg führt auf diese Weise zu einer Aktivierung des sympathischen Nervensystems, das evolutionsbedingt dafür zuständig war, den Körper für eine Flucht oder Kampfsituation bereit zu machen. Es kommt unter anderem zu einer Ausschüttung von Katecholaminen und ein Anstieg des Blutdruckes (35). Eine aktuelle Studie hat anhand von ^{18}FDG-PET-Scans den molekularen Beweis geliefert, dass Lärm zu einer neuronalen Aktivierung, genauer der Amygdala führt, was mit einer vermehrten Inflammation in der Aorta korreliert und mit einer erhöhten Inzidenz von schwerwiegenden kardiovaskulären Ereignissen assoziiert ist (47).

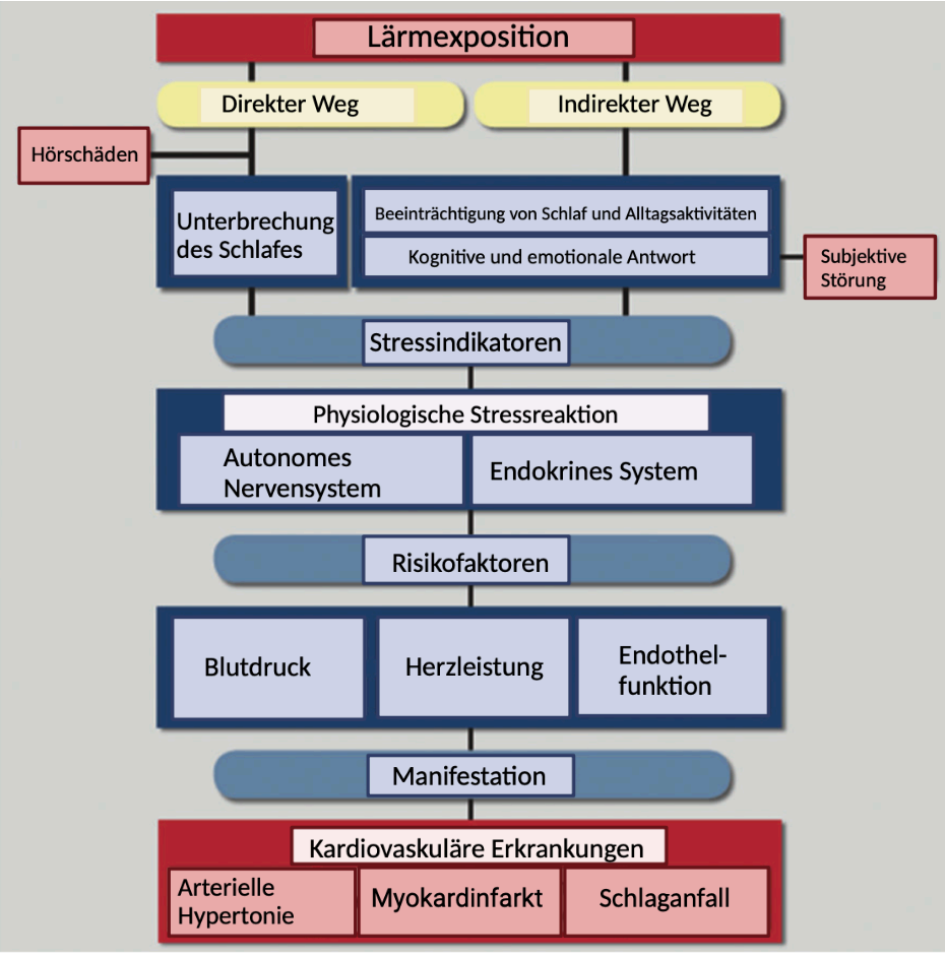

Abbildung 1-1: Lärmeffekte auf das kardiovaskuläre System
Dargestellt ist das von Babisch (46) entwickelte Schema, welcher die Lärmeffekte in eine direkten und indirekten Weg einteilt. Der direkte Weg führt neben dem Schaden auf das auditorische System zu Schlafunterbrechungen. Der indirekte Weg basiert auf der kognitiven und emotionalen Antwort des Körpers auf die Lärmbelastung. Beide Wege bilden ein Zusammenspiel aus Stressindikatoren. Es kommt auf Ebene des autonomen Nervensystems und des endokrinen Systems zur physiologischen Stressreaktion. Dies initiiert Risikofaktoren wie eine Erhöhung des Blutdruckes, Beeinträchtigung der kardialen Auswurfleistung oder der Endothelfunktion. Dies prädispositioniert die Manifestation von kardiovaskulären Erkrankungen wie arterielle Hypertonie, Myokardinfarkt oder einen Schlaganfall.
[Abbildung übersetzt und modifiziert aus (3)]

Eine Schlüsselrolle bei der Entstehung von kardiovaskulären Erkrankungen wird mittlerweile der innersten Schicht im Gefäßsystem, dem Endothel, zugeschrieben. 1992 zeigten Wu et al. (48), dass Lärmexposition (2 bzw. 4 Wochen, vier Stunden pro Tag, 6 Tage pro Woche bei 100 dB(A)) in Ratten die Vasodilatation von Aortensegmenten mittels Acetylcholins verschlechterte. Da die Beschallung von 100 dB(A) sehr wahrscheinlich zum Hörverlust der Tiere führt (49), wurden maximale Spitzenpegel von 85

dB(A) und mittlere Schallpegel von 72 dB(A) in verschiedenen Studien aus dem Labor von Univ.-Prof. Münzel und Univ.-Prof. Daiber verwendet, welche ebenfalls eine Beeinträchtigung des Endothels mit einhergehender Dysfunktion nachweisen konnten (3, 19, 50). Die möglichen synergistischen negativen Effekte von Lärm auf die Gefäßfunktion waren gerade dann bedenklich, wenn bereits eine Endotheldysfunktion bestand. Denn ein Anstieg des bestehenden kardiovaskulären Risikos stellt eine ernstzunehmende Gefahr dar (45).

Ein weiterer Faktor spielt die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies als Reaktion auf die Lärmexposition und die Aktivierung von inflammatorischen Vorgängen (19, 35). Vitamin C ist ein Antioxidans, welches nach Einnahme zu einer verbesserten Endothelfunktion führte. Dies stellte einen kausalen Zusammenhang zwischen der Gefäßstörung sowie oxidativem Stress her, der durch Lärm induziert wurde (3, 18, 26).

1.1.2 Nächtlicher Fluglärm

Ein ungestörter Schlaf ist Grundvoraussetzung, um tagsüber leistungsfähig zu sein. Der menschliche Organismus erkennt auch während der Schlafperiode Lärmereignisse und reagiert darauf, ohne dass der Mensch das direkt merkt. Diese Mechanismen sind Ausdruck einer ganzheitlichen Reaktion des Körpers und führen über komplexe Signalmechanismen beispielsweise zu einer Steigerung der Herzfrequenz oder einem Anstieg des Blutdrucks (26, 51, 52). In einer Studie von Kröller-Schön et al. (53) wurden die Auswirkungen von Fluglärmbelastung über 24 Stunden hinweg für 1,2, oder 4 Tage untersucht. Dabei wurden die kardiovaskulären Auswirkungen der Lärmexposition während der Schlaf- und Nachtphase verglichen. Hinsichtlich der unterschiedlichen Effekte einer täglichen und nächtlichen Beschallung zeigte sich eine Aggravation der bereits bekannten Effekte auf das kardiovaskuläre System bei nächtlicher Fluglärmbelastung. Dies spiegelte sich in der Erhöhung des Blutdrucks, der Detektion von oxidativem Stress sowie einer Beeinträchtigung der Endothelfunktion wider. Auffallend war auch die Störung der zirkadianen Rhythmik durch Lärm. Ähnliche Befunde konnte bei Menschen, welche in Schichtarbeit tätig waren und regelmäßige Schlafunterbrechungen erfuhren, festgestellt werden (54).

Zudem zeigte sich, dass Schlafentzug zu einer Beeinträchtigung der Gefäßfunktion führte und Schallqualität und -quantität sich auf die kardiovaskuläre Prognose auswirkten (55, 56).

Nächtliche Fluglärmexposition schien daher relevanter für die Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen zu sein als die Exposition tagsüber (26, 40). Grund dafür kann die wiederholte Erregung des autonomen Nervensystems sein, bei dem ein Gewöhnungseffekt an Lärmexposition in geringerem Maße ausgeprägt war als es beispielsweise bei kortikaler Erregung zu beobachten gewesen war (26). Bei letzterem kommt es nämlich zu einer thalamokortikalen Filterung, welche den Kortex vor Erregungen schützt, was für die Gewöhnung verantwortlich ist. Eine subkortikale Antwort, die unberührt von einer übergeordneten Kontrolle bleibt, wird als Grund für den ausbleibenden Gewöhnungseffekt auf kardiologischer Ebene diskutiert. Dieser Effekt ist von bedeutender Relevanz für die langfristige Entwicklung kardiologischer Erkrankungen (51). Denn das Risiko steigt mit der Dauer der Exposition (26).

Gesunde Probandinnen und Probanden schienen sich zwar zu einem gewissen Maße an die Lärmbelastung zu gewöhnen, jedoch fand dies nicht vollständig statt. Auch nach mehrjähriger Exposition kam es immer noch zu Lärm-induziertem nächtlichen Erwachen und Erregung des autonomen Nervensystems. Schlafunterbrechungen und -verkürzungen haben wiederum hormonelle und metabolische Veränderungen zur Folge, welche auf lange Sicht die Entstehung von kardiovaskulären Erkrankungen begünstigen können (26).

Auffällig war, dass nach genetischer Ausschaltung der Superoxidquelle NAD(P)H-Oxidase (Nox-2), die fluglärminduzierten Gefäßschäden wesentlich geringer ausfielen. Die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies im Gehirn und die Dysregulation der neuronalen NO-Synthase schienen dabei eine Rolle zu spielen und direkt an der pathologischen Genexpression und dem daraus entstehenden oxidativen Stress und Störung der Gefäßfunktion sowie Steigerung des erhöhten Blutdrucks beteiligt zu sein (35, 53).

Die Funktion und Relevanz der einzelnen Komponenten für das kardiovaskuläre System und damit einhergehende pathophysiologische Veränderungen werden im Folgenden detailliert erläutert.

1.2 Oxidativer Stress

Im menschlichen Organismus herrscht physiologisch ein Gleichgewicht zwischen pro- und antioxidativ wirkenden Mechanismen. Redoxreaktionen stellen einen zentralen Aspekt der Regulation im Organismus dar. Verschiebt sich das Gleichgewicht hin zugunsten der Pro-Oxidantien reichen antioxidative Maßnahmen nicht mehr aus. Bei diesem Zustand spricht man von oxidativem Stress. Dieser kann auf Dauer unter chronischen Zuständen bis hin zum Zelltod führen und wird mit vielen Pathologien in Verbindung gebracht (57, 58).

Im Mittelpunkt steht dabei die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS). Die Bildung von ROS im aeroben Organismus ist unausweichlich und im Rahmen von Immunreaktionen sogar essenziell für die Protektion des Organismus. Redoxreaktionen selbst stellen einen zentralen Aspekt der Regulation und Signalvermittlung dar. In geringen Konzentrationen haben Oxidantien wichtige Aufgaben wie die Oxidation von Thiolgruppen zur Aktivierung und Inhibierung von Proteinen und die Modulation der Signaltransduktion durch Nitrierung von Tyrosinresten (4, 59-61). ROS sind aber auch in der Lage körpereigene Moleküle so strukturell zu modifizieren, dass damit ein vollständiger Funktionsverlust einhergeht. (4, 62, 63)

Wichtige Vertreter sind das Superoxidradikal $^{\bullet}O_2^-$, Hydroxylradikal $^{\bullet}OH$ sowie Peroxynitrit $ONOO^-$. Reaktive Sauerstoffspezies zeichnen sich durch ihre hohe Reaktionsbereitschaft aus, da sie ein ungepaartes Elektronenpaar besitzen. Dadurch sind sie als Elektronenakzeptor in der Lage, durch die Initiation von Radikalkettenbildung selbst Radikale zu bilden (64). Die essentielle Rolle von Stickstoffmonoxid und seine Relevanz für den Gefäßtonus werden ausführlich in *Kapitel 1.3.2* erläutert.

Physiologische Quellen in der Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies, größtenteils das Superoxidanion, sind die mitochondriale Atmungskette, Peroxisomen sowie P-450-Cytochrome. Dabei entstehen reaktive Sauerstoffspezies jedoch als Nebenprodukt. Als primäre Aufgabe zur Bildung von ROS wurde die phagozytäre, membranständige NAD(P)H-Oxidase identifiziert. Dieses Enzym ist jedoch nicht auf Phagozyten begrenzt, sondern in jeglichen Geweben vorhanden. Daneben stellte sich heraus, dass unter pathologischen Mechanismen eine Entkoppelung der endothelialen NO-Synthase ebenfalls ROS produzieren kann. Als Schutzmechanismus gibt es zur

Neutralisierung von reaktiven Sauerstoffspezies Enzyme wie die Superoxiddismutase, Glutathionperoxidase und Katalase (14, 65).

Dem Transkriptionsfaktor Forkhead Box O3 (FOXO 3) wird eine wichtige Rolle für die Gefäßhomöostase sowie für die antioxidative Protektion von Zellen zugeschrieben. Er ist in der Lage, die Expression von antioxidativen Enzyme wie die Mangan-Superoxiddismutase (Mn-SOD) zu beeinflussen (66, 67). Generell soll die Familie der FOXO-Proteine eine entscheidende Rolle bei der Regulation der zellulären Antwort auf oxidativen Stress und damit verbundenen Einfluss auf altersbedingte Erkrankungen sowie die Zellalterung an sich spielen. Denn sie sollen in der Lage sein, Einfluss auf die antioxidative Kapazität auf zellulärer Ebene zu nehmen (68, 69). Die Inaktivierung der FOXO-Faktoren führte zu einer Akkumulation von reaktiven Sauerstoffspezies, welche eine beschleunigte Bildung von atherosklerotischen Veränderungen nach sich zog (68, 70).

1.2.1 Wichtige Vertreter der reaktiven Sauerstoffspezies

Wichtige Vertreter sind das Hydroxylradikal, Superoxidanion, Wasserstoffperoxid sowie Peroxynitrit. Das Hydroxylradikal ist selbst extrem reaktiv und deswegen in der Lage, mit fast jedem umliegenden Molekül zu reagieren, dabei interagiert es jedoch unspezifisch. Gebildet wird es wie folgt: Die Reduktion von Fe^{3+}-Ionen zu Fe^{2+}-Ionen mittels Superoxids bildet Sauerstoff. Gleichzeitig dismutiert Superoxid zu Wasserstoffperoxid und Sauerstoff. Wasserstoffperoxid reagiert mit Fe^{2+}-Ionen zu Fe^{3+}-Ionen sowie einem Hydroxylanion und einem Hydroxylradikal. (Fenton-Reaktion) Der Haber-Weiss-Zyklus beschreibt diese gesamte Reaktion mit den Fe^{3+}-Ionen als Katalysator. Beeinflusst wird die Reaktion durch die vorhandenen Eisenspeicher. Bei einem regelrechten Eisenhaushalt ist die Menge der Bildung von Hydroxylradikalen gering und stellt weniger eine Gefahr für den Organismus dar (4).

$$Fe^{3+} + {}^{\bullet}\mathbf{O_2}^{-} \longrightarrow Fe^{2+} + O_2$$

$$Fe^{2+} + H_2O_2 \longrightarrow Fe^{3+} + OH^{-} + \bullet\mathbf{OH} \quad \textit{Fenton-Reaktion}$$

$$\bullet\mathbf{O_2}^{-} + H_2O_2 \xrightarrow{Fe^{3+}} O_2 + \bullet\mathbf{OH} + OH^{-} \quad \textit{Haber-Weiss-Zyklus}$$

Eine entscheidende Rolle spielt das Superoxidanion. Es ist selbst vergleichsweise reaktionsarm, hat aber aufgrund seiner Position als Gegenspieler von Stickstoffmonoxid eine zentrale Rolle. Es entsteht durch die Einelektronenreduktion von molekularem Sauerstoff. Das Superoxidanion zerfällt mittels Gleichgewichtsreaktion durch Disproportionierung. Zusätzlich gibt es CuZn-Superoxiddismutase im Zytoplasma und extrazellulär sowie die Mn-Superoxiddismutase in den Mitochondrien, was die toxischen Eigenschaften dieses Moleküls unterstreicht. Diese wandelt zwei Superoxidanionen in Wasserstoffperoxid (H_2O_2) sowie Sauerstoff um. Das Superoxidanion kann aber auch zusammen mit Stickstoffmonoxid (•NO) zu Peroxynitrit reagieren, was wesentlich schneller abläuft als die Entgiftung durch die SOD (4, 14, 64). Peroxynitrit selbst ist hochpotent und unter anderem in der Lage, Enzyme über Veränderung von Tyrosinresten zu modifizieren, wodurch Signaltransduktionen negativ beeinflusst werden können. Weiter oxidiert es Thiol-abhängige Proteine und hemmt die mitochondriale SOD, was über einen Anstieg von Superoxidradikalen zu einer Schädigung der Mitochondrien führt (4, 60, 71).

1.2.2 Die NAD(P)H-Oxidase

Die NAD(P)H-Oxidase (Nox) bildet die Hauptquelle für die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies. Die sogenannte Nox-Familie spielt eine große Rolle für die Redoxregulation und für die körpereigene Abwehr von Krankheitserregern. Dabei können Endotoxine die Nox selbst aktivieren und es kommt zu einer starken ROS-Produktion, was als *oxidative burst* bezeichnet wird (4, 65). Die NAD(P)H-Oxidasen sind transmembranöse Proteine, welche Superoxid bilden, indem sie Sauerstoff reduzieren. In phagozytierenden Zellen ebenso wie in Endothelzellen wird diese als Nox-2 bezeichnet. Homologe bilden die Nox-1 und Nox-4, welche sich in glatten Muskel- sowie Endothelzellen befinden. Aktiviert wird die phagozytäre NAD(P)H-Oxidase (Nox-2) durch die Translokation der zytosolischen Untereinheiten $p40^{phox}$, $p47^{phox}$, $p67^{phox}$ und Rac1 an die membranständigen $gp91^{phox}$ und $p22^{phox}$, die das aktive Zentrum des Enzyms bilden und für die katalytische Funktion verantwortlich sind (siehe *Abb. 1-2*). Dies wird unteranderem durch die Phosphorylierung der Untereinheit $p47^{phox}$ durch die Proteinkinase C oder die Bindung von GDP nach Umwandlung zu GTP an Rac1 ausgelöst. Das Zusammenspiel aller Komponenten bildet die aktive NAD(P)H-Oxidase, welche

aus NADPH und zwei Sauerstoffmolekülen dann $NADP^+$ sowie zwei Superoxidmoleküle bildet (4, 65, 72). Einen ähnlichen Aktivierungsmechanismus gibt es für die Nox-1, allerdings fungieren dort Noxa1 und Noxo1 als zytosolischen Untereinheiten (73). Die Nox-4 wird anders reguliert und wird als konstitutiv aktive Isoform bezeichnet (73).

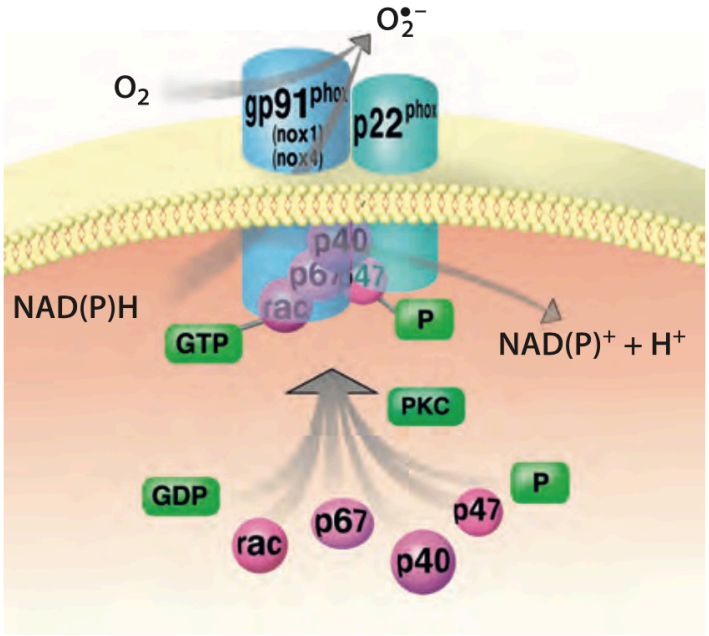

Abbildung 1-2: Funktionsprinzip der phagozytären NAD(P)H-Oxidase
Generierung von Superoxid durch die NAD(P)H-Oxidase. Die Translokation der zytosolischen Untereinheiten ($p40^{phox}$, $p47^{phox}$, $p67^{phox}$ und Rac1) an die membranständigen Untereinheiten ($gp91^{phox}$ und $p22^{phox}$) bilden die aktive NAD(P)H- Oxidase. Detaillierte Erklärung erfolgt im Text.
Abkürzungen: O_2: Sauerstoffmolekül, $\bullet O_2^-$: Superoxidmolekül, NAD(P)H: Nicotinamidadenindinukleotidphosphat/ Nicotinamidadenindinukleotid, $NAD(P)^+$: oxidierte Form von NADPH/NADH, H^+: Wasserstoff-Ion, GTP: Guanosintriphosphat, P: Phosphat, GDP: Guanosindiphosphat, PKC: Proteinkinase C. [Abbildung aus (4)]

1.2.3 Mitochondriale Atmungskette und oxidativer Stress

Nachdem reaktive Sauerstoffspezies identifiziert wurden, wurde eine wichtige Quelle für deren Bildung in den Mitochondrien gefunden (59). Die Aufgabe der Mitochondrien auf zellulärer Ebene ist die Generierung von Energie in Form von Adenosintriphosphat (ATP). Die Komplexe der mitochondrialen Atmungskette stellen dabei die Endstrecke der Energiegewinnung dar, indem sie durch oxidative Phosphorylierung ATP

generieren. Dabei dienen die Coenzyme NADH und $FADH_2$ als Reduktionsäquivalente und haben die Aufgabe, Wasserstoff zwischenzulagern. Die in den Reduktionsäquivalenten gespeicherte Energie wird zur Erzeugung eines Protonengradienten genutzt, welcher wiederum die Bildung einer energiereichen Phosphorsäureanhydridbindung im ATP möglich macht. Erreicht wird dies durch die Komplexe der Atmungskette und die Kompartimentierung der doppelten Mitochondrienmembran (14). Die Komplexe der Atmungskette, vorwiegend Komplex I und III, sind selbst unter physiologischen Bedingungen Produzenten von reaktiven Sauerstoffspezies als Nebenprodukt ihrer metabolischen Aktivität. Denn durch die NAD(P)H-Oxidase in diesen Komplexen kann molekularer Sauerstoff zu Superoxid reduziert werden. Mitochondrien stellen so eine der wichtigsten Quellen der Bildung von intrazellulären reaktiven Sauerstoffspezies her (11, 74, 75). Poren sowie Kanäle in der Mitochondrienmembran, aber auch der Effekt auf das Membranpotential selbst, sind relevant für die Verteilung von reaktiven Sauerstoffspezies in den verschiedenen Zellkompartimenten. Systeme zur Aufrechterhaltung der Redox-Homöostase unter physiologischen Bedingungen sowie insbesondere in Stresssituationen sind daher essentiell. Die mitochondriale Mangan-Superoxiddismutase ist eine Möglichkeit, Superoxid abzubauen (4, 11, 58). Bei Schädigung der Mn-SOD durch Tyrosinnitrierung oder Dimerisierung kommt es zu einer gesteigerten mitochondrialen ROS-Bildung. Dies zeigten Daiber et al. (76) durch Versuche mit einem heterozygoten Mn-SOD-Knockout. Erhöhte Superoxidspiegel beschädigen die mitochondriale Atmungskette durch die Oxidation der Eisen-Schwefel-Proteine einzelner Komplexe (4). Zudem aktivieren reaktive Sauerstoffspezies aus dem Zytosol Kanäle wie ATP-sensitive Kaliumkanäle in der Mitochondrienmembran und führen so zur Veränderung des Membranpotentials. Die mitochondrialen ROS (mROS) interagieren mit Poren in der Membran (mPTP), was es den mROS möglich macht, ins Zytosol zu gelangen, dort die Proteinkinase C zu aktivieren, die wiederum die NAD(P)H-Oxidase Aktivität steigert. Es kommt zur vermehrten Superoxidbildung und es beginnt ein Circulus vitiosus (5). Diese Vorgänge sind in *Abbildung 1-3* zusammengefasst.

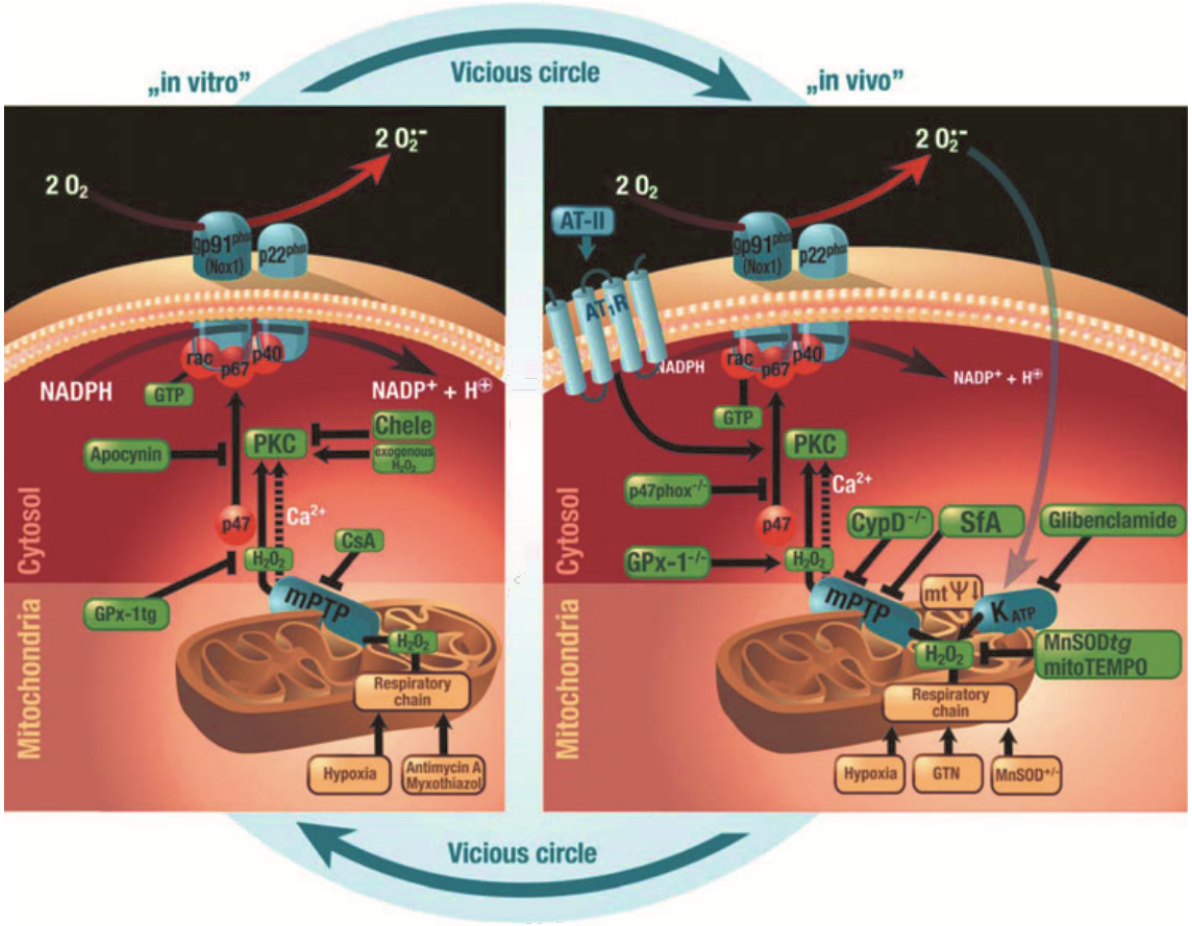

Abbildung 1-3: Wechselwirkung der mitochondrialen ROS-Bildung und der NAD(P)H-Oxidase

Die Bildung von Superoxid durch die NAD(P)H-Oxidase interagiert mit einem Kalium Kanal in der mitochondrialen Membran (K_{ATP}). Dies führt dazu, dass mitochondrial gebildete reaktive Sauerstoffspezies (mROS) über Poren (mPTP) ins Zytosol gelangen. Diese können dann durch Aktivierung der zytosolischen Proteinkinase C die NAD(P)H-Oxidase zur vermehrten ROS-Produktion stimulieren. Die Bildung von mtROS kann zudem durch Hypoxie oder eine Defizienz der Mn-SOD gesteigert werden. Die mPTP wird durch Cyclophilin D reguliert, welches wiederrum oxidativ aktiviert werden kann.

Abkürzungen/Übersetzungen: O_2: Sauerstoffmolekül, $\bullet O_2^-$: Superoxid, NAD(P)H: Nicotinamidadenindinukleotidphosphat/Nicotinamidadenindinukleotid, $NAD(P)^+$: oxidierte Form von NADPH/NADH, H^+ : Wasserstoff-Ion, GTP: Guanosintriphosphat, P: Phosphat, GDP: Guanosindiphosphat, PKC: Proteinkinase C, H_2O_2: Wasserstoffperoxid, Ca^{2+}: Calcium-Ionen, AT-II: Angiotensin II, AT_1-R: Angiotensin-Rezeptor 1, p47, p40, p67 und rac: zytosolische Untereinheiten der NAD(P)H-Oxidase, $gp91^{phox}$ und $p22^{phox}$: membranständige Untereinheiten der NAD(P)H-Oxidase, $gp91phox^{-/-}$: genetische Deletion von $gp91^{phox}$, mtΨ: mitochondriales Membranpotential, CypD: Cyclophilin D, $CypD^{-/-}$: genetische Deletion von CypD, SfA: Sanglifehrin A, MnSOD: Mangan-Superoxiddismutase, MnSODtg: genetische Überexpression der Mn-SOD, $MnSOD^{+/-}$: heterozygote Mn-SOD Defizienz, mitoTEMPO: Mitochondrien spezifische Antioxidantien, Chele: Chelerythrin, CsA: Cyclosporin A, GPx-1: Glutathionperoxidase-1, GPx-1tg: Überexpression der GPx-1, $GPx\text{-}1^{-/-}$: genetische Deletion der GPx-1. [Abbildung aus (5)]

1.3 Das Endothel - seine regulatorischen Funktionen

Das Endothel besteht aus Endothelzellen, welche die innerste Zellschicht von Gefäßen bildet. Sie stellt die Verbindung zwischen Gefäßwand und dem Gefäßlumen her. Es hat dabei eine Barrierefunktion, nimmt gleichzeitig eine zentrale Rolle für die Viskosität des Blutes, das Immunsystem und die Regulation des Gefäßtonus ein. Das Endothel ist in der Lage, Faktoren zu bilden, welche vasoaktiv, immunmodulatorisch, oxidativ oder antioxidativ wirken können. Es ist dazu fähig, Konzentrationsänderungen von vasomotorischen Stimuli im Blut wahrzunehmen, aber auch physikalische Veränderungen wie Druckunterschiede zu registrieren und adäquat zu reagieren. Diese Prozesse bilden ein komplexes Zusammenspiel aus Bindung, eigener Synthese und Ausschüttung von vasoaktiv wirksamen Substanzen. Daneben nimmt das Endothel Einfluss auf die transendotheliale Migration von Entzündungszellen, das Wachstumsverhalten von glatten Muskelzellen und die Adhäsion von Entzündungszellen und Thrombozyten an die Gefäßwand (4, 6, 77, 78).

1.3.1 Der Gefäßtonus - nervale und hormonelle Modulation

Der Tonus der Blutgefäße spielt eine entscheidende Rolle in der Aufrechterhaltung der Kreislauffunktion des Körpers. Die Modulation des Gefäßtonus garantiert die ausreichende Durchblutung verschiedener Gewebe im Organismus entsprechend unterschiedlichen Ansprüchen je nach Bedarfssituation (6). Daneben ist ein ausreichender Ruhetonus essenziell für die Aufrechterhaltung des arteriellen Blutdrucks. Dies gewährleisten vor allem die arteriellen Widerstandsgefäße. Der Ruhetonus ist ein Gleichgewicht aus Kontraktion der glatten Muskelzellen in der Gefäßwand sowie dem intraluminalen Druck. Zum einen kontrahieren die glatten Muskelzellen aufgrund ihrer Dehnung, zum anderen hat das sympathische Nervensystem in der Gefäßwand die Möglichkeit, auf den Gefäßtonus Einfluss zu nehmen. Vor allem arterielle Gefäße besitzen in ihrer Gefäßwand sympathische Nervenendigungen. Als Modulator spielt vor allem das Hormon Noradrenalin eine Rolle. Es bindet an α1-adrenerge Rezeptoren und kann dadurch den Tonus in den Gefäßen erhöhen. Auch Adrenalin kann in hohen Konzentrationen auf diesem Weg eine Vasokonstriktion erwirken. Über die Bildung von den natriuretischen Peptiden ANP und BNP bei Dehnung der Herzvorhöfe kommt es vaskulär zur Vasodilatation (6).

1.3.2 Schlüsselrolle des Endothels und Stickstoffmonoxid bei der Modulation des Gefäßtonus und vaskulären Protektion

Das Endothel steht durch Bildung von Modulatoren, welche vasodilatatorisch oder vasokonstriktorisch wirken können, in einer Schlüsselposition für die Regulation des Gefäßtonus. Furchgott stellte 1980 die Hypothese auf, dass im Endothel eine relaxierende Substanz produziert wird, welche später als „Endothelium derived relaxing factor“ (EDRF) bezeichnet wurde (79, 80). Ab dann waren die außerordentliche Bedeutung und Wichtigkeit des Endothels für die Regulation der Gefäßfunktion bekannt und auch seine entscheidende Bedeutung für die Pathophysiologie von kardiovaskulären Erkrankungen wurde schnell damit in Verbindung gebracht (81, 82). Ignarro et. al (83) konnten Ende der 80er Jahre nachweisen, dass es sich bei EDRF um den Vasodilatator •NO handelt und dieser intrinsisch die lösliche Guanylatzyklase stimuliert (84). Im Jahr 1998 erhielten Furchgott, Ignarro und Murad (der Entdecker der Stickstoffmonoxidsynthasen) für diese Entdeckung den Nobelpreis für Medizin (85).

•NO ist das kleinste bioaktive Molekül, welches endogen gebildet wird. Synthetisiert wird es über zwei Oxidationsschritte aus der Aminosäure L-Arginin durch die NO-Synthase, von der es drei Isoformen gibt: neuronale NO-Synthase (NOS-1), induzierbare NO-Synthase (NOS-2) und endotheliale NO-Synthase (NOS-3). Das Gefäßendothel bildet kontinuierlich Stickstoffmonoxid, welches leicht Zellmembranen überwindet, in benachbarte Zellen diffundiert und den Gefäßtonus als wichtiger endogener Vasodilatator beeinflusst. Mechanische Veränderungen in der Schubspannung oder pulsatile Dehnung werden registriert und über verschiedene Signalwege wird die NO-Produktion angepasst. Seine bedeutende biologische Wirkung wird neben der hohen Permeabilität auch durch seine Signalfunktion vermittelt, die über die Bindung von Proteinen über zweiwertige Häm-Gruppen oder Eisen-Schwefel-Cluster, wie man sie in den Atmungskettenkomplexen der Mitochondrien findet, wirkt. Ein weiteres Beispiel ist die Bindung von •NO an die lösliche Form der Guanylylcyclase in der glatten Muskulatur, wodurch aus GTP der Second Messenger cGMP gebildet wird. Auf diese Weise wird durch die cGMP abhängige Proteinkinase (PKG) über molekulare Mechanismen wie der inhibitorischen Phosphorylierung eines Calciumkanals im endoplasmatischen Retikulum eine Absenkung der intrazellulären Kalziumkonzentration bewirkt, welche wiederum zu einer Gefäßrelaxation führt (4, 6, 64, 84).

Prostazyklin, welches vom Endothel gebildet wird, kann auch über die Bindung an einen Rezeptor an den glatten Muskelzellen eine Relaxation bewirken. Die Bildung von EDHF (Endothelium derived hyperpolarization factor) führt über eine Verringerung der glattmuskulären Erregbarkeit ebenfalls zu einer Vasodilatation (6).

Eine Vasokonstriktion wird hervorgerufen durch Botenstoffe wie Endothelin-1, Adrenalin, Thromboxan A_2 oder Angiotensin II (AT-II), welche über einen G-Protein gekoppelten Signalweg in glatten Muskelzellen wirken. Dadurch wird die (Phosphoinositid-spezifische) Phospholipase C (PLC) aktiviert und bildet aus Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP2) dann Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP3) und 1,2-Diacylglycerin (DAG). IP_3 bewirkt eine Steigerung der intrazellulären Calcium Freisetzung. Dies führt zur Aktivierung der Myosin-leichte-Ketten-Kinase, was die Kontraktion der glatten Muskelzellen über die Interaktion von Myosin-Aktin-Filamenten in der Gefäßwand bewirkt (6, 81, 86).

Einer der potentesten Vasokonstriktoren ist Angiotensin II, welcher mithilfe des Renin-Angiotensin-Aldosteron Systems (RAAS) gebildet wird. Das RAAS hat eine zentrale Aufgabe in der Regulation des arteriellen Blutdrucks. Die wichtigsten Effekte von AT-II werden über einen G_q/11-Protein gekoppelten AT_1-Rezeptor vermittelt. Dies führt zu einer Steigerung der Calcium Konzentration mit anschließender Vasokonstriktion. Der AT_1-Rezeptor ist dabei vor allem an glatten Muskelzellen von Widerstandsgefäßen exprimiert. AT-II scheint jedoch auch pathologische Effekten an Gefäßen wie die Stimulation zur Proliferation von glatten Muskelzellen und strukturelle Veränderung an der Gefäßwand zu vermitteln (6).

Die endothelabhängige Vasodilatation mittels •NO als Gegenspieler zu hormonellen und nervalen Einflüssen ist nur bei einem intakten Endothel gewährleistet. Ein intaktes und funktionsfähiges Endothel ist daher essenziell für die Aufrechterhaltung einer physiologischen Gefäßhomöostase (9, 87-89). Alle beschriebenen Prozesse sind in *Abbildung 1-4* zusammengefasst.

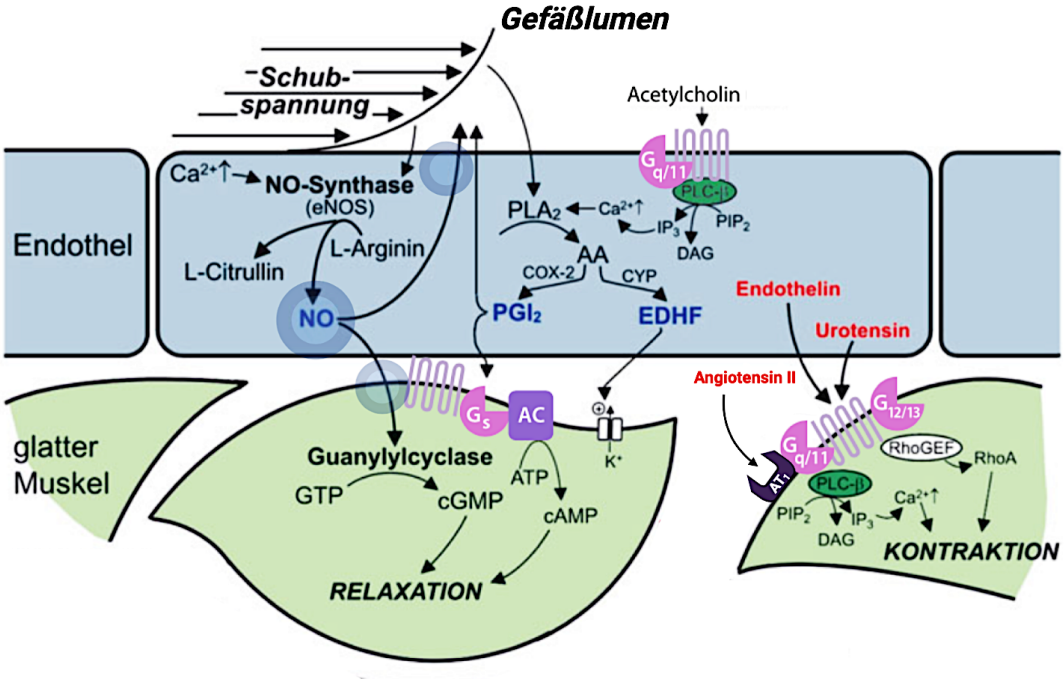

Abbildung 1-4: Endotheliale Mechanismen der Vasodilatation und -konstriktion
Schematische Darstellung der verschiedenen Mechanismen der Modulation des Gefäßtonus durch das Endothel. Die relaxierenden Faktoren sind in blauer und die kontrahierenden Substanzen in roter Farbe dargestellt.
Abkürzungen: NO: Stickstoffmonoxid, eNOS: endotheliale NO-Synthase, PGI_2: Prostazyklin, EDHF: Endothelium derived hyperpolarization factor, PLA_2: Phospholipase 2, AA: Arachidonsäure, COX-2: Cyclooxygenase 2, CYP: Cytochrom-P450-Monooxygenase, Ca^{2+}: Calcium-Ionen, IP3: Inositol-1,4,5-trisphosphat, DAG: Diacylglycerin, PIP_2: Phosphatidylinositolbisphosphat, GTP: Guanosintriphosphat, cGMP: cyclisches Guanosinmonophosphat, ATP: Adenosintriphosphat, cAMP: cyclisches Adenosinmonophosphat, K^+: Kalium Ion, AC: Adenylylcyclase, G_s / $G_{q/11}$/ $G_{12/13}$: G-protein gekoppelte Rezeptoren, RhoGEF: Rho-Guaninnukleotid-Austauschfaktor, RhoA: Protein der Ras-Homologenfamilie A, PLC- β: Phosphoinositid-Phospholipase C β. [Abbildung modifiziert aus (6)]

1.3.3 Die endotheliale NO-Synthase

Im Endothel gebildetes Stickstoffmonoxid spielt eine fundamentale Rolle in der Regulation der Gefäßhomöostase. Eine Verminderung der NO-Bioverfügbarkeit ist eines der Hauptmerkmale bei Patientinnen und Patienten mit Koronarer Herzkrankheit und verstärkt die Bildung von atherosklerotischen Plaques. Die NO-Bildung wird durch eine konstitutiv exprimierte NO-Synthase gewährleistet, die wie in *Abbildung 1-5* beschrieben aus L-Arginin •NO produziert (90). Bereits in Ruhe kommt es zu einer ständigen basalen NO-Freisetzung (91).

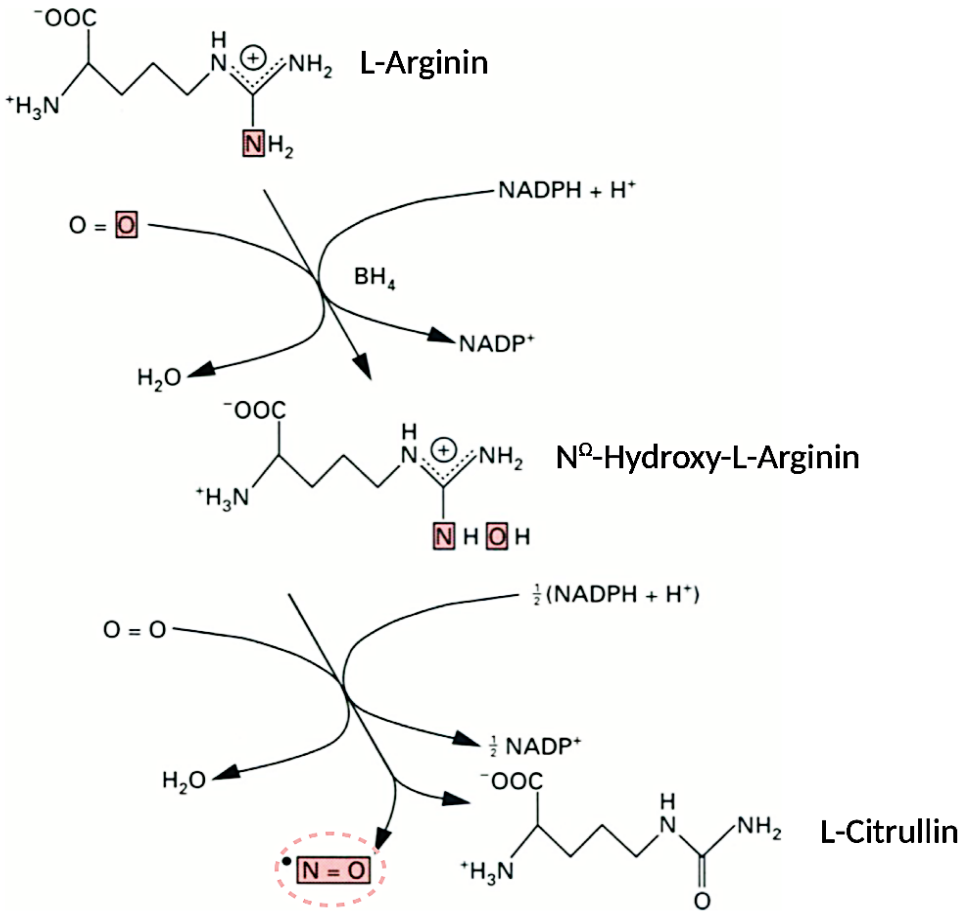

Abbildung 1-5: Bildung von Stickstoffmonoxid
Aus L-Arginin wird in zwei Oxidationsschritten über das Intermediat N^{Ω}-Hydroxy-L-Arginin L-Citrullin und NO gebildet. Dafür wird die reduzierte Form von NADPH als Co-Substrat genutzt. Relevant für die Reaktion ist zudem molekularer Sauerstoff sowie der Kofaktor Tetrahydrobiopterin.
Abkürzungen: NO: Stickstoffmonoxid, NADPH: Nicotinamidadenindinukleotidphosphat, BH_4: Tetrahydrobiopterin. [Abbildung modifiziert aus (7)]

Die Regulation der eNOS findet sowohl durch Acetylierung als auch Phosphorylierung statt, was jeweils eine Interaktion mit unterschiedlichen Liganden nach sich zieht. Eine Aktivierung erfolgt über eine Steigerung der intrazellulären Calcium-Konzentration, da auf diese Weise die Bindungsfähigkeit von Calmodulin an die eNOS verbessert wird und eine Aktivitätssteigerung nach sich zieht. Ein weiterer Stimulus sind verstärkte Scherkräfte, welche auf das Endothel wirken, und zu einer Phosphorylierung der e-NOS führen. Sie stellen einen der wichtigsten Aktivatoren der eNOS dar. Ein zusätzlicher unabhängiger, entscheidender Faktor für die Aktivität des Enzyms ist die Phosphorylierung des Serinrests 1177 (90-93). In ruhenden Endothelzellen führt die Bindung von Caveolin zur Inhibition der eNOS. Unter steigender Ca^{2+}-Konzentration fördert Calmodulin die Trennung von Caveolin von der eNOS und es kommt zur Aktivierung des Enzyms (91). Auch die Modulierung der Genexpression der eNOS ist ein weiterer Stellmechanismus für die Aktivitätssteigerung. Eine verstärkte Expression kann unter anderem als Reaktion auf vermehrte Schubspannung auf das Endothel beobachtet werden (94, 95). Allerdings kann die vermehrte Expression der eNOS unter oxidativen Stress Bedingungen zu hohen Spiegeln an dysfunktionaler oder entkoppelter eNOS führen und so gegenteilige Effekte induzieren. (88) So wird die Hochregulation der eNOS auch in Tieren mit kardiovaskulären Krankheiten beobachtet und als gegenregulatorische (oftmals vergebliche) Reaktion des Organismus auf die oxidativen Schäden interpretiert. (88)

1.3.4 Die Entkopplung der endothelialen NO-Synthase

Die Relevanz von reaktiven Sauerstoffspezies wurde bereits in *Kapitel 1.2* erläutert. Ein weiterer, pathophysiologisch entscheidender Mechanismus ist die Entkopplung der eNOS. Superoxidbildung durch die NAD(P)H-Oxidase führt zur Entstehung von Peroxynitrit, welches für den grundlegenden Mechanismus der eNOS-Entkopplung verantwortlich gemacht wird. Ein Verlust der Elektronen in der Elektronentransportkette in der Reduktasedomäne führt zur Übertragung der Elektronen auf molekularen Sauerstoff anstatt auf L-Arginin oder das Intermediat N^{Ω}-Hydroxy-L-Arginin kann nicht ausreichend stabilisiert werden. Resultat ist die Entstehung von Superoxid anstatt des protektiven Stickstoffmonoxids (4, 5, 88).

Die „*kindling radicals*“- oder „*bonfire*“-Hypothese beschreibt diese Umwandlung der eNOS in einen Superoxidgenerator, welche selbst durch Superoxid ausgelöst wird (96). Verschiedene Auslöser werden dafür verantwortlich gemacht, die auch als Redox-Schalter bezeichnet werden (eine Übersicht bietet *Abb. 1-6*). Essentiell für die Aktivität der eNOS ist das Vorhandensein des Cofaktors Tetrahydrobiopterin (BH_4) (88). Durch Peroxynitrit kommt es zu einer oxidativen Konversion von BH_4 über $\bullet BH_3$ zu BH_2 und damit zu einem Verlust des funktionsfähigen Cofaktors BH_4. Dies ist einer der am besten verstandenen Auslöser zur Entkopplung der eNOS (4, 88, 97).

Weitere Mechanismen sind die Oxidation des Zink-Thiolat-Clusters in der Bindungsregion der eNOS durch Veränderung der Dimer-Bindung (4, 98) und die S-Glutathionylierung an den Cysteinresten 689 und 908 in der Reduktasedomäne (72). Unter oxidativem Stress kommt es vermehrt zu S-Glutathionylierung. Die Phosphorylierung des Tyrosinrests 657 durch die Prolin-reiche Tyrosin-Kinase 2 (PYK-2) führt zur Inaktivierung der eNOS (88, 99). Die Phosphorylierung am Threoninrest 495 durch die Proteinkinase C (PKC) führt ebenfalls zu einer Verringerung der Enzymaktivität sowie einer möglichen Entkopplung (88, 100, 101). Die Phosphorylierungen durch diese Kinasen werden als Redox-Schalter angesehen, da sie durch Wasserstoffperoxid oder Peroxynitrit aktiviert werden können (5). Asymmetrisches Methylarginin (ADMA) stellt einen potenten endogenen eNOS-Inhibitor dar, welcher möglicherweise eine Entkopplung begünstigt (10, 88). ADMA stellt einen Redox-Schalter dar, weil der Abbau von ADMA durch die DDAH-Enzyme durch reaktive Sauerstoffspezies gehemmt wird und die

Bildung von ADMA durch PRMT-Enzyme durch oxidativen Stress begünstigt wird (5, 102).

Die beschriebene Entkopplung findet nicht nur bei der endothelialen NO-Synthase statt, sondern auch bei den induzierbaren und neuronalen Isoformen (4, 88).

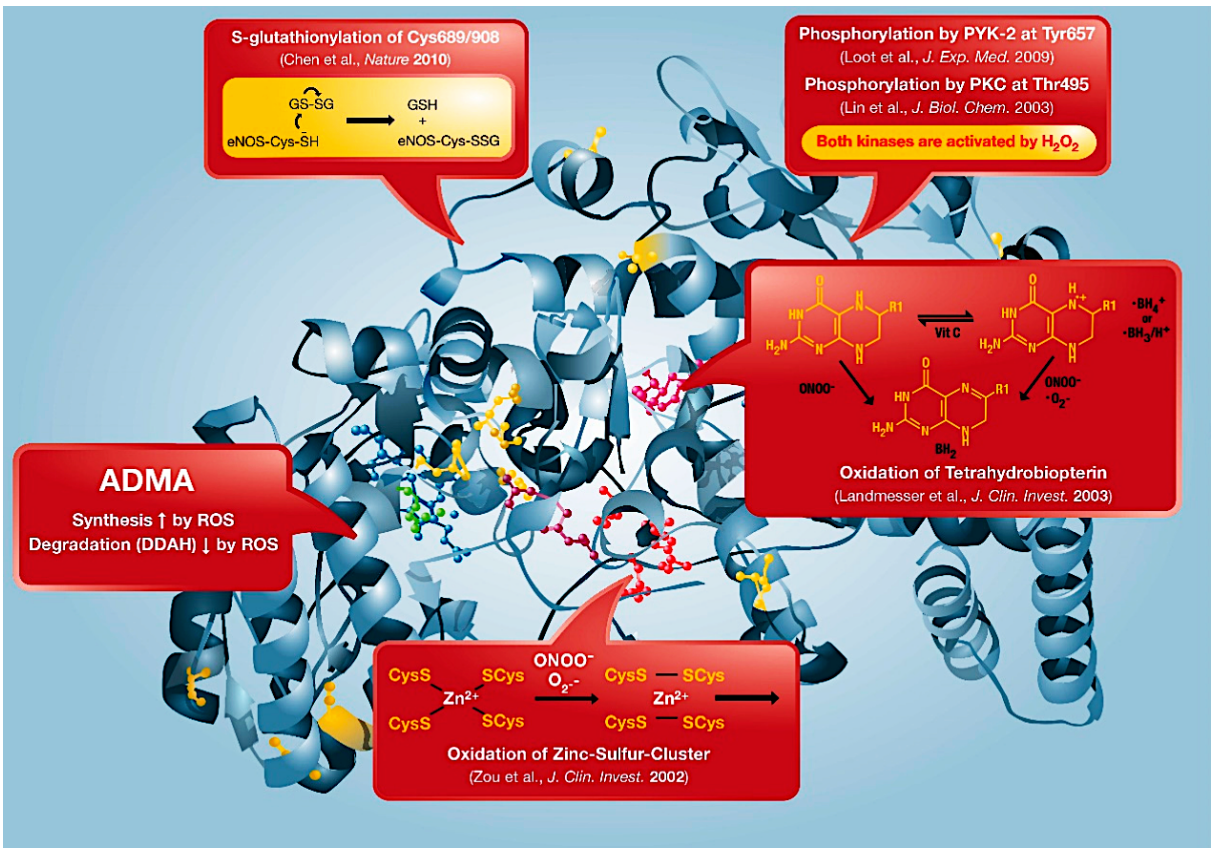

Abbildung 1-6: Redox-Schalter der endothelialen NO-Synthase
Die roten Kästen stellen die verschiedenen Redox-Schalter der eNOS dar, welche zu einer Entkopplung führen. Kristallstrukturanalyse der humanen eNOS basiert auf der Proteindatenbank 3NOS (DOI:10.2210/pdb3nos/pdb) unter Verwendung des PyMOL Prohramms Molecular Graphic System Version 1.2rl (DeLano Scientific LLC)
Abkürzungen/Übersetzungen: ADMA: asymmetrisches Dimethylarginin, ROS: reaktive Sauerstoffspezies, DDAH: Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase, BH_4: Tetrahydrobiopterin, Vit C: Vitamin C, Cys: Cystein, Tyr: Tyrosin, Thr: Threonin, PYK-2: Prolin reiche Tyrosin Kinase 2, PKC: Proteinkinase C, H_2O_2: Wasserstoffperoxid, NO: Stickstoffmonoxid, eNOS: endotheliale NO-Synthase, GSH: Glutathion, GSSG: Glutathion Disulfid, $•O_2^-$: Superoxid, $ONOO^-$: Peroxynitrit. [Abbildung aus (5)]

1.4 Der Zusammenhang zwischen endothelialer Dysfunktion und kardiovaskulären Erkrankungen

1.4.1 Die Dysfunktion des Endothels

Wie bereits beschrieben, ist das Endothel ein komplexes System, welches essenzielle Aufgaben für die Aufrechterhaltung physiologischer Körperfunktionen innehat (78). Bei einer Störung des Endothels kommt es zu seiner Beeinträchtigung und es verliert seine Funktionsfähigkeit. Dies bedeutet, dass das Endothel nicht mehr adäquat reagieren kann. Kommt es beispielsweise zu einer dauerhaften Aktivierung des RAAS, wird der AT_1 Rezeptor übermäßig aktiviert.

Dies führt nicht nur zu einer übermäßigen Vasokonstriktion, sondern auch zur Aktivierung der NAD(P)H-Oxidase, eine Quelle für reaktive Sauerstoffspezies (4).

Die Produktion von Stickstoffmonoxid im intakten Endothel führt nicht nur zu einer Vasodilatation, sondern zusätzlich diffundiert •NO auch in das Lumen der Gefäße und schützt die Gefäßwand vor Adhäsionen von Thrombozyten sowie Entzündungszellen (86, 103). Bei einer verringerten NO-Bildung fällt dieser protektive Faktor zunehmend weg. Grund dafür können stetige Inflammation oder exogene Noxen sein. Durch vermehrte Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies kann die Atmungskette der Mitochondrien beeinträchtigt werden und – die vermutlich wichtigste Rolle – die eNOS entkoppelt werden, was sie zu einer zusätzlichen Superoxidquelle macht. Neben dem Wegfall des positiven Effekts von Stickstoffmonoxid kann über verschiedene Pathomechanismen die Entstehung vaskulärer Erkrankungen begünstigt werden. In diesem Fall spricht man von einer endothelialen Dysfunktion (4, 104).

Diagnostizieren lässt sich diese endotheliale Dysfunktion mittels Acetylcholin-Test (siehe *Abb. 1-7*). Furchgott konnte in (79) nachweisen, dass Acetylcholin abhängig von der Intaktheit des Endothels eine Vasodilatation oder Vasokonstriktion bewirken konnte. Die Stimulation von muskarinergen Acetylcholin-Rezeptoren am Endothel führt dazu, dass es zu einer erhöhten Konzentration von intrazellulärem Calcium kommt. Dies hat zur Folge, dass über den Ca^{2+} / Calmodulin-Komplex die endothelabhängige NO-Synthase aktiviert wird und es zu endothelabhängiger Bildung von •NO kommt, welches eine Relaxation der glatten Muskelzellen zur Folge hat. Dadurch kommt es •NO vermittelt zur Vasodilatation. An den glatten Muskelzellen gibt es jedoch auch Rezeptoren für Acetylcholin, welche nach Stimulation durch ihren Liganden

erhöhte intrazelluläre Calcium Spiegel bewirken, die in den glatten Muskelzellen direkt zu einer vermehrten Aktivität der Myosin-leichte-Ketten-Kinase führen und somit durch Phosphorylierung von Myosin und vermehrter Interaktion der Myosin-Aktin-Filamente eine Vasokonstriktion auslösen. Die direkte kontrahierende Wirkung von Acetylcholin auf die glatten Muskelzellen wird bei funktionstüchtigem Endothel durch die eNOS-abhängige NO-Produktion und dessen vasodilatierenden Effekt überlagert. Fehlt nun die vasodilatatorische Wirkung aufgrund eines funktionslosen Endothels, äußert sich die Gabe von Acetylcholin in einer paradoxen Vasokonstriktion, da es zu einer Reduktion der NO-Verfügbarkeit gekommen ist (4, 79, 81, 92). Diese wird für diagnostische Zwecke, z.B. im Herzkatheterlabors angewendet (105). Umgekehrt zeigt eine vermehrte vasodilatatorische Antwort eine verbesserte endotheliale Funktion an. Es zeigte sich zudem, dass eine Dysfunktion des Endothels weit vor makroskopisch sichtbaren Gefäßveränderungen beobachtet werden kann und somit ein Prädiktor für die Entstehung von kardiovaskulären Ereignissen darstellt (4, 106).

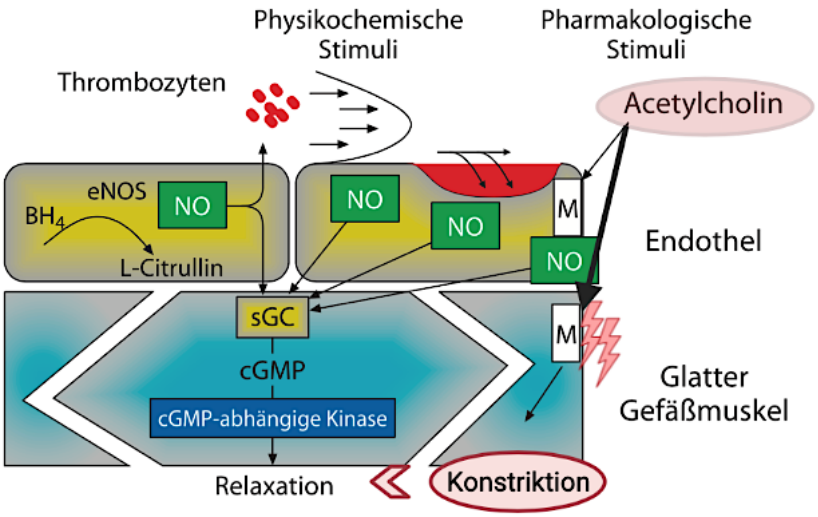

Abbildung 1-7: Mechanismus der Vasokonstriktion nach Gabe von Acetylcholin bei endothelialer Dysfunktion
Nach Gabe von Acetylcholin überwiegt die Aktivierung der muskarinergen Rezeptoren an den glatten Muskelzellen, welche eine Vasokonstriktion vermitteln, wenn das Endothel geschädigt ist. Sonst überwiegt immer die eNOS/NO vermittelte Vasodilatation.
Abkürzungen: NO: Stickstoffmonoxid, eNOS: endotheliale NO-Synthase, BH_4: Tetrahydrobiopterin, M: Muskarinerger Acetylcholin-Rezeptor, cGMP: cyclisches Guanosinmonophosphat, sGC: lösliche Guanylatcyclase. [Abbildung modifiziert aus (4)]

1.4.2 Die Rolle von oxidativem Stress bei der Entstehung der endothelialen Dysfunktion

Im Mittelpunkt bei der endothelialen Dysfunktion steht die Entkopplung der endothelialen NO-Synthase durch die Oxidation des Kofaktors Tetrahydrobiopterin. Die Interaktion von •NO und $^{\bullet}O_2^-$ führt zur Bildung von Peroxynitrit und somit wird neben der Verringerung der NO-Spiegel ein pro-atherogen wirkender Gegenspieler erzeugt (4). Eine weitere Komponente ist die Inaktivierung der löslichen Guanylatzyklase durch Peroxynitrit und Superoxid, sodass keine NO-vermittelte Relaxation der glatten Gefäßmuskelzellen mehr stattfinden kann (107). Ein zusätzlicher Faktor ist die Inaktivierung der Prostazyklinsynthase durch Peroxynitrit. Die Thromboxan- sowie die Prostazyklinsynthase verwenden dasselbe Substrat. Thromboxan A_2 wirkt vasokonstriktorisch, Prostazyklin vasodilatativ. Bei einer inhibierten Prostazyklinsynthase wird wesentlich mehr Thromboxan A_2 gebildet, was eine verstärkte Vasokonstriktion nach sich zieht (4). Es fällt auf der einen Seite der protektiven Faktors Stickstoffmonoxid weg, auf der anderen Seite vermitteln ROS zusätzlich pro-atherogen und vasokonstriktorische Mechanismen. Die Wirkung der reaktiven Sauerstoffspezies ist nicht auf das Endothel beschränkt, sondern greift in die Regulationswege der gesamten Gefäßwand ein, was in einer Beeinträchtigung der gesamten Gefäßfunktion resultiert (4, 108). Diese Prozesse sind in *Abbildung 1-8* zusammengefasst.

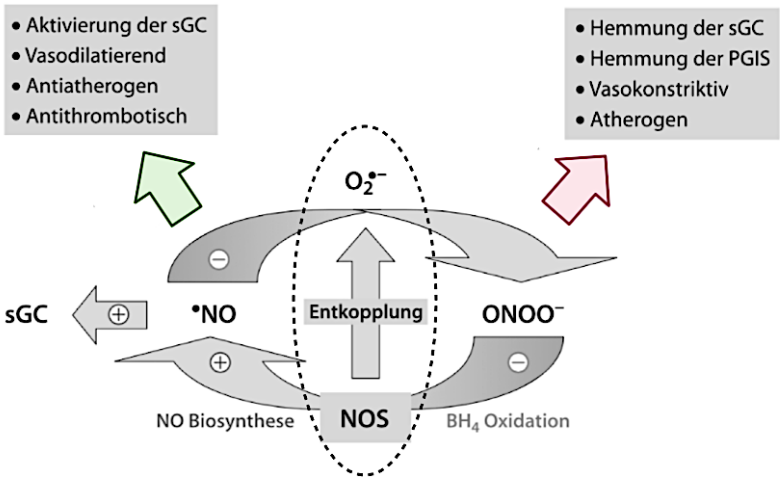

Abbildung 1-8: Die Wechselwirkung zwischen •NO, $ONOO^-$ und •O2-
Im Mittelpunkt steht die Bildung von Superoxid durch die entkoppelte NO-Synthase (gestrichelte Linie). Dargestellt sind die protektiven (grüner Pfeil) und schädlichen (roter Pfeil) Mechanismen.
Abkürzungen: sGC: lösliche Guanylatcyclase, •NO: Stickstoffmonoxid, $ONOO^-$: Peroxynitrit, $\bullet O_2^-$: Superoxid, PGIs: Prostazyklinsynthase, BH_4: Tetrahydrobiopterin, NOS: NO-Synthase. [Abbildung modifiziert aus (8)]

1.4.3 Entstehung der Atherosklerose

Die Atherosklerose ist Grundlage für die Entstehung von ischämischen Erkrankungen an Gefäßen. Bei ihr kommt es zu pathologischen Veränderungen von Gefäßen durch Bildung von lipidhaltigen Plaques, Aktivierung von Entzündungsprozessen und Einwanderung von Entzündungszellen wie Makrophagen und T-Lymphozyten in die Gefäßwand (109). Sind die Herzkranzgefäße betroffen, kann dies sich in einer Koronaren Herzkrankheit äußern. Prinzipiell führt die Atherosklerose zu einer Einengung des Lumens bis hin zum vollständigen Verschluss, was in einer Sauerstoffunterversorgung des nachgeschalteten Gebietes endet (Ischämie): Ein Herzinfarkt oder ein ischämischer Schlaganfall sind die Folge (30). Die Entstehung nennt man Atherogenese. Sie stellt ein multifaktorielles Geschehen dar. Das Endothel hat dabei große Relevanz. Denn zum einen hat die endotheliale Dysfunktion eine Initiatorfunktion bei der Bildung von atherosklerotischen Veränderungen in Gefäßen, zum anderen trägt sie zu einer Zunahme bei bereits bestehenden Plaques bei (78). Durch die Entkopplung der eNOS kommt es zu einer Bildung von Superoxiden sowie damit vermehrten Entstehung von Peroxynitrit, welches wiederum stark pro-atherogen wirkt. Es kommt zu einer verstärkten Adhäsion von Makrophagen sowie neutrophilen Granulozyten, welche in die Gefäßwand einwandern. Diese Entzündungszellen können durch oxidative Vorgänge das Endothel zusätzlich schädigen (4). Ein entscheidender Faktor sind vor allem cholesterinreiche Lipoproteine (vor allem LDLs). Denn sie werden durch vermehrte reaktive Sauerstoffspezies in ihre oxidierte Form überführt, sogenannte oxidierte Low Density Lipoproteins (ox-LDL) (78, 110, 111). Ox-LDLs sind Mitverursacher einer Kaskade von Entzündungsprozessen. Außerdem führen sie zur initialen Plaque-Formation in der Gefäßwand, da die Makrophagen diese oxidierten LDLs phagozytieren und zu Schaumzellen konvertieren. Durch verschiedene Mechanismen kommt es zu einer Aggregation von Thrombozyten und einer Wachstumsstimulation. Kommt es zu einer Plaqueruptur, so ist eine Verschleppung sowie vollständige Einengung des nachgeschalteten Lumens möglich. Ob ein Plaque rupturiert, hängt mit seiner Stabilität zusammen. Dieser lässt sich durch Modifikation von Risikofaktoren sowie pharmakologische Therapien stabilisieren (4, 112, 113). Oxidierte Lipoproteine verringern zudem die endothelabhängige Vasodilatation. Bei nicht oxidierten ist dies nicht der Fall. Eine Erklärung dafür ist die Aktivierung eines Scavenger-Rezeptors am Endothel, welche den L-Arginin/NO-Signalweg beeinträchtigt und dadurch die Stickstoffmonoxid Bildung

verringert wird. •NO inhibiert die Bildung von oxidierten LDLs. Oxidationsprozesse scheinen daher eine entscheidende Relevanz für die Entstehung der Atherosklerose sowie der Beeinträchtigung des Endothels und nachfolgenden kardiovaskulären Ereignissen zu haben (siehe *Abb. 1-9*) (10, 89, 114).

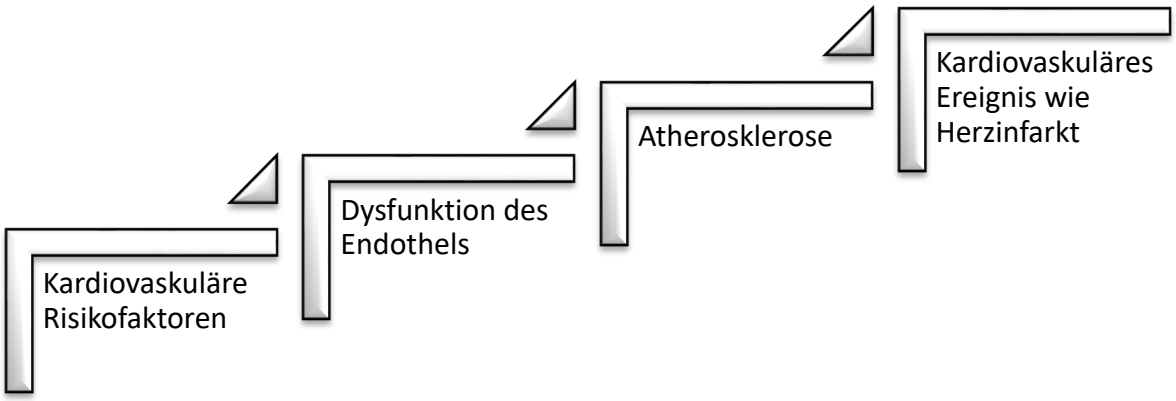

Abbildung 1-9: Die Entstehungskette kardiovaskulärer Erkrankungen
[Abbildung modifiziert aus (9)]

1.4.4 Arterielle Hypertonie

Die Regulation des Blutdrucks im kardiovaskulären System ist essentiell zur Aufrechterhaltung lebenswichtiger Körperfunktionen. Bei Lageänderung oder Veränderungen des peripheren Widerstands muss die zerebrale Perfusion dauerhaft gewährleistet sein und gleichzeitig sollte der mittlere Blutdruck nicht zu vielen Schwankungen unterliegen. Eine langfristige Blutdruckregulierung wird mithilfe des RAAS erzielt, welches über die Ausschüttung von Angiotensin II den Gefäßwiderstand erhöhen und über die vermehrte Salzretention das Blutvolumen vergrößern und somit den Blutdruck steigern kann (30).

Arterielle Hypertonie ist ein weit verbreiteter kardiovaskulärer Risikofaktor in unserer Gesellschaft. Von einer arteriellen Hypertonie spricht man laut der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie und der European Society of Cardiology ab einem Blutdruck von 140/90 mmHg. Der Zusammenhang zwischen arterieller Hypertonie und kardiovaskulären Ereignissen ist nicht linear zuordenbar. Sicher ist jedoch, dass ein erhöhter arterieller Blutdruck zu einem gesteigerten kardiovaskulären Gesamtrisiko und damit einer gesteigerten Morbidität und Mortalität beiträgt (30, 115).

Die essentielle Hypertonie, welche 85-90% ausmacht, zeichnet sich durch die Erhörung des peripheren Widerstands in arteriellen Gefäßen aus (104, 116).

Die endotheliale Dysfunktion kann einen erhöhten Gefäßwiderstand als Folge haben. Eine wichtige Rolle spielt dabei die Bildung des Vasokonstriktors Angiotensin II. Es zeigte sich, dass die Behandlung mit AT-II zu einer gesteigerten Superoxidbildung über die Aktivierung der NAD(P)H-Oxidase führte. Die Folge war die Beeinträchtigung der Endothelintegrität wegen einer verringerten NO-Bioverfügbarkeit. Die erhöhte oxidative Stressbildung hat - wie bei der Atherogenese - Einfluss auf die Wandbeschaffenheit von Gefäßen, die Fähigkeit zur Vasodilatation als auch auf myogenen Tonus der Gefäßwand. All dies sind Faktoren, welche den peripheren Widerstand schlussendlich erhöhen und in einer Steigerung des arteriellen Blutdrucks resultieren (104, 117, 118). Erhöhte arterielle Blutdruckwerte stellen somit einen prädispositionierenden Faktor für anschließende kardiovaskuläre Ereignisse dar (118).

1.4.5 Ausdauertraining als Modulator des kardiovaskulären Risikoprofils

Körperliches Training ist eine einfache Strategie, sein persönliches kardiovaskuläres Risiko zu senken. Denn Lebensstilveränderungen sind, im Gegensatz zu beispielsweise biologischem Alter, beeinflussbare Variablen für kardiovaskuläre Ereignisse und Erkrankungen (119). Ausdauertraining hat dabei einen positiven Einfluss auf den arteriellen Blutdruck, die endotheliale Funktion sowie auf Biomarker im Vollblut. Der Effekt ist vor allem bei Menschen ausgeprägt, welche bereits ein hohes kardiometabolisches Risikoprofil aufweisen (120). Moderates Ausdauertraining zeigte sich bei der Behandlung von arteriellem Hypertonus als effektive Behandlungsstrategie. Neben einer kurzfristigen Absenkung des Blutdrucks als physiologische Reaktion auf den Sport führte Ausdauertraining auf lange Sicht hin zu neuroendokrinen und vaskulären Veränderungen. Diese äußerten sich zum Beispiel in einer Vergrößerung des Lumendurchmessers der Gefäße und in einer Anpassung der Expression von vasokonstriktorischen und -dilatativ wirkenden Faktoren (121). Außerdem hatte Ausdauertraining einen positiven Effekt auf die mentale Gesundheit (122).

Die deutsche Gesellschaft für Kardiologie in Zusammenarbeit mit der European Society of cardiology empfiehlt in ihren Leitlinien zur Prävention von kardiovaskulären Ereignissen und als erste Maßnahme zur Therapiestrategie der arteriellen Hypertonie die Modifikation des Lebensstils, wozu körperliche Betätigung zählt. Beachtung finden sollten dabei immer persönliche Präferenzen, Komorbiditäten, Umsetzbarkeit sowie das allgemeine Risikoprofil der Patientinnen und Patienten (123).

1.5 PRMT-1/DDAH-2/ADMA - Signalweg

Die Bildung von Stickstoffmonoxid durch die eNOS ist ein entscheidender Mediator zur Aufrechterhaltung der vaskulären Homöostase. Ein Defizit in der NO-Bildung durch die Blockade des L-Arginin/NO-Stoffwechselwegs bringt dieses Gleichgewicht ins Wanken, ist mit der Entstehung von zahlreichen kardiovaskulären Erkrankungen assoziiert und wird als pro-atherosklerotisch angesehen (10, 124).

1992 fanden Vallance et al. (125) einen endogenen kompetitiven Inhibitor der NO-Synthase: Asymmetrisches Dimethylarginin/ N^G-N^G-Dimethyl-L-Arginin (ADMA) (siehe *Abb. 1-10*). ADMA konkurriert mit dem eigentlichen Substrat L-Arginin um die Bindungsstelle an der endothelialen NO-Synthase (126).

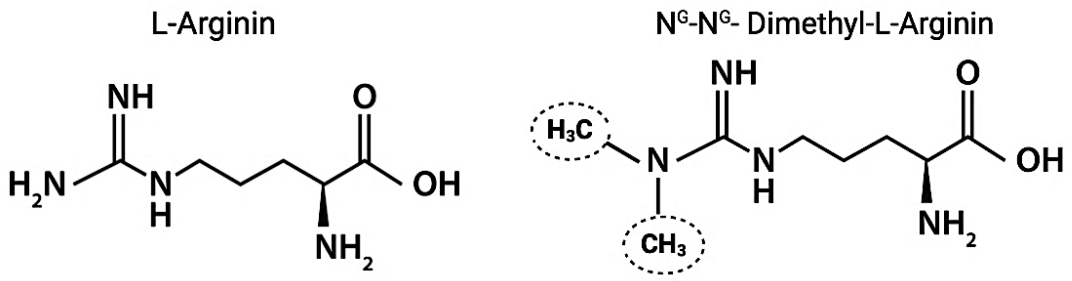

Abbildung 1-10: Strukturformeln von L-Arginin und N^G-N^G-Dimethyl-L-Arginin
ADMA ist ein kompetitiver Inhibitor der NO-Synthase und konkurriert mit dem eigentlichen Substrat L-Arginin. Strukturell unterscheiden sich die Moleküle durch zwei Methylgruppen (gestrichelte Linie).

Es zeigte sich, dass erhöhte ADMA-Spiegel mit zahlreichen kardiovaskulären Pathologien einhergingen, darunter auch die Beeinträchtigung der endothelialen Funktion (125, 127, 128). Miyazaki et al. (129) zeigten in einer Studie 1999, dass erhöhte ADMA-Level mit einer Verdickung der Gefäßwand assoziiert waren. Weiter fanden sich erhöhte ADMA-Spiegel im Plasma bei Studiengruppen mit arterieller Hypertonie, Hypercholesterinämie und Atherosklerose (127, 130). Auch im Rahmen der Athero-Gene Studie in Mainz und Koblenz konnte gezeigt werden, dass ADMA-Spiegel im Plasma prädiktiv für ein erhöhtes kardiovaskuläres Risiko in Patienten mit KHK sind (128). Da sich ADMA unabhängig von Risikofaktoren wie Rauchen, Alter oder Lebensalter verhielt, gilt es als autonomer Biomarker für kardiovaskuläre Erkrankungen und Ereignisse (128, 131).

ADMA entsteht beim proteolytischen Abbau von Proteinen, welche methylierte Arginin-Seitenketten besitzen. Diese Methylierung findet über die Protein-Arginin-Methyltransferase 1 (PRMT-1) statt. Methylierung von Proteinseitenketten dienen generell der Modulation der Proteinfunktion. Anschließend findet entweder die Metabolisierung von ADMA durch das Enzym Dimethylarginin Dimethylaminohydrolase (DDAH) statt, welches ADMA zu Citrullin und Dimethylamin abbaut, oder ADMA wird direkt renal ausgeschieden (10, 132, 133). Verringerte DDAH-Spiegel wurden mit erhöhten ADMA-Spiegeln und damit einhergehender Beeinträchtigung der NO-Bioverfügbarkeit in Verbindung gebracht (133). Diese Prozesse sind in *Abbildung 1-11* dargestellt.

DDAH kommt in zwei Isoformen vor, wobei lange die Annahme bestand, dass DDAH-1 vorwiegend in Zellen mit Expression der neuronalen NOS (nNOS) und DDAH-2 mit Expression der eNOS vorherrschend sei. Dies ist jedoch nicht ausreichend geklärt (133). DDAH-2 hatte nachweislich Effekte auf die Relaxationsfähigkeit von Gefäßen (134) und die Inhibition beider Isoformen beeinflusste die NO-Produktion. Die vollständigen funktionellen Mechanismen der DDAH-1 und 2 sowie die Rolle von PRMTs bei der Regulation der NO-Produktion in endothelialen Zellen sind noch unklar. Vieles deutet darauf hin, dass eine Dysregulation des PRMT-1/DDAH-2/ADMA-Signalwegs eine entscheidende Rolle in der Pathogenese von kardiovaskulären Veränderungen spiele (133).

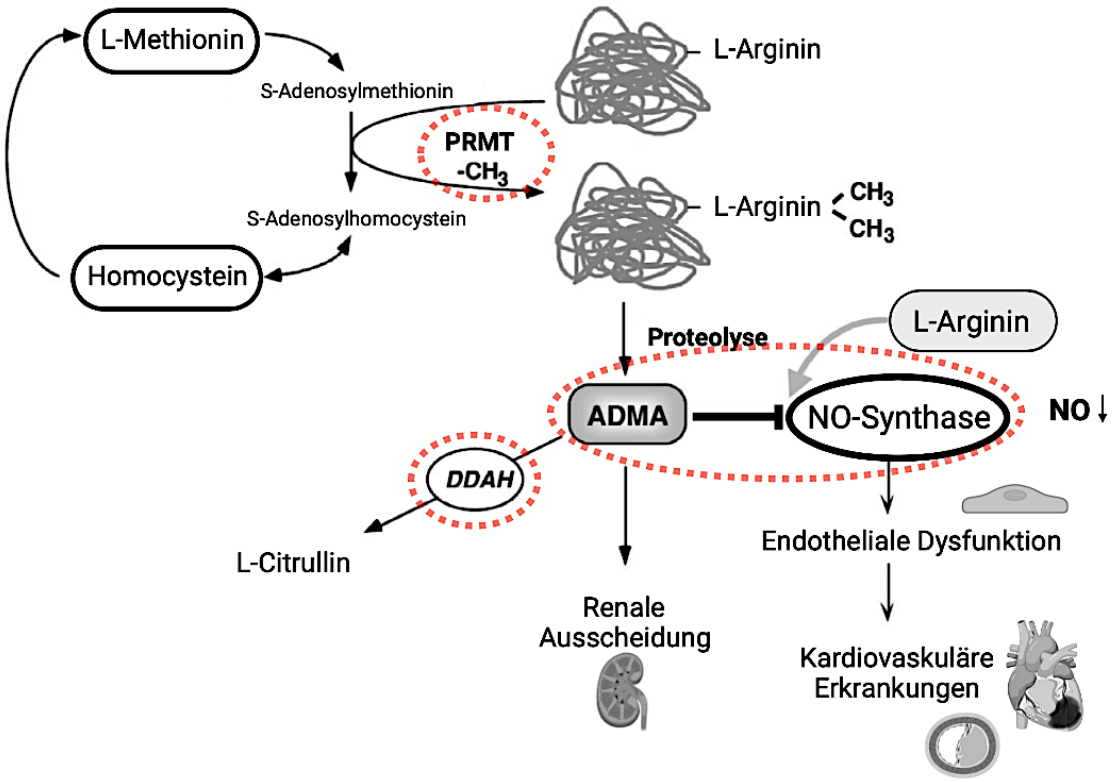

Abbildung 1-11: Biochemische Stoffwechselwege von ADMA
Mittels Protein-Arginin-Methyltransferasen werden Seitenketten von L-Arginin innerhalb von Proteinen methyliert. Als Donor fungiert hierbei S-Adenosylmethionin. Nach proteolytischem Abbau dieser Proteine ist ADMA frei im Zytoplasma vorhanden. Dabei hemmt es die NO-Synthase, indem es mit L-Arginin konkurriert, was zu einer verringerten NO-Bildung führt. Damit verursacht ADMA eine Beeinträchtigung der Endothelfunktion, was wiederum mit zahlreichen kardiovaskulären Ereignissen in Zusammenhang steht. ADMA kann entweder renal ausgeschieden werden oder mithilfe einer Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase zu L-Citrullin und Dimethylamin abgebaut werden.
Abkürzungen: ADMA: Asymmetrisches Dimethylarginin/N^G-N^G-Dimethyl-L-Arginin, DDAH: Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase, PRMT: Protein-Arginin-Methyltransferase. PRMT-ADMA-DDAH Achse: gestrichelte rote Linie. [Abbildung übersetzt und modifiziert aus (10)]

1.6 Die AMP-abhängige Kinase: AMPK

Die AMP-abhänge Kinase stellt ein wichtiges Kontrollsystem dar, da sie als Sensor der zellulären Energiebilanz angesehen wird (135). Als Kinase gehört sie zu der Gruppe von Enzymen, welche andere Proteine phosphorylieren, also eine Phosphat-Gruppe auf eine Aminosäureseitenkette übertragen können. Rückgängig gemacht wird dies von Enzymen der Gruppe der Phosphatasen (13). Ihren Namen verdankt die AMPK ihrem wichtigsten physiologischen Aktivator: AMP. Sie fungiert als Hauptschalter für Energieproduktion und -umsatz. Kommt es zu einem Abfall der Energiewährung ATP, wird sie aktiviert, um so das Überleben der Zelle zu sichern (136). Unabhängig vom Energiestoffwechsel werden der AMPK entscheidende Rollen für das kardiovaskuläre System zugeschrieben: Wirkung auf die NO-Bioverfügbarkeit über die Aktivierung der eNOS, die Angiogenese, die Inhibition der Proliferation von glatten Muskelzellen in der Gefäßwand sowie anti-apoptotische Signalmechanismen (136-139). Eine Zusammenfassung bietet *Abbildung 1-12.*

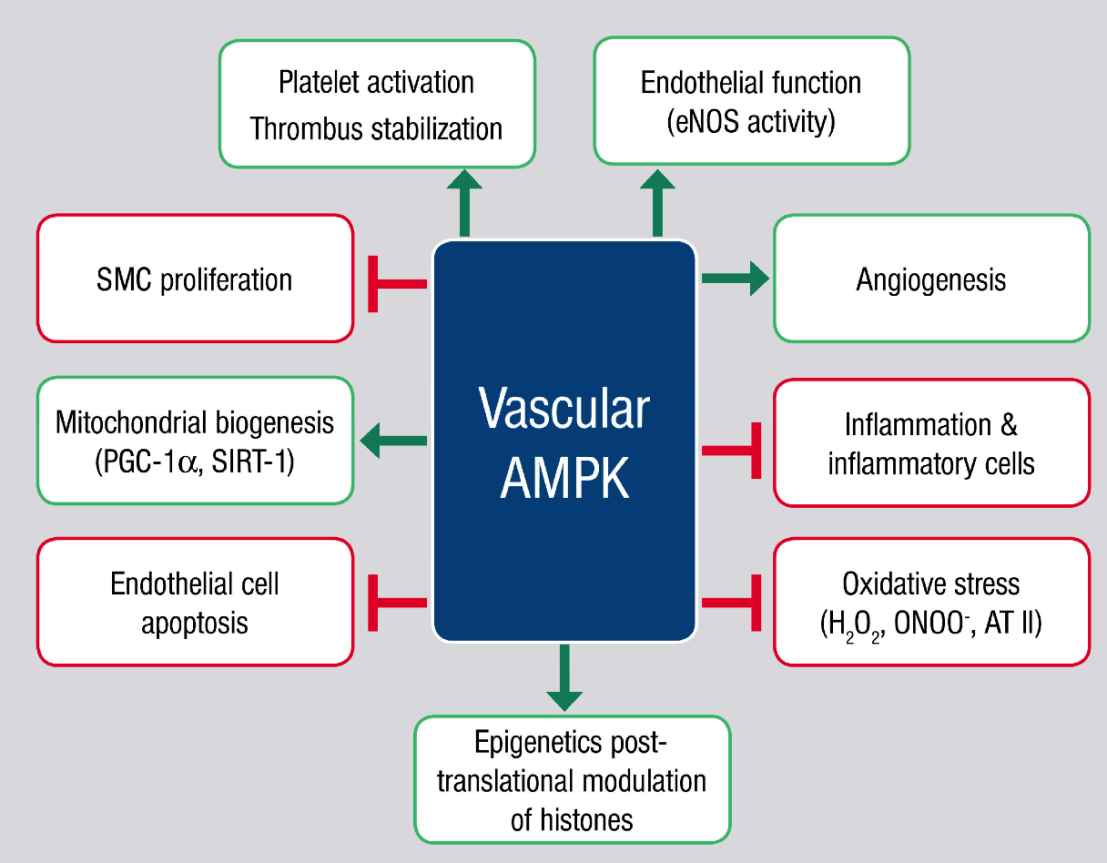

Abbildung 1-12: Physiologische Funktionen der vaskulären AMPK
Grün umrahmte Kästen: Die vaskuläre AMPK führt zu einer Induktion der Angiogenese, verbessert die Endothelfunktion über die Aktivierung der eNOS, führt zu einer Stabilisierung von Thromben und einer Plättchen-Aktivierung und zu epigenetischen Modulierungen. Zudem reguliert sie die mitochondriale Biogenese. Rot umrahmte Kästen: Die vaskuläre AMPK hemmt Prozesse im Rahmen der Inflammation und inflammatorische Zellen, die Bildung von oxidativem Stress, die Apoptose von endothelialen Zellen und die Proliferation von glatten Muskelzellen.
Abkürzungen/Übersetzungen: AMPK: Adenosinmonophosphat- abhängige Kinase, AT II: Angiotensin II, eNOS: endotheliale NO-Synthase, H_2O_2 Wasserstoff, $ONOO^-$: Peroxynitrit Anion, PGC-1 α: Peroxisome Proliferator-activated Receptor Gamma Coaktivator 1-alpha; SIRT-1: Sirtuin 1; SMC: smooth muscle cell= Glatte Muskelzelle [Abbildung aus (11)]

1.6.1 Historische Einordnung

Die Entdeckung der AMPK basierte auf zwei unabhängigen Untersuchungen. 1973 wurde die Assoziation mit einer Proteinkinase für die Inaktivierung der Acetyl-CoA Carboxylase sowie der HMG-CoA-Reduktase festgestellt (140, 141). Beide Enzyme sind für geschwindigkeitsbegrenzende Schritte in der Fettsäuresynthese und Cholesterinbildung zuständig. In dieser Zeit wurde die generelle Möglichkeit der Regulation von

Schlüsselenzymen in verschiedenen Stoffwechselwegen über Phosphorylierung entdeckt (142).

Der Name AMPK wurde zuerst 1988 von Munday et al. (143) verwendet, als dieser die ACC-Kinase 3 für die Reduktion von V_{max} bei der Bildung von ACC verantwortlich machte. Ein Jahr später konnten Carling et al. (144) nachweisen, dass es sich bei der HMG-CoA-Reduktase Kinase und der ACC-Kinase um dasselbe Enzym handelte: die AMPK. Die AMPK ist in der Lage bei niedrigen Energiereserven, anabole Stoffwechselwege wie die Fettsäuresynthese oder die Proteinsynthese abzuschalten, katabole Stoffwechselwege hingegen zu aktivieren, um die Energieversorgung der Zelle sicherzustellen. Dies passiert bei niedrigen ATP und hohen AMP-Spiegeln (142).

1999 wurde durch Chen et al. (145) zum ersten Mal deutlich, welche wichtige Rolle die AMPK durch die Phosphorylierung der eNOS für das kardiovaskuläre System spielen könnte.

1.6.2 Aufbau und Strukturanalyse

Die AMPK wird ubiquitär im Organismus exprimiert und existiert als heterotrimere Struktur. Eingeteilt werden kann die Struktur in eine katalytische α Einheit und die regulatorischen Einheiten β und γ. Säugetiere haben diese verschiedenen Untereinheiten (α1, α2; β1, β2; γ1, γ2, γ3) auf unterschiedlichen Genen codiert (146). Insgesamt lassen sich daher zwölf Isoformen dieses Enzyms bilden, die vom jeweiligen Zelltyp, in dem sie exprimiert werden, abhängen. Die α Untereinheit bildet am N-Terminus die Serin/Threonin Kinase-Domäne, welche einen N-Lobe und C-Lobe mit einem aktiven Zentrum dazwischen beinhaltet. Die Phosphorylierung des Threoninrests Thr^{172} ist unabdingbar für die Aktivität der AMPK. In der *Abbildung 1-13* bindet das aktive Zentrum den Inhibitor Staurosporin. Neben der Kinase-Domäne befindet sich die autoinhibitorische Domäne (AID). Die Beta-Untereinheit beinhaltet den kohlenhydratbindenden Anteil (CBM= Carboanhydrate binding module) sowie den C-Terminus. Die CBM-Domäne spielt eine entscheidende Rolle bei der Messung der Energiestände in der Zelle. Die γ Untereinheit enthält regulatorische Bindungsstellen für Adenosinnukleotide. Zudem interagiert die CBM-Bindungsstelle mit der γ Untereinheit, in der die Individuelle Aktivierung der AMPK stattfindet (11, 12, 147).

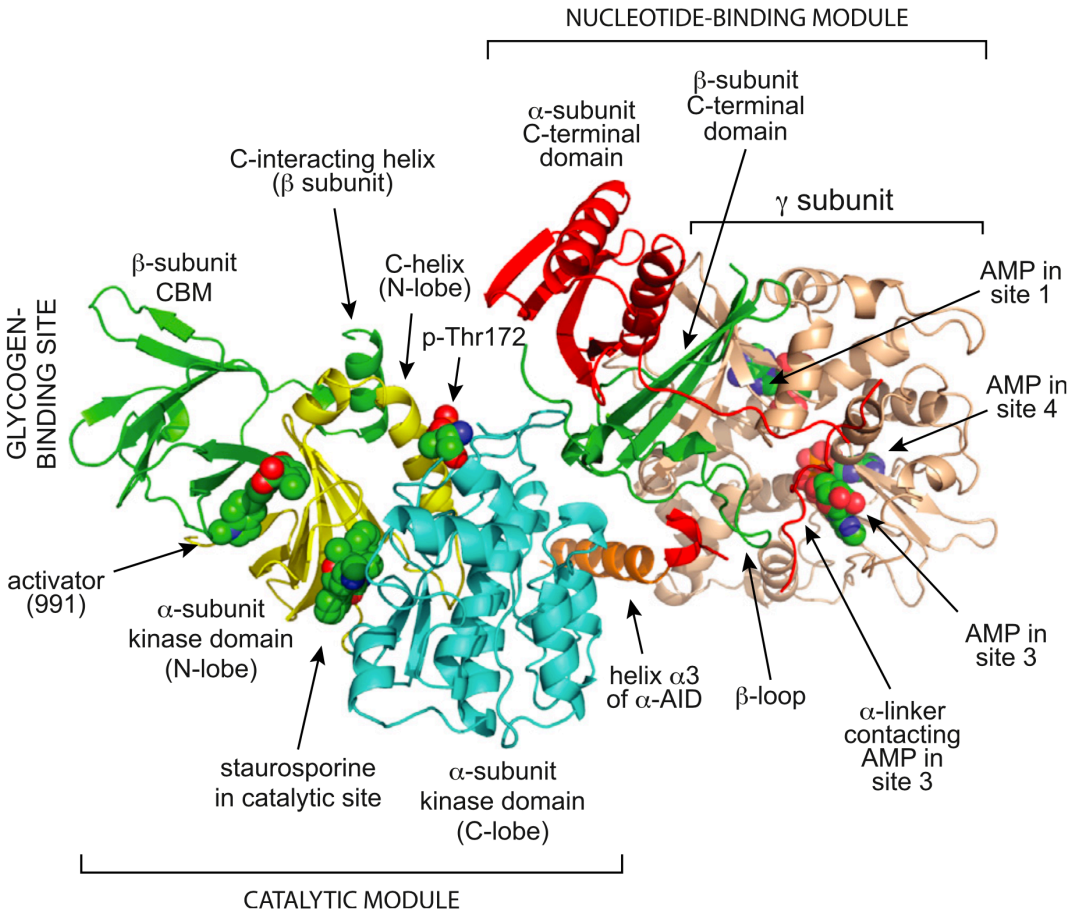

Abbildung 1-13: Kristallstruktur der heterotrimeren AMPK
Die α, β und γ Untereinheit der AMPK sind in „Cartoon"- Darstellung farbkodiert gezeigt. Die drei AMP-bindenden Elemente, der Aktivator 991 sowie der Kinase Inhibitor Staurosporin und Phopshpo-Thr172 erscheinen in Kugelansicht mit grünem C Atom, rotem O Atom, blauem N Atom und orangenem P-Atom.
Abkürzungen/Übersetzungen: AID: autoinhibitorische Domäne, CBM: carboanhydrate binding Module= Kohlenhydrat bindendes Element, AMP: Adenosinmonophosphat, Thr: Threonin, p-Thr172: phosphorylierter Threoninrest
Die Kristallstruktur wurde mit MacPyMOl kreiert mit Nutzung der Protein Datenbank PDB File 4 CFE. [Abbildung aus (12)]

1.6.3 Regulation der AMPK-Aktivität und Mechanismen der intrazellulären Energiemessung

Der Schüsselmechanismus der Aktivierung der AMPK findet über die Phosphorylierung des Threoninrests Thr^{172} statt, welches sich in der α Untereinheit der Kinase-Domäne befindet. Diese Reaktion wird von zwei unterschiedlichen Kinasen katalysiert, der Calcium/Calmodulin- abhängigen Protein Kinase Kinase 2 (CaMKK2) und der Leber Kinase B1 (LKB1). CaMKK2 wird durch Steigerung der intrazellulären Calcium-Ionen Konzentrationen aktiviert, was oft durch verschiedene Hormone vermittelt wird. Diese stellt den Hauptaktivator in Endothelzellen dar. Die LKB1 ist, unabhängig von externen Einflüssen, dauerhaft aktiv und wird als Master-Kinase für die Aktivierung der AMPK angesehen. Durch diese beiden unabhängigen Aktivierungswege kann die AMPK über verschiedene Signalwege beeinflusst werden (11, 13). Die Hauptwege der AMPK-Aktivierung sind in *Abbildung 1-14* dargestellt.

Allosterisch wird die AMPK durch die Bindung von AMP an die γ Untereinheit aktiviert. Die Stärke der Aktivitätssteigerung wird dabei jedoch durch den Aufbau der katalytischen α Untereinheit und der regulatorischen γ Untereinheit bestimmt. Die Bindung von AMP resultiert in einer Konformitätsänderung in der Kinase-Domäne. Hohe ATP-Konzentrationen wirken der AMP-Aktivierung dafür entgegen. Die Bindung von ATP und AMP scheinen sich daher auszuschließen. Die AMPK gilt daher als Sensor des intrazellulären ATP/AMP Verhältnisses. Die Konzentrationen von AMP und ATP bedingen sich gegenseitig durch die Wirkung der Adenylatcyclase mit folgender Reaktion: AMP+ATP ←→2 ADP. Die Kombination der allosterischen Aktivierung und Phosphorylierung führt zu einer 1000-fachen Aktivitätssteigerung (146). Denn AMP führt zu einer Steigerung der LKB1 vermittelten Phosphorylierung, einer verminderten Dephosphorylierung sowie eine Steigerung der bereits phosphorylierten AMPK. Diese drei Mechanismen wirken synergistisch auf die Leistung des Enzyms (13).

Daneben gibt es auch die Möglichkeit der pharmakologischen Aktivierung der AMPK, was durch verschiedene Aktivatoren erreichbar ist, unter anderem AICAR (5-Aminoimidazol-4-Carboxymidribonucleosid). AICAR wirkt als AMP-Analogon und imitiert die AMP vermittelte Aktivierung als potenter Stimulator (11, 148).

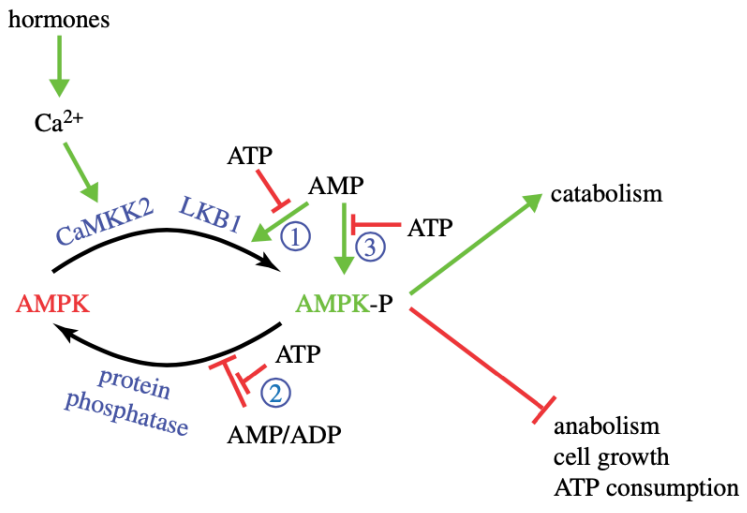

Abbildung 1-14: Dreifache Aktivierung der AMPK
1. AMP führt zu einer vermehrten Phosphorylierung der AMPK vermittelt durch die LKB1.
2. AMP inhibiert die Dephosphorylierung durch Proteinphosphatasen. Hohe ADP-Spiegel können die Wirkung von AMP imitieren.
3. AMP führt zur allosterischen Aktivierung der AMPK
ATP antagonisiert alle drei Effekte. Die CaMKK2 phosphoryliert ebenfalls die AMPK an Thr172, jedoch Calcium vermittelt.
Abkürzungen/Übersetzungen: Ca^{2+}: Calcium-Ionen, AMP: Adenosinmonophosphat, ADP: Adenosindiphosphat, ATP: Adenosintriphosphat AMPK: AMP- abhängige Kinase, AMPK-P: phosphorylierte Adenosinmonophosphat- abhängige Kinase an Thr172, CaMKK2: Ca^{2+}/ Calmodulin-dependent protein kinase kinase-2= Calcium/Calmodulin abhängige Proteinkinase Kinase 2, LKB1: Liver Kinase B1= Leber Kinase B1. [Abbildung aus (13)]

1.6.4 Der Einfluss der AMPK auf die Bildung von vaskulärem oxidativem Stress sowie die endotheliale Funktion

Die AMPK ist bekannt für ihren wichtigen Beitrag zur Gefäßhomöostase (32). In *Kapitel 1.2.3* wurde deutlich, dass eine der Hauptquellen der ROS-Bildung in der mitochondrialen Atmungskette lokalisiert ist (11). Ein zentraler Regulator im Rahmen von antioxidativen Prozessen ist der Transkriptionsfaktor Nrf-2. Die Aktivierung von Nrf-2 durch ROS dient der Aufrechterhaltung der Redox-Homöostase. Nach Phosphorylierung durch die Proteinkinase C δ (PKC δ) ist dieser in der Lage aus dem Zytosol in den Zellkern zu translozieren und dort an antioxidative Regionen der DNA zu binden (ARE= antioxidant response elements). Diese aktivieren dann die Expression von antioxidativen Enzymen (11, 149, 150).

Die AMPK gilt als positiver Aktivator von Nrf-2, indem sie den Serinrest Ser^{550} phosphoryliert und so Nrf-2 im Zellkern akkumuliert. Die Folge ist eine gesteigerte Aktivierung von antioxidativ wirkenden Enzymen in der Zelle. Diese direkte Beeinflussung des antioxidativem Abwehrsystems stellt eine wichtige Verbindung zwischen der Redox-Homöostase und Zellmetabolismus dar (11, 151). Die AMPK kann auch direkt über die Oxidation von Cystein-Seitenketten mittels S- Glutathionylierung in der Kinase -Domäne aktiviert werden. Grund dafür können hypoxische Zustände in der Zelle sein, welche zu einer gesteigerten ROS-Bildung führen (152, 153). Daneben kann eine Aktivierung auch indirekt über redoxsensitive upstream Kinasen sattfinden. Kommt es beispielsweise bei Hungerzuständen zur ROS-Bildung, nimmt die AMPK eine entscheidende Funktion beim Zellüberleben ein (11, 154).

Insgesamt stellt die AMPK eine Schlüsselfunktion in der Aufrechterhaltung der intrazellulären Stoffwechselhomöostase und Regulation der Redoxbalance dar. Ihre Funktionalität steht an einer zentralen Position bei der Aufrechterhaltung der physiologischen Zustände und damit die Erhaltung der kardiovaskulären Gesundheit (155, 156).

Eine funktionstüchtige NO-Synthase ist entscheidend für die endotheliale Funktion. Die AMPK kann über verschiedene Signalwege Einfluss auf die Bildung von Stickstoffmonoxid nehmen. Durch vermehrte Schubspannung im Gefäßsystem wird die AMPK aktiviert und vermittelt über die Phosphorylierung der Serinreste $Ser^{633/635}$ eine Aktivierung der eNOS (157). Für die Funktionstüchtigkeit der eNOS ist ihr Cofaktor Tetrahydrobiopterin essentiell, welcher über die GTP Hydrolase I (GCH-I) reguliert wird. AMPK nimmt Einfluss auf die Proteinstabilität der GCH-I, was zu einem verringerten Abbau dieses Enzymes führt (158).

Das Labor für molekulare Kardiologie der Universitätsmedizin Mainz konnte zeigen, dass Angiotensin II vermittelte Effekte wie die endotheliale Dysfunktion, die vermehrte Invasion von Entzündungszellen und die massive Bildung von Superoxiden in der Gefäßwand durch die Aktivierung der AMPK signifikant verbessert werden konnte. Dies war vorwiegend der vaskulären Isoform AMPK α1 zuzuschreiben (159). Die Integrität endotheliale AMPK α1 scheint daher ein Kernelement bei der Erhaltung der Gefäßhomöostase und bei der Immunantwort im Gefäßsystem unter Stressbedingungen im Sinne eines pro-oxidativem Status zu sein (11, 22).

1.6.5 AMPK und Ausdauersport

Mangelnde Bewegung ist ein möglicher Grund zur Entwicklung von kardiovaskulären Erkrankungen. Ausdauersport ist dabei eine effektive und gleichzeitig einfache Lösung zur Verhinderung von kardialen Risikofaktoren wie Übergewicht und arterieller Hypertonie. Verschiedene Studien gehen davon aus, dass die AMPK eine entscheidende Rolle zur Vermittlung von diesen positiven Effekten spielt (21, 160).

Die AMPK wird als Energiesensor durch Veränderungen im AMP/ATP-Verhältnis aktiviert. Vermehrter Verbrauch von ATP geht mit erhöhten AMP-Spiegeln einher und das Verhältnis verschiebt sich (11, 13). Vermehrter Verbrauch der Energiewährung ATP wird durch körperliches Training erzielt, was zur Aktivierung der AMPK führt (161).

Die Effekte auf das Gefäßsystem sind dabei multifaktoriell vermittelt. Eine zentrale Rolle spielt die Aktivierung der eNOS zur Steigerung der NO-Bioverfügbarkeit im Gefäßsystem (136, 145, 162). Diese Aktivierung ist hauptsächlich durch die vaskuläre Isoform vermittelt, welche im Endothel sowie in glatten Muskelzellen zu finden ist (163, 164). Der gesteigerte Blutfluss im Gefäßsystem während sportlicher Aktivität führt zu einer stärkeren Schubspannung im Gefäß und darin liegenden Endothel. Dies ist eine der wichtigsten Aktivatoren der eNOS (90). Durch körperliche Aktivität kam es zur Phosphorylierung des Serinrests Ser^{1177} der eNOS, was bei einem endothelialen Knockout der AMPK α1 ausblieb (23, 165). Diese als auch die Phosphorylierung am Serinrest $Ser^{633/635}$, welche in einer vermehrten NO-Verfügbarkeit resultierte, wird der AMPK zugeschrieben, welche selbst durch vermehrte Schubspannung aktiviert wird (21, 157).

Freiwilliges Ausdauertraining hat sich als effektive Strategie zur Vermittlung von positiven Effekten auf das kardiovaskuläre System herausgestellt. Besonders als Strategie zur primären Prävention, aber auch als Beeinflussung von bereits bestehenden Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems. Vor allem bei Herzinsuffizienz und koronarer Herzkrankheit scheint Ausdauertraining sich vorteilhaft auf den Krankheitsverlauf und die Mortalität auszuwirken (166, 167). Kröller-Schön et al. zeigten in (21), dass Ausdauertraining ein effizienter Aktivator verschiedener metabolischer Signalwege darstellt und unter anderem die AMPK, vor allem die Untereinheit α1, aktiviert.

1.7 Stand der Forschung

Lärmexposition, vor allem Fluglärm, führen nachweislich zu einer gesteigerten Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies und Beeinträchtigung der endothelialen Funktion im Gefäßsystem. Dies sind entscheidende pathophysiologische Merkmale beim Entstehungsmechanismus von zahlreichen kardiovaskulären Erkrankungen und Ereignissen (3, 35).

Das Enzym AMPK nimmt eine zentrale Regulatorfunktion bei Energieprozessen in der Zelle ein. Gleichzeitig werden ihr für die Aufrechterhaltung der vaskulären Homöostase relevante Funktionen im Gefäßsystem zugeschrieben (137, 138). Es konnte bereits nachgewiesen werden, dass die AMPK eine Schlüsselrolle in der Vermittlung von protektiven Effekten von Ausdauersport spielt (21). Dabei wurde ein globaler Knockout der vaskulären Isoform der AMPK α1 auf seine Mechanismen hin untersucht. Die Gefäßfunktion wird jedoch maßgeblich durch die Endothelzellen und die darin abspielenden Prozesse und Reaktionen reguliert. Jansen et al. (23)[1] konnten zeigen, dass der Knockout der endothelialen AMPK α1 kombiniert mit Ausdauersport zu einer verstärkten endothelialen Dysfunktion und vermehrten Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies führte.

In Tiermodellen konnte die pharmakologische Aktivierung der AMPK, AT-II vermittelte Bildung von oxidativem Stress reduzieren und dadurch die Endothelfunktion maßgeblich verbessern (159). Zudem stellte sich die vaskuläre Isoform der AMPK als zentraler Mechanismus zur Unterdrückung von oxidativem Stress im Gefäßsystem heraus (32). Aufgrund dieser Studie zum globalen vaskulären Knockout der AMPK wurde anschließend nachgewiesen, dass die endotheliale AMPK α1 in der Lage war, die Endothelfunktion unter AT-II Gabe dennoch zu erhalten (22).

Diese Daten wiesen auf eine protektive Wirkung der AMPK, vor allem der vaskulären Untereinheit α1, für das kardiovaskuläre System hin. Die molekularen Mechanismen, vor allem der Anteil der endothelspezifischen AMPK α1 an diesen Effekten, sind jedoch noch unzureichend verstanden.

---

[1] Persönliches Mitwirken bei dieser Studie aus dem Labor der molekularen Kardiologie der Universitätsmedizin Mainz.

2 Zielsetzung

Die Relevanz von Fluglärm induzierten Schäden auf das kardiovaskuläre System wurden in den vorliegenden Abschnitten detailliert erläutert. Dabei steht das Endothel und seine Funktion im Mittelpunkt der Entstehung vieler kardiovaskulärer Erkrankungen. Deutlich wurde zudem, dass die Mechanismen der vaskulären Isoform der AMPK vielversprechende Bedeutung für die Prävention dieser Auswirkungen haben könnte. Jedoch ist noch nicht ausreichend geklärt, welchen Anteil die endothelspezifische AMPK α1 an der Wirkung der vaskulär vermittelten AMPK-Mechanismen hat. Außerdem sind die mechanistischen Einzelheiten der endothelspezifischen AMPK α1 in Bezug auf ihre Aktivierung und ihr Verhalten in Bezug auf Fluglärmexposition unzureichend untersucht.

Zielsetzung der vorliegenden Arbeit ist daher die weitere Untersuchung der protektiven kardiovaskulären Effekte von Ausdauertraining auf die Fluglärm-vermittelten Stressreaktionen und die Validierung der bereits bekannten einhergehenden Schäden im vaskulären System. Dabei steht die Bedeutung der endothelspezifischen AMPK α1 bei der Vermittlung dieser Effekte im Fokus. Verstärktes Augenmerk soll dabei, neben bereits bekannten Parametern, auf folgende Punkte gelegt werden:

- Die Funktion und Dysfunktion des Endothels
- Das Verhalten des systolischen Blutdrucks
- Die Bildung von oxidativem Stress (ROS) im Blut und in den Mitochondrien
- Expression der aktivierten AMPK α1

Zum besseren Verständnis wurden als „proof of concept“ Studie die molekularen Mechanismen der AMPK α1 durch einen endothelspezifischen Knockout näher untersucht. Dabei wurden die Effekte des endothelspezifischen Knockouts der AMPK α1 auf Fluglärmexposition sowie zusätzlichem Ausdauertraining in Bezug auf die vaskuläre Funktion und weitere wichtige Mediatoren im Gefäßsystem analysiert. In der vorliegenden Arbeit wurde dafür mit dem Knockout Model α1AMPK$^{fl/fl}$ x Cdh5-Cre+ gearbeitet.

3 Material

3.1 Chemikalien und Reagenzien

Substanz	Hersteller/ Sitz
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Hamburg
Acetylcholinchlorid	Sigma-Aldrich, Hamburg
Acrylamide-bis Solution 40% (3,3% C)	BioRad Laboratories GmbH, Feldkirchen
Agarose Elektrophorese Grad	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Albumin bovine Fraktion V (BSA)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Aprotinin (aus Rinderlunge)	Sigma-Aldrich, Hamburg
APS (Ammoniumpersulfat)	Sigma-Aldrich, Hamburg
Aqua dest. B. Braun	B. Braun Deutschland GmbH, Melsungen
BenchMarkTM Protein Ladder	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Bromphenolblau	AppliChem GmbH, Darmstadt
Calciumchlorid	Fluka™ Analytical, Seelze
DC-Protein Assay Kit	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
D-(+)-Glukose	Sigma-Aldrich, Hamburg
Dihydroethidium 95% (DHE)	Fluka™ Analytical, Seelze
Dikaliumhydrogenphosphat (K_2HPO_4)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Dinatriumhydrogenphophat (Na_2HPO_4)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Direct PCR Lysis Reagent	VWR International GmbH, Darmstadt
Dithiotreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, Hamburg
DNA-Molekulargewichtsmarker VIII	Roche Holding AG, Basel (Schweiz)
D-Mannitol	Sigma-Aldrich, Hamburg
DPBS (Dulbecco´s Phosphate buffered Saline= Dulbeccos phosphatgepufferte Kochsalzlösung)	Sigma-Aldrich, Hamburg
EDTA	AppliChem GmbH, Darmstadt
EDTA- freies cOmplete, Proteasehemmer-Cocktail	Roche Holding AG, Basel (Schweiz)

EGTA	Sigma-Aldrich, Hamburg
Ethanol 70% und 96%	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
GelRed® Nucleic Acid Gel Stain	Biotium, Fremont (USA)
Glycin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Glyzerin	AppliChem GmbH, Darmstadt
Hepes	Fluka™ Analytical, Seelze
Hot Star Taq Master Mix Kit	Qiagen, Hilden
Isofluran (FORENE®)	Abbott GmbH, Wiesbaden
Isopropanol	AppliChem GmbH, Darmstadt
Isotone Kochsalzlösung 0,9% (NaCl)	B. Braun AG, Melsungen
Kaliumchlorid (KCl)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Ladepuffer	Sigma- Aldrich, Hamburg
Leupeptin	Sigma- Aldrich, Hamburg
L-NAME	Fluka™ Analytical, Seelze
Magnesiumsulfat ($MgSO_4$)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Methanol	Sigma-Aldrich, Hamburg
Milchpulver	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
MitoSOX™ Invitrogen	Thermo Fischer Scientific, Waltham (USA)
Natriumdihydrogenphosphat (NaH_2PO_4)	Sigma-Aldrich, Hamburg
NADPH	Sigma- Aldrich, Hamburg
Natrium-Acetat	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natrium-Hepes	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumhydrogencarbonat ($NaHCO_3$)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Natriumorthovanadat	Sigma- Aldrich, Hamburg
Pepstatin A	Sigma-Aldrich, Hamburg
Phenylmethansulfonylfluorid	Sigma-Aldrich, Hamburg
Phosphatase Inhibitoren Cocktail 1	Sigma-Aldrich, Hamburg
Pierce ™ ECL Western Blot Substrates (Luminol Enhancer, Peroxide Solution)	Thermo Fischer Scientific, Waltham (USA)

PonceauS (0,1% in 5%-igem Eisessig)	Sigma-Aldrich, Hamburg
Precision Plus Protein Standard-Dual C Color	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Prostaglandin F2 α	Cayman Chemicals, Ann Arbor (USA)
Proteinkinase K	Qiagen, Hilden
Protease Inhibitor Cocktail	Sigma-Aldrich, Hamburg
Roti®-Quant (5-fach Konzentrat)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
QuantiTect Probe RT-PCR Kit	Qiagen, Hilden
SDS	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Sucrose (Saccharose)	Sigma-Aldrich, Hamburg
Super Signal ECL	Thermo Fischer Scientific, Waltham (USA)
TEMED (N,N,N´,N´-Tetramethylethylendiamin)	Sigma-Aldrich, Hamburg
Trichloressigsäure	Merck KGaA, Darmstadt
Tris- Base (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-base) 99,8%	Sigma-Aldrich, Hamburg
Tris-HCl(Tris-(hydroxymethyl)-aminomethanhydroxychlorid)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Triton X-100 1%ig	Sigma-Aldrich, Hamburg
Trizma Base (Tris-hydroxymethyl)-aminomethan	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Tween 20	Serva Electrophoresis GmbH/ Sigma-Aldrich, Hamburg

Alle hier nicht aufgelisteten Chemikalien oder Reagenzien wurden von der Carl Roth GmbH in Karlsruhe, Fluka™Analytical in Seelze oder Sigma-Aldrich in Hamburg bezogen.

3.2 Puffer und Lösungen

Alphabetisch sortiert

Ammoniumpersulfat (APS) 10% (SDS-PAGE)

APS	10 g
ad Aqua bidest.	100 ml

Hepes-Mito-Puffer

eingestellt auf 7,4 pH

Hepes	50 mM
Sucrose	70 mM
Mannitol	220 mM
EGTA	1 mM
BSA Albumin Fraktion	30,3 µM

Homogenisierungs-Lösung (Hg-Lösung)

eingestellt auf pH 7,5

Hg-Puffer (s.u.)	8,65 ml
Protease Inhibitor Cocktail	100 µl
Phosphatase Inhibitor Cocktail	100 µl
Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF) (0,1 M in Methanol)	50 µl
Triton X-100 10%-ig	1 ml
Natriumorthovanadat	100 µl

Homogenisierungs-Puffer (Hg-Puffer)

eingestellt auf pH 7,5

EDTA	20 mM
EGTA	3 mM
Sucrose	250 mM
Tris-HCl	20 mM

Krebs-Hepes-Inhibitoren-Puffer

eingestellt auf pH 7,4

Aprotinin (1 mg/ml- H_2O)	100 µl
Leupeptin (5 mg/ml- H_2O)	10 µl
Pepstatin (2 mg/ml Ethanol)	40 µl
ad Krebs-Hepes-Puffer	10 ml

Krebs-Hepes-Puffer

eingestellt auf pH 7,35

$CaCl_2$	2,5 mM
D-Glukose	11,1 mM
K_2HPO_4	1,03 mM
KCl	4,69 mM
$MgSO_4$	1,2 mM
Na-Hepes	20 mM
NaCl	99,01 mM
$NaHCO_3$	25 mM

Laemmli-Puffer (3-fach)

Bromphenolblau (Spatelspitze ad H_2O)	300 µl
Glyzerin	3000 µl
Tris-HCl 1M (pH 6,8)	1880 µl
SDS (20%-ig)	3000 µl
Aqua bidest.	320 µl

Aliquotieren auf 850 µl, vor Gebrauch jeweils 150 µl 2-Mercaptoethanol pro Aliquot hinzufügen.

Organbadpuffer

eingestellt auf pH 7,4 bei einer Temperatur von 37° Celsius.

$CaCl_2$	1,87 mM
D-Glukose	11,1 mM
K_2HPO_4	1,03 mM
KCl	4,69 mM
$MgSO_4$	1,2 mM
NaCl	118,3 mM
$NaHCO_3$	25 mM

PSS (Physiological Salt solution)

eingestellt auf pH 7,4 bei 37° C.

NaCl	119 mmol/l
KCl	4,69 mM
$NaHCO_3$	25 mM
$MgSO_4$x $7H_2O$	1,17 mM
KH_2 PO_4	1,18 mM
$CaCl_2$ x$2H_2O$	2,5 mM
Na_2 EDTA	0,03 mM
Glukose	5,5 mM

SDS-PAGE: Ammoniumpersulfat (APS) 10%

APS	10 g
ad Aqua bidest.	100 ml

SDS-PAGE: Laufpuffer 10-fach

Glycin	192 mM
SDS	35 mM
TRIS-Base	250 mM

SDS-Page: Sammelgel

Aqua bidest.	3,2 ml
Sammelgelpuffer (s.u.)	1,2 ml
Acrylamid (40%)	0,5 ml
SDS (10%)	50 µl
APS (10%)	50 µl
TEMED	5 µl

SDS-PAGE: Sammelgelpuffer *eingestellt auf pH 6,8*

Tris-HCl	0,5 M

SDS-PAGE: Natrium dodecyl sulfat (SDS) 10%

SDS	10 g
ad Aqua bidest.	100 ml

SDS-PAGE: Trenngel 10%

Aqua bidest.	4,8 ml
Trenngelpuffer (s.u.)	2,5 ml
Acrylamid (40%)	2,5 ml
SDS (10%)	100 µl
APS (10%)	100 µl
TEMED	10 µl

SDS-PAGE: Trenngel-Puffer

eingestellt auf pH 8,8

Tris-HCl 1,5 M

TAE- Puffer (Tris-Acetat-EDTA-Puffer)

Tris	242g
Na-EDTA 0,5M	100ml
Essigsäure 100%	57,1ml
ad Aqua Bidest.	1L

Transferpuffer (Blotting Puffer)

Glycin	192 mM
TRIS-Base	250 mM
Methanol	250 ml
ad Aqua bidest.	1000 ml

Tris-Mito-Puffer

eingestellt auf pH 7,5

Sucrose	340 mM
KCl	100 mM
Tris Hydrochlorid	19,92 mM
EDTA	1 mM

Waschpuffer

PBS 10- fach (phosphate buffered saline)

eingestellt pH auf 7,4

NaCl	1,37 M
Na_2HPO_4	100 mM
KCl	27 mM
KH_2PO_4	17,6 mM

PBS- T (phosphate buffered saline with tween)

eingestellt auf pH 7,4

PBS 10-fach	100 ml
Tween 20	1 ml
ad Aqua bidest.	1000 ml

TBS 10 – fach (tris buffered saline)

eingestellt auf pH 7,6

NaCl	1,5 M
Tris-Base	200 mM

TBS- T (tris buffered saline with tween)

eingestellt auf pH 7,6

TBS 10-fach	100 ml
Tween 20	1 ml
ad Aqua bidest.	1000 ml

3.3 Antikörper

3.3.1 Primäre Antikörper

Tabelle 3-1: Primäre Antikörper für Western Blot und Dot Blot

Antikörper	Klonalität	Host	Blockme-dium	Verdün-nung	Hersteller
α1AMPK	polyklonal	Kaninchen	5% MLP in TBS-T	1:1000	Merck- Millipore, Darmstadt
Phospho-α1AMPK^{Thr172}	polyklonal	Kaninchen	5% MLP in TBS-T	1:500	Cell Signaling Technology, Boston (USA)
ADMA	monoklonal	Kaninchen	3% BSA in PBS-T	1:1000	Cell Signaling Technology, Boston (USA)
α- Actinin	monoklonal	Maus	3% BSA in TBS-T	1:2000	Sigma-Aldrich, Hamburg

Oben aufgeführte primäre Antikörper wurden zur Quantifizierung der jeweiligen Proteinexpression verwendet.

3.3.2 Sekundäre Antikörper

Tabelle 3-2: Sekundäre Antikörper für Western Blot und Dot Blot

Antigen	Host	Verdünnung	Hersteller
Anti- Maus	Pferd	1:10.000	Vector Laboratories, USA
Anti-Kaninchen	Ziege	1:10.000	Vector Laboratories, USA

Oben aufgeführte sekundäre Antikörper wurden anschließend an die Auftragung der primären Antikörper zur Quantifizierung der Proteinexpression der primären Antikörper verwendet.

3.4 Verbrauchsmaterialien

96-Well-Mikrotiterplatte, Nunc Surface	Greiner Bio-ONE GmbH, Frickenhausen
Cellstar ® PP Teströhrchen 15 ml	Greiner Bio-ONE GmbH, Frickenhausen
Cellstar ® PP Teströhrchen 50 ml	Greiner Bio-ONE GmbH, Frickenhausen
Einmalküvetten PS, 1,5ml	Brand Scientific GmbH, Wertheim
Einwegskalpell Nr. 10	Feather ® Safety Razor Co., Osaka (Japan)
Eppendorf-Pipettenspitzen Research 0,1 µl-5000 µl	Eppendorf AG, Hamburg
Eppendorf Tubes ® 0,5ml-2ml	Eppendorf AG, Hamburg
Filterpapier (Mini Trans- Blot®)	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen
Gazin (Tupfer aus Verbandmull, gerollt)	Lohmann und Rauscher, Rengsdorf
Gel Blotting Papier GB 002	Whatman GmbH, Dassel
Nitrozellulose Transfer Membran	Whatman GmbH, Dassel
Nunc Lab Tek Chamber Slide	Nalge Nunc International Corporation, Rochester (USA)
Pipetten Tip 200 µl	Sarstedt AG&Co. KG, Nümbrecht
Rneasy® Fibrous Tissue Mini Kit	Qiagen, Hilden
Röhren 5 ml (75x12mm)	Sarstedt AG & Co.KG, Nümbrecht
S-Monovetten® EDTA (Blut-Entnahmesystem 7,5ml Z-Gel)	Sarstedt AG & CO, Nümbrecht
Sterican® Injektionskanüle Gr.18, (0,45x25mm)	B. Braun AG, Melsungen
TipOne 10/20µl Graduated Tip Natural Tips/Filter	Starlab International GmbH, Hamburg

Alle hier nicht aufgeführten Verbrauchsmaterialien wurden von Sigma- Aldrich in Hamburg, Eppendorf AG in Hamburg und Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen bezogen.

3.5 Laborgeräte und Detektionskameras

Gerät	Hersteller/ Sitz
Bridge Bioamplifier ETH 255	C.B.Sciences Inc., Dover (USA)
Blutdruckmanschette Coda System	Kent Scientific Corp., Torrington (USA)
Centro LB 960	Berthold Technologies GmbH & Co. KG, Bad Wildbad
Class II Sound Level Meter 246	Casella Solutions, Sterlin (USA)
ECL ChemoStar	Intas, Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen
Federscheren	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg
Feinwaage ARJ 120-4M	Kern & Sohn GmbH, Balingen
Grundig MS 540 compact Sound System	Beko Grundig Deutschland, Eschborn
Heizplatte MR-Hei Standard	Heidolph Instruments, Schwabach
Homogenisator RW16 Basic	IKA-Werke GmbH und Co. KG, Staufen im Breisgau
HPLC System Jasco	Jasco Labor & Datentechnik GmbH, Groß-Umstadt
HPLC C_{18}- Nucleosil 100-3 Säule(125x4)	Macherey & Nagel, Düren
Innova® CO2 Incubator Brutschrank	New Brunswick Scientific, Edison (USA)
Inversmikrokop Axiovert 40C	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Isometrische Transducer	Radnoti LLC, Monrovia (USA)
Isometrische Transducer	Kent Scientific Corp., Torrington (USA)
Langhaarrasierer	Philips, Amsterdam (Niederlande)
Magnetrührer	Heidolph Instruments GmbH& Co. KG, Schwabach
Mikrotom Leica	Leica Biosystems GmbH, Nussloch
Microplate Reader MRX II Dynex für UV/Vis Absorption	iLF bioserve e.K, Langenau
Minifold I, Vacuum System (Dot Blot)	Whatman® Schleicher & Schuell GmbH, Dassel
Mini-PROTEAN ® III, Gelelektrophorese System	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen

Mini Trans Blot ® (Blotting-Anlage), Elektrophoretic Transfer Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen
Mikroskop für Gefäßpräparation	Krüss Optronic GmbH, Hamburg
Multi Wire Myograph System	Danish Myo Technology. Hinnerup (Dänemark)
Octal Bridge Amp ML228	ADInstruments, Sydney (Australien)
Organbäder	Kent Scientific Corp., Torrington (USA)
Organbäder	Radnoti LLC, Monrovia (USA)
Heizplatte	Leica Biosystems, Nussloch
Photometer Helios alpha	Thermo Fischer Scientific, Waltham(USA)
pH- Meter 211, Microprozessor	HANNA Instruments, Woonsocket (USA)
Pipetten Eppendorf Research	Eppendorf AG, Hamburg
Pipetten Gilson	Gilson Scientific, Middleton (USA)
Pinzetten und Präperierscheren	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg
Powerlab 8sp	ADInstruments, Sydney (Australien)
Powerlab 8/30 ML870	ADInstruments, Sydney (Australien)
Power Pac Basic	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen
StepOnePlus RT-PCR System	Life Technologies GmbH,
Test Tube Thermostat TCR 100	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Thermomixer Comfort	Eppendorf AG, Hamburg
Thermoschüttler	Eppendorf AG, Hamburg
ThermoStat 2761	Eppendorf AG, Hamburg
ThermoStat Plus	Eppendorf AG, Hamburg
Vortex Genie 2 (G560E), 230V, 50Hz	Scientific Industries Inc., Bohemia (USA)
Wage LE225D	Sartorius AG, Göttingen
Western Blot Imager, Chemicam HR 16	Intas Science Imaging, Göttingen
Zellcounter KX-21N	Sysmex Corporation, Kōbe (Japan)
Zentrifuge Mikro 22 R Typ 1110	Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen
Zentrifuge MiniSpin Plus	Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifuge Rotofix 32 Typ 1205	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen

3.6 Software

Adobe Photoshop CS2, Version 9.0.2	Adobe Systems GmbH, München
Axiovision Rel 4.3	Carl Zeiss AG, Oberkochen
CODA data Acquisition Software	Kent Scientific Corp., Torrington (USA)
ChromBass Chromatography Data System	Jasco Labor & Datentechnik GmbH, Groß-Umstadt
ChromNav Chromatography Data System	Jasco Labor & Datentechnik GmbH, Groß-Umstadt
Dynex Revelation 4.25	iLF bioserve e.K, Langenau
Gel-Pro Analyzer™ 6.0	Media Cybernetics, Rockville (USA)
Microsoft Office	Microsoft, Redmond, Washington (USA)
Organbad, Chart 5	ADInstruments, Sydney (Australien)
Prism Statistics (Version 9)	GraphPad Software LLC, San Diego (USA)
Terminal.exe	MetaQuotes Software Corporation, Zypern

4 Methoden

4.1 Tiermodell, Behandlung und Tierpräparation

4.1.1 Tiermodell

Alle Experimente, welche an Tieren für die vorliegende Arbeit durchgeführt wurden, unterliegen den Richtlinien „Guide for Care and Use of Laboratory Animals“, welche von den U.S. National Institutes of Health herausgegeben wurden (168). Zudem wurde die Studie vom Ethikkomitee der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz sowie dem Landesuntersuchungsamt Rheinland-Pfalz die Studie geprüft und genehmigt (Zulassungsnummer 23 177-07/ G17—1-066). Für die Studie wurden Mäuse mit einer endothelspezifischen Deletion der AMPK α1 gezüchtet.

Die Gruppenbezeichnung ist AMPK α1 EC KO. Dafür wurden B6.Cg-Tg(Cdh5-Cre^{+})7Mia/J Mäuse mit einem C57BL/6J Hintergrund mit α1 AMPK$^{fl/fl}$ gekreuzt.

Die Cdh5-Cre^{+} Mäuse mit dem C57BL/6J Hintergrund werden in dieser Arbeit als Wildtyp bezeichnet (169, 170). Insgesamt wurden 242 Mäuse für diese Versuchsreihe verwendet und sind entsprechend ihrer Exposition in *Tabelle 4-1* aufgelistet.

Tabelle 4-1: Mauslinien mit entsprechender Exposition

Gruppe	Mauslinie	Exposition	Bezeichnung
1	Cdh5-Cre^{+} (n=27)	-	WT
2	Cdh5-Cre+ (n=42)	Fluglärm	WT+Noise
3	Cdh5-Cre+ (n=53)	Fluglärm + Ausdauer-training auf freiwilliger Basis	WT+Noise+ Exercise
4	α1 AMPK$^{fl/fl}$ x Cdh5-Cre+ (n=28)	-	AMPK α1 EC KO
5	α1 AMPK$^{fl/fl}$ x Cdh5-Cre+ (n=37)	Fluglärm	AMPK α1 EC KO + Noise
6	α1 AMPK$^{fl/fl}$ x Cdh5-Cre+ (n=55)	Fluglärm+ Ausdauer-training auf freiwilliger Basis	AMPK α1 EC KO + Noise + Exercise

Aufgeführt sind die sechs Mauslinien, welche für die Studie zum Einsatz kamen. Cdh5-Cre^{+} stellt hierbei den Wildtyp dar und somit die Kontrollgruppe. Die Gruppen 4, 5 und 6 stellen die korrespondierenden Knockoutgruppen zu 1, 2 und 3 dar. Die Gruppen 2 und 5 wurden der Lärmbelastung ausgesetzt. Die Gruppen 3 und 6 führten vorab Ausdauersport auf freiwilliger Basis durch und wurden anschließend ebenfalls derselben Lärmexposition ausgesetzt.
Abkürzungen/Übersetzungen: Noise= Fluglärmexposition (4 Tage), Exercise= Ausdauertraining (7 Wochen), WT = Wildtyp, AMPK α1 EC KO= Knockout der endothelialen AMPK α1, WT+Noise= Wildtyp sowie Fluglärmexposition für vier Tage, AMPK α1 EC KO + Noise= endothelialer AMPK α1 Knockout + Fluglärmexposition für vier Tage, WT +Exercise + Noise= Wildtyp sowie Fluglärmexposition und vorausgegangener Ausdauersport für sieben Wochen, AMPK α1 EC KO + Exercise + Noise = endothelialer Knockout der AMPK α1 sowie Fluglärmexposition und vorausgegangener Ausdauersport für sieben Wochen.

4.1.2 Studienprotokoll sowie Lärmexposition

Ab einem Alter von vier bis sechs Wochen startete das freiwillige Ausdauertraining für die AMPK α1 EC KO sowie die dazu korrespondierende Wildtypgruppe für sieben Wochen und vier Tage. Kröller-Schön et al. zeigten bereits in (21), dass die Mäuse unabhängig vom Knockout eine durchschnittliche Distanz von knapp fünf Kilometern laufen. Die hier beschriebene Studie wurde unter den gleichen Bedingungen durchgeführt. Jede Maus in der Ausdauergruppe befand sich über den gesamten Studienzeitraum allein in einem Käfig, welcher mit einem Laufrad ausgestattet war. Die Lärmexposition fand an den letzten vier Tagen des Experiments statt. Mit einem Grundig MS 540 Compact Sound System wurden mittlere Schallpegel von 72dB(A) mit maximalen Schallpegeln von 85 dB(A) erzeugt. Der allgemeine Hintergrundschallpegel im Tierhaus lag bei 48-50 dB(A). Die Schallpegel wurden mit einem Class II Sound Level Meter der Firma Casella Solutions gemessen. Das Maximum von 85 dB(A) wurde deswegen eingehalten, um einen Hörschaden bei den Tieren zu vermeiden, welcher laut der National Institutes of Health bei einem Schallpegel über 85 dB(A) eintreten könnte (49, 171). Insgesamt fanden innerhalb von zwei Stunden 69 Lärmbeschallungen mit einer Dauer von 43 Sekunden statt. Um einen Gewöhnungseffekt an die Lärmbelastung zu vermeiden, wurden zwischen diesen Ereignissen immer wieder in unregelmäßigen Abständen Lärmpausen eingeschoben. Dieses Lärmmuster wiederholte sich immer wieder. (19). Die Lautsprecher waren wie in Münzel et al. (19) bereits beschrieben ungefähr 30 cm über den Käfigen installiert und auf die Käfige hin ausgerichtet. Die Kontrollgruppen Wildtyp sowie AMPK α1 EC KO erhielten keinerlei Exposition. Die Lärmbelastung sowie das Ausdauertraining fand in der Wildtyp sowie AMPK α1 EC KO Gruppe unter denselben Bedingungen statt. Illustriert ist das Studienprotokoll in *Abbildung 4-1.*

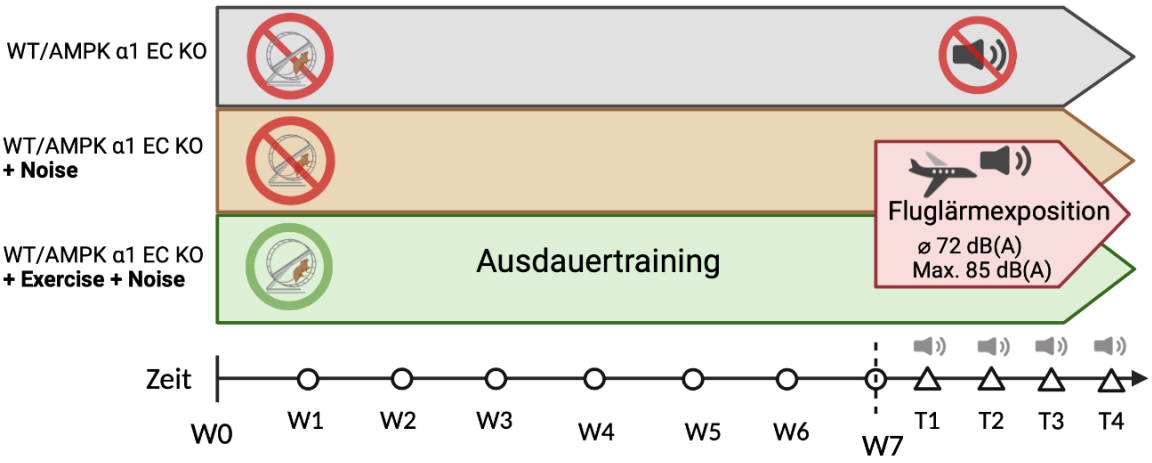

Abbildung 4-1: Studienprotokoll
Darstellung der verschiedenen Studiengruppen mit ihrer Intervention.
Abkürzungen/Übersetzungen: T= Tag, W= Woche, Noise=Lärmexposition, Exercise= Ausdauertraining, WT = Wildtyp, AMPK α1 EC KO= Knockout der endothelialen AMPK α1, WT+Exercise= Wildtyp sowie Lärmexposition für vier Tage, AMPK α1 EC KO + Noise= endothelialer AMPK α1 Knockout + Lärmexposition für vier Tage, WT +Exercise + Noise= Wildtyp sowie Lärmexposition und vorausgegangener Ausdauersport für sieben Wochen, AMPK α1 EC KO + Exercise + Noise = endothelialer Knockout der AMPK α1 sowie Lärmexposition und vorausgegangener Ausdauersport für sieben Wochen. dB (A): Dezibel-Bewertungskurve A, der Schalldruckpegel genormt nach der internationalen Frequenzbewertungskurve A.

4.2 Transgene Mäuse: endothelialer AMPK α1 Knockout

Um die Funktion und die damit einhergehende Bedeutung von einzelnen Genen untersuchen zu können, müssen diese Gene erst einmal identifiziert werden. Um zu verstehen, welche Aufgabe einem bestimmten Gen zukommt, nutzt man häufig die Möglichkeit, dieses Gen für Untersuchungen auszuschalten. Man generiert einen sogenannten Knockout (172, 173). Für die Versuchsreihe musste ein genetischer Knockout der endothelial exprimierten AMPK α1 hergestellt werden, um die Bedeutung der endothelialen AMPK α1 für die Gefäßfunktion zu untersuchen. Diese Knockouttiere wiesen - im Vergleich zu ihrem entsprechendem Wildtyp - eine genetische Variation auf: eine funktionslose endotheliale AMPK α1 (174). Dieser spezifische Knockout wurde von Benoit Viollet (INSERM, Paris) für die Versuchsreihe zur Verfügung gestellt. Zur Überprüfung, dass es sich um den spezifischen Genotyp bei den Tieren handelte, wurde eine Genotypisierung durchgeführt.

4.2.1 Genotypisierung aus Ohrlochstanzung

Für die Genotypisierung und zur gleichzeitigen Markierung der Mäuse wurde die Polymerase-Kettenreaktion (siehe *Kapitel 4.2.2*) mit Ohrlochstanzungen als Methode verwendet. Dafür wurde zunächst mithilfe einer Stanze ein zwei Millimeter großes Loch in die Ohrmuschel der Tiere gestanzt. Dieses Verfahren gilt als schmerzarm und hat ein geringes Blutungsrisiko für die Versuchstiere (175). Weiter wurde darauf geachtet, dass es zu keiner Kontamination der ausgestanzten Proben kam. Zum Lysieren des Teils der Ohrmuschel wurde 100 µl DirectPCR Lysis Reagenz (von PeqLab VWR Company) verwendet und 1,5 µl der Proteinkinase K (Qiagen) hinzugefügt. Dieses Gemisch wurde dann über Nacht (insgesamt 16 Stunden) bei 55°C und auf einem Thermoschüttler bei 400 rpm inkubiert. Zur Inaktivierung der Proteinkinase K war eine Erhitzung auf 85°C für eine Dauer von 45 Minuten nötig. Mithilfe eines Wasserbades konnte eine gleichmäßige Erhitzung des Gemisches gewährleistet werden. Die Inaktivierung war nötig, um die Taq-Polymerase, welche bei der Polymerase-Kettenreaktion Verwendung fand, zu schützen. Das hergestellte Lysat konnte im Anschluss zur DNA-Analyse mithilfe der Polymerase-Kettenreaktion verwendet werden (176, 177)[2].

4.2.2 Polymerase- Kettenreaktion

Auf der DNA jedes Individuums ist die genetische Information verschlüsselt. DNA steht für Desoxyribonukleinsäure. Sie ist ein Makromolekül, welches aus einem Zucker, der Desoxyribose, Phosphat und den vier Basen Adenosin, Cytosin, Guanin und Tyrosin besteht. Gebildet wird sie durch zwei Stränge, welche sich antiparallel ausrichten und zu einer Helix-Struktur organisieren (178). Im Jahr 1984 stellte Kary B. Mullis erstmalig die Methode der Polymerase-Kettenreaktion vor, welche es ermöglichte, spezifische DNA-Segmente in vitro zu amplifizieren. Mithilfe der Vervielfältigung eines DNA-Abschnitts lässt sich dieser weiter untersuchen (179, 180).

Der Vorgang der Polymerase- Kettenreaktion lief wie folgt ab: Im ersten Schritt wurde die doppelsträngige DNA in einer initialen Denaturierung auf 94°C erhitzt. Nun begann der erste Zyklus mit einer einminütigen Denaturierung. Ziel war die Auftrennung der

---

[2] Die Genotypisierung wurde mithilfe von [redacted] und [redacted] durchgeführt, ehemalige Mitarbeiterin des Labors für molekulare Kardiologie der Universitätsmedizin Mainz.

DNA in ihre Einzelstränge. Um den Startpunkt der DNA-Synthese zu definieren, wurden Oligonukleotide (=Primer) hinzugefügt, welche die komplementären Basen zu den beiden Startpunkten der Sequenz enthielten. Nach Abkühlung auf 50-68°C war es möglich, dass diese Oligonukleotide sich an die DNA anlagerten, und es kam zur Hybridisierung der Primer mit dem DNA-Einzelstrang (181, 182). Zur Synthese der gewünschten DNA wurden Desoxyribonukleotidtriphosphate dATP, dCTP, dGTP sowie dTTP und eine Polymerase hinzugefügt, welche vom 5‘ zum 3‘ Ende die Nukleotide komplementär zum Einzelstrang synthetisierte (Elongation). Funktionstüchtig war die Polymerase in einer Pufferlösung, welche Magnesium-Ionen enthielt. Anforderung an die Polymerase war die Hitzestabilität aufgrund der hohen Temperatur während der Denaturierung (183). Dies war mit der Taq-Polymerase möglich, welche das Bakterium Thermus aquaticus synthetisierte (182, 183). Der beschriebene Zyklus (siehe *Tabelle 4-2*) konnte immer wiederholt werden. Auf diese Weise wurde innerhalb eines jeden Zyklus die Anzahl der Sequenz verdoppelt und es kam zu einer Replikation von 2^n, wobei n die Anzahl der Zyklen darstellte. Verwendet wurde für diese Methode der HotStar Master Mix (Qiagen) (2).

Tabelle 4-2: Phasen eines Zyklus der PCR

Phase	*Dauer*	*Temperatur*
Initiale Denaturierung	3 Min.	94°C
Zyklus aus 3 Schritten		
1. Denaturierung	0,5-1 Min.	94°C
2. Annealing	0,5-1 Min.	50-68°C
3. Elongation	1 Min.	72°C
Finale Elongation	10 Min.	72°C

Insgesamt wurden für die Genotypisierung-PCR 36 Zyklen durchgeführt.
[Tabelle übersetzt und modifiziert aus (2)]

4.2.3 Gelelektrophorese

Für die Analyse der DNA auf die Knockout-Allele bzw. die Wildtyp-Allele wurde eine Gelelektrophorese mit Agarosegel verwendet. Der chemisch-physikalische Hintergrund bei der Gelelektrophorese ist die Auftrennung von Molekülen, beispielsweise Nukleinsäuren oder Proteinen, nach Größe und Ladung. Nukleinsäuren sind negativ geladen und wandern daher zur Anode hin. Mithilfe eines Gels - in diesem Fall Agarose - wurde ein stabiles Netz aus gleich großen Poren gebildet. Agarose selbst ist ein Polysaccharid. Der Anteil an Agarose in dem Gel beeinflusst die Größe der Poren, die sich so kontrollieren lassen. Anschließend wurde nach Auftragen der Proben eine Spannung angelegt. Das führte dazu, dass die Moleküle sowohl anhand der Größe als auch anhand der Ladung aufgetrennt wurden. Je kleiner und negativer geladen ein Molekül war, desto schneller und weiter wanderte es im Gel. Mithilfe eines Fluoreszenzfarbstoffs wurden die Banden sichtbar gemacht. In diesem Fall war dies Ethidiumbromid (Schematische Illustration der Gelelektrophorese in *Abb. 4-2*). Da sich der Genotyp zwischen den Knockoutmäusen und den Wildtypmäusen unterschied, konnte auf diese Weise zwischen den beiden Gruppen differenziert werden (14, 184).

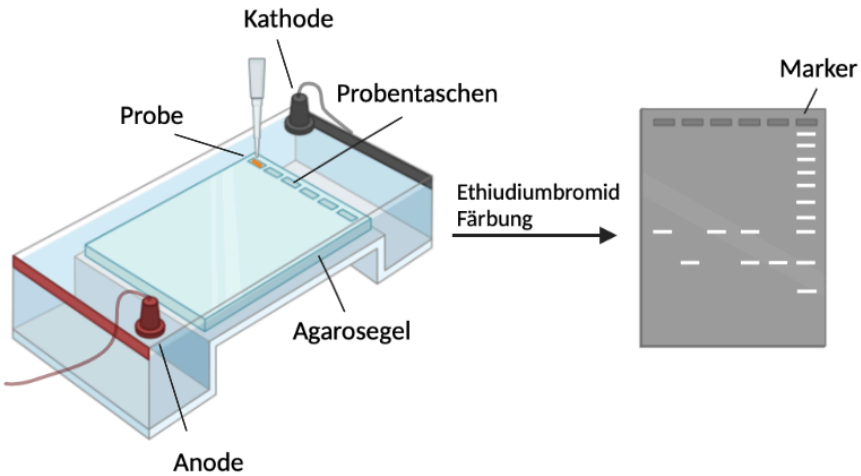

Abbildung 4-2: Schematische Darstellung der Gelelektrophorese
Nach der Probenauftragung wandern die Moleküle abhängig von ihrer Größe und Ladung durch das Agarosegel. Mithilfe eines Markers kann nach Sichtbarmachung der entstandenen Banden das Gewicht abgelesen und auf diese Weise identifiziert werden.
[Abbildung modifiziert aus (14)]

4.3 Tier- sowie Aortenpräparation

4.3.1 Tötung der Tiere und Organentnahme

Die Tötung der Tiere wurde unter Einhaltung des geltenden Tierschutzgesetzes (185) durchgeführt. Die Kenntnisse und Fähigkeiten für tierexperimentelles Arbeiten gemäß der Tierschutzversuchstierverordnung (186) wurden durch das Ausbildungsprogramm der TARC (Translational Animal Research Center der Universitätsmedizin Mainz) erworben.

Vor der Tötung der Tiere wurde eine Anästhesie mit Ketamin sowie Analgesie mit Xylazin durchgeführt. Zum Testen der Narkosetiefe wurde der Zwischenzehenreflex bei den Versuchstieren geprüft. Anschließend wurde mit einer Schere der Bauchraum der Maus vorsichtig eröffnet, sodass Sicht auf das Diaphragma sowie die Bauchorgane möglich war. Um eine Verletzung der Bauchorgane zu vermeiden, wurde mit einer Pinzette die Bauchwand leicht angehoben. Daraufhin wurde in das Diaphragma vom Rippenbogen her eingeschnitten und entfernt.

In den noch schlagenden linken Ventrikel des Herzens wurden 200 Einheiten Heparin injiziert, um eine Koagulation durch die nun in den Herzkammern einsetzende Stase zu verhindern. Anschließend wurde circa 0,8-1 ml Blut kardial entnommen. Es wurde in EDTA Monovetten überführt und zur Gewinnung des Plasmas für anschließende Untersuchungsreihen wie die Analyse mittels Dot Blot bei 3600 rpm für 10 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert (Rotor 10 cm). Danach wurden Herz, beide Lungenflügel, Gehirn und Nieren entnommen und entweder sofort weiterverwendet oder mithilfe von flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Die Aorta wurde vollständig und somit mit ihrem thorakalen als auch abdominellen Part entnommen. Abgesetzt wurde diese kranial zu Beginn der Aorta ascendens und kaudal kurz nach der Bifurkation der Iliakalgefäße. Essenziell bei dieser Entnahme war die Vermeidung einer Zugspannung an den Gefäßen, sodass es zu keiner Schädigung des Endothels kam. Die Gefäßabgänge der Aorta wurden kurz danach abgesetzt. Zusätzlich wurde noch die Arteria mesenterica superior entnommen. Hierbei galt ebenfalls äußerste Sorgfalt bei der Entnahme. Die Gefäße wurden auf 4°C gekühlten Krebs-Hepes-Puffer bis zur anschließenden Gefäßpräparation zwischengelagert. Sämtliche entnommene Organe wurden generell für die längere Aufbewahrung in flüssigem Stickstoff schockgefroren und in Gefrierschränken bei -80°C gelagert.

4.3.2 Gefäßpräparation

Die Gefäßpräparation der Aorta sowie der A. mesenterica superior war notwendig, um die Endothelfunktion dieser Gefäße überprüfen zu können. Bei der Gefäßpräparation der Aorta und der A. mesenterica superior war es daher von großer Relevanz, dass Zugspannung sowie Druck auf die Gefäße bei der Präparation vermieden wurden, um mögliche Endothelverletzungen aufgrund einwirkender Scherkräfte zu verhindern. Die Gefäße wurden von perivaskulärem Fett und umliegendem Gewebe mithilfe von feinen Präparierscheren sowie Pinzetten unter Zuhilfenahme eines Binokularmikroskops befreit. Während der Präparation lagen die Aorta und A. mesenterica superior stets in mit Krebs-Hepes Puffer (KH-Puffer *in Kapitel 3.2*) gefüllten Petrischalen, welche mit Eis gekühlt wurden. Anschließend wurden drei Millimeter lange Gefäßabschnitte aus dem thorakalen Part der Aorta mit einem scharfen Skalpell ohne Zug am Gefäß abgeschnitten, welche im Anschluss für isometrische Tonusstudien im Organbad verwendet wurden. Die restliche Aorta wurde für die Proteinaufbereitung im Western Blot und Dot Blot sowie für weitere Untersuchungen mittels HPLC-Methode weiterverarbeitet. Die detaillierte Beschreibung der Vorgehensweise ist in den Kapiteln der jeweiligen Methoden beschrieben. War eine direkte Weiterverarbeitung der Proben möglich, so wurden diese in Kreps-Hepes Puffer auf Eis zwischengelagert. War eine längere Lagerung der Gewebeproben nötig, so wurden diese generell in flüssigem Stickstoff schockgefroren und in Gefrierschränken bei -80°C aufbewahrt.

4.4 Detektion der Endothelfunktion durch isometrische Tonusstudien

Die entscheidende Rolle des Endothels für die Regulation des Gefäßtonus sowie der Hintergrund des Acetylcholin-Tests wurden bereits in den *Kapiteln 1.3* und *1.4.1* näher erläutert. Zur Messung der maximalen Vasokonstriktion wurde Kaliumchlorids verwendet. Extrazelluläres Kaliumchlorid führt dazu, dass es durch membranständige Kanäle zu einem Einstrom von Ca^{2+}-Ionen in die Zelle kommt. Diese intrazellulär erhöhte Calciumkonzentration führt zu einer Kaskade, welche in einer Vasokonstriktion endet. Die so maximal erreichbare Vasokonstriktion wurde dann als Referenzwert verwendet (187, 188).

Mittels nacheinander geschalteter Zugabe aufsteigender Acetylcholin-Konzentrationen wurde dann die endothelabhängige Relaxation der Gefäße gemessen, welche Aufschluss über die Funktionsfähigkeit des Endothels gab.

Verwendet wurden für die isometrischen Tonusstudien an der Aorta zwei Organbäder von Kent Scientific Cop. und Radnoti LLC für die Aorta sowie das Multi Wire Myograph System 620 M (Danish Myo Technology) zur Messung der Arteria mesenterica superior.

4.4.1 Organbad

Für das Organbad wurde jeder präparierte 3mm lange Aortenring in zwei sich gegenüberliegende Drahtdreiecke gefädelt. Diese wurden in eine Organbadkammer (25ml) (siehe *Abb. 4-3*) eingehängt. Kontakt hatten die Dreiecke mit einem Transducer, welcher als Kraftumwandler fungierte und die Spannungsdifferenzen der Gefäßstücke aufnehmen konnte. So hing das Aortenstück frei in der Organbadkammer. Der Puffer im Organbad wurde auf 37°C erwärmt (Organbadpuffer in *Kapitel 3.2*) und mit einem Gasgemisch aus 95% O_2 und 5% CO_2 versetzt, um die Messung in einem physiologischen Milieu durchführen zu können. Zu Beginn wurde manuell eine Spannung von 300 mg angelegt, welche in einem Intervall von 30-60 Minuten auf drei Gramm erhöht wurde. Dies diente dazu, einen Nullwert zu generieren.

Ein Kraftwandler konnte die Spannungsänderung bei Zugabe von Stimulantien messen. Gestartet wurde mit einem allgemeinen Funktionstest. Dafür wurde Kaliumchlorid (KCl)-Lösung in die Organbadkammer appliziert. Es wurde abgewartet bis sich ein Spannungsplateau eingestellte. Danach kam die Auswaschung von KCl und der Vorgang wurde wiederholt. So wurde erreicht, dass die Aortenringe besser auf die Stimulation mittels Acetylcholins und eine Vorspannung mittels Prostaglandins F2 α (s.u.) reagierten, und des Weiteren getestet, ob überhaupt eine vasomotorische Antwort erreicht werden konnte.

Eine Dosis-Wirkungskurve wurde für KCl mittels folgender Konzentrationen erreicht: 5mM, 10mM, 20mM, 40mM, 80mM. Es folgte die Auswaschung des Stimulans und die Einstellung auf die Nulllinie.

Zur Herstellung einer Vorspannung der Gefäße wurde Prostaglandin F2 α verwendet. Dabei wurde 70-80% der maximal möglichen KCl-Konstriktion als Zielvorspannung eingestellt. Nach erneuter Auswaschung des Stimulans folgte nun die Relaxationsmessung mittels Acetylcholins und die Erstellung einer Dosis-Wirkungs-Kurve. Dabei wurden logarithmisch aufsteigende Acetylcholin-Konzentrationen in 0,5er Schritten in einem Dosisbereich von 10^{-9} bis $10^{-5,5}$ M aufgetragen. Bei jeder Zielkonzentration wurde abgewartet, bis sich ein Plateau einstellte. Die Technik der isometrischen Tonusmessung mittels Organbäder wurde in zahlreichen Publikationen aus dem Labor für molekulare Kardiologie von Prof. Münzel und Prof. Daiber veröffentlicht (189-191)[3].

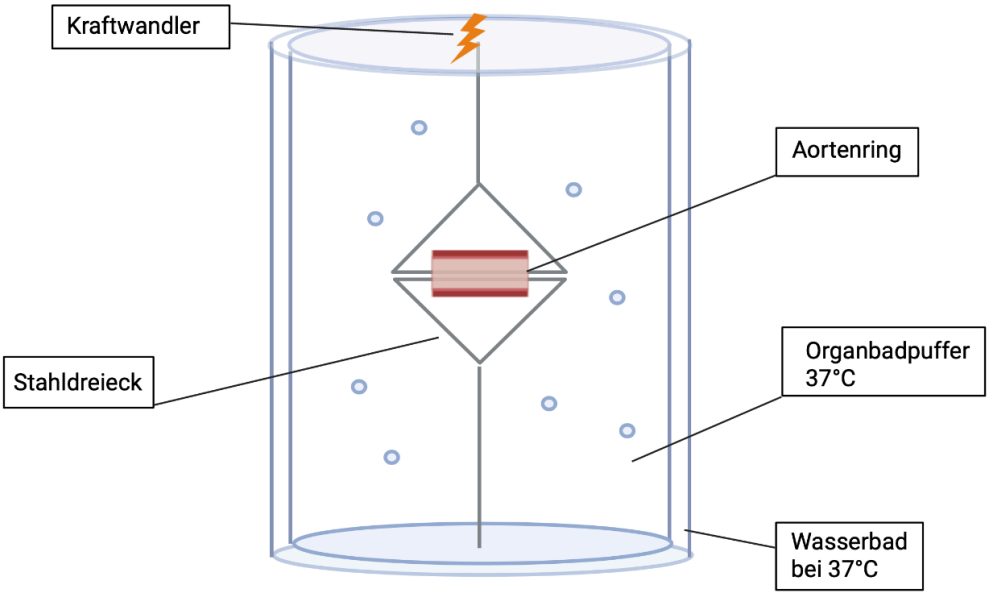

Abbildung 4-3: Schematische Darstellung einer Organbadkammer
Nach Entnahme der Mausaorta und Präparation des perivaskulären Fettgewebes wurde jeweils ein Ring in dem 37°C warmen Organbadpuffer in einer Organbadkammer eingespannt. Über einen Kraftwandler wurde bei Hinzufügen von vaskulär wirksamen Substanzen die vasokonstriktorische Antwort der Aortenringsegmente gemessen.

[3] Die isometrischen Tonusstudien an der Aorta wurden im Labor für Kardiologie der Universitätsmedizin Mainz mit freundlicher Unterstützung von [redacted] und [redacted] durchgeführt.

4.4.2 Multi Wire Myograph System

Die Gefäßpräparation der A. mesenterica superior entsprach der Methode in *Kapitel 4.3.2* Die präparierten Arteriensegmente entsprachen einer Länge von 1-2mm. Diese wurden in die Kammern des Multi Wire Myograph System 620 M (Danish Myo Technology) eingespannt (siehe *Abb. 4-4*). Zunächst wurde der Myograph für eine Äquilibrierung mit einem PSS-Puffer (PSS-Puffer in *Kapitel 3.2*) gestartet, welcher mit einem Gasgemisch aus 95% O_2 und 5% CO_2 versetzt war. Diese Äquilibrierung fand für 30 Minuten über ein standardisiertes Computerprogramm statt (192). Nach dieser Prozedur wurde zur Überprüfung der suffizienten Kontraktilität der Arterienringe PSS mit KPSS für 2 Minuten ausgetauscht. In dieser Lösung wurde im PSS-Puffer das NaCl mit einer äquimolaren Konzentration von KCl (Konzentration von K^+ lag bei 120 mM) ersetzt. Danach folgte ein Waschschritt mit PSS. Konnte eine ausreichende Kontraktilität mithilfe von KPSS erzielt werden, wurde mittels Norepinephrin (finale Konzentration von 10 µM) eine Vorspannung erzielt. Sobald die Vorspannung längere Zeit konstant blieb, wurden aufsteigende Konzentrationen von Acetylcholin (0.001 – 10 mmol/l) hinzugefügt (193-195). Diese wurden in Logarithmusschritten im Abstand von 0,5 von 10^{-5} bis 10^{-9} in einer Dosis-Wirkungs-Kurve aufgetragen. Damit hatte man die Möglichkeit, die Relaxationsfähigkeit der Gefäße aus den verschiedenen Gruppen in Relation zu setzen. Die Methode wurde von Puzserova et al. in (192, 193) mehrfach beschrieben. [4]

Abbildung 4-4: Multi Wire Myograph System 620 M
Aus dem Labor für molekulare Kardiologie von Prof. Münzel und Prof. Daiber der Universitätsmedizin Mainz.

[4] Die Durchführung dieser Methode erfolgte durch [redacted] ehemalige Mitarbeiterin des Labors für molekulare Kardiologie der Universitätsmedizin Mainz.

4.5 Nicht- invasive Blutdruckmessungen

Die arterielle Hypertonie stellt einen wichtigen Risikofaktor bei kardiovaskulären Ereignissen dar. Daher ist es von entscheidender Relevanz, Faktoren zu untersuchen, die sich auf den Blutdruck auswirken (116).

Die Blutdruckmessungen wurden plethysmographisch und damit mit einer nicht invasiven Methode durchgeführt. Während der ersten sieben Wochen wurde wöchentlich und in den letzten vier Tagen täglich der Blutdruck mit dem CODA 2 System (Kent Scientific Corp.) am Schwanz der Tiere gemessen. Erfasst wurden die erhobenen Daten über die CODA Data Acquisition Software. Zu Beginn des Experiments wurden Trainingsversuche mit den Mäusen gemacht, um die Tiere an die Methode zu gewöhnen und sie dadurch weniger Stress auszusetzen. Die Tiere durften von sich aus in die Anlage zur Blutdruckmessung gehen, welche aus einer eingespannten Röhre sowie einer auf 32°C angewärmten Platte bestand. Zudem fand die Messung in einer ruhigen Umgebung statt. Am Schwanz der Tiere wurden eine Okklusionsmanschette sowie eine Manschette, welche den Volumendruck aufzeichnete, angebracht. Darüber wurde dann der Blutdruck insgesamt 12-13 Mal gemessen. Die ersten zwei bis drei Messungen wurden als Akklimatisation angesehen und gingen nicht in die Datenerfassung ein. Aus den restlichen zehn Werten wurde ein Mittelwert für jedes Tier errechnet (19, 53, 196). Feng et al. (197) hatten bereits nachgewiesen, dass sich die plethysmographische Methode gegenüber der radiotelemetrischen Messung, welche über implantierte Katheter bestimmt wurde, als gleichwertig darstellte. [5]

[5] Mit freundlicher Unterstützung von [redacted] ehemalige Mitarbeiterin des Labors für molekulare Kardiologie der Universitätsmedizin Mainz, und [redacted], Mitarbeiterin des Labors für molekulare Kardiologie der Universitätsmedizin Mainz.

4.6 Next Generation Sequencing: RNA- Sequenzierung

Next Generation Sequencing macht es möglich, innerhalb kürzester Zeit DNA oder RNA zu sequenzieren. Mithilfe von RNA-Sequenzierung lassen sich die verschiedenen Expressionsmuster und die Stärke der Genexpression in unterschiedlichen Versuchsgruppen untersuchen. Die Regulierung der RNA-Expression wirkt sich direkt auf die Bildung der Proteine aus. Die Sequenzierung kann daher Einblicke in die RNA-Verarbeitung und Regulation geben (198-200).

Die RNA-Sequenzierung, die NGS-Bibliotheksvorbereitung, NovaSeq pe150 Sequenzierung, die Qualitätskontrolle der RNA-Proben und der Daten sowie die Datenanalyse wurden von Novogene Bioinformatics Technology Co. in Cambridge durchgeführt. Zur RNA-Isolation wurde das RNeasy Mini Kit (Qiagen) verwendet. Visualisiert wurde die Genveränderung mithilfe eines Streudiagramms (Vulkandiagramm). Veränderungen in biochemischen Prozessen wurde mit der KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) Pathway Analyse sichtbar gemacht. Für die Analyse der Interaktionen zwischen den Zielproteinen wurde die Datenbank STRING Version 11.0 verwendet (201).

4.7 mRNA-Expression mittels RT-PCR

Die Relevanz von mRNA-Expressionsmustern sowie die Funktionsweise der Polymerase-Kettenreaktion wurde bereits erläutert. Bei der quantitativen Real-Time PCR (qRT-PCR) können im Gegensatz zur NGS nur eine begrenzte Anzahl an bekannten Zielsequenzen untersucht werden. Die qRT-PCR besteht aus der reversen Transkription der mRNA in die cDNA (komplementäre DNA), die Vervielfältigung der cDNA sowie anschließender Quantifizierung. Mithilfe von Fluoreszenzfarbstoffen, welche über bestimmte DNA-spezifische Sonden an die zu amplifizierenden DNA-Sequenzen binden, wird die Quantifikation möglich (202-204). Mittels RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit (Qiagen) wurde RNA aus Mausaorta isoliert. Zur Bestimmung wurden insgesamt 250 ng der gesamten RNA genutzt. TaqMan-Sonden wurden zur Fluoreszenzmarkierung verwendet (205). Verwendete TaqMan RT-PCR Assays sind in *Tabelle 4-3* aufgelistet. Durchgeführt wurde die qRT-PCR mittels Quanti-Tect™ Probe RT-PCR Kit (Qiagen) (203).

Tabelle 4-3: TaqMan RT-PCR Assays für die gesuchten mRNA-Sequenzen

TaqMan RT-PCR Assay	
PRMT-1	Mm00480135_g1
DDAH-2	Mm00516769_g1
FOXO-3	Mm01185722_m1
Housekeeping Gen: TATA Box bindendes Protein	Mm00446973_m1

Die Quantifikation kann absolut oder relativ ermittelt werden. In diesem Fall wurde die relative Quantifikation gewählt. Dabei wurde die Expression der mRNA mit einem nicht regulierten Gen, dem sogenanntem Housekeeping Gen, in Relation gesetzt. Zur Quantifizierung der mRNA-Expression wurden Crossing Points (CP-Werte) verwendet. Der CP-Punkt ist ein Wert, an dem das detektierte Fluoreszenzsignal ein Plateau erreicht. Zur Analyse des Expressionsunterschiedes wurde dabei die $2^{-\Delta\Delta CT}$ Methode genutzt. Dabei wird die Differenz zwischen der Expression der untersuchten mRNA-Expression und der Referenz mRNA-Expression (Housekeeping Gen) gebildet (206).

$$\Delta CP = CP_{\text{untersuchtes mRNA-Expression}} - CP_{\text{Referenz-mRNA Expression}}$$

Dieser Schritt stellt eine Normierung dar. Anschließend können die Versuchsgruppen untereinander in Beziehung gesetzt werden. Dabei wurden die Interventionsgruppen mit der Kontrolle in Relation gebracht. Die Ergebnisse wurden in Prozent von der Wildtypgruppe angegeben (205, 207, 208).

$$\Delta\Delta CP = \Delta CP_{\text{Intervention}} - \Delta CP_{\text{Kontrolle}}$$

4.8 Detektion von oxidativem Stress

Die Endothelfunktion ist vor allem vom Gleichgewicht zwischen der Produktion von Stickstoffmonoxid sowie der Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies abhängig. Die ROS-Bildung hat direktem Einfluss auf die Integrität des Endothels (21). Reaktive Sauerstoffspezies nehmen Einfluss auf den Redox-Status in ihrer Umgebung und können ihre unmittelbaren umliegenden Strukturen beeinflussen und auch direkt schädigen (4). Daher ist es von überaus entscheidender diagnostischer Bedeutung, verschiedene Gewebe auf die Bildung von oxidativem Stress zu untersuchen und eine Quantifizierung vorzunehmen.

Reaktive Sauerstoffspezies, vor allem freie Radikale, haben die Eigenschaft, mit umliegenden zellulären Komponenten wie Nukleinsäuren oder Proteinen zu reagieren und deutliche Schäden anzurichten (209). Zur Detektion dieser macht man es sich zunutze, dass reaktive Sauerstoffspezies sehr schnell andere Moleküle oxidieren. Diese Produkte kann man nachweisen. Ein Indikator für intrazelluläre oxidative Stressbildung ist Dihydroethidium (DHE). Ist intrazellulär das Sauerstoffradikal Superoxidanion O_2•- vorhanden, so wird DHE zu 2-Hydroxyethidium (2-OH-E^+) oxidiert. Es ist aber auch möglich, dass DHE mit anderen Oxidantien unspezifisch reagiert. Dabei entsteht Ethidium (E^+) (210) (siehe *Abb. 4-5*). Sowohl E^+ als auch 2-OH-E^+ unterscheiden sich von der nicht oxidierten Form DHE durch eine rote Fluoreszenz (15, 211, 212).

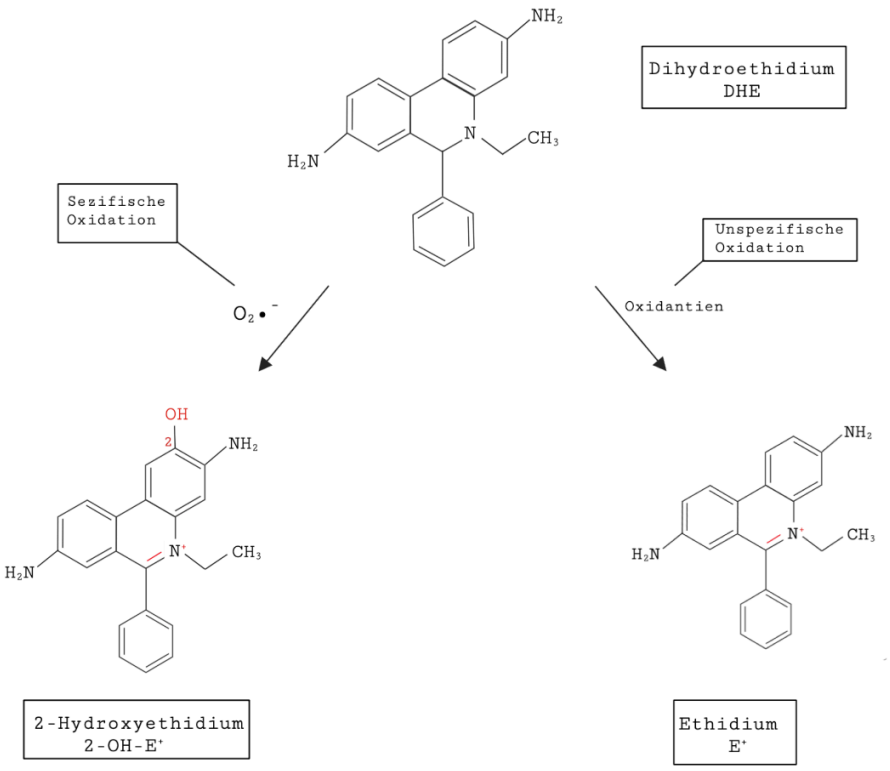

Abbildung 4-5: Oxidation von DHE
Chemische Struktur von Dihydroethidium, Ethidium und 2-Hydroxyethidium. Die Veränderungen an der chemischen Struktur durch Oxidation wurden rot markiert. Mithilfe einer Fluoreszenzmessung lassen sich die oxidierten Formen von DHE unterscheiden.
[Abbildung modifiziert aus (15)]

4.8.1 HPLC-Methode

HPLC (high performance liquid chromatography = Hochleistungsflüssigkeitschromatographie) ist ein analytisches Verfahren zur Trennung und Quantifizierung von Substanzen. Bei dieser Methode gibt es eine stationäre Phase, die in einer Säule einen hohen Druck erzeugt und die Trennsäule bildet. Eine mobile Phase macht es möglich, Proben auf ihre Bestandteile hin zu untersuchen. Läuft die mobile Phase durch die Trennsäule, kommt es zu Wechselwirkungen zwischen den Bestandteilen der mobilen und stationären Phase. Diese Wechselwirkungen hängen von den chemischen Eigenschaften der zu untersuchenden Substanz ab und führen zu einer unterschiedlichen immer wiederkehrenden Adsorption und Desorption, woraus sich unterschiedliche Geschwindigkeiten der Substanzen in der Trennsäule ergeben. Mithilfe eines Entgasers können Luftblasen aus dem System entfernt werden, da dies zu einer Verfälschung der Ergebnisse führen könnte. Zudem enthält das System einen UV und Fluoreszenz Detektor.

Auf diese Weise können die verschiedenen Bestandteile chromatographisch aufgetrennt und detektiert werden. Verwendet wurde ein HPLC-System von der Firma Jasco (213).

4.8.2 HPLC: ROS-Messungen in Aorta sowie Gehirn

Die HPLC-Methode wurde zur Detektion von der Bildung reaktiver Saustoffspezies in der Aorta und Gehirn verwendet. Zu Beginn wurden die Proben von Aorta und Gehirn für 30 Minuten bei 37°C mit 50µM DHE inkubiert. Anschließend wurde das Gewebe mithilfe eines Mörsers sowie Zugabe von flüssigem Stickstoff zu Pulver zerrieben und dann mit Homogenisierungspuffer (Hg-Puffer in *Kapitel 3.2*) vermengt. Nach einer Zentrifugation bei 20.000 x g für 10 Minuten bei Raumtemperatur wurden 50µL von dem Überstand abpipettiert und in der HPLC-Analyse verwendet werden. Eine C18-Nucleosil 100-3 Säule (Macherey & Nagel) diente der Trennung der Bestandteile. Die mobile Phase bestand aus der polaren Komponente Citratpuffer und der unpolaren Komponente Acetonitril. Unter folgenden Gradienten wurde Acetonitril appliziert: 0min: 36%; 7min: 40%; 8-12min: 95%; 13min: 36%. Die Flussgeschwindigkeit lag bei 1 ml/Min. DHE wurde mit einer Absorption von 355 nm, 2-Hydroxyethidiumbromid 2-OH-E^+ sowie Ethidium E^+ mithilfe von Fluoreszenz bei Ex. 480nm/Em. 580nm detektiert (53, 214).

4.8.3 Detektion von Superoxidbildung in Mitochondrien des Herzens

Zur Detektion von Superoxidbildung in den Mitochondrien wurde in der HPLC-Methode der Indikator MitoSOX verwendet (MitoSOX HPLC, siehe *Kapitel 4.8.6*). In Kalinovic et. al. (16) wurde bereits nachgewiesen, dass diese Methode eine valide Aussage über die mitochondriale Superoxidbildung gibt. Die mitochondriale Entstehung von Superoxiden sollte vor allem daher beachtet werden, da dadurch redoxsensitive Strukturen, die sich in der Mitochondrienmatrix befinden, geschädigt werden können (215). Durch die Möglichkeit der Isolation von Mitochondrien lassen sich diese separat auf die Bildung von Superoxiden untersuchen und es lassen sich direkte Rückschlüsse auf mögliche Cross-Talks zwischen den Mitochondrien und dem übrigen Zellmetabolismus ziehen. Zudem stellt sie ein Bild der vorherrschenden Redox-Homöostase dar (5).

4.8.4 Isolierung von Mitochondrien aus dem Herzen

Zur Isolation von Mitochondrien wurden Herzen isoliert mit einem Skalpell zerkleinert und mit 4°C kaltem Hepes-Mito-Puffer (siehe *Kapitel 3.2*) homogenisiert. Um die Mitochondrienfraktion von den restlichen zellulären Bestandteilen separieren zu können, schlossen sich drei Zentrifugationsschritte an. Zuerst wurde bei 1.500 x g und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert, der Überstand abgenommen und dieser dann erneut bei 2.000 x g für 5 Minuten zentrifugiert.

Final wurde die obere Phase erneut bei 20.000 x g für 20 Minuten zentrifugiert, um damit die Mitochondrien zu pelletieren. Nach diesem Schritt wurde das Pellet mit 1ml Hepes-Mito-Puffer (siehe *Kapitel 3.2*) vermengt und der letzte Zentrifugationsschritt wiederholt und das Pellet abschließend in 1ml Tris-Mito-Puffer (siehe *Kapitel 3.2*) resuspensiert. Diese Mitochondrien-Suspension wurde auf Eis gelagert (16).

4.8.5 Proteinbestimmung nach Lowry

Zur Proteinkonzentrationsbestimmung in der oben hergestellten Suspension wurde eine photometrische Methode, modifiziert nach Lowry, verwendet (216). Die Proteinbestimmung nach Lowry besteht aus zwei Schritten. Zuerst erfolgt eine Biuret-Reaktion. Die Peptidbindungen der Proteine sowie Cu^{2+}-Ionen bilden in alkalischer Lösung Komplexverbindungen. Die so entstandene blauviolette Färbung ist abhängig von der Anzahl der Komplexbindungen und je mehr Proteine in einer Probe vorhanden sind desto intensiver ist die Färbung. Nun werden in einem zweiten Schritt die Cu^{2+}-Ionen zu Cu^{+}-Ionen reduziert. Diese Cu^{+}-Ionen reduzieren dann gelbes Folin-Ciocalteu-Reagenz, welches aus Molybdän- sowie Wolfram-Heteropolysäuren besteht, zu Molybdänblau. Die Extinktion der Lösungen kann photometrisch bei einer Wellenlänge von 700nm gemessen werden. Aufgrund dieses zweiten Schrittes ist die Bestimmung nach Lowry wesentlich sensitiver als die Biuret-Reaktion für sich allein genommen. Proteinkonzentrationen im Bereich von 0,1–1 µg/ml lassen sich so nachweisen (216).

Die Schritte der Proteinbestimmung fanden im Detail wie folgt statt: Diese wurde mit dem DC Protein Assay Kit (BioRad Laboratories), welches Reagenz A, B und S enthielt, durchgeführt. Zuerst wurden die Mitochondrienfraktionen mit 1% SDS-Lösung vermengt, bei 37°C für zehn Minuten inkubiert und 25 µl der Proben in Küvetten gefüllt.

1 ml des Reagenz A und 20 µl des Reagenz S wurden miteinander vermischt, davon schließlich 125 µl zusammen mit 1 ml des Reagenz B in die Küvetten gegeben und mit den Proben vermengt. Als Blindwert diente Tris-Puffer (siehe *Kapitel 3.2*). Nach einer Inkubationszeit von zehn Minuten bei Raumtemperatur konnten die Extinktionen und somit Konzentrationen bei 700 nm photometrisch gemessen werden. Dafür wurde eine Eichkurve mithilfe des Standardproteins BSA erstellt. BSA wurde in den Konzentrationen 5,10,20 und 40 mg/ml verwendet (217).

4.8.6 MitoSOX HPLC

MitoSOX HPLC basiert vom Grundprinzip her auf der DHE basierten HPLC-Methode (erläutert in *Kapitel 4.8.1*). Zur Detektion von Superoxid wurde hierbei jedoch der Fluoreszenzfarbstoff MitoSOX Red (Invitrogen) verwendet. Unter Einfluss von Superoxid entsteht aus MitoSOX einerseits das Superoxid spezifische Oxidationsprodukt Triphenolphosphonium 2-Hydroxyethidium (2-OH-Mito-E^+) und unspezifisch Triphenlyphosphonium Ethium (MitoE^+). Anhand der Proteinkonzentrationsbestimmung nach Lowry bestand die Mitochondrienfraktion aus 5-10 mg/ml Gesamtprotein. Diese Suspension wurde dann auf eine Konzentration von 0,1 mg/ml in 0,5ml PBS-Puffer (siehe *Kapitel 3.2*) eingestellt und mit 5 µM MitoSOX für 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Um die Membran der Mitochondrien aufzulösen, wurde danach 50 v/v % Acetonitril hinzugefügt. So war es möglich, die Produkte, welche durch Oxidation von MitoSOX entstanden sind, mithilfe der HPLC-Methode zu untersuchen. 100 µl des zuvor zentrifugierten Gemischs fanden zur HPLC Analyse Verwendung. Der Gradient der mobilen Phase entsprach hierbei folgenden Werten: 0 Min. 22%, 10 Min. 55%, 22 Min. 63% 23-25 Min. 22%. Die Flussgeschwindigkeit lag bei 0,5 ml/min. MitoSOX wurde bei einer Absorption von 360 nm detektiert. Mithilfe eines Fluoreszenzdetektors wurden die Oxidationsprodukte MitoE+ und 2-OH-MitoE^+ bei einer Exzitation von 500 nm und Emission 580 nm gemessen (16, 218)[6]. Die Strukturen von MitoSOX sowie seine Oxidationsprodukte MitoE+ und 2-OH-MitoE^+ sind in *Abbildung 4-6* dargestellt.

[6] HPLC und MitoSOX HPLC wurden mit der Unterstützung von [redacted] und [redacted] durchgeführt. Beide sind Mitarbeitende der Universitätsmedizin Mainz.

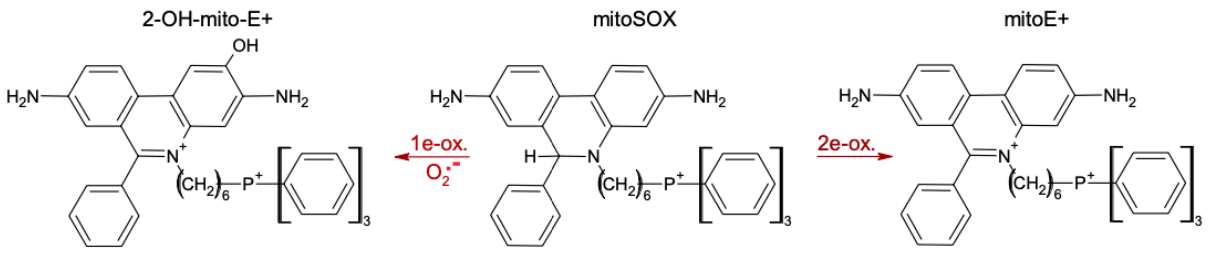

Abbildung 4-6: Strukturen von MitoSOX sowie seine Oxidationsprodukte MitoE+ und 2-OH-MitoE$^+$.
[Abbildung aus (16)]

4.9 Protein Expression in Plasma sowie Aorta

4.9.1 Gewebevorbereitung

Nach Präparation der Aorta (beschrieben in *Kapitel 4.3.*2) wurde vorwiegend der abdominelle Part der Aorta zur Proteinanalyse verwendet. Zur Vorbereitung wurde eine Inkubation mittels Inhibitoren-Puffer (siehe *Kapitel 3.2*) von zehn Minuten bei 37°C begonnen. Dies verhinderte einen Proteasen-bedingten Abbau der Proteine. Anschließend wurden die Aortenpräparate mithilfe flüssigen Stickstoffs schockgefroren. Zur Herstellung eines Proteinhomogenats erfolgte die Pulverisierung des Gewebes mittels eines Mörsers, welcher durch flüssigen Stickstoff gekühlt war. Dann wurde Hg-Lösung (siehe *Kapitel 3.2*) zu den pulverisierten Proben im Volumen-Verhältnis 1:1 hinzugefügt und mithilfe eines Vortexers vermengt. Die Proben wurden für 60 Minuten auf Eis inkubiert und alle fünf bis zehn Minuten erneut gevortext. Dieser Schritt ermöglichte die Auflösung der Zellmembranen und Freisetzung der Proteine. Zuletzt wurden die Proben für zehn Minuten bei 10.000 x g bei 4°C zentrifugiert und der proteinhaltige Überstand in neue Eppendorf Gefäße überführt. Die Messung der Proteinkonzentration in den Proben fand anschließend mittels Bradford Assay statt (196).

4.9.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinbestimmung des Plasmas sowie der Proteinhomogenate (*Kapitel 4.9.1*) der Aorta wurde mittels Bradford-Methode durchgeführt (219), welche eine photometrische Konzentrationsbestimmung ermöglicht. Der Farbstoff Coomassie brilliant Blue bildet in ungebundener, kationischer Form einen roten Farbton (Absorptionsspektrum 465nm) (220). Durch die Bindung von basischen Aminosäureseitenketten kommt es zur Komplexbildung und der Farbstoff wird in seiner anionischen Form stabilisiert. Es folgt ein Farbumschlag nach blau (Absorptionsspektrum von 595nm). Die Zunahme der Absorption wird zur photometrischen Messung der Proteinkonzentrationen verwendet (219, 221). Diese Farbreaktion ist schematisch in *Abbildung 4-7* dargestellt.

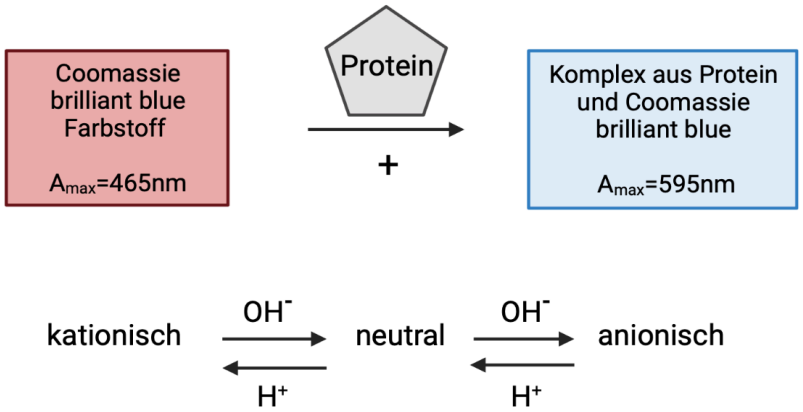

Abbildung 4-7: Darstellung der Farbreaktion von Coomassie brilliant Blue
Die Bindung von Aminosäureseitenketten und dem Farbstoff Coomassie brilliant Blue führt zu einer Stabilisierung in der anionischen Form und Änderung des Absorptionsmaximums. Die Zunahme der Absorption bei 595nm ist ein Maß für die Proteinkonzentration in der Probe (220). [Abbildung modifiziert aus (17)]

Da die Farbreaktion vom Protein abhängig ist, benötigt man ein Standardprotein. Dafür wurde BSA in den Konzentrationen 1, 5, 10, 20, 30 ng/ µl verwendet. Als Nullabgleich wurde destilliertes Wasser genutzt. Die Aortenproben wurden mit einer Verdünnung von 1:200 und die Plasmaproben 1:2000 bestimmt. Pro Well wurden 80 µl pipettiert und 200 µl von der Bradford Essenz (Roti-Quant in einer Verdünnung von 1:5) hinzugefügt. Alle Proben sowie die Standards wurden vierfach getestet, mithilfe eines Platereaders photometrisch ausgelesen und mit dem Programm Revelation die Proteinkonzentration anhand der Standardkurve berechnet.

4.9.3 SDS-PAGE

SDS-PAGE steht für Sodium Dodecyl Sulfat Polyacrylamid Gelelektrophorese und stellt damit eine Form der Elektrophorese dar. Bei dieser Methode werden Gemische aus verschiedenen Proteinen nach ihrem Molekulargewicht her im elektrischen Feld aufgetrennt. Das Trennmedium hierbei ist ein Gel aus Polyacrylamid, welches zusätzlich SDS enthält. SDS kann aufgrund seiner starken negativen Ladung die Eigenladung der Proteine maskieren (222, 223).

Den Proben wurde 3-fach Laemmli (gemischt mit 2-Mercaptoethanol) im Verhältnis 2:1 zugesetzt. Mittels 2-Mercaptoethanol sowie Erhitzung der Proben für fünf Minuten auf 95°C wurde eine Auflösung der Sekundär- und Tertiärstruktur der Proteine erzielt und die Proteine befanden sich wieder in ihrer Primärstruktur (223).

Zur Auftrennung der Proteine wurde ein 10%iges Trenngel sowie 4%iges Sammelgel verwendet. Mithilfe von APS als Initiator und TEMED als Katalysator begann eine Polymerisationsreaktion mit Bildung einer netzartigen Gelstruktur. Neben den Proben (20 µg jeder Probe pro Slot) wurden als kDa-Marker in jeweils einen Slot jeweils der Precision Plus Protein Standard Marker Dual Color sowie der 10kDa BenchMark pipettiert. Das Gel lief für 10 Minuten bei 60 V vor, sodass die Proben vollständig ins Sammelgel eintreten konnten. Anschließend liefen die Proben bei 140 V bis zur gewünschten Auftrennung der Proteine weiter. Verwendet wurde das Mini-PROTEAN ® III Gelelektrophorese System (Bio-Rad Laboratories GmbH) (196, 222, 223).

4.9.4 Western Blot

Western Blotting bezeichnet den elektrophoretischen Transfer von Proteinen von einem Gel auf eine Membran. Verwendet wurde hierfür die Mini Trans Blot ® Elektrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad Laboratories GmbH). Der Transfer wird erreicht, indem ein elektrisches Feld senkrecht zur Membran angelegt wird und so die zuvor über eine SDS-PAGE aufgetrennten Proteine aus dem Gel eluiert und auf die Membran transferiert werden, an der sie aufgrund hydrophober Wechselwirkungen haften bleiben. Dafür wurde ein sogenanntes Blot-Sandwich verwendet, welches aus einem Schwamm, Filterpapier, einer Nitrocellulosemembran sowie dem Gel besteht. Das Muster der Auftrennung der Proteine, welches in der Gelelektrophorese entstanden ist, bleibt bei dem Transfer erhalten. Der Transfer fand bei 100 mA über Nacht statt (196, 224).

Für die Färbung der Proteinbanden wurde im Anschluss auf die Nitrocellulose Membran mit dem Farbstoff PonceauS für ein bis zwei Minuten inkubiert. Dieser Schritt ist notwendig, um die 10kDa Marker Banden zu färben und so eine horizontale Teilung der Membran in verschiedene Antigen-spezifische Abschnitte zu ermöglichen. Gleichzeitig wird ein suffizienter Transfer der Proteine sichergestellt. Diese Färbung ist reversibel und führt zu keiner Interaktion mit den folgenden Immunreaktionen (225).

4.9.5 Immunologischer Nachweis von Proteinen sowie densitometrische Auswertung

Nach dem Transfer der Proteine auf die Membran wurden die freien Bindungsstellen mit in TBS-T gelöstem BSA (3%) oder Milchpulver (5%) blockiert (Blockmedium), da sonst eine spezifische Bindung der Antikörper an die entsprechenden Antigene nicht möglich gewesen wäre. Anschließend wurde die Membran in einem Blockmedium, welches den Primärantikörper des gesuchten Proteins enthielt, über Nacht bei 4°C in einem Wiegeschaukler inkubiert. Als Primärantikörper wurden anti-AMPK α1, anti-Phospho-AMPKα ^{Thr172} und anti-α-Actinin verwendet. Die detaillierte Beschreibung der Antikörper mit ihren zugehörigen Blockmedien und Verdünnungen wurden in *Kapitel 3.3* aufgeführt. Am folgenden Tag wurden mithilfe von vier fünfminütigen Waschschritten mit TBS-T schwach und unspezifisch gebundene Antikörper entfernt. Danach folgte in gleicher Weise für 1-2 Stunden bei Raumtemperatur die Applikation des mit einer Peroxidase gekoppelten sekundären Antikörpers, welcher an den primären Antikörper binden konnte. Es folgten erneut die bereits aufgeführten vier Waschschritte. (225) Zur Visualisierung des Antigen-Antikörper-Komplexes wurde Pierce ECL Western Blot Substrat verwendet. Die durch die Peroxidase ausgelöste Chemilumineszenz sichtbar werdenden sekundären Antikörper des Komplexes wurden mit dem ECL ChemoStar (Intas, Science Imaging Instruments GmbH) dokumentiert. Zur densitometrischen Quantifikation wurde die Software Gel Pro Analyzer genutzt und zur Analyse das Programm Gel-Pro Analyzer™ 6.0. Die integrierten optischen Dichten (IOD) der Proteinbanden für AMPK α1 und anti-Phospho-AMPKα ^{Thr172} wurden an denen der entsprechenden α-Actinin-Banden normalisiert und damit eine relative Expression zur Kontrollgruppe berechnet. Die Bilder wurden im Format JPEG gespeichert (196, 225, 226).

4.9.6 Dot Blot Analyse

Zur Analyse und Quantifizierung von Proteinen in Plasmaproben wurde die Dot Blot Methode angewendet. Im Gegensatz zur Western Blot Methode findet keine vorherige elektrophoretische Auftrennung der Proteine statt, sondern eine direkte Auftragung der Proben auf eine Nitrocellulosemembran. Auf diese Weise findet eine semiquantitative Bestimmung der Proteinkonzentration statt. Im Detail bedeutet das Folgendes: 100 µl (0.5 µg/µl Protein, nach Bradford Analyse) EDTA-Plasma wurde pro Slot auf eine Nitrocellulose Membran mithilfe eines Minifold I Dot Blot Systems (Schleicher&Schuell) transferiert, welches an eine Wasserpumpe angeschlossen war.

Jeder Slot wurde zuvor zweimal mit 200 µl PBS-Puffer (siehe *Kapitel 3.2*) vor und nach dem Proteinauftrag gespült. Zur Fixierung der Proteine wurde die Membran für 60 Minuten bei 60 °C getrocknet. Nach Färbung mit PonceauS folgten nun Blockierung der Membran und Inkubation mit primärem sowie sekundärem Antikörper als auch Dokumentation, Quantifizierung und Berechnung der Expression analog zur Western Blot Methode. Normalisiert wurde hierbei auf die IOD- Werte der PonceauS gefärbten Dots. Als primärer Antikörper wurde ADMA, als Waschpuffer wurde jedoch PBS-T genutzt (225, 227).

Western Blot als auch Dot Blot Methode wurden nach etablierten Protokollen, welche unter anderem in Oelze et al. (226) und Kröller-Schön et al. (227) beschrieben sind, durchführt.

4.10 Statistische Analyse

Bei den Experimenten wurden sowohl der Mittelwert als auch die dazugehörige Standardabweichung errechnet, angegeben sind die Ergebnisse in Mittelwert ± SEM (Standard error of the mean). Als statistisch signifikant wurden nur Werte angesehen, welche $p < 0{,}05$ erfüllten. Die absoluten p-Werte finden sich in den Graphen selbst separat aufgeführt.

Für die statistische Analyse wurde Prism für Windows verwendet (Version 9, GraphPad Software Inc.). Für die statistische Auswertung der isometrischen Tonusstudien im Organbad wurde die zweifache Varianzanalyse (Two-Way ANOVA) mit Tukey Korrektur zum Vergleich mehrerer Mittelwerte herangezogen.

Für die Bestimmung von Protein- und mRNA-Expressionen und für die Messungen der oxidativen Stressbildung in Aorta, Blutplasma und Herzen und des Blutdrucks wurde die einfaktorielle Varianzanalyse (One-Way ANOVA) mit Bonferroni Korrektur verwendet, um mehrere Mittelwerte miteinander vergleichen zu können. Variiert die Anzahl der Wiederholungen in den verschiedenen Experimenten, liegt es daran, dass nicht alle Tiere für alle Experimente verwendet wurden.

5 Ergebnisse

5.1 Vaskuläre Funktion

Die Rolle der vaskulären Funktion ist essentiell für den Gefäßtonus (87, 88). Zur Überprüfung der Gefäßfunktion dienten isometrische Spannungsstudien. Dafür wurden Segmente aus der Aorta thoracalis und der Arteria mesenterica der Versuchsmäuse entnommen. Diese wurden dann nach ihrer Relaxationskapazität untersucht und in Dosis-Wirkungskurven logarithmisch aufgetragen. Die verschiedenen Gruppen konnten so miteinander verglichen werden. Diese Untersuchungsmethode macht es möglich, Rückschlüsse auf die Integrität des Endothels zu gewinnen.

5.1.1 Die endothelabhängige Relaxation der Arteria thoracalis und Arteria mesenterica

In den *Abbildungen 5-1* und *5-2* wurde in Arteriensegmenten mittels Acetylcholins die Endothelfunktion gemessen. Die drei Gruppen (Wildtyp, Lärmexposition und Lärmexposition plus Ausdauersport) sind jeweils zusammen in einem Graphen dargestellt. Im Gegensatz zur Kontrollgruppe ist die Relaxationsfähigkeit der Aorta thoracalis in der lärmexponierten Gruppe eingeschränkt. Dies ist bereits bei geringer Dosis von Acetylcholin nachweisbar und schreitet mit höheren Dosen fort. Mithilfe der Intervention von Ausdauersport ließ sich die eingeschränkte Relaxationsfähigkeit beinahe vollständig aufheben und eine signifikante Linksverschiebung der Dosis-Wirkungskurve war zu erkennen. Die Dosis-Wirkungskurven der Ausdauergruppe und der Kontrollgruppe verlaufen unabhängig von der Acetylcholindosis annähernd auf demselben Niveau. Ausdauersport stellt dabei nahezu vollständig die Fluglärm-vermittelte eingeschränkte Endothelfunktion wieder her. Ebenfalls untersucht wurde die endothelabhängige Vasodilatation in der Arteria mesenterica superior (*Abb. 5-2*). Auch bei der Arteria mesenterica superior findet man durch Fluglärmexposition eine eingeschränkte Endothelfunktion. Mithilfe der Intervention Ausdauersport ließ sich ebenfalls - wie bereits bei der Aorta thoracalis beobachtet - die Fluglärm-induzierte endotheliale Dysfunktion wieder nahezu vollständig aufheben.

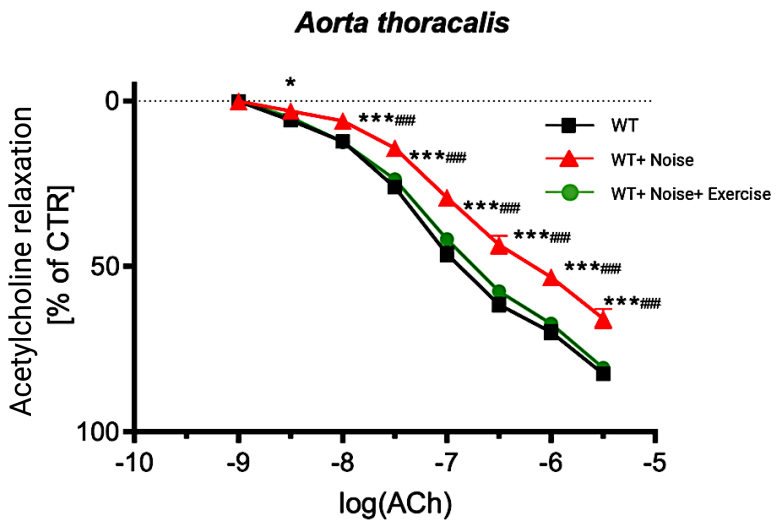

Abbildung 5-1: Effekte der endothelabhängigen Vasodilatation in der Aorta thoracalis
Isometrische Spannungsstudie an der Aorta thoracalis zur Relaxationsfähigkeit gegenüber Acetylcholin. Die Abbildung zeigt Mittelwerte ± SEM von n= 23-49 Aortenringen pro Gruppe. p Werte < 0.05 werden als signifikant angesehen (* = WT vs. Noise, **#**= WT **+** Exercise vs. Noise) Abkürzungen/Übersetzungen: WT= Wildtyp, Noise= Fluglärmexposition, Exercise= Ausdauertraining, ACh= Acetylcholin.

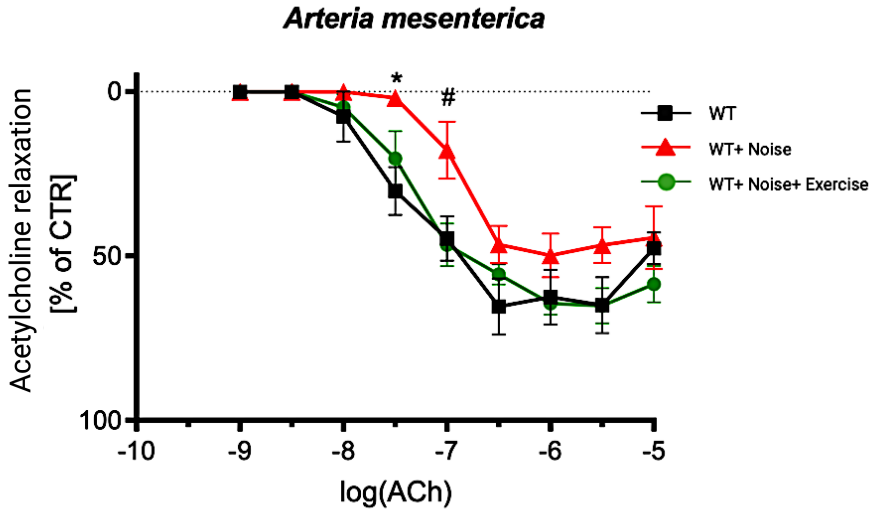

Abbildung 5-2: Effekte der endothelabhängigen Vasodilatation in der Arteria mesenterica superior
Isometrische Spannungsstudie an der Aorta thoracalis zur Relaxationsfähigkeit gegenüber Acetylcholin. Die Abbildung zeigt Mittelwerte ± SEM von n= 5-10 Aortenringen pro Gruppe.
p Werte < 0.05 werden als signifikant angesehen (* = WT vs. Noise, **#**= WT **+** Exercise vs. Noise) Abkürzungen/Übersetzungen: WT= Wildtyp, Noise= Fluglärmexposition, Exercise= Ausdauertraining, ACh= Acetylcholin.

5.2 Arterielle Hypertonie

Der systolische Blutdruck wurde bei den Tieren mithilfe der Schwanzmessung erhoben. Dabei wurde in den ersten sieben Wochen wöchentlich der Blutdruck gemessen, während der viertägigen Fluglärmexposition täglich.

5.2.1 Verhalten des systolischen Blutdrucks

In der *Abbildung 5-3* zeigt sich in den ersten sieben Wochen kein Unterschied in dem Verhalten des systolischen Blutdrucks der Ausdauergruppe zur Kontrollgruppe. Die Fluglärmexposition führt bereits nach einem Tag zum Anstieg des systolischen Blutdrucks um 15 mmHg, nach vier Tagen bis zu 30 mmHg. Je länger die Exposition andauerte desto stärker stieg der Blutdruck an. Die Ausdauergruppe zeigte im Gegensatz zur Kontrolle eine minimale Blutdruckerhöhung. Der starke Anstieg des systolischen Blutdrucks durch die Lärmexposition ließ sich in der Ausdauergruppe nicht finden. Die systolischen Blutdruckwerte in der Ausdauergruppe wurden nahezu vollständig auf die Kontrollwerte zurückgeführt.

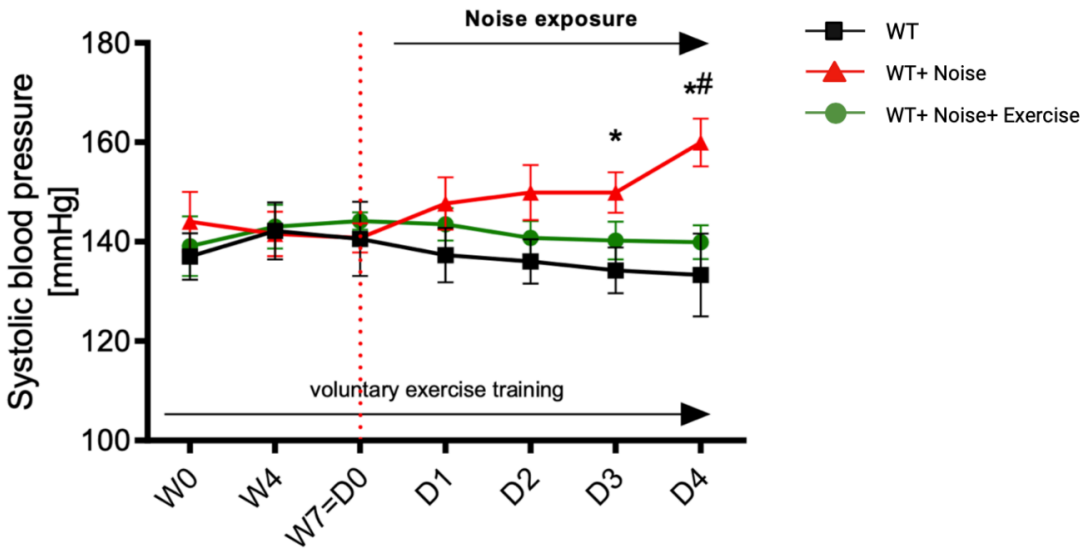

Abbildung 5-3: Systolischer Blutdruck
Nicht-invasive systolische Blutdruckmessungen an den Schwänzen der Tiere. Es wurde bei n=6-20 Tieren der Blutdruck gemessen. Werte mit $p<0,05$ werden als signifikant angesehen (*=Wildtyp vs. Noise; **#**=Wildtyp**+** Ausdauersport vs. Noise).
Abkürzungen/Übersetzungen: WT= Wildtyp, Noise= Fluglärmexposition, Exercise= Ausdauertraining, W=Woche, D=Tag.

5.3 NGS: Einfluss von Fluglärmexposition und Ausdauersport

Mithilfe von Next Generation Sequencing wurden zahlreiche Expressionsmuster untersucht, welche in Signalwege, die für die Redox-Homöostase, zirkadianen Rhythmus, AMPK-Signaltransduktion, NO-Vermittlung und Inflammation verantwortlich sind, involviert sind. Die detaillierte Aufschlüsselung der erhobenen Daten und veränderten Genexpressionen befindet sich im Anhang dieser Arbeit.

5.3.1 Redox-Homöostase, zirkadianer Rhythmus und AMPK- Transduktion, NO-Bildung und Inflammation

Die Daten aus der Next Generation Sequencing Analyse zeigten einen großen Einfluss der viertägigen Fluglärmexposition auf verschiedene Signalwege und damit einhergehende Veränderungen der Genexpression. Dazu gehörte das antioxidative System, der eNOS/NO/cGMP-Signalweg sowie intrazelluläre Inflammation. Lärmexposition zeigte dabei einen enormen Einfluss auf intrazelluläre Signalwege in sehr früher Stufe der Signaltransduktion. Ein Beispiel dafür ist die Aktivierung der eNOS, die zelluläre Antwort auf oxidativen Stress und der Einfluss auf die Redox-Homöostase innerhalb der Zelle. Als Präventionsstrategie zeigte Ausdauersport einen nur mäßigen Einfluss auf die durch Lärmexposition veränderten Parameter und Signalwege auf RNA- Ebene (siehe *Abb. 5-4*).

Dennoch ließen sich über 3000 Gene mit log2-fachen Veränderungen in ihrer Expression nachweisen. Dies jedoch ohne Signifikanz. Genaue Beschreibung der Hoch- und Herunterregulierung verschiedener Genexpressionen ist in *Abbildung 5-5* dargestellt.

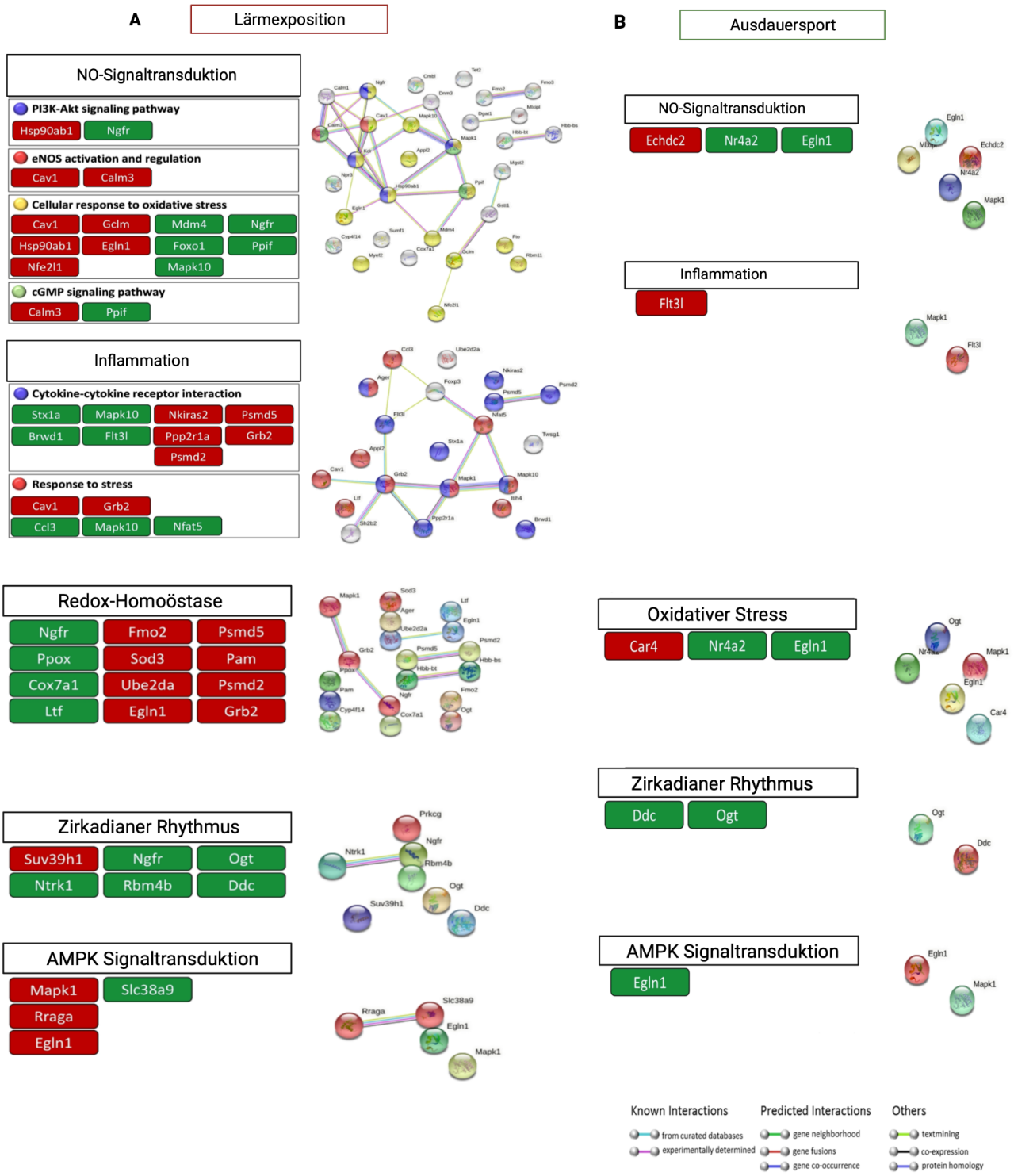

Abbildung 5-4: Zusammenfassende Übersicht der signifikanten Veränderungen von Signalwegen durch Lärmexposition sowie Ausdauersport plus Lärmexposition
Darstellung der Veränderung der Signalwege durch (A) viertägige Lärmexposition (WT vs Noise) und (B) Ausdauersport plus Lärmexposition. (Noise vs. Noise + Exercise) Hochregulierung = grün; Herunterregulierung = rot. Eine detaillierte Beschreibung befindet sich im Anhang. Das Cluster-Mapping wurde mit STRING generiert.

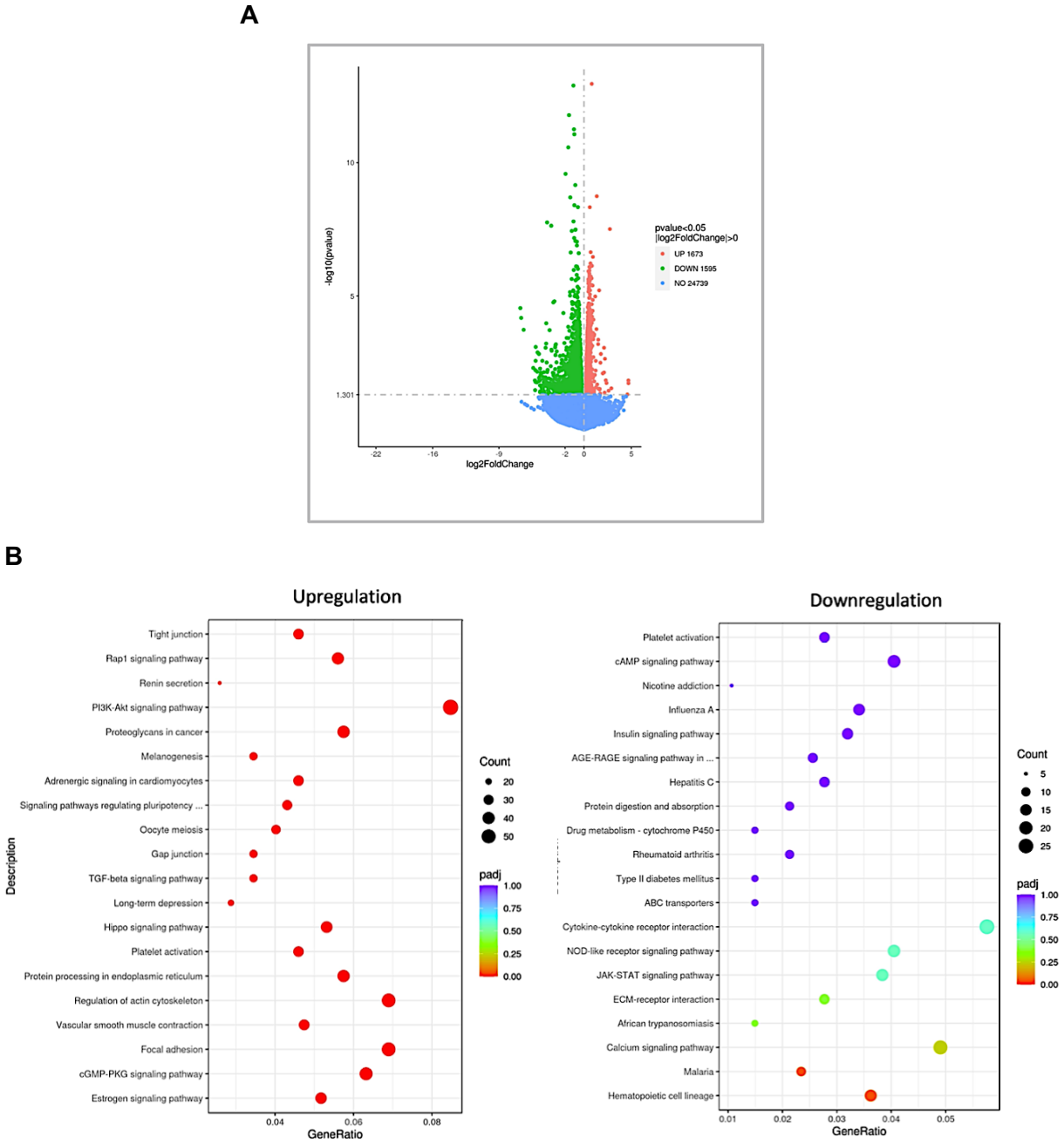

Abbildung 5-5: Next Generation Sequencing Daten zur Veränderung der Genexpression durch AMPK-Aktivierung (Noise vs. Exercise + Noise)
(A) Volcano Plots der NGS-Daten, welche durch veränderte mRNA Expression in Aortengewebe durch Ausdauersport gefunden werden konnte. Den jeweiligen Signalwegen wurden Gene gemäß der KEGG-Klassifikation zugeordnet. (B) Hoch- bzw. Herunterregulierung der KEGG-Signalwege durch Ausdauersport. Entnommen aus dem bioinformatischen Standardanalysebericht von Novogene.

5.4 Oxidative Stressbildung

5.4.1 Oxidative Stressbildung in der Aorta

Die oxidative Stressbildung in der Aorta wurde mittels HPLC untersucht. Als Indikator für intrazelluläre oxidative Stressbildung wurde dabei Dihydroethidium verwendet.

In *Abbildung 5-6* zeigt die Bildung von 2-Hydroxyethidium in der Aorta der drei Versuchsgruppen. Dabei wird deutlich, dass eine gewisse Grundbildung von Superoxid in der Aorta generell vorhanden ist. Durch den Einfluss von Fluglärm kommt es zu einer Verdopplung der Konzentration von 2-Hydroxyethidium und somit einem signifikanten Anstieg der Bildung von Superoxid. Die Ausdauergruppe zeigt hingegen ein wesentlich niedrigeres Niveau von 2-Hydroxyethidium. Dies entspricht beinahe der Wildtypgruppe. So zeigt sich, dass sich über Ausdauersport eine signifikante Abmilderung der Superoxidbildung erzielen lässt. Die Superoxidbildung stellt ein generelles Abbild des oxidativen Stresses im vorherrschenden Zellmilieu dar.

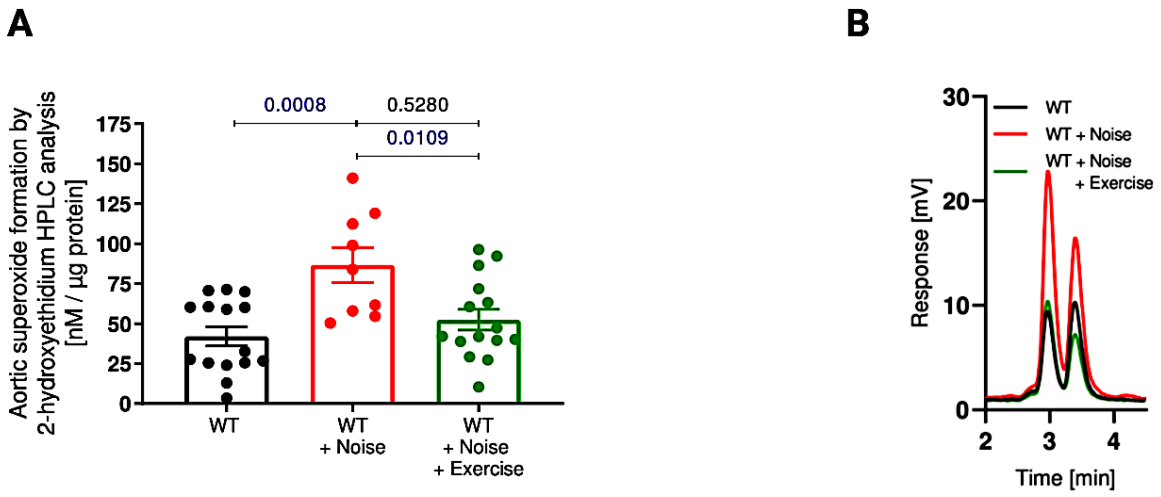

Abbildung 5-6: Bildung von 2-Hydroxyethidium in der Aorta
Mittels HPLC-Methode wurde die Bildung von Superoxid in der Aorta nachgewiesen und quantifiziert (A). Ein repräsentatives Chromatogramm ist in (B) abgebildet.
Die Abbildung zeigt Mittelwerte ± SEM von n= 9-15 Versuchstieren. Die genauen p-Werte sind in der Abbildung angegeben.
Abkürzungen/Übersetzungen: WT= Wildtyp, Noise= Fluglärmexposition, Exercise= Ausdauertraining.

5.4.2 Oxidative Stressbildung im Gehirn

Auf dieselbe Weise wie in der Aorta wurde die Bildung von oxidativem Stress in zerebralen Gewebeproben getestet. Dargestellt ist dies in *Abbildung 5-7.* Hierbei ließ sich einerseits wie bereits in der Aorta über HPLC-Messungen eine Basiskonzentration von 2-Hydroxyethidium finden. Durch die viertägige Fluglärmexposition kam es zu einer verstärkten Bildung von oxidativem Stress. Auch hier ließ sich eine Verdopplung der Konzentration von 2-Hydroxyethidium finden. Durch die Intervention Ausdauersport ließ sich dieser lärminduzierte Anstieg beinahe auf den Ausgangswert der Kontrollgruppe zurückführen, was auf eine protektive Wirkung des körperlichen Trainings auf die Bildung von oxidativem Stress schließen lässt.

Andererseits wird dem Transkriptionsfaktor Forkhead Box O3 wird eine zellprotektive Wirkung in einem oxidativen Milieu zugeschrieben, da er in der Lage ist, die Expression von antioxidativ wirkenden Enzymen, positiv zu beeinflussen (66, 67).

q-RT-PCR Analysen zeigten, dass die Intervention mit Ausdauersport zu einer verstärkten Expression der mRNA von zerebralem FOXO 3 führte. Fluglärmexposition erzielte dabei eine Herunterregulierung der Expression von FOXO 3, was mit einer verringerten protektiven Wirkung gleichzusetzen ist. Ausdauersport über knapp sieben Wochen übertraf bei der Expression hingegen sogar die Wildtypgruppe bei über 100% im Vergleich zur Kontrolle.

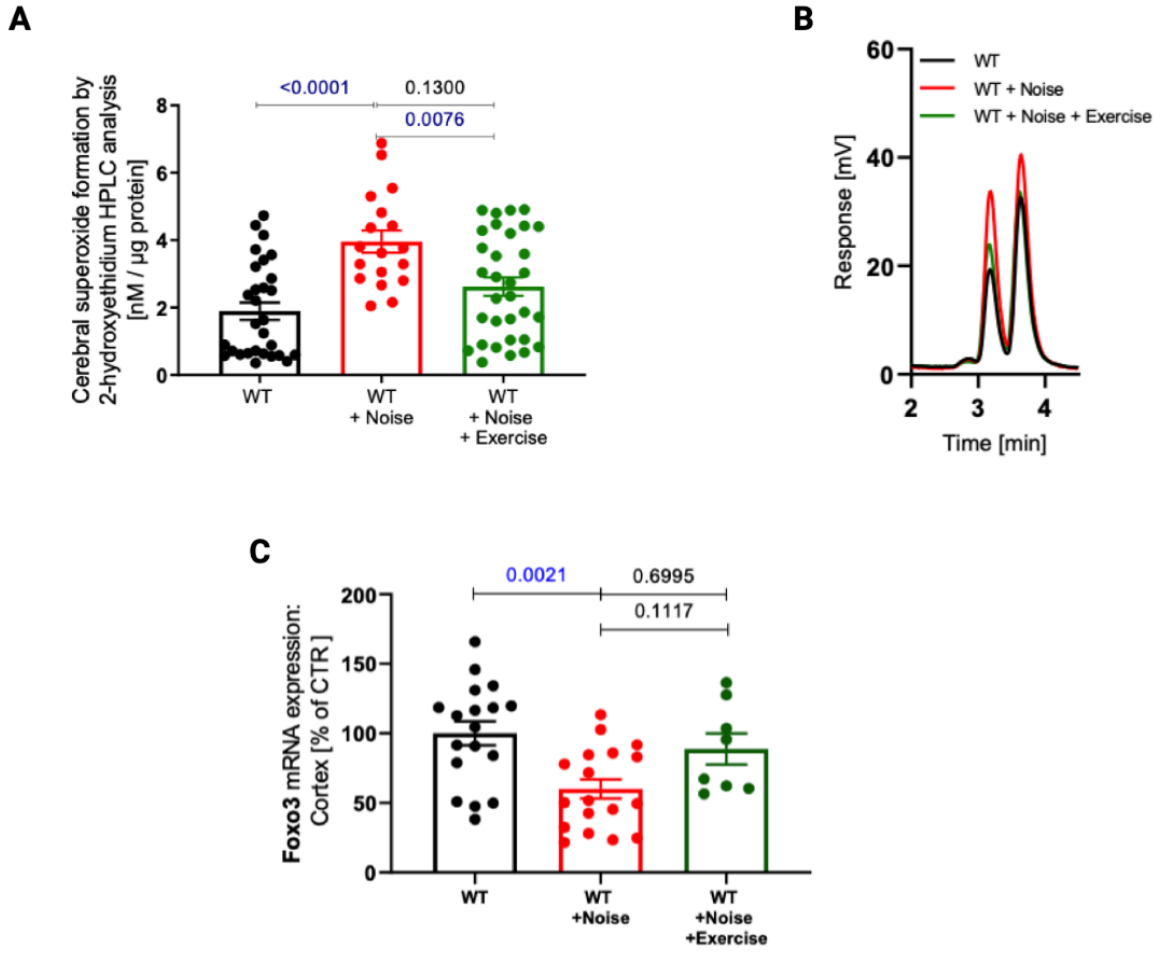

Abbildung 5-7: Zerebrale Bildung von oxidativem Stress und Aktivierung des antioxidativen Systems mittels FOXO3-Expression

Mittels HPLC-Methode wurde die Bildung von Superoxiden in cerebralem Gewebe nachgewiesen und quantifiziert (A). Ein repräsentatives Chromatogramm ist in (B) dargestellt, (C) zeigt die mRNA-Expression von cerebralem FOXO3.

Die Abbildung (A,B) zeigt Mittelwerte ± SEM von n= 18-32 Versuchstieren. Die Abbildung C zeigt Mittelwerte ± SEM von n= 8-18. Die genauen p-Werte sind in der Abbildung angegeben. Abkürzungen/Übersetzungen: WT= Wildtyp, Noise= Fluglärmexposition, Exercise= Ausdauertraining, Foxo3: Transkriptionsfaktor Forkhead Box O3.

5.4.3 Mitochondriale oxidative Stressbildung

Die Bildung von oxidativem Stress wurde durch MitoSOX HPLC untersucht. Der Grundmechanismus entspricht dabei der klassischen HPLC-Methode.

Die Ergebnisse der isolierten Mitochondrien aus den Herzen der Versuchstiere spiegeln die bereits erhobenen Daten der oxidativen Stressbildung wider (siehe *Abb. 5-8*). Eine basale Superoxidbildung wird hier ebenfalls beobachtet. Durch die Fluglärmbelastung von vier Tagen kam es zu einer Verdopplung der Superoxidkonzentration in den Mitochondrien.

Durch ein zuvor ausgeführtes Ausdauertraining konnte diese Superoxidformation vollständig korrigiert werden und entsprach der gemessenen Konzentration der Wildtypgruppe.

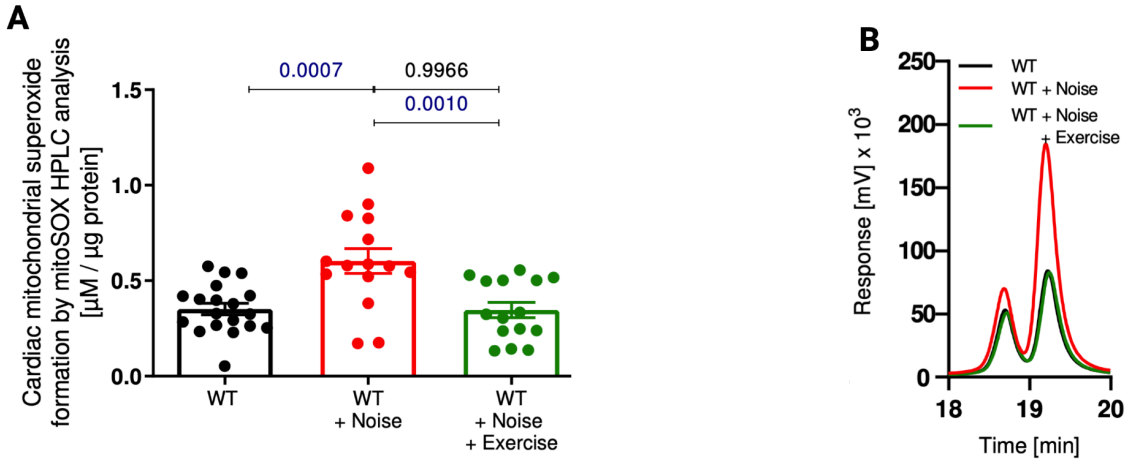

Abbildung 5-8: MitoSOX HPLC-Analyse der kardial isolierten Mitochondrien
Mittels MitoSOX HPLC-Methode wurde die Bildung von Superoxid in den kardialen Mitochondrien nachgewiesen und quantifiziert (A) und ein repräsentatives Chromatogramm (B) aufgezeichnet. Die Abbildung zeigt Mittelwerte ± SEM von n= 15-19 Versuchstieren. Die genauen p-Werte sind in der Abbildung angegeben.
Abkürzungen/Übersetzungen: WT= Wildtyp, Noise= Fluglärmexposition, Exercise= Ausdauertraining.

5.5 PRMT-1/DDAH-2/ADMA - Signalweg

In dieser Studie wurde die Proteinexpression von ADMA im Blutplasma mithilfe der Dot Blot Analyse untersucht. Außerdem wurde das Verhalten der aortalen mRNA-Expression der Isoform 2 von DDAH sowie von PRMT-1 bei den verschiedenen Untersuchungsgruppen ermittelt.

In *Abbildung 5-9* sind die Ergebnisse zur Analyse der verschiedenen Expression des PRMT-1/DDAH-2/ADMA-Signalwegs dargestellt. Dabei zeigte sich, dass durch die Fluglärmexpression eine Bildung der vierfachen Konzentration von asymmetrischem Dimethylarginin im Vergleich zur Kontrolle nachgewiesen werden konnte (*Abb. 5-9 A*). Diese Erhöhung ging mit einer erniedrigten Bildung von DDAH-2 unter Einfluss des viertägigen Fluglärms einher (*Abb. 5-9 C*). ES zeigte sich eine Reduktion auf weniger als 50% der Kontrollgruppe. Die erniedrigte Expression von DDAH-2 war mit einer verstärkten aortalen mRNA-Expression von PRMT-1 assoziiert (*Abb. 5-9 D*). PRMT-1 methyliert Proteinseitenketten und katalysiert damit einen wichtigen Schritt für die Bildung von ADMA (10). Dieser Anstieg der Expression von PRMT-1 und die Senkung der Expression von DDAH-2 konnte mittels Ausdauersport korrigiert werden und führte zu einer Normalisierung der DDAH-2 Expression (*Abb. 5-9 C*) und Verringerung der PRMT-1 Expression (*Abb. 5-9 D*).

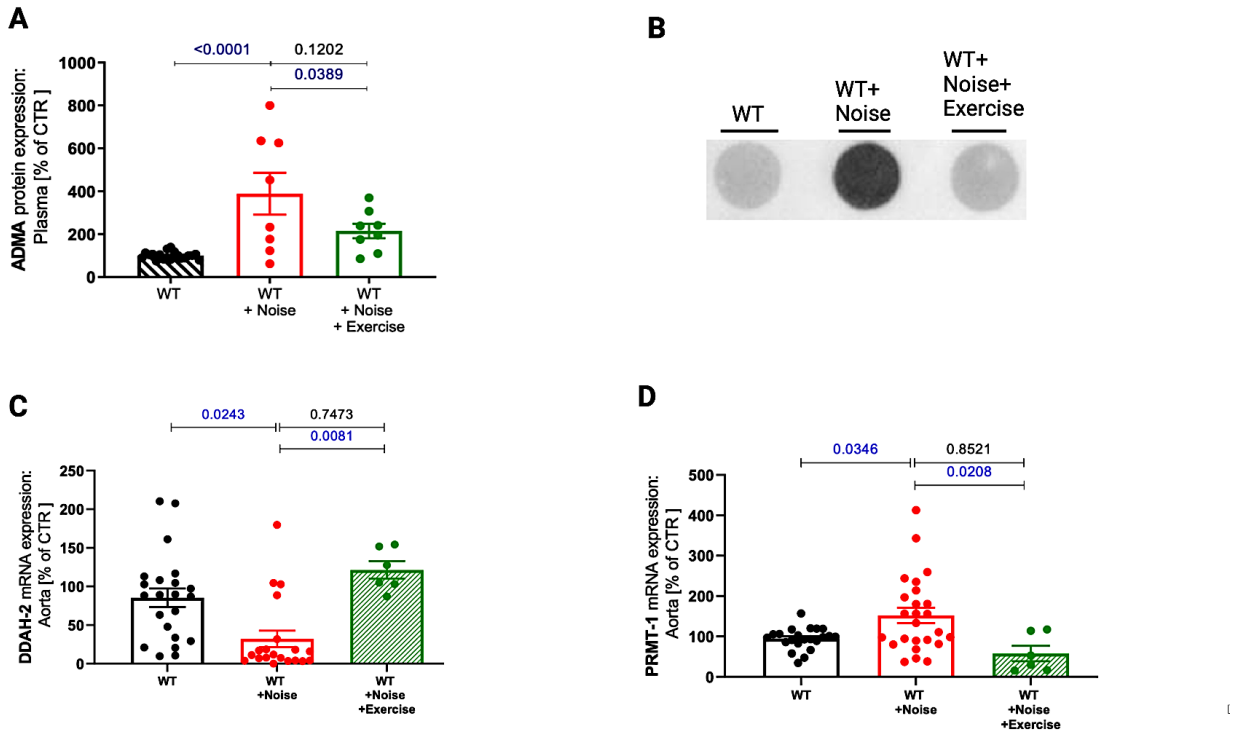

Abbildung 5-9: PRMT-1/DDAH-2/ADMA Protein- bzw. mRNA-Expression
(A) Mittels Dot Blot Methode wurde die Protein-Expression von ADMA ermittelt. (B) zeigt einen repräsentativen Dot Blot für die ADMA-Expression.
(C) Die mRNA-Expressionen von DDAH-2 und (D) PRMT-1 wurden mithilfe der -RT-PCR ermittelt. Die Abbildung zeigt Mittelwerte ± SEM von (A) n= 8-22 Versuchstieren, (C) n= 6-22 Versuchstieren und (D) n=6-25 Versuchstieren. Die genauen p-Werte sind in der Abbildung angegeben. Abkürzungen/Übersetzungen: WT= Wildtyp, Noise= Fluglärmexposition, Exercise= Ausdauertraining.

5.6 „Proof of concept" Studie: Knockout der endothelialen AMPK α1

Zum besseren Verständnis des Mechanismus und der funktionalen Relevanz der endothelialen AMPK α1 als präventive Maßnahme für vaskuläre Schäden, welche durch Fluglärm vermittelt wurden, wurde ein endothelspezifischer Knockout verwendet. Es wurden dieselben Untersuchungen wie mit den Wildtypmäusen durchgeführt, um einen differenzierteren Einblick in die Funktionsweise der endothelialen AMPK α1 zu erhalten.

5.6.1 AMPK α1 -Expression und Aktivierung

In *Abbildung 5-10* sind die Expressionsniveaus der AMPK α1 sowie der Phosphorylierung am Threonin-Rest 172 der AMPK α1 in der Aorta dargestellt. Dabei zeigte sich in den Wildtypmäusen durch eine viertägige Lärmbelastung weder ein Effekt auf die Proteinexpression der AMPK α1 noch auf die Phosphorylierung des Threonin-Rests. Ausdauersport hingegen führte in den Wildtypmäusen zu einer Verstärkung tendenziell in der Expression der AMPK α1 als auch signifikant in der Phosphorylierung, welche als entscheidender Marker der Aktivierung angesehen wird.

Im Gegensatz zu den Versuchsgruppen der Wildtyptiere führte der endothelspezifische Knockout (AMPK α1 EC KO) generell zu einer erheblichen Reduktion der aortalen Expression der AMPK α1 als auch der Phosphorylierung an Threonin 172. Der positive Einfluss von Ausdauersport auf die Expression der AMPK α1 als auch auf die p-AMPK ^{Thr172} war in keinster Weise mehr feststellbar. Die Expressions- und Phosphorylierungsmuster der Lärmexpositionsgruppe entsprach weitestgehend der Ausdauergruppe. Die höchste Expressions-und Phosphorylierungsrate innerhalb der Knockoutgruppen präsentierte sich ohne Interventionen. Die Restexpression ist dabei auf die noch bestehende Expression der vaskulären AMPK zurückzuführen, da lediglich die endotheliale AMPK spezifisch deletiert wurde.

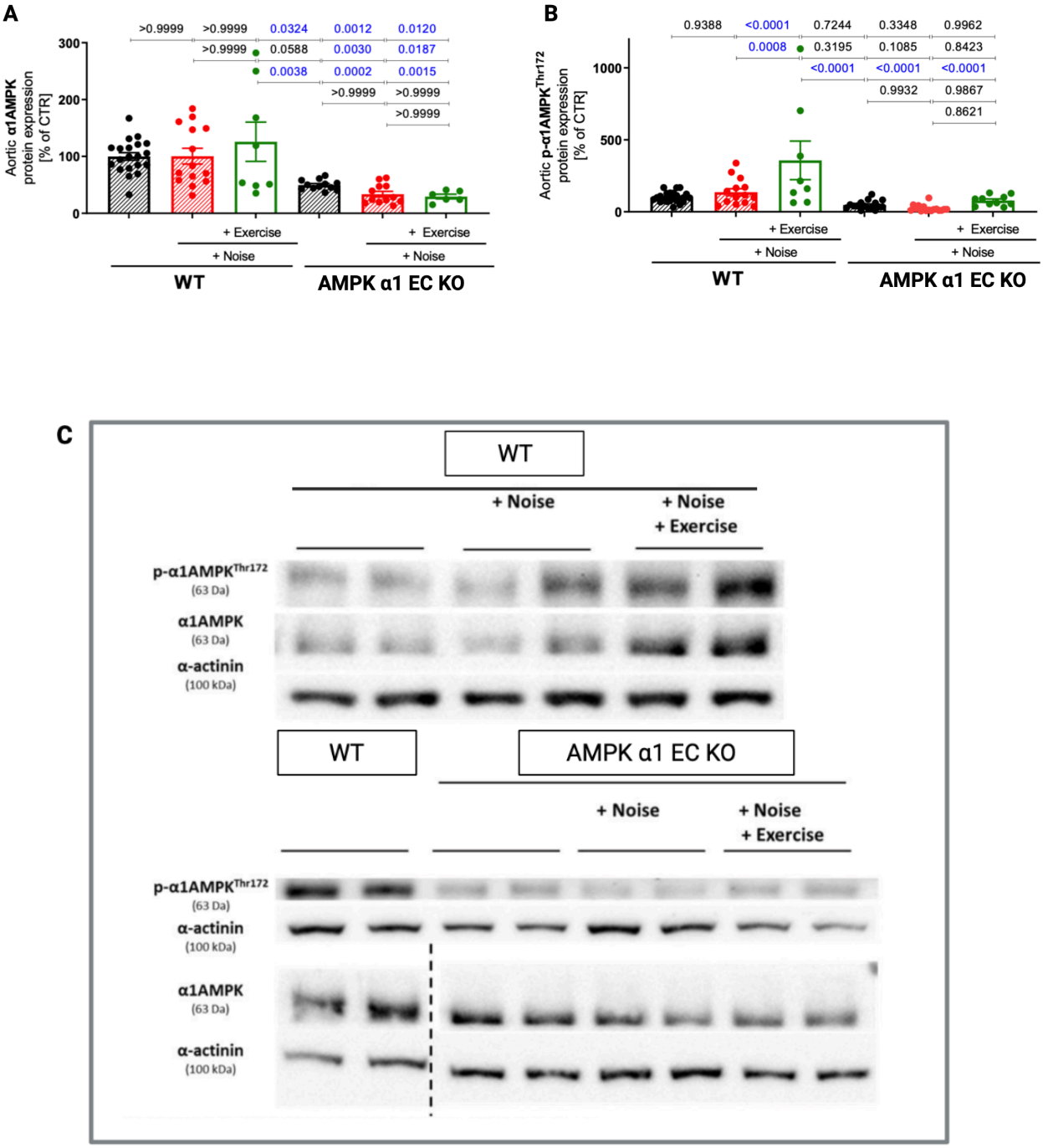

Abbildung 5-10: Aktivierung und Expression der AMPK α1 in Wildtypmäusen und endothelspezifischen Knockoutmäusen
Mithilfe von Western Blots wurde durch densitometrische Quantifikation die Expression der aortalen AMPK α1 sowie die Phosphorylierung am Threoninrest 172 untersucht. Gezeigt ist der Effekt von Ausdauersport auf die Proteinphosphorylierung bzw. -expression von AMPK α1 (A) und p-AMPK α1 ^{Thr172} (B). Die Normalisierung erfolgte auf α-Actinin. Repräsentative Western Blots sind in (C) dargestellt. Die Abbildung zeigt Mittelwerte ± SEM von n= 8-20 Versuchstieren (A) und n=8-26 Versuchstieren (B)
Abkürzungen/Übersetzungen: WT = Wildtyp, Noise= Fluglärmexposition, Exercise= Ausdauertraining, AMPK α1 EC KO= Knockout der endothelialen AMPK α1.

5.6.2 Vaskuläre Funktion der endothelialen AMPK α1

Welche Rolle die Funktion der endothelspezifischen AMPK α1 bei der Vermittlung protektiver Effekte von Ausdauersport auf die Endothelfunktion einnimmt, wurde in der Aorta thoracalis und Arteria mesenterica superior mithilfe von Relaxationsstudien im Organbad und Myograph System untersucht.

5.6.3 Die endothelabhängige Relaxation der Aorta thoracalis und A. mesenterica

In *Abbildung 5-11* ist die endothelabhängige Relaxation in der Aorta thoracalis auf Acetylcholin dargestellt. Die Lärmexposition in den AMPK α1 Knockoutmäusen führte dabei zu einer Beeinträchtigung der Endothelfunktion. Dies äußerte sich in einer Rechtsverschiebung der Kurve im Gegensatz zur Kontrollgruppe. Ausdauersport konnte diese nicht verbessern. Die Graphen beider Gruppen laufen identisch. Die durch Ausdauersport erreichte Linksverschiebung, welche bei der Wildtypgruppe beobachtet werden konnte (siehe *Abb. 5-1*), blieb bei deletierte AMPK α1 vollständig aus. Der alleinige Knockout ohne Intervention oder externe Exposition beeinträchtigte die endotheliale Funktion nicht und verhielt sich entsprechend der Wildtypgruppe.

Ähnliche Befunde konnten bei den Dosis-Wirkungskurven der A. mesenterica superior gefunden werden (*Abb. 5-12*). Hierbei führten ebenfalls die Fluglärmexposition sowie der zuvor ausgeführte Ausdauersport zu einer Beeinträchtigung der endothelialen Funktion. Der alleinige Knockout führte ebenfalls zu einer geringeren Beeinträchtigung der Endothelfunktion, jedoch nicht so stark, wie es bei den Interventionsgruppen zu beobachten war.

Sichtbar wurde hierbei die Schlüsselrolle der Ausdauersport vermittelten Effekte der endothelialen AMPK α1 für die Endothelfunktion.

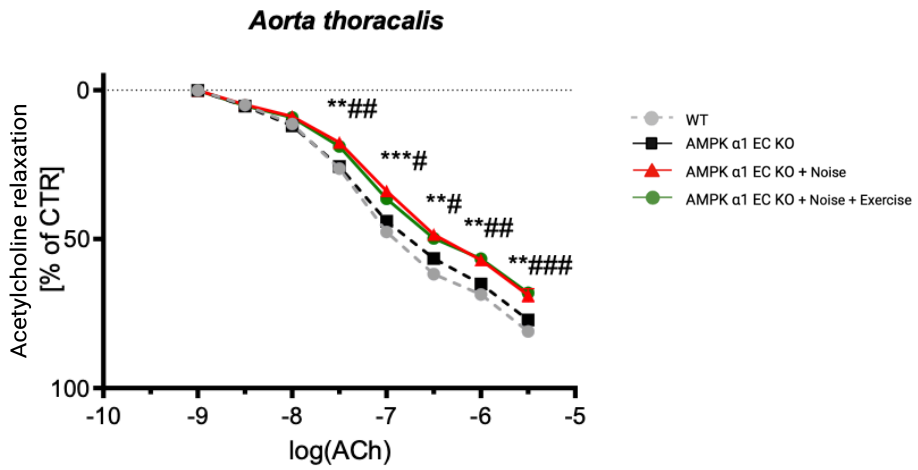

Abbildung 5-11: Effekte der endothelabhängigen Vasodilatation in der Aorta thoracalis bei endothelspezifischem Knockout der AMPK α1
Isometrische Spannungsstudien an der Aorta thoracalis zur Relaxationsfähigkeit auf Acetylcholin. Die Abbildung zeigt Mittelwerte ± SEM von n= 24-41 Aortenringen pro Gruppe. Die Daten der nicht exponierte Wildtypgruppe wurden als Vergleich herangezogen (grau, gestrichelt. Die Werte entsprechend aus *Abbildung 5-1*).
p-Werte < 0.05 werden als signifikant angesehen (* = AMPK α1 EC KO vs. Noise, **#**= AMPK α1 EC KO **+** Exercise vs. Noise).
Abkürzungen/Übersetzungen: WT = Wildtyp, Noise= Fluglärmexposition, Exercise= Ausdauertraining, AMPK α1 EC KO= Knockout der endothelialen AMPK α1, ACh=Acetylcholin.

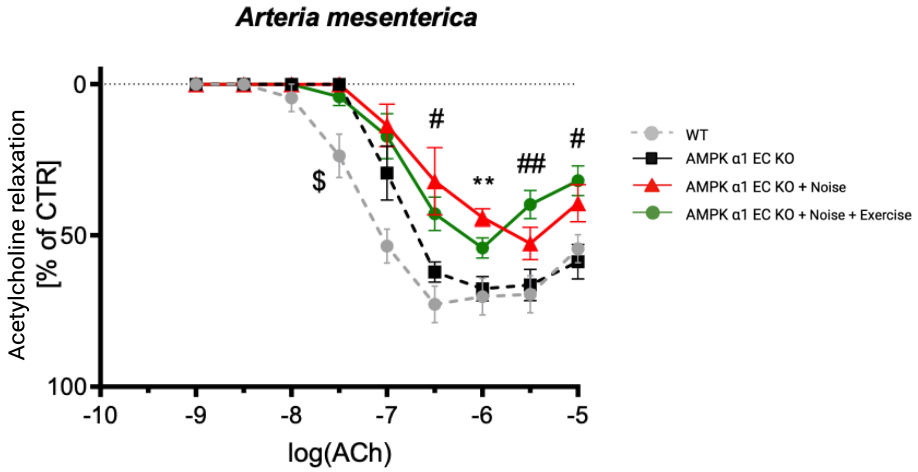

Abbildung 5-12: Effekte der endothelabhängigen Vasodilatation in der Arteria mesenterica superior bei endothelspezifischem Knockout der AMPK α1
Isometrische Spannungsstudie an der Aorta thoracalis zur Relaxationsfähigkeit auf Acetylcholin. Die Abbildung zeigt Mittelwerte ± SEM von n= 6-7 Aortenringen pro Gruppe. Die Daten der nicht exponierte Wildtypgruppe wurde als Vergleich herangezogen (grau, gestrichelt. Die Werte entsprechend *Abbildung 5-2*).
p-Werte < 0.05 werden als signifikant angesehen (* = AMPK α1 EC KO vs. Noise, **#**= AMPK α1 EC KO **+** Exercise vs. Noise, $=WT vs. AMPK α1 EC KO).
Abkürzungen/Übersetzungen: WT = Wildtyp, Noise= Fluglärmexposition, Exercise= Ausdauertraining, AMPK α1 EC KO= Knockout der endothelialen AMPK α1, ACH= Acetylcholin.

5.6.4 Arterielle Hypertonie

5.6.5 Verhalten des systolischen Blutdrucks

In *Abbildung 5-13* sind die systolischen Blutdruckwerte der AMPK α1 Knockoutgruppen sowie der nicht exponierten Wildtypgruppe dargestellt. Den niedrigsten systolischen Blutdruck hatten dabei die Tiere in der Wildtypgruppe (WT). Der endotheliale Knockout der AMPK α1 führte auch ohne weitere externe Einflüsse zu einem leichten Anstieg des systolischen Blutdrucks.

Auffällig ist, dass den höchsten systolischen Blutdruck über den gesamten Beobachtungszeitraum die Ausdauersportgruppe aufwies. Dieser Anstieg ereignete sich bereits in den ersten vier Wochen der Intervention ohne Lärmexposition. Die maximale Differenz zur Kontrolle (AMPK EC KO) lag bei ungefähr 15 mmHg. Die viertägige Lärmexposition verstärkte die bereits hohen systolischen Blutdruckwerte nur noch minimal. Diese blieben beinahe konstant hoch innerhalb des Expositionszeitraums.

Die lärminduzierte arterielle Hypertension, welche in den Wildtypmäusen durch Ausdauersport verhindert werden konnte, wurde in den Knockoutmäusen durch Ausdauersport sogar noch zusätzlich verstärkt. Ein präventiver Mechanismus blieb vollkommen aus. In der viertägigen Fluglärmexposition lag die Differenz zwischen der Ausdauergruppe sowie der Kontrolle (AMPK EC KO) bei ungefähr 20 mmHg. Das Maximum des systolischen Blutdrucks von 160 mmHg entsprach dabei der Wildtypgruppe mit Lärmexposition.

Alleinige Fluglärmexposition führte in der Knockoutgruppe wie bei der Wildtypgruppe zu einem Anstieg des systolischen Blutdrucks. Dieser war bereits nach eintägiger Exposition zu beobachten. Das Maximum erreichte dieser nach vier Tagen und lag dann auf dem Niveau der AMPK α1 EC KO+Noise+ Exercise Gruppe.

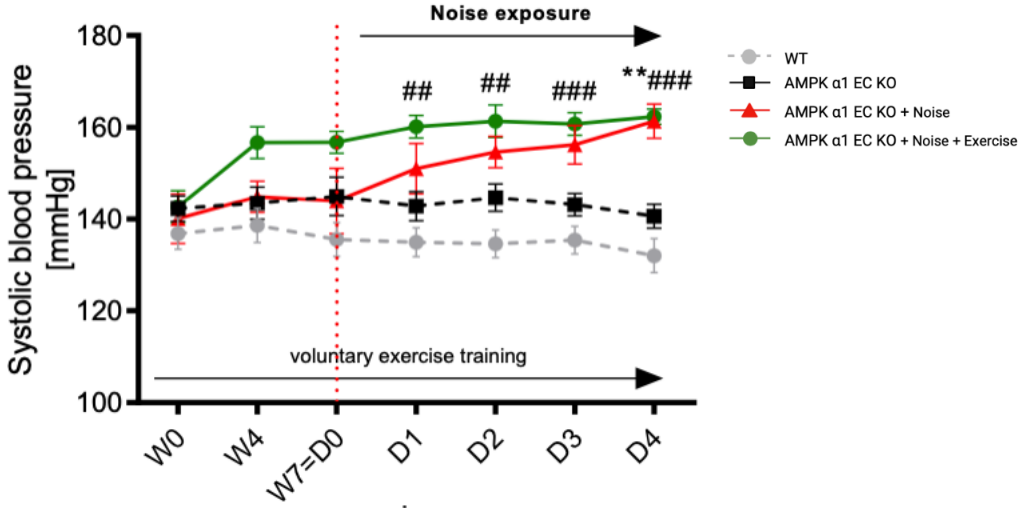

Abbildung 5-13: Systolischer Blutdruck bei endothelspezifischem AMPK α1 Knockout
Systolische Blutdruckmessungen an den Schwänzen der Tiere. Die Daten der nicht exponierte Wildtypgruppe wurde als Vergleich herangezogen. (grau, gestrichelt. Die Werte entsprechend aus *Abbildung 5-3*. Es wurde bei Tieren n=7-17 der systolische Blutdruck gemessen. p-Werte mit p<0,05 werden als signifikant angesehen (*****=AMPK α1 EC KO vs. Noise; **#**= AMPK α1 EC KO**+** Ausdauersport vs. Noise).
Abkürzungen/Übersetzungen: WT = Wildtyp, Noise= Fluglärmexposition, Exercise= Ausdauertraining, AMPK α1 EC KO= Knockout der endothelialen AMPK α1, W=Woche, D=Tag.

5.6.6 PRMT-1/DDAH-2/ADMA - Signalweg bei Deletion der endothelspezifischen AMPK α1

Die Effekte einer genetischen Deletion der endothelspezifischen AMPK α1 auf den PRMT-1/DDAH-2/ADMA - Signalweg sind in *Abbildung 5-14* zusammengefasst. Diese wurden in Aortengewebe untersucht.

Im Einklang mit den Ergebnissen in der Wildtypgruppe (*Abb. 5-9*) kam es auch bei einem endothelialen Knockout der AMPK α1 unter Fluglärmexposition zu einem Anstieg der ADMA-Spiegel im Plasma. Im Gegensetz zu den Ergebnissen in *Kapitel 5.5* (*Abb. 5-9*) erzielte Ausdauersport keine Senkung der ADMA-Konzentration, sondern induzierte einen signifikanten Anstieg der ADMA-Spiegel. Im Vergleich zu den anderen Knockout Versuchsgruppen wurde sogar ein Maximum erreicht.

Die Expression von Dimethylarginin Dimethylaminohydrolase 2 (DDAH-2) war in allen Knockoutgruppen im Vergleich zum Wildtyp kaum noch nachweisbar.

Die Expressionen von PRMT-1 und ADMA in den Knockoutgruppen verhielten sich vom Muster her gleich. Ein Maximum konnte für PRMT-1 ebenfalls in der AMPK α1 EC KO+Fluglärm+Ausdauertraining Gruppe gemessen werden.

Die endothelialen AMPK α1 Defizienz ohne jegliche externe Intervention bewirkte in der Expression von ADMA sowie PRMT-1 Vergleich zum Wildtyp kaum eine Veränderung.

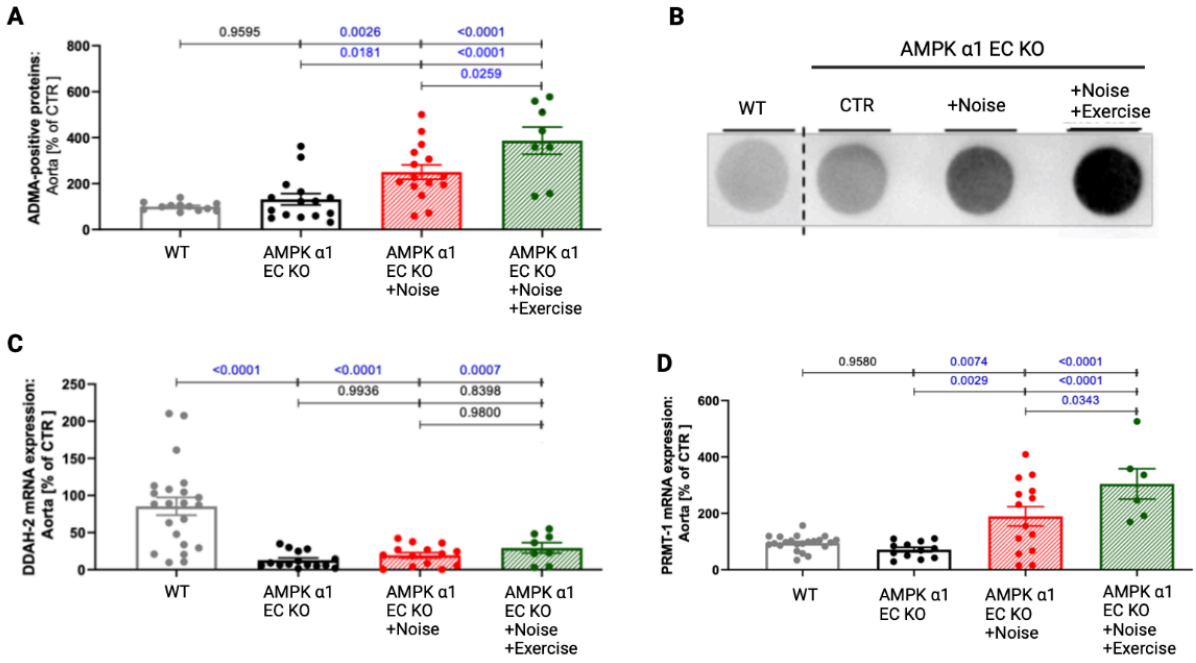

Abbildung 5-14 PRMT-1/DDAH-2/ADMA Expressionsmuster bei endothelialem AMPK α1 Knockout

(A) Mittels Dot Blot Methode wurde die Protein-Expression im Plasma von ADMA ermittelt. (B) Ein repräsentativer Dot Blot für die ADMA-Expression ist ebenfalls dargestellt. Die mRNA-Expressionen in der Aorta von DDAH-2 (C) und PRMT-1 (D) wurden mithilfe von q-RT-PCR ermittelt. Die Daten der nicht exponierte Wildtypgruppe wurde als Vergleich herangezogen. (grauer Balken. Die Werte entsprechend aus *Abbildung 5-9.)* Die Abbildung zeigt Mittelwerte ± SEM von (A) n= 8-15 Versuchstieren, (C) n= 8-22 Versuchstieren und (D) n=6-22 Versuchstieren. Die genauen p-Werte sind in der Abbildung angegeben.
Abkürzungen/Übersetzungen: WT = Wildtyp, Noise= Fluglärmexposition, Exercise= Ausdauertraining, AMPK α1 EC KO= Knockout der endothelialen AMPK α1

5.6.7 Oxidative Stressbildung bei Deletion der endothelspezifischen AMPK α1

Die Effekte einer Deletion der endothelialen AMPK α1 auf die Formation von oxidativem Stress im vaskulären System, im Gehirn und den Mitochondrien im Herzen wurden wie in der Wildtypgruppe mit denselben Methoden untersucht. Aortales sowie zerebrales Gewebe wurde mittels HPLC-Methode auf die Bildung von 2-Hydroxyethidium und isolierte Mitochondrien mittels MitoSOX HPLC-Methode auf die Bildung von Superoxid untersucht.

5.6.7.1 Oxidative Stressbildung in der Aorta

In *Abbildung 5-15* ist die Superoxidformation in der Aorta dargestellt. Dabei fällt auf, dass durch die Fluglärmexposition eine vermehrte Bildung von Superoxid in den AMPK α1 defizienten Mäusen detektiert werden konnte. Die Konzentration überstieg die Daten der Wildtypmäuse, welche ebenfalls mit Lärm exponiert wurden. Die alleinige Defizienz der AMPK α1 führt zu keiner vermehrten Bildung von oxidativem Stress in der Aorta. Der vorher durchgeführte Ausdauersport aggravierte den Effekt der Lärmbelastung zusätzlich. Das Maximum der Superoxidkonzentration wurde daher in den AMPK α1 defizienten Mäuse gefunden, welche Ausdauersport machten und einer viertägigen Lärmbelastung ausgesetzt waren. Der präventive Mechanismus von Ausdauersport, welche in den Wildtypmäusen beobachtet werden konnte, wurde vollständig aufgehoben.

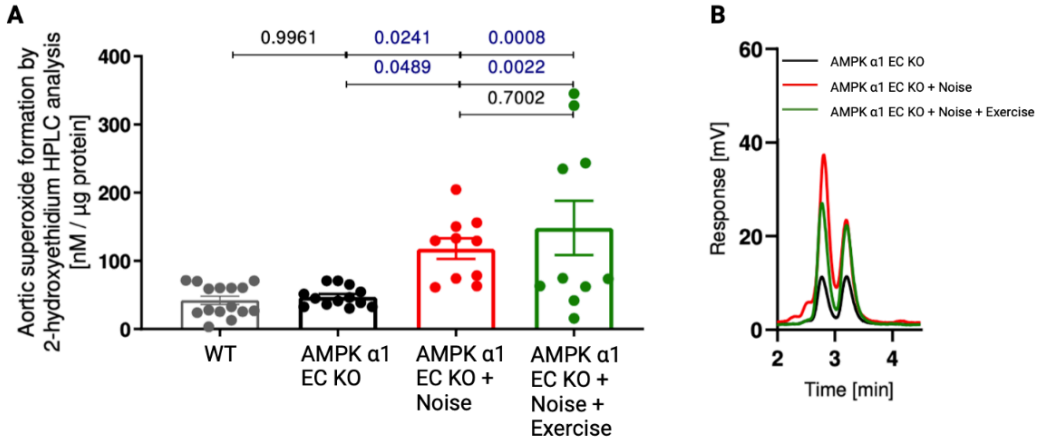

Abbildung 5-15: Bildung von 2-Hydroxyethidium in der Aorta bei genetischer Deletion der endothelialen AMPK α1
Mittels HPLC-Methode wurde die Bildung von Superoxid in der Aorta gemessen und quantifiziert (A) und ein repräsentatives Chromatogramm (B) aufgezeichnet. Die Daten der nicht exponierte Wildtypgruppe wurde als Vergleich herangezogen. (grauer Balken. Die Werte entsprechend aus *Abbildung 5-6.)*
Die Abbildung zeigt Mittelwerte ± SEM von n= 10-15 Versuchstieren. Die genauen p-Werte sind in der Abbildung angegeben.
Abkürzungen/Übersetzungen: WT = Wildtyp, Noise= Fluglärmexposition, Exercise= Ausdauertraining, AMPK α1 EC KO= Knockout der endothelialen AMPK α1

5.6.7.2 Oxidative Stressbildung im Gehirn

Die zerebrale oxidative Stressbildung wurde wie die vaskuläre ermittelt und ist in *Abbildung 5-16* dargestellt. Dabei ließen sich in den verschiedenen Gruppen ähnliche Formationsmuster der Bildung von oxidativem Stress in den verschiedenen Gruppen wie im aortalen Gewebe nachweisen. Die alleinige Defizienz der endothelialen AMPK α1 führte nicht wesentlich zu einer Veränderung in der Formation von 2-Hydroxyethidium. Die Fluglärmexposition sowie der zusätzliche Ausdauersport führten im selben Maße zu einer Steigerung der Superoxidbildung im Vergleich zu den hier gezeigten, unbehandelten Kontrollgruppen (AMPK α1 EC KO und WT).

Betrachtet man die Superoxidbildung der Knockoutgruppe, welche einer Fluglärmexposition ausgesetzt war, so unterscheidet sich diese nur unwesentlich von der entsprechenden Wildtypgruppe (*Abb. 5-7*).

Der präventive Faktor des Ausdauersports, welcher in der Wildtypgruppe beobachtet werden konnte, fiel vollständig weg. Eine Aggravation durch die Kombination aus Fluglärmexposition und Ausdauersport ließ sich in diesem Fall nicht beobachten.

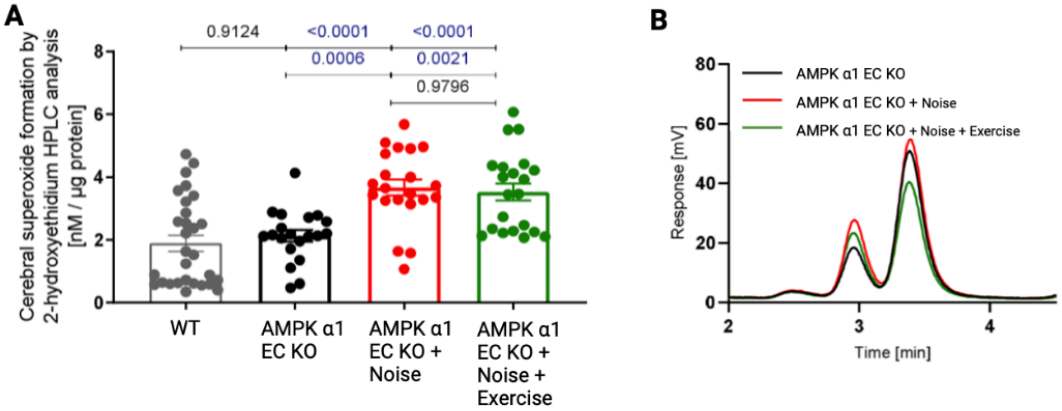

Abbildung 5-16: Zerebrale Bildung von oxidativem Stress bei genetischer Deletion der endothelialen AMPK α1
Mittels HPLC-Methode wurde die Bildung von Superoxiden in cerebralem Gewebe nachgewiesen und quantifiziert (A). Das entsprechende Chromatogramm ist in B dargestellt.
Die Abbildung zeigt Mittelwerte ± SEM von n= 20-29 Versuchstieren. Die genauen p-Werte werden in der Abbildung angegeben. Die Daten der nicht exponierte Wildtypgruppe wurde als Vergleich herangezogen. (grau, gestrichelt. Die Werte entsprechend aus *Abbildung 5-7.*
Abkürzungen/Übersetzungen: WT = Wildtyp, Noise= Fluglärmexposition, Exercise= Ausdauertraining, AMPK α1 EC KO= Knockout der endothelialen AMPK α1

5.6.7.3 Mitochondriale oxidative Stressbildung

Die ermittelten Daten in *Abbildung 5-17* aus den isolierten kardialen Mitochondrien spiegeln die bereits aufgeführten Ergebnisse wider. Die basale Formation von oxidativem Stress in den Wildtypmäusen unterschied sich nicht wesentlich von der AMPK α1 Knockoutgruppe, welche keiner Exposition und Intervention ausgesetzt worden war. Die Fluglärmexposition führte in AMPK α1 EC KO ebenfalls zu einer gesteigerten Bildung von oxidativem Stress. Diese Ergebnisse weisen eine weite Streuung auf, stellen sich aber als signifikant dar. Durch Ausdauersport wurde die Bildung von Superoxid in den Mitochondrien der Herzen zusätzlich aggraviert.

Das Maximum der Konzentration von Superoxid konnte in der Kombination aus Fluglärmexposition und Ausdauersport bei defizienter AMPK α1 festgestellt werden. Eine präventive Komponente von Ausdauersport fiel bei defizienter AMPK α1 vollständig weg.

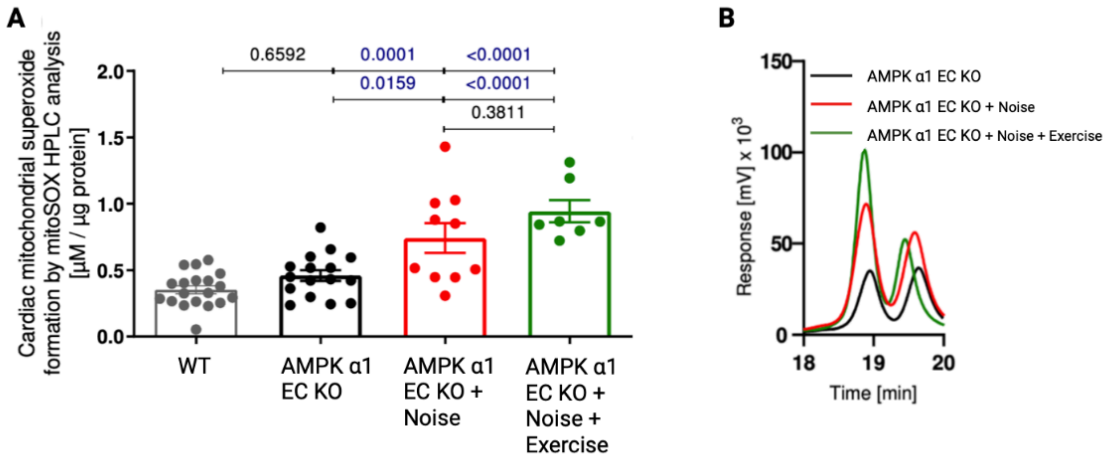

Abbildung 5-17: MitoSOX HPLC-Analyse der kardial isolierten Mitochondrien bei Defizienz der endothelialen AMPK α1

Mittels MitoSOX HPLC-Methode wurde die Bildung von Superoxid in den kardialen Mitochondrien nachgewiesen und quantifiziert (A) und ein repräsentatives Chromatogramm (B) aufgezeichnet. Die Daten der nicht exponierte Wildtypgruppe wurde als Vergleich herangezogen. (grau, gestrichelt. Die Werte entsprechend aus *Abbildung 5-8*

Die Abbildung zeigt Mittelwerte ± SEM von n= 6-19 Versuchstieren. Die genauen p-Werte sind in der Abbildung angegeben.

Abkürzungen/Übersetzungen: WT = Wildtyp, Noise= Fluglärmexposition, Exercise= Ausdauertraining, AMPK α1 EC KO= Knockout der endothelialen AMPK α1

6 Diskussion

Umwelteinflüsse wie Fluglärm als Risikofaktor für das Herz-Kreislauf-System des Menschen haben in den letzten Jahrzehnten in der kardiovaskulären Forschung immer mehr Beachtung erhalten (33). Vermehrte Fluglärmexposition ist mit einem erhöhten Risiko eines Schlaganfalls, koronarer Herzkrankheit und Herz-Kreislauf-Erkrankungen generell assoziiert (41). Die WHO empfiehlt daher den durchschnittlichen Schallpegel von Fluglärm auf unter 45 dB(A) zu senken, um negative Auswirkungen auf das kardiovaskuläre System zu verhindern (228).

Pathophysiologische Ursprünge zu identifizieren, ist von entscheidender Bedeutung beim Verständnis der Entstehung von Krankheiten. Der technologische Fortschritt, der der Gesellschaft die vorherrschende Mobilität durch Verkehrsmittel wie Flugzeuge gebracht hat, ist aus heutiger Sicht kaum noch wegzudenken. Mobilität hat große Relevanz für die Weltwirtschaft, den internationalen Dialog und die Lebensqualität vieler Menschen. Will man dies – und zwar nicht auf Kosten der Gesundheit der Bevölkerung - erhalten, sind Präventivmaßnahmen unausweichlich.

Ausdauersport hat sich als effektives Mittel gegen die Entwicklung von kardiovaskulären Erkrankungen und als Therapiestrategie zur Verhinderung des Fortschreitens dieser Erkrankungen herausgestellt und ist sogar in Lage, die Gesamtmortalität zu senken (119-121, 229). Verschiedene Studien bringen den positiven Effekt von Ausdauersport mit der Integrität der AMPK α1 in Zusammenhang (21, 160).

Der vollständige Mechanismus ist jedoch noch nicht ausreichend geklärt.

Die vorliegende Arbeit hat sich zum Ziel gesetzt, die bereits bekannten schädlichen Einflüsse von Fluglärm auf das kardiovaskuläre System auf pathophysiologischer Ebene zu validieren. Zudem wurde untersucht, ob Ausdauersport als präventive Maßnahme gegen Fluglärm induzierte Gefäßschäden effektiv sei. Mit der „proof of concept“ Studie der genetischen Deletion der endothelialen AMPK α1 wurde eine Möglichkeit geschaffen, mechanistische Einblicke in die vaskulär vermittelten präventiv wirksamen Funktionen der endothelialen AMP-abhängigen Kinase zu erlangen und ihre Wirkweise besser zu verstehen.

6.1 Ausdauersport als Modulator der Fluglärm-induzierten Gefäßschäden

6.1.1 Effekte von Fluglärm auf die Endothelfunktion, den systolischen Blutdruck und auf die Bildung von oxidativem Stress

Die Assoziationen von Lärmexposition mit negativen Auswirkungen auf das kardiovaskuläre System und erhöhten Inzidenzen von zahlreichen Erkrankungen wie arterieller Hypertonie, koronarer Herzkrankheit oder Myokardinfarkt wurden in verschiedenen Studien bereits festgestellt (3, 36, 230, 231).

In der vorliegenden Arbeit konnten bereits bekannte Auswirkungen von Fluglärm auf das kardiovaskuläre System validiert werden. Es zeigte sich durch die Exposition mit viertägigem Fluglärm, dass es zu einer Einschränkung der endothelialen Funktion sowohl in der Aorta thoracalis als auch in der Arteria mesenterica superior kam. Damit einher ging ein Anstieg des systolischen Blutdrucks, welcher sein Maximum nach vier Tagen erreichte. In Zusammenhang damit kam es sowohl zerebral als auch vaskulär zu einer vermehrten Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies. Dies konnte ebenfalls in Mitochondrien der Herzen gefunden werden.

Münzel et al. (19) und Kröller-Schön et al. (53) konnten bereits in experimentellen Mausstudien nachweisen, dass die Exposition von Fluglärm die endotheliale Funktion beeinträchtigte (*Abb. 6-1, B*) und die Bildung von oxidativem Stress und von inflammatorischen Mediatoren verstärkte. Es wurden ebenfalls dieselben Schallpegel verwendet mit einem Maximum von 85dB(A) sowie Durchschnittswerten von 72 dB(A). Die Lärmexposition fand in (19) analog zu dem in dieser Arbeit verwendeten Expositionsprotokoll statt. Sichtbar wurde dabei auch, dass es bereits nach einem Tag zu einem signifikanten Anstieg des systolischen Blutdrucks kam (*Abb. 6-1 A*). In einer weiteren Studie von Frenis et al. (20) zur langfristigen Auswirkung von Fluglärm konnte ebenfalls ein Anstieg des systolischen Blutdrucks nach vier Tagen beobachtet werden. Dort wurde zudem festgestellt, dass sich keine Adaptation der Regulation der Blutdruckwerte in einem Zeitraum von 28 Tagen bemerkbar machte. Dies unterstützt die Beobachtung der HYENA Studie, in der ein verstärktes Auftreten von arterieller Hypertension bei Menschen, welche in der Umgebung von Flughäfen wohnten, gefunden werden konnte (40).

Nach derzeitiger Vorstellung sind die Beeinträchtigung der endothelialen Funktion und der Anstieg des Blutdrucks - beides bereits nach eintägiger Lärmexposition feststellbar - der Aktivierung des RAAS und der Bildung von Katecholaminen wie Noradrenalin und Adrenalin zuzuschreiben (19). In Menschen konnte als neuroendokrine Antwort auf Lärmexposition eine vermehrte Bildung des Stresshormons Cortison (232) und eine Steigerung der Bildung von Katecholaminen wie Adrenalin in gesunden Probanden, welche Lärm ausgesetzt waren, nachgewiesen werden (26). Dabei kam es außerdem zu einer Verringerung der Fluss-abhängigen-Dilatation (FMD), was direkten Rückschlüsse auf die endotheliale Funktion erlaubt. Außerdem konnte bei Patientinnen und Patienten, welche bereits unter einer kardiovaskulären Erkrankung litten, eine zusätzliche Einschränkung der endothelialen Funktion beobachtet werden (45). Die zentrale Rolle des RAAS konnte durch die Tatsache unterstützt werden, dass durch Gabe des ACE-Hemmers Captopril eine Verringerung des Lärminduzierten erhöhten Blutdrucks im Mausmodell erreicht werden konnte (20).

Die beeinträchtigte vaskuläre Funktion wurde mit oxidativen Prozessen in Verbindung gebracht, da das Antioxidans Vitamin C eine Verbesserung der FMD in gesunden Probanden erzielte (26).

Die vermehrte Bildung von oxidativem Stress durch die Exposition von Mäusen mit Fluglärm, welcher Rund um die Uhr stattfand, wurde mit der NADPH-Oxidase (Nox-2) assoziiert, da es bei genetischer Deletion der Untereinheit $gp91^{phox}$ zu einer Verringerung der aortalen ROS-Produktion kam. Gleiche Daten wurden für die zerebrale ROS-Produktion gefunden. Außerdem konnte aufgrund der Exposition von Fluglärm eine verringerte Expression sowie einer Verstärkung der Phosphorylierung der nNOS, welche mit einer Entkopplung der neuronalen NOS assoziiert ist, festgestellt werden. Beides konnte durch eine Defizienz der NAD(P)H-Oxidase rückgängig gemacht werden (53).

Die vermehrte aortale sowie zerebrale Superoxidproduktion konnte ebenfalls bei mehrtägiger Fluglärmexposition festgestellt werden (20) und wurde durch die vorliegende Studie erneut bekräftigt (*Abb. 6-1 C/D*).

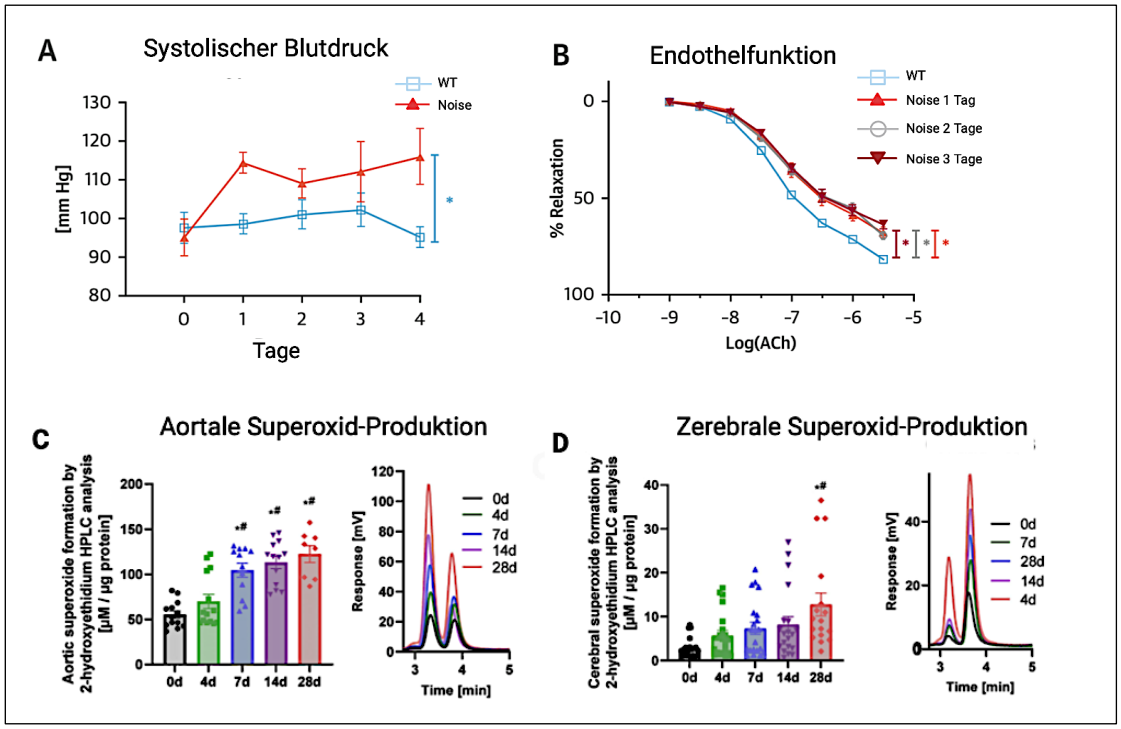

Abbildung 6-1: Negative kardiovaskuläre Effekte durch Fluglärmexposition in experimentellen Mausstudien
A: Sichtbarer Anstieg des systolischen Blutdrucks durch Lärmexposition. B: Eingeschränkte endotheliale Funktion nach viertägiger Lärmexposition. Ergebnisse mit *p < 0.05 vs. CTR oder WT wurden als signifikant erachtet.
Anstieg der aortalen (C) sowie zerebralen (D) ROS-Produktion linear zur Expositionszeit. Ergebnisse mit p < 0.05: * vs. 0d, # vs. 4d wurden als signifikant erachtet. Verwendung von männlichen C57BL/6J Mäusen.
Abkürzungen: WT: Wildtyp, Noise: Lärmexposition, d= Tag, Ach: Acetylcholin
[Abbildung: A und B aus (18) mit Ergebnissen der Originalpublikation (19), C und D aus (20)]

Eine zentrale Bedeutung bei den negativen Einflüssen von Fluglärm auf das kardiovaskuläre System wird der Entkopplung der endothelialen NO-Synthase zugeschrieben. Die „kindling radicals“ – Hypothese beschreibt die Tatsache, dass durch reaktive Sauerstoffspezies - gebildet beispielsweise durch die NAD(P)H-Oxidase in inflammatorischen Zellen - die endotheliale NO-Synthase selbst zu einem Superoxidgenerator wird (96).

In der vorliegenden Studie konnte durch Lärmexposition verstärkte mitochondriale ROS-Bildung nachgewiesen werden. Die Relevanz der Atmungskette als entscheidende Quelle für die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies ist bereits länger bekannt (11, 58, 233).

Die mitochondriale Superoxiddismutase als Möglichkeit des Abbaus der reaktiven Sauerstoffspezies ist daher von großer Bedeutung. Dies untermauerte eine Studie von Daiber et al. in (76), die nachwies, dass es durch eine heterozygote Defizienz der Mn-SOD zu einer verstärkten Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies kam. Außerdem zeigte sich, dass durch die vermehrte Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies, diese durch Poren der mitochondrialen Membran in das Zytosol translozierten. Dadurch kam es zu einer sich gegenseitig bedingenden Wechselwirkung zwischen zytosolischer und mitochondrialer Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies. Denn die mitochondrial gebildeten ROS können wiederum durch Translokation die NAD(P)H-Oxidase aktivieren (5). Daiber sah verschiedene Erklärungen für die vermehrte mitochondriale Bildung: Die Beschädigung der Atmungskette selbst, was zu einer verstärkten Fehlleitung der Elektronen führe und somit einer Steigerung der Superoxidbildung, die Inaktivierung der Mn-SOD durch reaktive Sauerstoffspezies sowie die Verstärkung der mitochondrialen ROS-Bildung durch zytosolische Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (58). Doughan et al. (234) konnten nachweisen, dass AT-II Behandlung die zytosolische NAD(P)H-Oxidase aktivierte, was wiederum zu einer Beeinträchtigung der Mitochondrien und vermehrten Bildung von mtROS führte. Durch Blockade der NAD(P)H-Oxidase konnte dieser Mechanismus verhindert werden. Die Inaktivierung eines mitochondrialen Ionenkanals konnte das Membranpotential beeinflussen und so die Translokation von reaktiven Sauerstoffspezies aus den Mitochondrien ins Zytosol unterbinden. Kröller-Schön et al. (235) zeigten, dass die Blockade der mitochondrialen Pore mPTP die AT-II vermittelte Endotheldysfunktion verhinderte. Da Fluglärm im Mausmodell das RAAS aktiviert und erhöhte AT-II Spiegel gefunden wurden (19), wird ein ähnlicher Crosstalk zwischen NAD(P)H-Oxidasen und mtROS auch bei Fluglärm stattfinden.

Deutlich wird hierbei vor allem die komplexe Wechselwirkung der mitochondrialen und zytosolischen ROS-Bildung und ihre Relevanz für die vaskuläre NAD(P)H-Oxidase. Die gegenseitige Beeinflussung im Sinne eines Circulus vitiosus wird mit der Pathophysiologie vieler Erkrankungen in Verbindung gebracht (5, 88).

Mithilfe der Intervention Ausdauersport blieb in der vorliegenden Studie trotz viertägiger Lärmexposition ein Anstieg des systolischen Blutdrucks aus und die endotheliale Funktion blieb unbeeinträchtigt. Gleichzeitig konnte die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies durch die Lärmexposition durch Ausdauersport im Vorfeld und während

der Lärmexposition vollständig abgemildert werden. Dies traf auf die zerebrale, aortale sowie mitochondriale ROS-Produktion zu. Die positiven Auswirkungen von Ausdauersport auf das vaskuläre System in dem Ausmaß, wie sie eben beschrieben wurden, werden der Intaktheit der AMPK α1 zugeschrieben (21, 160).

Die AMPK gilt als Energiesensor der Zelle, welcher Veränderungen im Konzentrationsverhältnis von AMP/ATP messen kann (11). Durch Ausdauersport wird Energie (ATP) verbraucht. Das AMP/ATP- Verhältnis ändert sich zugunsten des AMPs und stimuliert so die AMPK (161). In Tierexperimenten, in denen der positive Effekt von Ausdauersport auf den Skelettmuskel untersucht wurde, konnte festgestellt werden, dass die AMPK essentiell für die Vermittlung derartiger Funktionen sei. Untersucht wurde dabei jedoch die Isoform α2 (236).

Chen et al. (145) konnten in Ratten nachweisen, dass die AMPK in Endothelzellen und Myozyten die endotheliale NO-Synthase unter Vorhandensein von Calcium und Calmodulin an Ser^{1177} phosphorylierte und auf diese Weise aktivierte. Diese Ergebnisse ließen sich in vitro als auch in vivo unter myokardialer Ischämie der Rattenherzen finden. Diese Aktivierung führte zu einer gesteigerten NO-Verfügbarkeit und verbesserten Endothelfunktion. Letzteres konnte ebenfalls in der vorliegenden Studie beobachtet werden.

Kröller-Schön et al. (21) wiesen nach, dass die AMPK α1 neben erhöhten AMP-Konzentrationen auch durch vermehrte Scherkräfte aktiviert wird. Sportliche Aktivität führt zu einer vermehrten Gefäßdurchblutung und automatischen Steigerung des Herzminutenvolumens im Gefäßsystem. Die dadurch verstärkte Schubspannung im Gefäßlumen wirkt direkt auf die Endothelzellen ein, was als effizienter Stimulator der AMPK α1 angesehen wird (21). Gleicher Aktivierungsmechanismus gilt für die endotheliale NO-Synthase. Die dadurch aktivierte eNOS kann mehr NO produzieren, was wiederum die Vasodilatation begünstigt. Daneben scheinen beide Enzyme sich auch gegenseitig in ihrer Aktivität zu beeinflussen. Die Aktivierung der AMPK α1 durch Scherkräfte scheint daher ein sehr wichtiger Mechanismus zu sein, über den sie ihre protektiven Effekte für das Endothel und die Gefäßhomöostase vermittelt (21).

Eine Erklärung für die verminderte Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies durch die Aktivierung der AMPK α1 bot eine Studie von Schuhmacher et al. (32). Die AMPK soll

nämlich auf die Nox-2 Aktivität Einfluss haben. Die Nox-2 hat im Endothel große Relevanz für die endotheliale Redox-Homöostase.

Die AMPK α1 stellt generell über den hemmenden Einfluss auf proinflammatorische Modulatoren sowie die steigernde Wirkung auf antioxidativen Enzyme einen wichtigen Beitrag zur Unterdrückung einer inflammatorischen zellulären Antwortbildung und Aufrechterhaltung der Redox-Homöostase dar. Dies zeigt sich beispielsweise über die Aktivierung der antioxidativ wirkenden Hämoxygenase 1. Essentiell sind diese Mechanismen vor allem unter inflammatorischen und pro-oxidativen Stimuli (22). Fluglärmexposition, vermittelt durch die Bildung von oxidativem Stress und endothelialer Dysfunktion, ist ein bekannter inflammatorischer und pro-oxidativer Stimulus für das Gefäßsystem (3, 19, 53).

In einem tierexperimentellen Modell, bei dem AT-II Behandlung zur Ausbildung einer Hypertension führte, konnte keine Verringerung des mittleren arteriellen Drucks durch die pharmakologische Aktivierung der AMPK α1 mittels AICAR erreicht werden (159). Dies steht nicht im Einklang mit der Verringerung des systolischen Blutdrucks durch die Aktivierung der AMPK α1 mittels Ausdauersport in den vorliegenden Ergebnissen.

Durch die Intervention Ausdauersport kam es in der folgenden Studie zu einer vermehrten Expression der aortalen AMPK α1 sowie der Phosphorylierung am Threoninrest Thr^{172}. Diese Ergebnisse standen im Einklang mit der bereits bestehenden Meinung, dass Ausdauersport eine effektive Maßnahme zur Aktivierung der AMPK α1 sei (21). Lärmexposition hatte in der vorliegenden Studie weder einen Effekt auf die Expression der aortalen AMPK α1 noch auf die Phosphorylierung.

6.1.2 Auswirkungen auf den PRMT-1/DDAH-2/ADMA - Signalweg

ADMA als kompetitiver Inhibitor der endothelialen NO-Synthase wird aufgrund der Beeinträchtigung der NO-Bildung mit vielen kardiovaskulären Erkrankungen assoziiert (125-128). Surdacki et al. (130) fanden in einem Patientenkollektiv mit arterieller Hypertension erhöhte ADMA Spiegel im Plasma. Die vorliegenden tierexperimentellen Ergebnisse unterstützen dies. Erhöhte arterielle Blutdruckwerte waren ebenfalls mit erhöhten ADMA-Spiegeln im Plasma der Versuchstiere zu finden, welche einer viertägigen Lärmexposition ausgesetzt waren. Ausdauersport konnte trotz Lärmexposition die ADMA-Spiegel sowie den systolischen Blutdruck senken. Analog verhielt sich das

Enzym PRMT-1, welches für die Methylierung von Arginin-Seitenketten in Proteinen zuständig ist. Gleichzeitig wurde das Enzym DDAH-2, welches ADMA abbaut, unter Lärmexposition in seiner Expression stark herunterreguliert. Diesen Pathomechanismen konnte Ausdauersport entgegenwirken.

DDAH ist in zwei verschiedenen Isoformen zu finden (133, 237). Wang et al. (134) konnten immunhistochemisch die Expression von DDAH-2 im Endothel darstellen. Pope et al. (133) schrieben DDAH-1 aufgrund der Enzymkinetik eine dominante Rolle zu. In einer Studie von Wang et al. (134) führt die Inhibition von DDAH-1 zwar zu einer Steigerung der ADMA-Spiegel, zeigte aber keinen Effekt auf die Relaxationsfähigkeit von isolierten Gefäßen. Bei DDAH-2 Inhibition blieben ADMA-Spiegel unverändert, die Relaxation wurde aber beeinträchtigt. Die Inhibition von DDAH-1 und 2 führte zu einer Reduktion der endothelialen NO-Produktion. Um zu bestätigen, dass diese durch ADMA vermittelt war, wurde L-Arginin supplementiert. L-Arginin konkurriert als eigentliches Substrat mit ADMA um die Bindungsstelle an der eNOS. Ein reversibler Effekt konnte bei der Inhibition von DDAH-2 jedoch nicht beobachtet werden, woraus man schließen konnte, dass DDAH-2 auch über ADMA-unabhängige Mechanismen agiert (133). Altmann et al. (238) sind der Meinung, dass DDAH-2 keinen Einfluss auf den Metabolismus von ADMA habe und machen lediglich die Isoform 1 dafür verantwortlich. Die vorliegenden Ergebnisse unterstützen diese Auffassungen nicht, da hierbei verringerte ADMA-Spiegel mit erhöhten DDAH-2 Spiegeln gefunden wurden, was nahelegt, dass ADMA durch DDAH-2 abgebaut worden ist. Auf der anderen Seite lassen die verringerten PRMT-1 Konzentrationen auch auf eine verminderte Bildung als Ursache schließen. Vermehrte ADMA-Spiegel gingen zudem mit der Beeinträchtigung der endothelialen Funktion einher sowie einer Steigerung der Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies, was wiederum im Einklang mit der Entstehung von kardiovaskulären Erkrankungen steht (237).

Leiper et al. (239) stellten die Hypothese auf, dass DDAH-1 neben der Beeinflussung des ADMA/NO-Signalwegs andere unabhängigen Regulationsmechanismen haben müsse. Unterstützt wird dies durch die Tatsache, dass ein vollständiger Knockout von DDAH-1 letal endet, ein triple NOS-Knockout jedoch lebensfähig ist (133, 239). Der ADMA-abhängige Signalweg von DDAH-2 wird durch die vorliegenden Ergebnisse weiter unterstützt, schließt einen unabhängigen Weg aber nicht aus.

Leiper et al. (239) führten außerdem an, dass die posttranslationale Methylierung von Argininresten in Proteinen Auswirkung auf die NO-Homöostase habe. Dies wird durch vermehrte PRMT-1 Expression mit einhergehenden verstärkten ADMA-Spiegeln durch Lärm unterstützt. Mithilfe von Ausdauersport konnten die Fluglärminduzierten Veränderungen im PRMT-1/DDAH-2/ADMA Signalweg vollständig rückgängig gemacht werden. Der genaue molekulare Interaktionsmechanismus dieses Signalwegs sowie die Relevanz der verschiedenen Isoformen von DDAH für die Bioverfügbarkeit von NO bleiben dennoch weiterhin unzureichend geklärt.

In der vorliegenden Studie konnte erneut bekräftigt werden, dass Fluglärmexposition einen negativen Einfluss auf die endotheliale Funktion, die Bildung von oxidativem Stress sowie den ADMA-Signalweg hat. Gleichzeitig stellte sich Ausdauersport, welcher vor und während der Exposition auf freiwilliger Basis ausgeführt wurde, als effektive Präventionsstrategie dar. Da gewisse schädliche Einflüsse auf das vaskuläre System im täglichen Leben nicht vollständig vermeidbar sind, ist es für die Erhaltung der Gesundheit von außerordentlicher Relevanz, Strategien auszuüben, um kardiovaskuläre Schäden und Protektion im Gleichgewicht zu halten (*Abb. 6-2, A*). Eine Zusammenfassung der Untersuchungsergebnisse finden sich in der folgenden Graphik schematisch dargestellt. (*Abb. 6-2, B*)

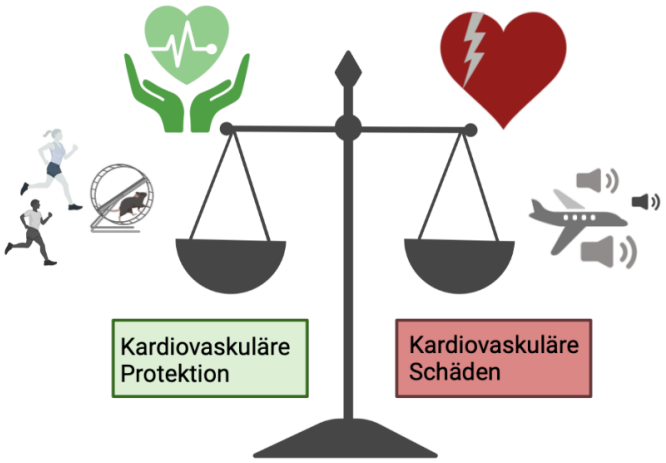

Abbildung 6-2 A: Gleichgewicht von kardiovaskulären Schäden sowie Protektion
Rot: Fluglärmexposition, Grün: Ausdauersport. Genaue mechanistische Einblicke in Abbildung 7-2 B.

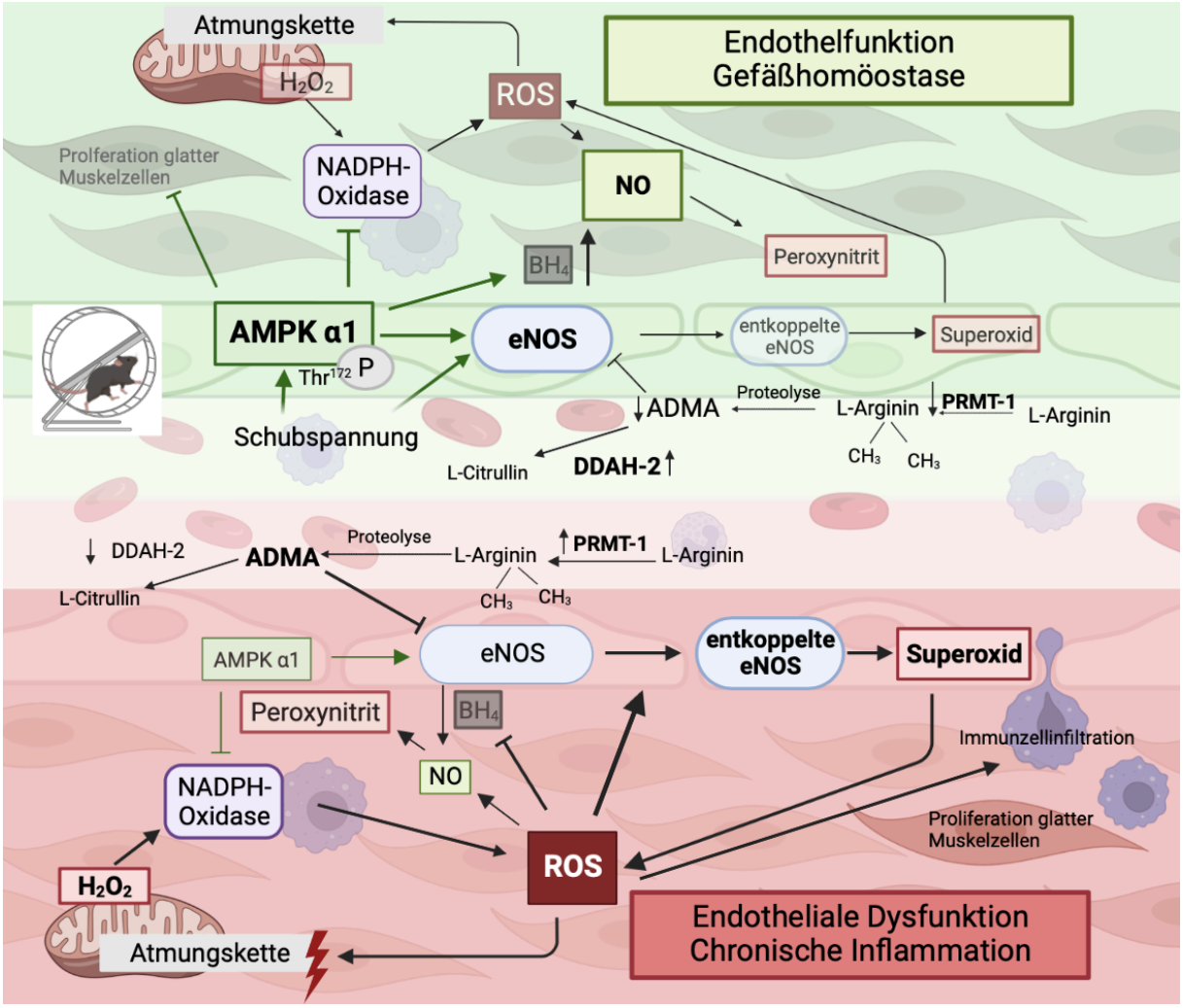

Abbildung 6-2 B: Protektiven Effekte von Ausdauersport vermittelt durch die endotheliale AMPK α1 als Modulator der schädlichen Auswirkungen von Fluglärmexposition auf das Gefäßsystem

Fluglärmexposition führt über verschiedene Mechanismen zu einer verstärkten Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS). Als Folge kommt es zu einer chronischen Inflammation sowie endothelialen Dysfunktion (Rötliche Farbe). Als Gegenspieler wird über Ausdauersport die endothelialen AMPK α1 aktiviert und führt über die Steigerung der eNOS zu einer vermehrten NO-Bildung, was wiederum die endotheliale Funktion sowie die Gefäßhomöostase schützt (grünliche Farbe).

Abkürzungen: H_2O_2: Wasserstoffperoxid, ROS: reaktive Sauerstoffspezies, BH_4: Tetrahydrobiopterin, NO: Stickstoffmonoxid, eNOS: endotheliale NO-Synthase, ADMA: asymmetrisches Dimethylarginin, DDAH-2: Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase (Isoform 2) PRMT-1: Protein Arginin Methyltransferase, Thr^{172}: Threoninrest 172.

6.1.3 Auswirkungen auf die Genexpression, vorwiegend des Transkriptionsfaktors FOXO 3

FOXO 3 wird eine wichtige Rolle in der Zellalterung und zellulärer Redox-Homöostase vor allem durch Aktivierung protektiver Mechanismen zugeschrieben (66). In der vorliegenden Studie sank unter Einfluss von Fluglärmexposition die zerebrale FOXO 3-Expression, gleichzeitig kam es zu einem Anstieg der ROS-Bildung. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen von Kröller-Schön et al. (53). Zusätzlich wurde dort die pharmakologische Aktivierung der FOXO 3-Expression mittels Bepridil durchgeführt, was zu einer signifikanten Senkung der Bildung von zerebralem oxidativem Stress führte. Denselben Effekt erzielte Ausdauersport in den vorliegenden Ergebnissen. Dies unterstützt erneut die antioxidative Wirkung von FOXO 3 sowie den antioxidativen Effekt von Ausdauersport.

Eine direkte Interaktion der AMPK mit FOXO 3 wurde von Greer et al. (240) vermutet. Diese sahen eine direkte Interaktion der AMPK und FOXO 3 durch Phosphorylierung an mehreren regulatorischen Seitenketten. Die Lokalisation des Transkriptionsfaktors blieb davon jedoch unbeeinflusst. Die Aktivierung der vaskulären AMPK durch Ausdauersport in Kröller-Schön et al. (21) konnten dies nicht bestätigen. Sie fanden keinen signifikanten, quantitativen Unterschied in der Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors Forkhead Box O 3.

Kröller-Schön et al. (53) konnten durch die Analyse mittels NGS massive Veränderungen in der Genexpression rund um die Regulation des zirkadianen Rhythmus sowie Inflammation bei Fluglärmexposition, welche rund um die Uhr stattfand, feststellen. Sie sahen FOXO 3 als Knotenpunkt dieser veränderten Signalwege an.

In den vorliegenden Ergebnissen mittels NGS konnten ebenfalls Veränderungen in essentiellen Signalwegen für den zirkadianen Rhythmus sowie inflammatorischen Zellantwort durch viertägige Lärmexposition gefunden werden. Zusätzlich zeigten sich Veränderungen in der Regulierung von Genen, welche Signalwege für die NO- Bioverfügbarkeit, AMPK-Signaltransduktion sowie die Redox-Homöostase betreffen. Ausdauersport hatte dabei jedoch nur wenig Einfluss auf die Genexpression – zwar waren zahlreiche Gene reguliert, jedoch unter dem Signifikanz-Schwellenwert der bioinformatischen Analysen.

6.2 Deletion der endothelialen AMPK α1: Folgen für das kardiovaskuläre System

Bei der vorliegenden Studie wurde mithilfe eines endothelspezifischen Knockouts der AMPK α1 der mechanistische Effekt der AMPK α1 auf das kardiovaskuläre System, vorwiegend auf die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies sowie die endotheliale Funktion, näher untersucht. Es zeigte sich, dass es durch die Fluglärmexposition sowie zusätzlichen Ausdauersport zu einer Beeinträchtigung der endothelialen Funktion bei Defizienz der endothelialen AMPK α1 kam. Eine Dämpfung der lärminduzierten endothelialen Dysfunktion konnte weder in der Aorta thoracalis noch in der Arteria mesenterica superior beobachtet werden. Gleichermaßen verhielt es sich mit dem systolischen Blutdruck.

Die AMPK gilt als ein wichtiger Aktivator der endothelialen NO-Synthase (136, 145) und spielt somit eine entscheidende Rolle für die Endothelfunktion (156). Kröller-Schön et al. (21) konnten bereits nachweisen, dass bei fehlender vaskulärer Expression der AMPK die endotheliale Funktion durch Ausdauersport nicht verbessert werden konnte. Dabei handelte es sich jedoch um einen globalen Knockout der vaskulären AMPK. Eine vermehrte Bildung von NO, welche unter Ausdauertraining beobachtet werden konnte, blieb bei AMPK Defizienz vollständig aus. Gleichermaßen verhielt es sich mit der Expression der endothelialen NO-Synthase sowie der Phosphorylierung am Serinrest Ser^{1177}, welcher als Aktivierungsstelle der eNOS gilt.

Der Transkriptionsfaktor Nrf2 spielt bei der Aktivierung der eNOS durch verstärkte Schubspannung eine wichtige Rolle (241). Diese stellt einen essentiellen Stimulus für die Aktivierung der endothelialen NO-Synthase dar (90). Nrf2 wurde bei intakter AMPK α1 durch Ausdauertraining sehr stark exprimiert. Dies blieb bei defizienter AMPK α1 aus (21).

Die Integrität der AMPK α1 scheint daher ein entscheidender Mechanismus für die Verbesserung der Endothelfunktion durch Ausdauersport zu spielen. Da das Fehlen der endothelialen AMPK α1 zu keiner Verbesserung der Endothelfunktion führte, scheint die endothelspezifische Form der AMPK α1 einen sehr großen Anteil an den Ausdauersport vermittelten protektiven Effekten auf das Endothel zu haben.

Reaktive Sauerstoffspezies spielen eine entscheidende Rolle für die Gefäßhomöostase (4). Eine ausgewogene Balance zwischen NO- und ROS-Konzentrationen ist essentiell für die Aufrechterhaltung der Endothelfunktion (242). Die AMPK wird als Protektor vor zellulärem oxidativem Stress angesehen (156).

Die hier vorliegenden Ergebnisse zeigten, dass bei defizienter endothelialer AMPK α1 Ausdauersport die bereits durch Fluglärmexposition vermittelte ROS-Bildung zusätzlich aggravierte. Die alleinige Defizienz hatte keinen Einfluss auf die Konzentrationen von reaktiven Sauerstoffspezies. Letzteres entsprach den Ergebnissen von Kröller-Schön et al. (21) für die vaskuläre Deletion. Eine Aggravation der ROS-Bildung durch Ausdauersport ließ sich dort jedoch nicht finden (21). Dies lässt vermuten, dass die endotheliale AMPK α1 vorwiegend aktiv wird, wenn schädliche Einflüsse die Gefäßhomöostase in Gefahr bringen, wie es durch die Lärmexposition der Fall ist.

Außerdem führte die Deletion der AMPK α1 in myelomonozytären Zellen zu einer Ausprägung eines pro-inflammatorischen Phänotyps (243). Dies steht im Einklang mit der starken ROS-Bildung in den Knockoutgruppen.

Die Aktivierung der AMPK findet vorwiegend über die Phosphorylierung an Thr^{172} statt (13). Bei vaskulärer Deletion der AMPK α1 kam es zu einer massiven Reduktion der Expressionen der aortalen AMPK α sowie der p-AMPK α^{Thr172}, was Kröller-Schön et al. (21) als Zeichen für die fundamentale Rolle der Isoform α1 für die Gefäßzellen ansahen. Sehr ähnliche Expressionsmuster konnten bei der hier vorliegenden endothelspezifischen Deletion der AMPK α1 gefunden werden. Vor allem die phosphorylierte Form am Thyrosinrest Thr^{172} war kaum noch zu finden. Dies lässt auf eine außerordentliche Bedeutung der endothelialen AMPK α1 an der gesamten vaskulären AMPK schließen und schreibt ihr eine wichtige Vermittlerfunktion der protektiven Effekte zu. (siehe zusammenfassende Übersicht der vaskulären Effekte der AMPK in *Abb. 6-3*)

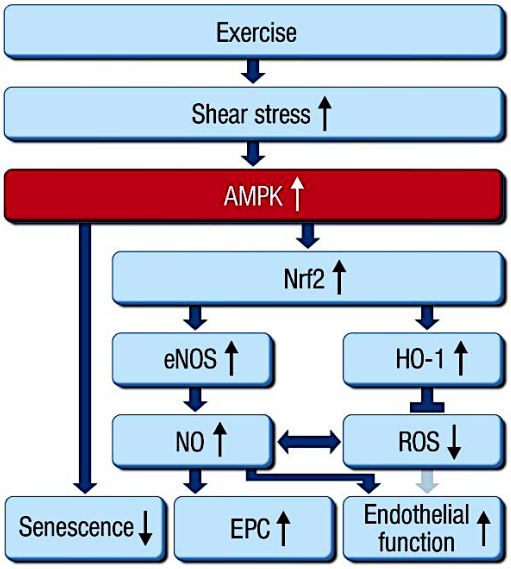

Abbildung 6-3: AMPK-abhängige Effekte auf das Gefäßsystem
Ausdauersport führt zu einer verstärkten Auswurfleistung am Herzen. Dies vermehrt Scherkräfte in den Gefäßen. Die AMPK reguliert die endotheliale eNOS hoch über Phosphorylierung. Diese Aktivierung läuft parallel neben der verstärkten Expression des NrF2 ab, was gleichzeitig zu einer verstärkten Aktivierung der Hämoxygenase 1 führt. Diese Mechanismen resultieren in einer verstärkten Bildung von NO und Verringerung der zirkulierenden reaktiven Sauerstoffspezies, was sich beides positiv auf die Endothelfunktion auswirkt. Daneben senkt die AMPK die Zellalterung und hat Einfluss auf Vorläuferzellen des Endothels. Letzteres benötigt jedoch eine intakte NO-Synthase.
Abkürzungen: AMPK: Adenosinmonophosphat-abhängige Kinase, Nrf2: Nuclear factor like 2, eNOS: endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase, NO: Stickstoffmonoxid, HO-1: Hämoxygenase-1, ROS: reaktive Sauerstoffspezies, EPC: Endothelial Progenitor Cells= endotheliale Vorläuferzellen.
[Abbildung aus (21)]

ADMA hat als Inhibitor der eNOS eine wichtige Rolle für die Gefäßhomöstase (125, 133). Welche Funktion die endotheliale AMPK α1 in dem PRMT-1/DDAH-2/ADMA-Signalweg einnimmt, wurde bis jetzt unzureichend untersucht. Die vorliegenden Daten lassen auf einen Interaktionsmechanismus schließen, da durch Ausdauersport der negative Einfluss von Lärmexposition auf die Bildung und den Abbau von ADMA vollständig ausgeglichen werden konnte. Die Defizienz der endothelialen AMPK α1 führte nicht nur zu einem Ausbleiben der positiven Wirkung von Ausdauersport auf den PRMT-1/DDAH-2/ADMA-Signalweg, sondern Ausdauersport aggravierte die Fluglärm-induzierte schädliche Wirkung noch zusätzlich. Dies wurde vor allem in der verstärkten Bildung von ADMA deutlich.

Angiotensin II stellt einen inflammatorischen Stimulus für die Gefäßwand dar (244). Die Wirkung von AT-II auf das Endothel wurde von Kröller-Schön et al. (22) mithilfe eines endothelialen Knockouts der AMPK α1 untersucht, wie er in der vorliegenden Studie ebenfalls verwendet wurde. Die niedrig-dosierte AT-II Behandlung führte dabei bei Wildtypmäusen bereits zu einer minimalen Beeinträchtigung der Endothelfunktion. Bei genetisch ausgelöschter AMPK α1 wurde diese zusätzlich verstärkt. Die Untersuchungen wurden an TekCre Mäuse vorgenommen (*Abb. 6-4, A*). Gleiche Beobachtungen konnten jedoch auch bei den hier verwendeten CadhCre Mäusen mit spezifischem Knockout der endothelialen AMPK α1 beobachtet werden. Eine alleinige Defizienz führte ebenfalls zu keiner Veränderung der Endothelfunktion (*Abb. 6-4, A*). In Assoziation damit stand eine verringerte NO-Konzentration, welche bei den Knockouttieren gemessen werden konnten. Die Gabe von AT-II verstärkte diese Beobachtung noch einmal zusätzlich.

Im Gegensatz zur vorliegenden Studie konnte keinerlei Veränderung beim systolischen Blutdruck beobachtet werden (*Abb. 6-4, B*). Weder die Gabe von AT-II noch der endotheliale Knockout der AMPK α1 hatten auf diesen einen Einfluss (22). Diese Ergebnisse unterschieden sich von den vorliegenden Ergebnissen, da es dort sowohl unter Lärmexposition als auch durch die Deletion der endothelialen AMPK α1 zum Anstieg des systolischen Blutdrucks kam, welcher bei Intaktheit der AMPK α1 durch Ausdauersport normalisiert werden konnte. Die Integrität der endothelialen AMPK α1 scheint daher essentiell für die Blutdruckregulierung zu sein, insbesondere unter hypertensiv wirkenden Stimuli wie Lärmexposition. Unter Beachtung der Ergebnisse von Kröller-Schön et al. (22) sollten jedoch auch AMPK α1 unabhängige Möglichkeiten der Blutdruckregulierung durch Ausdauersport in Betracht gezogen werden.

Aortale Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies führte in den Wildtypmäusen zu keinerlei Veränderung durch Gabe von Angiotensin II (*Abb. 6-4, C*). Auch die alleinige Defizienz führte zu keiner wesentlichen Steigerung der ROS-Produktion (22). Dies stimmt mit den hier erlangten Ergebnissen zur ROS-Produktion überein. Erst wenn ein negativer Stimulus bei deletierter AMPK α1 auf das Gewebe einwirkte, kam es zu einer Aggravation der ROS-Produktion.

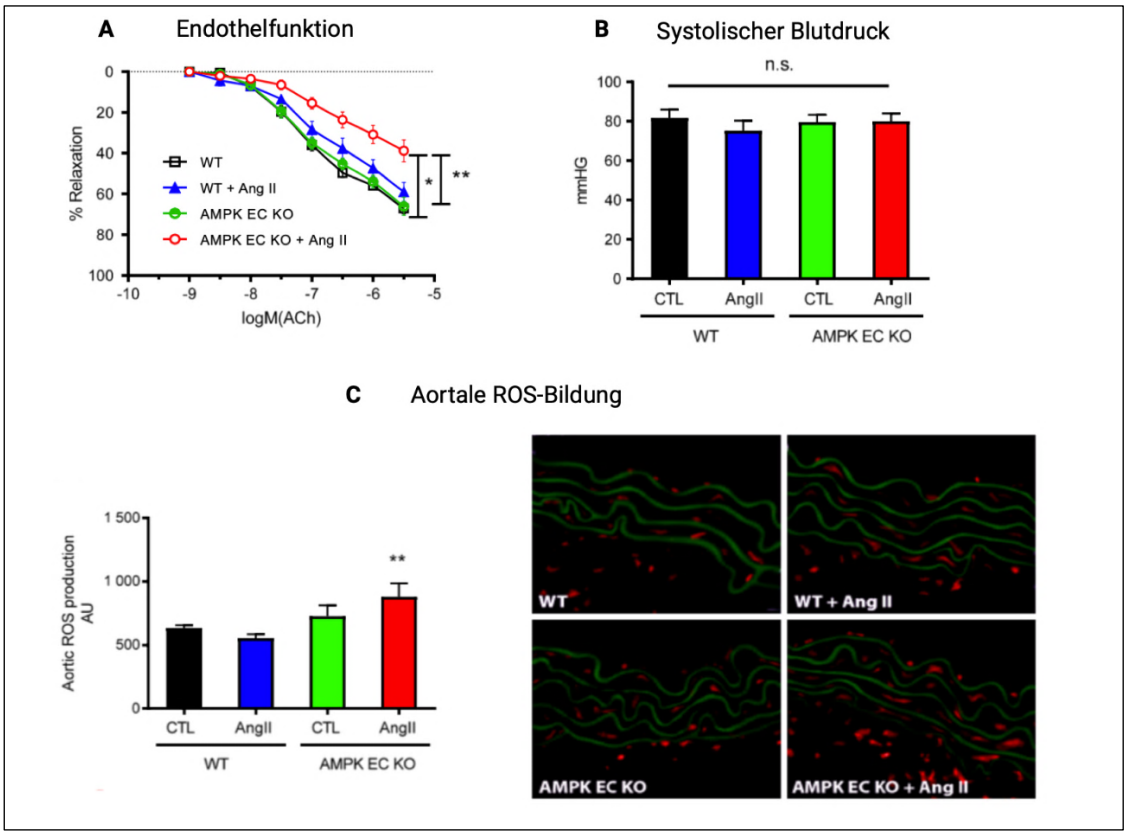

Abbildung 6-4: Die AMPK α1 als Modulator der Angiotensin II vermittelten Wirkungen auf die Endothelfunktion und die ROS-Bildung
Die Gabe von Angiotensin II führt zu einer minimalen Beeinträchtigung der Endothelfunktion. Dies wird jedoch verstärkt, wenn die AMPK α1 deletiert ist. (A) Weder Angiotensin II noch die Defizienz der endothelialen AMPK α1 führt zu einer Änderung des systolischen Blutdrucks. (B) Durch die Gabe von Angiotensin II kommt es zu keiner Veränderung der Bildung von oxidativem Stress in der Aorta in den Wildtypmäusen. Bei Deletion der AMPK α1 hingegen führt die Stimulation durch Angiotensin II zu einer signifikanten Steigerung der ROS-Produktion. Dargestellt ist dies zusätzlich an DHE Kryoschnitten, eine vermehrte Rotbildung zeigt dabei verstärkte ROS-Produktion an. (C) Als signifikant wurde *$p < 0.05$ vs. WT, **$p < 0.05$ vs. WT + Ang II angesehen. Die Angiotensin II Behandlung fand über sieben Tage mit der Dosis 0.5 mg/kg statt. Versuchstiere: TekCre Mäuse.
Abkürzungen/Übersetzungen: WT: Wildtyp, CTL: Kontrolle, Ang II: Angiotensin II, ROS: reaktive Sauerstoffspezies, AMPK EC KO: Knockout der endothelialen AMPK α1.
[Abbildung mit Ergebnissen aus (22)]

Die endotheliale AMPK α1 wird vor allem dann aktiv, wenn es zu einem negativen Stimulus kommt. In der vorliegenden Studie war es die Fluglärmexposition. Eine alleinige Defizienz führt ohne Exposition zu keiner schädlichen Wirkung auf das Gefäßsystem. Die endotheliale AMPK α1 stellt damit ein Schutzschild dar, welches vor allem in dem Moment aktiv wird, wenn negative externe Einflüsse das Endothel einwirken.

6.3 Ausdauersport - eine effektive Prävention für das kardiovaskuläre System?

Ausdauersport führte in den Endothelzellen zu einer verringerten Apoptose (245), einer Steigerung der Bildung von Vorläuferzellen sowie einer vermehrten Angiogenese (246). Kröller-Schön et al. (21) machten für die verlangsamte Zellseneszenz die AMPK verantwortlich, welche durch Ausdauersport aktiviert wird. Die Deletion der endothelialen AMPK α1 führte bei Fluglärmexposition in der vorliegenden Studie zu einer verstärkten Dysfunktion des Endothels sowie zu einer vermehrten Bildung von oxidativem Stress. Ausdauersport aggravierte die Endotheldysfunktion und die oxidative Stressbildung noch zusätzlich, anstatt diese zu verbessern, wie es in der Wildtypgruppe der Fall war. In diesem Fall war Ausdauersport schädlicher für das Endothel als die Fluglärmexposition für sich allein genommen. Diese Ergebnisse ließen vermuten, dass Ausdauersport auch eine schädliche Wirkung auf das kardiovaskuläre System haben könnte. Auf der anderen Seite bekräftigen die Ergebnisse der „proof of concept“ Studie, dass die endotheliale AMPK α1 eine essentielle Rolle in der Vermittlung der protektiven Effekte von Ausdauersport spielen müsse. In einer Studie von Jansen et al.[7] (23) wurde mithilfe von TekCre Mäusen und einem Knockout die alleinige Wirkung von Ausdauersport bei Deletion der endothelialen AMPK α1 untersucht. Auffällig dabei war, dass bei Deletion der endothelspezifischen AMPK α1 der Ausdauersport zu einer Beeinträchtigung der Endothelfunktion führte ohne jeglichen externen Einfluss (*Abb. 6-5, A*). Bei einem globalen Knockout der AMPK α1 war dies nicht zu finden (21). Da die Produktion von Stickstoffmonoxid einen direkten Zusammenhang mit der Gefäßhomöostase hat (88, 89), wurde zusätzlich die Produktion von NO gemessen (*Abb. 6-5, B*). Der positive Einfluss von Ausdauersport auf die NO-Bildung wurde durch AMPK α1 Deletion aufgehoben. Der NO-Anstieg ließ sich durch das Expressionsverhalten der eNOS erklären (*Abb. 6-5, C*). Der Anstieg der aortalen NO-Konzentration sowie die vermehrte Expression der eNOS lässt sich auf diese Weise direkt mit einer Ausdauersport vermittelten Aktivierung der endothelialen AMPK α1 in Verbindung bringen. Das Verhältnis von NO- und Endothelin-1 Bildung stellt eine wichtige Ursache von vaskulären Pathologien dar (247).

---

[7] Persönliches Mitwirken bei dieser Studie aus dem Labor der molekularen Kardiologie der Universitätsmedizin Mainz

Durch den Knockout der endothelialen AMPK α1 wurde eine vermehrte Bildung von ET-1 festgestellt (146), welches wiederum eine Erklärung für die verstärkte Beeinträchtigung der Endothelfunktion sein kann.

Da auch durch Lärmexposition Endothelin-1 vermehrt gebildet wird (19), ist dies eine mögliche Erklärung der synergistischen, negativen Effekte von Lärm und Ausdauersport auf die Endothelfunktion und auf den systolischen Blutdruck bei endothelialer Deletion der AMPK α1. ET-1 aktiviert nämlich vasokonstriktorische Signalwege (18).

Die ROS-Bildung wurde ebenfalls gemessen (*Abb. 6-5, E*). Die Defizienz der endothelialen AMPK α1 führte dabei mitochondrial und vaskulär zu einer verstärkten Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies. Bei der aortalen ROS-Bildung führte Ausdauersport zusätzlich zu einer Steigerung (23). Dies entsprach den Ergebnissen der vorliegenden Studie, jedoch war der negative Einfluss von Ausdauersport stärker ausgeprägt. Zu beachten ist, dass bei den vorliegenden Ergebnissen Ausdauersport in der Kombination mit Lärmexposition untersucht wurde, die zu einer bekannten Steigerung der ROS-Produktion führt (18, 19). Ein entscheidender Mechanismus bei der vermehrten ROS-Produktion ist die Entkopplung der endothelialen NO-Synthase durch Peroxynitrit (4, 5). Jansen et al. (23) konnten bei Deletion der endothelialen AMPK α1 durch Ausdauersport eine vermehrte entkoppelte eNOS nachweisen, während in Wildtypmäusen die eNOS in einem gekoppelten Zustand blieb. Für die Entkopplung der eNOS durch Peroxynitrit ist eine ROS-Quelle als Initiator notwendig. Eine entscheidende Rolle spielt dabei die Nox-2 (53). Die Expression der Nox-2 in Lungenendothelzellen war in der Wildtypgruppe durch Ausdauersport weniger ausgeprägt. Die Defizienz der endothelialen AMPK α1 führte jedoch zu einem Anstieg der Expression. Ähnliche Befunde fanden sich für die aortale Nox-2 Expression (23) (*Abb. 6-5 D*).

Die mitochondriale Atmungskette ist eine wichtige Quelle für reaktive Sauerstoffspezies (59). Durch Ausdauersport zeigte sich die mitochondriale ROS-Bildung verringert, was sich mit den vorliegenden Ergebnissen deckt. Diese Effekte blieben bei defizienter endothelialer AMPK α1 aus (23). Weiter wurde bei Fehlen der endothelialen AMPK α1 eine verringerte Expression antioxidativer Enzyme festgestellt, was wiederum eine Erklärung für die vermehrte ROS-Produktion darstellt (23).

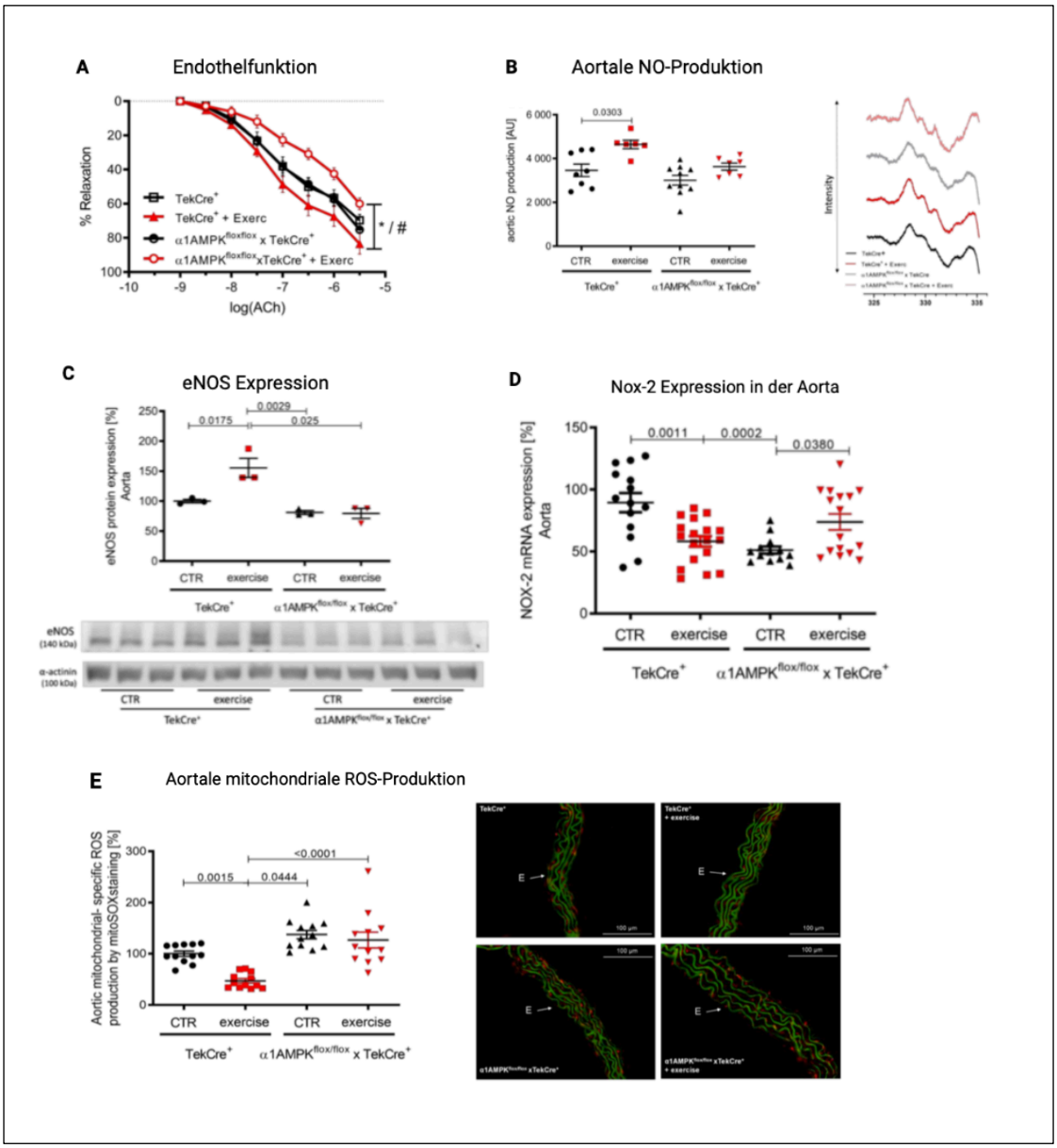

Abbildung 6-5: Auswirkungen der endothelialen Deletion der AMPK α1 auf die Endothelfunktion, NO-Bioverfügbarkeit sowie Bildung von oxidativem Stress

Auswirkungen von Ausdauersport auf die Endothelfunktion (A), die Bildung von NO in der Aorta (B), die Expression der eNOS (C) sowie die aortale mRNA-Expression der Nox-2 (D) in Wildtypmäusen sowie Mäusen mit Defizienz der endothelialen AMPK α1. Gleichermaßen wurde die aortale mitochondriale Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies mittels MitoSOX untersucht. Entsprechende DHE Kryoschnitte (E).).

Als signifikant wurde * $p < 0.05$ vs. TekCre^{+}. # $p < 0.05$ vs. α1AMPK$^{fl/fl}$ x TekCre^{+} + Exercise angesehen. Verwendung von TekCre^{+} Mäusen.

Abkürzungen: ROS: Reaktive Sauerstoffspezies, NO: Stickstoffmonoxid, eNOS: endotheliale NO-Synthase, Nox-2: NADPH-Oxidase 2, CTR: Kontrolle, Exercise: Ausdauersport, H_2O_2: Wasserstoffperoxid, α1AMPK$^{flox/flox}$: endothelialer Knockout der AMPK α1.

[Abbildung mit Ergebnissen aus (23)]

Die Nox-2 spielt eine entscheidende Rolle in Fluglärm-induzierter Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (53), welche wiederum ursächlich für die Entkopplung der endothelialen NO-Synthase sein können (4, 5). Die Integrität der endothelialen AMPK α1 stellt einen essentiellen Schutzmechanismus für das vaskuläre System dar. Der bereits bekannte Anteil der vaskulären AMPK an den protektiven Effekten von Ausdauersport ist größtenteils auf die endotheliale Expression zurückzuführen.

Fehlt diese, aggraviert Ausdauersport die bereits vorhandenen Lärm-induzierten Schäden und verstärkt das bereits vorhandene pro-oxidative Milieu. Das Fehlen der AMPK α1 führt nicht nur zu einem oxidativen Phänotyp (243), der sonst protektiv wirkende Ausdauersport verstärkt diesen sogar. Eine mögliche Erklärung dafür wären fehlende Kompensationsmechanismen. Eine weitere Erklärung, welche in Erwägung gezogen werden könnte, ist die Aktivierung der eNOS durch vermehrte Schubspannung (90), welche während körperlicher Aktivität vorhanden ist (21). Ist diese jedoch aufgrund der Fluglärmexposition entkoppelt und zu einem Superoxidgenerator geworden, würde die vermehrte Schubspannung durch Ausdauersport, die Bildung von Superoxiden auf diese Weise verstärken. Dies würde die negativen synergistischen Effekte von Fluglärmexposition kombiniert mit Ausdauersport bei defizienter AMPK α1 eventuell erklären.

6.4 Methoden

Zum besseren Verständnis der NO-Bioverfügbarkeit als Antwort auf Ausdauersport hätte die aortale NO-Produktion gemessen werden können. Diese wurde jedoch bereits in einer früheren Studie von Jansen et al. (23) bestimmt, welche ebenfalls im Labor der molekularen Kardiologie der Universitätsmedizin Mainz durchgeführt wurde. In der genannten Studie wurde nur die Wirkung von Ausdauersport in Wildtypmäusen und Mäusen mit Defizienz der endothelialen AMPK α1 untersucht.

Zur Überprüfung der These, ob Ausdauersport die Fluglärm-induzierte entkoppelte endotheliale NO-Synthase zusätzlich aktiviert und in einer vermehrten Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies resultiert, wären weitere Untersuchungen nötig. Die Überprüfung, inwieweit die ROS-Bildung auf eine entkoppelte eNOS zurückzuführen sei, könnte mittels DHE-Färbung in Anwesenheit des NOS-Inhibitors L-N^G-nitroarginine-methylester-hydrochloride (L-NAME) an aortalen Kryoschnitten vorgenommen werden.

Zur weiteren Differenzierung, welchen Anteil die beiden Isoformen DDAH-1 und 2 für den Abbau von ADMA im Endothel (133) und damit verbunden Wirkung auf die NO-Bildung haben, wäre die zusätzliche Bestimmung von DDAH-1 aufschlussreich gewesen. Sie hätte weitergehende Einblicke in den ADMA/DDAH-Signalweg sowie die Relevanz beider Isoformen für das Endothel und ihr jeweiliges Verhalten in Bezug auf verschiedene Interventionen bringen können.

Für die Untersuchungen eines näheren Zusammenhangs der AMPK α1 und des FOXO 3 Transkriptionsfaktors hätte die Expression von FOXO3 in der AMPK α1 EC KO Gruppe stattfinden können. Die Bestimmung der FOXO3-Expression wurde nur in der Wildtypgruppe vorgenommen. Ob die protektiv wirkende Aktivierung der endothelialen AMPK α1 unter anderem über die Interaktion mit dem Transkriptionsfaktor FOXO 3 zu erklären sei, bleibt weiterhin unzureichend untersucht. Dies wäre ein interessanter Aspekt, welcher in weiteren Studien detaillierter analysiert werden könnte.

Alle Methoden, die in der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurden, sind im Labor der molekularen Kardiologie bereits seit Jahren etabliert (19-22). MitoSOX/HPLC als Methode zur Messung mitochondrialer ROS-Produktion wurde ebenfalls untersucht und stellte sich als effektive und valide Methode heraus (16).

6.5 Limitationen

Für die Durchführung der Laufexperimente war jedes Tier, welches Ausdauertraining absolvierte, in Einzelhaltung, da jeder Käfig mit einem eigenen Laufrad ausgestattet war. Die Kontrollgruppe befand sich hingegen in Gruppenhaltung. Aufgrund dieser Tatsache unterschieden sich die Lebensbedingungen der Kontroll- sowie der Lärmgruppen von den Interventionsgruppen. Zudem ist bekannt, dass soziale Isolierung ein starker mentaler Stressfaktor ist und einen signifikanten kardiovaskulären Risikofaktor darstellt (248). Dies könnte einen Teil der protektiven Effekte des Ausdauertrainings kompensiert haben.

Ein weiterer Aspekt ist die gelaufene Strecke der Mäuse, welche bei ungefähr fünf Kilometern pro Tag liegt. Dies ist auf die Größe der Maus gesehen eine sehr lange Strecke. Will man die Ergebnisse auf den Menschen übertragen und dabei einen großen Teil der Gesellschaft erreichen, so ist ein Maß an sportlicher Aktivität zu finden, welcher in den Lebensalltag integrierbar ist. Denn jede Strategie ist nur so gut, wie die Gesellschaft sie annimmt.

Zudem sollte beachtet werde, dass jedes Individuum nicht nur einem Umweltstressor isoliert ausgesetzt ist. Neben der Lärmbelastung ist auch die Feinstaubbelastung, vor allem in Städten, ein Risiko für die dort lebende Bevölkerung (242). Das Zusammenspiel von verschiedenen Umweltstressoren für die kardiovaskuläre System und damit einhergehende Gesundheit der Menschen sollte beachtet werden.

Eine weitere Limitation ist das Tierexperiment an sich. Inwieweit die gefundenen Ergebnisse auf den Menschen übertragbar sind, muss in weiterführenden Studien detaillierter ermittelt werden.

Ein zusätzlicher Punkt ist die Anzahl der Versuchstiere. In manchen Experimenten wurden lediglich sechs bis acht Untersuchstiere für die Datenanalyse verwendet. Ein Beispiel dafür sind die Expressionen von ADMA, DDAH-2 und PRMT-1 in der Knockoutgruppe, welche Ausdauersport verübt hat und Fluglärmexposition ausgesetzt war. Dies stellt eine sehr kleine Anzahl dar, was zu einer Beeinträchtigung der Aussagekräftigkeit der Ergebnisse geführt haben kann. Ein Grund dafür ist die Tatsache, dass in der Ausdauergruppe die Tiere eigene Käfige für sich haben mussten, um eine vergleichbare Laufdistanz zu gewährleisten. Einzelkäfige stellen eine logistische Herausforderung in der Tierhaltung dar.

Dennoch liefern die Ergebnisse einen Einblick in die Funktionsweise der endothelialen AMPK α1 als effektive Strategie zur Protektion kardiovaskulärer Schäden.

7 Klinischer Ausblick

Kardiovaskuläre Erkrankungen sowie Umweltstressoren wie Fluglärmexposition haben eine stetig zunehmende Bedeutung für unsere Gesellschaft (33). Da die Altersstruktur in Deutschland sich zunehmend zu einer alternden Bevölkerung wandelt (249), werden chronische Erkrankungen, die häufig das Herz-Kreislauf-System betreffen, eine immer wichtigere Rolle spielen. Die weltweite Mobilität, steigende Bevölkerungszahlen sowie stetiges Wirtschaftswachstum machen Flugverkehr unausweichlich (50). Präventionsstrategien sind daher essentiell. Ausdauersport stellt dabei eine kostengünstige und einfache Präventionsstrategie dar, die an jedes individuelle Fitnessniveau anpassbar ist. Neben der nicht-pharmakologischen Aktivierung der AMPK α1, stellt auch die pharmakologische Stimulation mittels AICAR eine effektive Strategie dar (159). Eine Möglichkeit wäre daher die kombinierte Aktivierung der AMPK mittels Ausdauertrainings sowie Pharmakotherapie. Vorwiegend hilfreich wäre dies für Patientinnen und Patienten, welche bereits an kardiovaskulären Vorerkrankungen leiden (45).

Zudem könnte die pharmakologische Aktivierung die Effekte von Ausdauersport, welche AMPK vermittelt sind, simulieren. Die AMPK α1 stellt daher ein effektives Ziel für Therapiestrategien zur Modulation des persönlichen kardiovaskulären Risikos dar.

Außerdem könnte bei individualisierten Präventionsstrategien die Untersuchung auf die individuelle Ausprägung der endothelialen AMPK α1 eine entscheidende Rolle spielen (23). Vorwiegend sollte dabei der Fokus auf Menschen gelegt werden, welche in unmittelbarer Nähe von Flughäfen oder anderen Lärmquellen wohnen, und darüber hinaus ein erhöhtes kardiovaskuläres Risikoprofil aufweisen. Diese sind durch die Lärmexposition zusätzlich gefährdet.
In der klinischen Praxis sollten Patientinnen und Patienten generell über die Gefahr von Fluglärmexposition für das Herz-Kreislauf-System und ihre Gesundheit aufgeklärt werden. Das Finden von individualisierten Präventionsstrategien sowie die Verbesserung des kardiovaskulären Risikoprofils sollten ein fester Bestandteil von Therapiekonzepten in der Behandlung von kardiovaskulären Erkrankungen werden. Die individuellen Interessen der Patientinnen und Patienten sollten dabei immer gewährleistet sein. Die generelle Übertragbarkeit auf den Menschen müsste zukünftig in klinischen prospektiven Studien näher untersucht werden.

8 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit konnten die bereits bekannten negativen Einflüsse von Fluglärmexposition auf das Gefäßsystem mithilfe einer Mausstudie validiert werden (3, 18, 19). Im Mittelpunkt standen dabei der Einfluss von Fluglärm auf die endotheliale Funktion, die Bildung von oxidativem Stress sowie den ADMA-Signalweg. Die Ergebnisse unterstreichen erneut die entscheidende Relevanz von Umweltstressoren wie Fluglärm für das Herz-Kreislauf-System.

Ausdauersport zeigte sich als effektive Präventionsstrategie gegen Fluglärm-induzierte Gefäßschäden. Diese Art von Prävention war in der Lage, trotz Fluglärmexposition signifikant die Bildung von oxidativem Stress zu verhindern, die Endothelfunktion zu erhalten und die AMDA-Konzentrationen zu normalisieren.

Im Fokus lag dabei die mechanistische Wirkweise der endothelialen AMPK α1 als Vermittler der positiven Effekte von Ausdauersport. Mit den hier präsentierten Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass die bereits bekannten Effekte der vaskulären AMPK, die durch Ausdauersport aktiviert wurde (21), auch im Zusammenspiel mit einer Fluglärmexposition durch die endotheliale Form der AMPK α1 vermittelt sind. Bei Deletion der endothelialen AMPK α1 blieben die protektiven Effekte von Ausdauersport vollständig aus.

Bei defizienter endothelialer AMPK α1 führte Ausdauersport zu einer Aggravation der bereits bestehenden Fluglärm-induzierten Gefäßschäden. Dies macht eine außerordentliche Schlüsselrolle der endothelialen AMPK α1 für die Redox-Homöostase der Endothelzellen deutlich. Die endotheliale AMPK α1 wird vor allem dann aktiv, wenn negative pro-oxidative Stimuli auf das Endothel einwirken. Sie hat damit eine Schutzschildfunktion für die Aufrechterhaltung der Zellhomöostase bei Einfluss von pro-oxidativen Einflüssen, wie es eine Fluglärmexposition darstellt.

Gerade Patientinnen und Patienten, welche an kardiovaskulären Vorerkrankungen leiden, sollten über die schädliche Wirkung von Fluglärmexposition aufgeklärt werden. Außerdem sollte vor allem Menschen mit einem erhöhten kardiovaskulären Risikoprofil supervisiertes Ausdauertraining angeboten werden: als Präventions- und Therapiestrategie bei kardiovaskulären Erkrankungen und zum Schutz vor Fluglärm-induzierten Gefäßschäden.

9 Literaturverzeichnis

1. Popper K. Logik der Forschung, 11. Auflage. Mohr Siebeck: Tübingen 2005. ISBN 3-16-148111-9.
2. Qiagen Sample and Assay Technologies, Taq PCR Handbook: For standard and specialized PCR applications with minimal optimization [Internet]. 2010 Available from: https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=c73208eb-a83e-40c4-a9b6-ea5c4c94b9f4&lang=en.
3. Munzel T, Gori T, Babisch W, Basner M. Cardiovascular effects of environmental noise exposure. Eur Heart J. 2014;35(13):829-36.
4. Daiber A, Munzel T. Pentaerythrityltetranitrat: Oxidativer Stress, Redoxregulation und NO-Bioverfügbarkeit - experimentelle und klinische Aspekte. Darmstadt: Steinkopf Verlag; 2006, ISBN 3-7985-1605-7.
5. Schulz E, Wenzel P, Munzel T, Daiber A. Mitochondrial redox signaling: Interaction of mitochondrial reactive oxygen species with other sources of oxidative stress. Antioxid Redox Signal. 2014;20(2):308-24.
6. Freissmuth M., Offermanns S., Böhm S. Pharmakologie und Toxikologie, Von den molekularen Grundlagen zur Pharmakotherapie Berlin, Heidelberg: Springer; 2020, ISBN 978-3-662-46688-9.
7. Knowles RG, Moncada S. Nitric oxide synthases in mammals. Biochem J. 1994;298 (Pt 2):249-58.
8. Bassenge E, Schneider HT, Daiber A. [Oxidative stress and cardiovascular diseases]. Dtsch Med Wochenschr. 2005;130(50):2904-9.
9. Sandri M, Mangner N, Adams V, Schuler G, Gielen St. Das vaskuläre Endothel als Zielorgan körperlicher Aktivität Journal für Kardiologie - Austrian Journal of Cardiolog. 2009(16):280-3.
10. Boger RH. The emerging role of asymmetric dimethylarginine as a novel cardiovascular risk factor. Cardiovasc Res. 2003;59(4):824-33.
11. Jansen T, Kvandova M, Daiber A, Stamm P, Frenis K, Schulz E, et al. The AMP-Activated Protein Kinase Plays a Role in Antioxidant Defense and Regulation of Vascular Inflammation. Antioxidants (Basel). 2020;9(6).
12. Hardie DG. AMPK--sensing energy while talking to other signaling pathways. Cell Metab. 2014;20(6):939-52.
13. Hardie DG. Keeping the home fires burning: AMP-activated protein kinase. J R Soc Interface. 2018;15(138).
14. Heinrich PC., Müller M., Graeve L. Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie. 9 ed. Heidelberg Springer; 2014, ISBN 13 978-3-642-17971-6.
15. Villaverde A, Netherton J, Baker MA. From Past to Present: The Link Between Reactive Oxygen Species in Sperm and Male Infertility. Antioxidants (Basel). 2019;8(12).
16. Kalinovic S, Oelze M, Kroller-Schon S, Steven S, Vujacic-Mirski K, Kvandova M, et al. Comparison of Mitochondrial Superoxide Detection Ex Vivo/In Vivo by mitoSOX HPLC Method with Classical Assays in Three Different Animal Models of Oxidative Stress. Antioxidants (Basel). 2019;8(11).
17. Eppendorf AG: Userguide: Erstellung einer Standardkurve für einen kolorimetrischen Assay am Eppendorf BioSpectrometer® basic und Eppendorf BioSpectrometer® kinetic [Internet]. 2011. Available from: https://www.eppendorf.com/product-media/doc/de/159776_Userguide/Eppendorf_Detection_Userguide_040_BioSpectrometer-basic_kinetic_Generationstandard-curvecolorimetric-assay-Eppendorf-BioSpectrometer-basic-Eppendorf-BioSpectrometer-kinetic.pdf.
18. Munzel T, Schmidt FP, Steven S, Herzog J, Daiber A, Sorensen M. Environmental Noise and the Cardiovascular System. J Am Coll Cardiol. 2018;71(6):688-97.
19. Munzel T, Daiber A, Steven S, Tran LP, Ullmann E, Kossmann S, et al. Effects of noise on vascular function, oxidative stress, and inflammation: mechanistic insight from studies in mice. Eur Heart J. 2017;38(37):2838-49.
20. Frenis K, Kalinovic S, Ernst BP, Kvandova M, Al Zuabi A, Kuntic M, et al. Long-Term Effects of Aircraft Noise Exposure on Vascular Oxidative Stress, Endothelial Function and Blood Pressure: No Evidence for Adaptation or Tolerance Development. Front Mol Biosci. 2021;8:814921.
21. Kroller-Schon S, Jansen T, Hauptmann F, Schuler A, Heeren T, Hausding M, et al. alpha1AMP-activated protein kinase mediates vascular protective effects of exercise. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2012;32(7):1632-41.

22. Kroller-Schon S, Jansen T, Tran TLP, Kvandova M, Kalinovic S, Oelze M, et al. Endothelial alpha1AMPK modulates angiotensin II-mediated vascular inflammation and dysfunction. Basic Res Cardiol. 2019;114(2):8.
23. Jansen T, Kvandova M, Schmal I, Kalinovic S, Stamm P, Kuntic M, et al. Lack of Endothelial alpha1AMPK Reverses the Vascular Protective Effects of Exercise by Causing eNOS Uncoupling. Antioxidants (Basel). 2021;10(12).
24. Alles bebt. Der Spiegel 12/1968 https://www.spiegel.de/kultur/alles-bebt-a-a2ecce18-0002-0001-0000-000046106751.
25. Eriksson C, Pershagen G., Nilsson M. Biological mechanisms related to cardiovascular and metabolic effects by environmental noise. World Health Organization 2018; https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/346548/WHO-EURO-2018-3009-42767-59666-eng.pdf?sequence=3&isAllowed=y.
26. Schmidt FP, Basner M, Kroger G, Weck S, Schnorbus B, Muttray A, et al. Effect of nighttime aircraft noise exposure on endothelial function and stress hormone release in healthy adults. Eur Heart J. 2013;34(45):3508-14a.
27. Fritschi L, Brown A, Rokho K, Schwela D, Kephalopoulos S. Burden of disease from environmental noise- Quantification of healthy life years lost in Europe World Health Organization 2011, ISBN 978 92 890 0229 5 https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/326424/9789289002295-eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y.
28. Lim SS, Vos T, Flaxman AD, Danaei G, Shibuya K, Adair-Rohani H, et al. A comparative risk assessment of burden of disease and injury attributable to 67 risk factors and risk factor clusters in 21 regions, 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. Lancet. 2012;380(9859):2224-60.
29. Statistisches Bundesamt (Destatis). Statistisches Jahrbuch Deutschland und Internationales.2019, ISBN 978-3-8246-1086-0.
30. Erdmann E. Klinische Kardiologie: Krankheiten des Herzens, des Kreislaufs und der herznahen Gefäße. Heidelberg Springer Medizin Verlag; 2011, ISBN 978-3-642-16480-4.
31. American Heart Association (ACC/AHA). Guidance for Preventing Heart Disease, Stroke Released. 1-800-AHA-USA1 (242-8721) 2019. https://newsroom.heart.org/news/accaha-guidance-for-preventing-heart-disease-stroke-released.
32. Schuhmacher S, Foretz M, Knorr M, Jansen T, Hortmann M, Wenzel P, et al. alpha1AMP-activated protein kinase preserves endothelial function during chronic angiotensin II treatment by limiting Nox2 upregulation. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2011;31(3):560-6.
33. Munzel T, Hahad O, Sorensen M, Lelieveld J, Duerr GD, Nieuwenhuijsen M, et al. Environmental risk factors and cardiovascular diseases: a comprehensive review. Cardiovasc Res. 2021.
34. Hahad O, Kröller-Schön S, Daiber A, Münzel T. The cardiovascular effects of noise. Dtsch Arztebl Int 2019:116: 245–50.
35. Munzel T, Kroller-Schon S, Oelze M, Gori T, Schmidt FP, Steven S, et al. Adverse Cardiovascular Effects of Traffic Noise with a Focus on Nighttime Noise and the New WHO Noise Guidelines. Annu Rev Public Health. 2020;41:309-28.
36. Babisch W. Cardiovascular effects of noise. Noise Health. 2011;13(52):201-4.
37. Vienneau D, Schindler C, Perez L, Probst-Hensch N, Roosli M. The relationship between transportation noise exposure and ischemic heart disease: a meta-analysis. Environ Res. 2015;138:372-80.
38. Miedema HM, Oudshoorn CG. Annoyance from transportation noise: relationships with exposure metrics DNL and DENL and their confidence intervals. Environ Health Perspect. 2001;109(4):409-16.
39. Hahad O, Beutel M, Michal M, Schulz A, Pfeiffer N, Gianicolo E, et al. [Noise annoyance in the German general population : Prevalence and determinants in the Gutenberg Health Study]. Herz. 2022;47(3):265-79.
40. Jarup L, Babisch W, Houthuijs D, Pershagen G, Katsouyanni K, Cadum E, et al. Hypertension and exposure to noise near airports: the HYENA study. Environ Health Perspect. 2008;116(3):329-33.
41. Hansell AL, Blangiardo M, Fortunato L, Floud S, de Hoogh K, Fecht D, et al. Aircraft noise and cardiovascular disease near Heathrow airport in London: small area study. BMJ. 2013;347:f5432.
42. Munzel T, Miller MR, Sorensen M, Lelieveld J, Daiber A, Rajagopalan S. Reduction of environmental pollutants for prevention of cardiovascular disease: it's time to act. Eur Heart J. 2020;41(41):3989-97.

43. Babisch W, Fromme H, Beyer A, Ising H. Increased catecholamine levels in urine in subjects exposed to road traffic noise: the role of stress hormones in noise research. Environ Int. 2001;26(7-8):475-81.
44. Selander J, Bluhm G, Theorell T, Pershagen G, Babisch W, Seiffert I, et al. Saliva cortisol and exposure to aircraft noise in six European countries. Environ Health Perspect. 2009;117(11):1713-7.
45. Schmidt F, Kolle K, Kreuder K, Schnorbus B, Wild P, Hechtner M, et al. Nighttime aircraft noise impairs endothelial function and increases blood pressure in patients with or at high risk for coronary artery disease. Clin Res Cardiol. 2015;104(1):23-30.
46. Babisch W. Updated exposure-response relationship between road traffic noise and coronary heart diseases: a meta-analysis. Noise Health. 2014;16(68):1-9.
47. Osborne MT, Radfar A, Hassan MZO, Abohashem S, Oberfeld B, Patrich T, et al. A neurobiological mechanism linking transportation noise to cardiovascular disease in humans. Eur Heart J. 2020;41(6):772-82.
48. Wu CC, Chen SJ, Yen MH. Effects of noise on blood pressure and vascular reactivities. Clin Exp Pharmacol Physiol. 1992;19(12):833-8.
49. Turner JG, Parrish JL, Hughes LF, Toth LA, Caspary DM. Hearing in laboratory animals: strain differences and nonauditory effects of noise. Comp Med. 2005;55(1):12-23.
50. Munzel T, Sorensen M, Schmidt F, Schmidt E, Steven S, Kroller-Schon S, et al. The Adverse Effects of Environmental Noise Exposure on Oxidative Stress and Cardiovascular Risk. Antioxid Redox Signal. 2018;28(9):873-908.
51. Basner M, Muller U, Elmenhorst EM. Single and combined effects of air, road, and rail traffic noise on sleep and recuperation. Sleep. 2011;34(1):11-23.
52. Carreras A, Zhang SX, Peris E, Qiao Z, Gileles-Hillel A, Li RC, et al. Chronic sleep fragmentation induces endothelial dysfunction and structural vascular changes in mice. Sleep. 2014;37(11):1817-24.
53. Kroller-Schon S, Daiber A, Steven S, Oelze M, Frenis K, Kalinovic S, et al. Crucial role for Nox2 and sleep deprivation in aircraft noise-induced vascular and cerebral oxidative stress, inflammation, and gene regulation. Eur Heart J. 2018;39(38):3528-39.
54. Amir O, Alroy S, Schliamser JE, Asmir I, Shiran A, Flugelman MY, et al. Brachial artery endothelial function in residents and fellows working night shifts. Am J Cardiol. 2004;93(7):947-9.
55. Takase B, Akima T, Uehata A, Ohsuzu F, Kurita A. Effect of chronic stress and sleep deprivation on both flow-mediated dilation in the brachial artery and the intracellular magnesium level in humans. Clin Cardiol. 2004;27(4):223-7.
56. Chien KL, Chen PC, Hsu HC, Su TC, Sung FC, Chen MF, et al. Habitual sleep duration and insomnia and the risk of cardiovascular events and all-cause death: report from a community-based cohort. Sleep. 2010;33(2):177-84.
57. Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. Exp Physiol. 1997;82(2):291-5.
58. Daiber A. Redox signaling (cross-talk) from and to mitochondria involves mitochondrial pores and reactive oxygen species. Biochim Biophys Acta. 2010;1797(6-7):897-906.
59. Sies H, Berndt C, Jones DP. Oxidative Stress. Annu Rev Biochem. 2017;86:715-48.
60. Lander HM, Sehajpal PK, Novogrodsky A. Nitric oxide signaling: a possible role for G proteins. J Immunol. 1993;151(12):7182-7.
61. Daiber A, Frein D, Namgaladze D, Ullrich V. Oxidation and nitrosation in the nitrogen monoxide/superoxide system. J Biol Chem. 2002;277(14):11882-8.
62. Annuk M, Zilmer M, Fellstrom B. Endothelium-dependent vasodilation and oxidative stress in chronic renal failure: impact on cardiovascular disease. Kidney Int Suppl. 2003(84):S50-3.
63. Robert-Koch-Institut. Oxidativer Stress und Möglichkeiten seiner Messung aus umweltmedizinischer Sicht. Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz. 2008;51(12):1464-82.
64. Daiber A., Ullrich V. Radikalchemie im Organismus: Stickstoffmonoxid, Superoxid und Peroxynitrit. Chemie in unserer Zeit 2002;6:366-75.
65. Bedard K, Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. Physiol Rev. 2007;87(1):245-313.
66. Eijkelenboom A, Burgering BM. FOXOs: signalling integrators for homeostasis maintenance. Nat Rev Mol Cell Biol. 2013;14(2):83-97.
67. Zhao Y, Liu YS. Longevity Factor FOXO3: A Key Regulator in Aging-Related Vascular Diseases. Front Cardiovasc Med. 2021;8:778674.
68. Martins R, Lithgow GJ, Link W. Long live FOXO: unraveling the role of FOXO proteins in aging and longevity. Aging Cell. 2016;15(2):196-207.

69. Kops GJ, Dansen TB, Polderman PE, Saarloos I, Wirtz KW, Coffer PJ, et al. Forkhead transcription factor FOXO3a protects quiescent cells from oxidative stress. Nature. 2002;419(6904):316-21.
70. Tsuchiya K, Westerterp M, Murphy AJ, Subramanian V, Ferrante AW, Jr., Tall AR, et al. Expanded granulocyte/monocyte compartment in myeloid-specific triple FoxO knockout increases oxidative stress and accelerates atherosclerosis in mice. Circ Res. 2013;112(7):992-1003.
71. Daiber A, Daub S, Bachschmid M, Schildknecht S, Oelze M, Steven S, et al. Protein tyrosine nitration and thiol oxidation by peroxynitrite-strategies to prevent these oxidative modifications. Int J Mol Sci. 2013;14(4):7542-70.
72. Breitenbach M, Rinnerthaler M, Weber M, Breitenbach-Koller H, Karl T, Cullen P, et al. The defense and signaling role of NADPH oxidases in eukaryotic cells : Review. Wien Med Wochenschr. 2018;168(11-12):286-99.
73. Brandes RP, Weissmann N, Schroder K. Nox family NADPH oxidases: Molecular mechanisms of activation. Free Radic Biol Med. 2014;76:208-26.
74. Zhang J, Wang Y, Liu X, Dagda RK, Zhang Y. How AMPK and PKA Interplay to Regulate Mitochondrial Function and Survival in Models of Ischemia and Diabetes. Oxid Med Cell Longev. 2017;2017:4353510.
75. Vakifahmetoglu-Norberg H, Ouchida AT, Norberg E. The role of mitochondria in metabolism and cell death. Biochem Biophys Res Commun. 2017;482(3):426-31.
76. Daiber A, Oelze M, Sulyok S, Coldewey M, Schulz E, Treiber N, et al. 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):579-88.
77. Schmidt R LF, Heckmann M Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie Springer. 2010:600-7.
78. Favero G, Paganelli C, Buffoli B, Rodella LF, Rezzani R. Endothelium and its alterations in cardiovascular diseases: life style intervention. Biomed Res Int. 2014;2014:801896.
79. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. Nature. 1980;288(5789):373-6.
80. Cherry PD, Furchgott RF, Zawadzki JV, Jothianandan D. Role of endothelial cells in relaxation of isolated arteries by bradykinin. Proc Natl Acad Sci U S A. 1982;79(6):2106-10.
81. Aktories K., Förstermann U., Hofmann FB., K. S. Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. 12 ed. München: Elsevier GmbH München; 2017 ISBN: 978-3-437-42525-7.
82. Napoli C, de Nigris F, Williams-Ignarro S, Pignalosa O, Sica V, Ignarro LJ. Nitric oxide and atherosclerosis: an update. Nitric Oxide. 2006;15(4):265-79.
83. 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):9265-9.
84. 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.
85. Herrmann P, Mauer D. Nobelpreis Medizin 1998 NO-„Dynamit“ in den Gefäßen. Notfall & Rettungsmedizin Springer-Verlag 1998;1(5):324-6.
86. Brixius K, Bloch W. Physiologie des Gefäßsystems In: Debus, E., Gross-Fengels, W.:Operative und interventionelle Gefäßmedizin. Berlin, Heidelberg: Springer; 2020, eBook ISBN 978-3-662-53380-2.
87. Perticone F, Ceravolo R, Pujia A, Ventura G, Iacopino S, Scozzafava A, et al. Prognostic significance of endothelial dysfunction in hypertensive patients. Circulation. 2001;104(2):191-6.
88. Daiber A, Xia N, Steven S, Oelze M, Hanf A, Kroller-Schon S, et al. New Therapeutic Implications of Endothelial Nitric Oxide Synthase (eNOS) Function/Dysfunction in Cardiovascular Disease. Int J Mol Sci. 2019;20(1).
89. Quaschning T, Ruschitzka F, Maier W, al. e. Die Rolle des Endothels bei der Entstehung und Behandlung von Gefäßerkrankungen. Internist 41. 2000:355-62.
90. 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):601-5.
91. 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):27383-8.
92. Schmidt R, Lang F, Heckmann M. Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie. Heidelberg: Springer Medizin Verlag; 2010, ISBN 978-3-642-01650-9.
93. Forstermann U, Sessa WC. Nitric oxide synthases: regulation and function. Eur Heart J. 2012;33(7):829-37, 37a-37d.

94. Moore JP, Weber M, Searles CD. Laminar shear stress modulates phosphorylation and localization of RNA polymerase II on the endothelial nitric oxide synthase gene. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2010;30(3):561-7.
95. Forstermann U, Kleinert H. Nitric oxide synthase: expression and expressional control of the three isoforms. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 1995;352(4):351-64.
96. Karbach S, Wenzel P, Waisman A, Munzel T, Daiber A. eNOS uncoupling in cardiovascular diseases--the role of oxidative stress and inflammation. Curr Pharm Des. 2014;20(22):3579-94.
97. Landmesser U, Dikalov S, Price SR, McCann L, Fukai T, Holland SM, et al. Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension. J Clin Invest. 2003;111(8):1201-9.
98. Zou MH, Shi C, Cohen RA. Oxidation of the zinc-thiolate complex and uncoupling of endothelial nitric oxide synthase by peroxynitrite. J Clin Invest. 2002;109(6):817-26.
99. Loot AE, Schreiber JG, Fisslthaler B, Fleming I. Angiotensin II impairs endothelial function via tyrosine phosphorylation of the endothelial nitric oxide synthase. J Exp Med. 2009;206(13):2889-96.
100. Lin MI, Fulton D, Babbitt R, Fleming I, Busse R, Pritchard KA, Jr., et al. Phosphorylation of threonine 497 in endothelial nitric-oxide synthase coordinates the coupling of L-arginine metabolism to efficient nitric oxide production. J Biol Chem. 2003;278(45):44719-26.
101. Fleming I, Fisslthaler B, Dimmeler S, Kemp BE, Busse R. Phosphorylation of Thr(495) regulates Ca(2+)/calmodulin-dependent endothelial nitric oxide synthase activity. Circ Res. 2001;88(11):E68-75.
102. Sydow K, Munzel T. ADMA and oxidative stress. Atheroscler Suppl. 2003;4(4):41-51.
103. Brandes RP, Fleming I, Busse R. Endothelial aging. Cardiovasc Res. 2005;66(2):286-94.
104. Gallo G, Volpe M, Savoia C. Endothelial Dysfunction in Hypertension: Current Concepts and Clinical Implications. Front Med (Lausanne). 2022;8:798958.
105. Investigators E. Effect of nifedipine and cerivastatin on coronary endothelial function in patients with coronary artery disease: the ENCORE I Study (Evaluation of Nifedipine and Cerivastatin On Recovery of coronary Endothelial function). Circulation. 2003;107(3):422-8.
106. Zeiher AM, Drexler H, Wollschlager H, Just H. Endothelial dysfunction of the coronary microvasculature is associated with coronary blood flow regulation in patients with early atherosclerosis. Circulation. 1991;84(5):1984-92.
107. Weber M, Lauer N, Mulsch A, Kojda G. The effect of peroxynitrite on the catalytic activity of soluble guanylyl cyclase. Free Radic Biol Med. 2001;31(11):1360-7.
108. Mulsch A, Oelze M, Kloss S, Mollnau H, Topfer A, Smolenski A, et al. Effects of in vivo nitroglycerin treatment on activity and expression of the guanylyl cyclase and cGMP-dependent protein kinase and their downstream target vasodilator-stimulated phosphoprotein in aorta. Circulation. 2001;103(17):2188-94.
109. Hansson GK, Hermansson A. The immune system in atherosclerosis. Nat Immunol. 2011;12(3):204-12.
110. Ference BA, Ginsberg HN, Graham I, Ray KK, Packard CJ, Bruckert E, et al. Low-density lipoproteins cause atherosclerotic cardiovascular disease. 1. Evidence from genetic, epidemiologic, and clinical studies. A consensus statement from the European Atherosclerosis Society Consensus Panel. Eur Heart J. 2017;38(32):2459-72.
111. Li C, Cai C, Zheng X, Sun J, Ye L. Orientin suppresses oxidized low-density lipoproteins induced inflammation and oxidative stress of macrophages in atherosclerosis. Biosci Biotechnol Biochem. 2020;84(4):774-9.
112. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. Nature. 2002;420(6917):868-74.
113. Libby P, Theroux P. Pathophysiology of coronary artery disease. Circulation. 2005;111(25):3481-8.
114. Plane F, Bruckdorfer KR, Kerr P, Steuer A, Jacobs M. Oxidative modification of low-density lipoproteins and the inhibition of relaxations mediated by endothelium-derived nitric oxide in rabbit aorta. Br J Pharmacol. 1992;105(1):216-22.
115. Deutsche Gesellschaft für Kardiologie – Herz-und Kreislaufforschung e.V. (2019)/Deutsche Hochdruckliga e.V. ESC/ESH Pocket Guidelines. Management der arteriellen Hypertonie, Version 2018. Kurzfassung der „2018 ESC/ESH Guidelines on the management of arterial hypertension“ European Heart Journal 2018. Grünwald: Börm Bruckmeier Verlag; 2018, ISBN 978-3-89862-986-7. Available from: https://leitlinien.dgk.org/files/28_2018_pocket_leitlinien_arterielle_hypertonie_aktualisiert.pdf.
116. Furger P. SURFMed: Guidelines Allgemeine Innere Medizin. Neuhausen am Rheinfall (Schweiz): Editions D&F GmbH 2021 ISBN 978-3-905699-48-7.
117. Mollnau H, Wendt M, Szocs K, Lassegue B, Schulz E, Oelze M, et al. 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.

118. Schuhmacher S, Wenzel P, Schulz E, Oelze M, Mang C, Kamuf J, et al. Pentaerythritol tetranitrate improves angiotensin II-induced vascular dysfunction via induction of heme oxygenase-1. Hypertension. 2010;55(4):897-904.
119. Paluch AE, Bajpai S, Bassett DR, Carnethon MR, Ekelund U, Evenson KR, et al. Daily steps and all-cause mortality: a meta-analysis of 15 international cohorts. Lancet Public Health. 2022;7(3):e219-e28.
120. Ashton RE, Tew GA, Aning JJ, Gilbert SE, Lewis L, Saxton JM. Effects of short-term, medium-term and long-term resistance exercise training on cardiometabolic health outcomes in adults: systematic review with meta-analysis. Br J Sports Med. 2020;54(6):341-8.
121. Ghadieh AS, Saab B. Evidence for exercise training in the management of hypertension in adults. Can Fam Physician. 2015;61(3):233-9.
122. Ali A, Tabassum D, Baig SS, Moyle B, Redgrave J, Nichols S, et al. Effect of Exercise Interventions on Health-Related Quality of Life After Stroke and Transient Ischemic Attack: A Systematic Review and Meta-Analysis. Stroke. 2021;52(7):2445-55.
123. Deutsche Gesellschaft für Kardiologie – Herz-und Kreislaufforschung e.V. (2021). ESC/ESH Pocket Guidelines. Prävention von Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Version 2021. Kurzfassung der „2021 ESC Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice“ European Heart Journal 2021. Grünwald: Börm Bruckmeier Verlag; 2021, ISBN: 978-3-89862-334-6. Available from: https://leitlinien.dgk.org/files/03_pocket_leitlinien_praevention_aktualisiert.pdf.
124. Boger RH. When the endothelium cannot say 'NO' anymore. ADMA, an endogenous inhibitor of NO synthase, promotes cardiovascular disease. Eur Heart J. 2003;24(21):1901-2.
125. Vallance P, Leone A, Calver A, Collier J, Moncada S. Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. Lancet. 1992;339(8793):572-5.
126. Kajimoto H, Kai H, Aoki H, Yasuoka S, Anegawa T, Aoki Y, et al. Inhibition of eNOS phosphorylation mediates endothelial dysfunction in renal failure: new effect of asymmetric dimethylarginine. Kidney Int. 2012;81(8):762-8.
127. Boger RH. Asymmetric dimethylarginine (ADMA): a novel risk marker in cardiovascular medicine and beyond. Ann Med. 2006;38(2):126-36.
128. Schnabel R, Blankenberg S, Lubos E, Lackner KJ, Rupprecht HJ, Espinola-Klein C, et al. Asymmetric dimethylarginine and the risk of cardiovascular events and death in patients with coronary artery disease: results from the AtheroGene Study. Circ Res. 2005;97(5):e53-9.
129. Miyazaki H, Matsuoka H, Cooke JP, Usui M, Ueda S, Okuda S, et al. Endogenous nitric oxide synthase inhibitor: a novel marker of atherosclerosis. Circulation. 1999;99(9):1141-6.
130. Surdacki A, Nowicki M, Sandmann J, Tsikas D, Boeger RH, Bode-Boeger SM, et al. Reduced urinary excretion of nitric oxide metabolites and increased plasma levels of asymmetric dimethylarginine in men with essential hypertension. J Cardiovasc Pharmacol. 1999;33(4):652-8.
131. Lu TM, Ding YA, Lin SJ, Lee WS, Tai HC. Plasma levels of asymmetrical dimethylarginine and adverse cardiovascular events after percutaneous coronary intervention. Eur Heart J. 2003;24(21):1912-9.
132. Xuan C, Xu LQ, Tian QW, Li H, Wang Q, He GW, et al. Dimethylarginine Dimethylaminohydrolase 2 (DDAH 2) Gene Polymorphism, Asymmetric Dimethylarginine (ADMA) Concentrations, and Risk of Coronary Artery Disease: A Case-Control Study. Sci Rep. 2016;6:33934.
133. Pope AJ, Karuppiah K, Cardounel AJ. Role of the PRMT-DDAH-ADMA axis in the regulation of endothelial nitric oxide production. Pharmacol Res. 2009;60(6):461-5.
134. Wang D, Gill PS, Chabrashvili T, Onozato ML, Raggio J, Mendonca M, et al. Isoform-specific regulation by N(G),N(G)-dimethylarginine dimethylaminohydrolase of rat serum asymmetric dimethylarginine and vascular endothelium-derived relaxing factor/NO. Circ Res. 2007;101(6):627-35.
135. Shirwany NA, Zou MH. AMPK in cardiovascular health and disease. Acta Pharmacol Sin. 2010;31(9):1075-84.
136. 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):3473-80.
137. 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):159-67.
138. 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):31000-6.
139. Nagata D, Takeda R, Sata M, Satonaka H, Suzuki E, Nagano T, et al. AMP-activated protein kinase inhibits angiotensin II-stimulated vascular smooth muscle cell proliferation. Circulation. 2004;110(4):444-51.

140. Beg ZH, Allmann DW, Gibson DM. Modulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity with cAMP and wth protein fractions of rat liver cytosol. Biochem Biophys Res Commun. 1973;54(4):1362-9.
141. Carlson CA, Kim KH. Regulation of hepatic acetyl coenzyme A carboxylase by phosphorylation and dephosphorylation. J Biol Chem. 1973;248(1):378-80.
142. Steinberg GR, Kemp BE. AMPK in Health and Disease. Physiol Rev. 2009;89(3):1025-78.
143. Munday MR, Campbell DG, Carling D, Hardie DG. Identification by amino acid sequencing of three major regulatory phosphorylation sites on rat acetyl-CoA carboxylase. Eur J Biochem. 1988;175(2):331-8.
144. 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(1-2):129-36.
145. Chen ZP, Mitchelhill KI, Michell BJ, Stapleton D, Rodriguez-Crespo I, Witters LA, et al. AMP-activated protein kinase phosphorylation of endothelial NO synthase. FEBS Lett. 1999;443(3):285-9.
146. Viollet B, Horman S, Leclerc J, Lantier L, Foretz M, Billaud M, et al. AMPK inhibition in health and disease. Crit Rev Biochem Mol Biol. 2010;45(4):276-95.
147. Hardie DG, Hawley SA, Scott JW. AMP-activated protein kinase--development of the energy sensor concept. J Physiol. 2006;574(Pt 1):7-15.
148. 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):558-65.
149. Huang HC, Nguyen T, Pickett CB. Phosphorylation of Nrf2 at Ser-40 by protein kinase C regulates antioxidant response element-mediated transcription. J Biol Chem. 2002;277(45):42769-74.
150. Cullinan SB, Diehl JA. PERK-dependent activation of Nrf2 contributes to redox homeostasis and cell survival following endoplasmic reticulum stress. J Biol Chem. 2004;279(19):20108-17.
151. Joo MS, Kim WD, Lee KY, Kim JH, Koo JH, Kim SG. AMPK Facilitates Nuclear Accumulation of Nrf2 by Phosphorylating at Serine 550. Mol Cell Biol. 2016;36(14):1931-42.
152. Mungai PT, Waypa GB, Jairaman A, Prakriya M, Dokic D, Ball MK, et al. Hypoxia triggers AMPK activation through reactive oxygen species-mediated activation of calcium release-activated calcium channels. Mol Cell Biol. 2011;31(17):3531-45.
153. Auciello FR, Ross FA, Ikematsu N, Hardie DG. Oxidative stress activates AMPK in cultured cells primarily by increasing cellular AMP and/or ADP. FEBS Lett. 2014;588(18):3361-6.
154. Ren Y, Shen HM. Critical role of AMPK in redox regulation under glucose starvation. Redox Biol. 2019;25:101154.
155. Wang S, Song P, Zou MH. AMP-activated protein kinase, stress responses and cardiovascular diseases. Clin Sci (Lond). 2012;122(12):555-73.
156. Zou MH, Wu Y. AMP-activated protein kinase activation as a strategy for protecting vascular endothelial function. Clin Exp Pharmacol Physiol. 2008;35(5-6):535-45.
157. Chen Z, Peng IC, Sun W, Su MI, Hsu PH, Fu Y, et al. AMP-activated protein kinase functionally phosphorylates endothelial nitric oxide synthase Ser633. Circ Res. 2009;104(4):496-505.
158. Wang S, Xu J, Song P, Viollet B, Zou MH. In vivo activation of AMP-activated protein kinase attenuates diabetes-enhanced degradation of GTP cyclohydrolase I. Diabetes. 2009;58(8):1893-901.
159. Schulz E, Dopheide J, Schuhmacher S, Thomas SR, Chen K, Daiber A, et al. Suppression of the JNK pathway by induction of a metabolic stress response prevents vascular injury and dysfunction. Circulation. 2008;118(13):1347-57.
160. Liu Y, Nguyen PT, Wang X, Zhao Y, Meacham CE, Zou Z, et al. TLR9 and beclin 1 crosstalk regulates muscle AMPK activation in exercise. Nature. 2020;578(7796):605-9.
161. Hardie DG, Carling D, Carlson M. The AMP-activated/SNF1 protein kinase subfamily: metabolic sensors of the eukaryotic cell? Annu Rev Biochem. 1998;67:821-55.
162. Kojda G, Cheng YC, Burchfield J, Harrison DG. Dysfunctional regulation of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) expression in response to exercise in mice lacking one eNOS gene. Circulation. 2001;103(23):2839-44.
163. Fisslthaler B, Fleming I. Activation and signaling by the AMP-activated protein kinase in endothelial cells. Circ Res. 2009;105(2):114-27.
164. Rodriguez C, Munoz M, Contreras C, Prieto D. AMPK, metabolism, and vascular function. FEBS J. 2021;288(12):3746-71.
165. Hambrecht R, Adams V, Erbs S, Linke A, Krankel N, Shu Y, et al. Regular physical activity improves endothelial function in patients with coronary artery disease by increasing phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase. Circulation. 2003;107(25):3152-8.

166. Adams V, Linke A. Impact of exercise training on cardiovascular disease and risk. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis. 2019;1865(4):728-34.
167. Lavie CJ, Arena R, Swift DL, Johannsen NM, Sui X, Lee DC, et al. Exercise and the cardiovascular system: clinical science and cardiovascular outcomes. Circ Res. 2015;117(2):207-19.
168. National Research Council. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 8th Edition. The National Academy Press, Washington DC. 2011.
169. Nakada D, Saunders TL, Morrison SJ. Lkb1 regulates cell cycle and energy metabolism in haematopoietic stem cells. Nature. 2010;468(7324):653-8.
170. Mounier R, Theret M, Arnold L, Cuvellier S, Bultot L, Goransson O, et al. AMPKalpha1 regulates macrophage skewing at the time of resolution of inflammation during skeletal muscle regeneration. Cell Metab. 2013;18(2):251-64.
171. National Institutes of Health, Consensus Development Conference. Noise and Hearing loss: Consens Statement. 1990;54(7):385-91.
172. Vuong S, Delgado-Olguin P. Mouse Genotyping In: Delgado-Olgiun, P.(eds.) Mouse Embryogenesis. Methods in Molecular Biology, vol 1752. Humana Press. New York,2018, eBook ISBN 978-1-4939-7714-7.
173. Hankenson FC, Garzel LM, Fischer DD, Nolan B, Hankenson KD. Evaluation of tail biopsy collection in laboratory mice (Mus musculus): vertebral ossification, DNA quantity, and acute behavioral responses. J Am Assoc Lab Anim Sci. 2008;47(6):10-8.
174. Viollet B, Andreelli F, Jorgensen SB, Perrin C, Geloen A, Flamez D, et al. The AMP-activated protein kinase alpha2 catalytic subunit controls whole-body insulin sensitivity. J Clin Invest. 2003;111(1):91-8.
175. Bonaparte D, Cinelli P, Douni E, Herault Y, Maas M, Pakarinen P, et al. FELASA guidelines for the refinement of methods for genotyping genetically-modified rodents: a report of the Federation of European Laboratory Animal Science Associations Working Group. Lab Anim. 2013;47(3):134-45.
176. Peqlab VWR Company: DirectPCR® Lysis Reagent Ear, Data Sheet [Internet]. Available from: https://de.vwr.com/assetsvc/asset/de_DE/id/17035128/contents.
177. Jacquot S, Chartoire N, Piguet F, Herault Y, Pavlovic G. Optimizing PCR for Mouse Genotyping: Recommendations for Reliable, Rapid, Cost Effective, Robust and Adaptable to High-Throughput Genotyping Protocol for Any Type of Mutation. Curr Protoc Mouse Biol. 2019;9(4):e65.
178. Bosserhoff A, Kappelmann-Fenzl M. Next Generation Sequencing (NGS): What Can Be Sequenced? In: Kappelmann-Fenzl, M.: Next Generation Sequencing and Data Analysis. Learning Materials in Biosciences. Cham(Schweiz) Springer 2021 ISBN: 978-3-030-62489-7.
179. 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 1:263-73.
180. Mullis KB. The unusual origin of the polymerase chain reaction. Sci Am. 1990;262(4):56-61, 4-5.
181. Innis MA, Myambo KB, Gelfand DH, Brow MA. DNA sequencing with Thermus aquaticus DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction-amplified DNA. Proc Natl Acad Sci U S A. 1988;85(24):9436-40.
182. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science. 1988;239(4839):487-91.
183. 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):6427-37.
184. Westermeier R. Gelektrophorese. In Gressner, A.M.. Arndt, T.: Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik. Springer Reference Medizin. Berlin, Heidelberg Springer; 2019, ISBN 978-3-642-12920-9.
185. §7a, §8. TierSchG.
186. Abschnitt Nr. 1-3, Anlage Nr.1 TierSchVersV.
187. Karaki H, Sato K, Ozaki H. Different effects of norepinephrine and KCl on the cytosolic Ca2+-tension relationship in vascular smooth muscle of rat aorta. Eur J Pharmacol. 1988;151(2):325-8.
188. Szadujkis-Szadurska K, Grzesk G, Szadujkis-Szadurski L, Gajdus M, Malinowski B, Wicinski M. Role of endothelium, acetylocholine and calcium ions in Bay K8644- and KCl-induced contraction. Mol Med Rep. 2013;8(3):914-8.
189. 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):187-94.
190. 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):5244-8.

191. Stamm P, Kalinovic S, Oelze M, Steven S, Czarnowski A, Kvandova M, et al. Mechanistic Insights into Inorganic Nitrite-Mediated Vasodilation of Isolated Aortic Rings under Oxidative/Hypertensive Conditions and S-Nitros(yl)ation of Proteins in Germ-Free Mice. Biomedicines. 2022;10(3).
192. Puzserova A, Bernatova I. Chronic social stress increases nitric oxide-dependent vasorelaxation in normotensive rats. Interdiscip Toxicol. 2010;3(4):109-17.
193. Puzserova A, Slezak P, Balis P, Bernatova I. Long-term social stress induces nitric oxide-independent endothelial dysfunction in normotensive rats. Stress. 2013;16(3):331-9.
194. Danisch Mayo Technology: Multi Wire Myograph System 620 M User Manual Vol. 2.0 [Internet]. Available from: https://www.dmt.dk/uploads/6/5/6/8/65689239/620m_manual_v2.0.pdf.
195. Stamm P, Oelze M, Steven S, Kroller-Schon S, Kvandova M, Kalinovic S, et al. Direct comparison of inorganic nitrite and nitrate on vascular dysfunction and oxidative damage in experimental arterial hypertension. Nitric Oxide. 2021;113-114:57-69.
196. Frenis K, Helmstadter J, Ruan Y, Schramm E, Kalinovic S, Kroller-Schon S, et al. Ablation of lysozyme M-positive cells prevents aircraft noise-induced vascular damage without improving cerebral side effects. Basic Res Cardiol. 2021;116(1):31.
197. Feng M, Whitesall S, Zhang Y, Beibel M, D'Alecy L, DiPetrillo K. Validation of volume-pressure recording tail-cuff blood pressure measurements. Am J Hypertens. 2008;21(12):1288-91.
198. Conesa A, Madrigal P, Tarazona S, Gomez-Cabrero D, Cervera A, McPherson A, et al. A survey of best practices for RNA-seq data analysis. Genome Biol. 2016;17:13.
199. Eisele M, Kappelmann-Fenzl M. NGS Technologies in: Kappelmann-Fenzl, M. Next Generation Sequencing and Data Analysis. Learning Materials in Biosciences. Cham(Schweiz) Springer 2021, ISBN: 978-3-030-62489-7.
200. Illumina: RNA Sequencing methods collection: An overview of recent RNA-Seq publications featuring Illumina® technology [Internet]. 2017. Available from: https://emea.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/research_reviews/rna-sequencing-methods-review-web.pdf.
201. Szklarczyk D, Gable AL, Lyon D, Junge A, Wyder S, Huerta-Cepas J, et al. STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. Nucleic Acids Res. 2019;47(D1):D607-D13.
202. Huggett J, Dheda K, Bustin S, Zumla A. Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. Genes Immun. 2005;6(4):279-84.
203. Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. Genome Res. 1996;6(10):986-94.
204. Nolan T, Hands RE, Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. Nat Protoc. 2006;1(3):1559-82.
205. Hausding M, Jurk K, Daub S, Kroller-Schon S, Stein J, Schwenk M, et al. CD40L contributes to angiotensin II-induced pro-thrombotic state, vascular inflammation, oxidative stress and endothelial dysfunction. Basic Res Cardiol. 2013;108(6):386.
206. 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):402-8.
207. Pfaffl, M.W.: Realtime RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung in BIOSpektrum 01 [Internet]. (2004). Available from: https://www.biospektrum.de/magazinartikel/real-time-rt-pcr-neue-ansaetze-zur-exakten-mrna-quantifizierung?dl=1.
208. Oelze M, Kroller-Schon S, Welschof P, Jansen T, Hausding M, Mikhed Y, et al. The sodium-glucose co-transporter 2 inhibitor empagliflozin improves diabetes-induced vascular dysfunction in the streptozotocin diabetes rat model by interfering with oxidative stress and glucotoxicity. PLoS One. 2014;9(11):e112394.
209. Pfaar U, Kübler E, Gygax D. Molekulare Regulation der Bildung und Inaktivierung reaktiver Sauerstoffspezies. In: Ganten, D., Ruckpaul, K., Köhrle, J.: Molekularmedizinische Grundlagen von para- und autokrinen Regulationsstörungen. Berlin, Heidelberg: Molekulare Medizin. Springer; 2006 ISBN 13: 978-3-540-28781-7.
210. Zielonka J, Kalyanaraman B. Hydroethidine- and MitoSOX-derived red fluorescence is not a reliable indicator of intracellular superoxide formation: another inconvenient truth. Free Radic Biol Med. 2010;48(8):983-1001.
211. Zhao H, Joseph J, Fales HM, Sokoloski EA, Levine RL, Vasquez-Vivar J, et al. Detection and characterization of the product of hydroethidine and intracellular superoxide by HPLC and limitations of fluorescence. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005;102(16):5727-32.

212. Fernandes DC, Wosniak J, Pescatore LA, Bertoline MA, Liberman M, Laurindo FRM, et al. Analysis of DHE-derived oxidation products by HPLC in the assessment of superoxide production and NADPH oxidase activity in vascular systems. Am J Physiol-Cell Ph. 2007;292(1):C413-C22.
213. Arndt T. Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie. In: Gressner, A.M., Arndt, T. : Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik. Springer Reference Medizin. Berlin, Heidelberg: Springer; 2019 ISBN: 978-3-662-48985-7.
214. Steven S, Frenis K, Kalinovic S, Kvandova M, Oelze M, Helmstadter J, et al. Exacerbation of adverse cardiovascular effects of aircraft noise in an animal model of arterial hypertension. Redox Biol. 2020;34:101515.
215. Daiber A, Di Lisa F, Oelze M, Kroller-Schon S, Steven S, Schulz E, et al. Crosstalk of mitochondria with NADPH oxidase via reactive oxygen and nitrogen species signalling and its role for vascular function. Br J Pharmacol. 2017;174(12):1670-89.
216. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem. 1951;193(1):265-75.
217. Bio-Rad Laboratories: DC Protein Assay Instruction Manual DataSheet [Internet]. Available from: https://www.bio-rad.com/sites/default/files/webroot/web/pdf/lsr/literature/LIT448.pdf.
218. Zielonka J, Hardy M, Kalyanaraman B. HPLC study of oxidation products of hydroethidine in chemical and biological systems: ramifications in superoxide measurements. Free Radic Biol Med. 2009;46(3):329-38.
219. 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;72:248-54.
220. Compton SJ, Jones CG. Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. Anal Biochem. 1985;151(2):369-74.
221. 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):424-6.
222. Schagger H. Tricine-SDS-PAGE. Nat Protoc. 2006;1(1):16-22.
223. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 1970;227(5259):680-5.
224. 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.
225. Bio-Rad Laboratories: Protein Blotting Guide, Electrophoresis and Blotting [Internet]. Available from: https://www.bio-rad.com/sites/default/files/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_2895.pdf.
226. Oelze M, Knorr M, Schuhmacher S, Heeren T, Otto C, Schulz E, et al. Vascular dysfunction in streptozotocin-induced experimental diabetes strictly depends on insulin deficiency. J Vasc Res. 2011;48(4):275-84.
227. Kroller-Schon S, Daiber A, Schulz E. Modulation of Vascular Function by AMPK: Assessment of NO Bioavailability and Surrogates of Oxidative Stress. Methods Mol Biol. 2018;1732:495-506.
228. World Helath Organization, Regional Office for Europe. Environmental Noise Guidelines for the European Region. Copenhagen: World Health Organization; 2018, ISBN 978-92-890-5356-3.
229. Huai P, Xun H, Reilly KH, Wang Y, Ma W, Xi B. Physical activity and risk of hypertension: a meta-analysis of prospective cohort studies. Hypertension. 2013;62(6):1021-6.
230. Sorensen M, Andersen ZJ, Nordsborg RB, Jensen SS, Lillelund KG, Beelen R, et al. Road traffic noise and incident myocardial infarction: a prospective cohort study. PLoS One. 2012;7(6):e39283.
231. Sorensen M, Hvidberg M, Hoffmann B, Andersen ZJ, Nordsborg RB, Lillelund KG, et al. Exposure to road traffic and railway noise and associations with blood pressure and self-reported hypertension: a cohort study. Environ Health. 2011;10:92.
232. Pouryaghoub G, Mehrdad R, Valipouri A. Effect of Acute Noise Exposure on Salivary Cortisol: A Randomized Controlled Trial. Acta Med Iran. 2016;54(10):657-61.
233. Zorov DB, Juhaszova M, Sollott SJ. Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release. Physiol Rev. 2014;94(3):909-50.
234. 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):488-96.
235. Kroller-Schon S, Steven S, Kossmann S, Scholz A, Daub S, Oelze M, et al. Molecular mechanisms of the crosstalk between mitochondria and NADPH oxidase through reactive oxygen species-studies in white blood cells and in animal models. Antioxid Redox Signal. 2014;20(2):247-66.
236. Lee-Young RS, Griffee SR, Lynes SE, Bracy DP, Ayala JE, McGuinness OP, et al. Skeletal muscle AMP-activated protein kinase is essential for the metabolic response to exercise in vivo. J Biol Chem. 2009;284(36):23925-34.

237. Lai L, Ghebremariam YT. Modulating DDAH/NOS Pathway to Discover Vasoprotective Insulin Sensitizers. J Diabetes Res. 2016;2016:1982096.
238. Altmann KS, Havemeyer A, Beitz E, Clement B. Dimethylarginine-dimethylaminohydrolase-2 (DDAH-2) does not metabolize methylarginines. Chembiochem. 2012;13(17):2599-604.
239. Leiper J, Nandi M, Torondel B, Murray-Rust J, Malaki M, O'Hara B, et al. Disruption of methylarginine metabolism impairs vascular homeostasis. Nat Med. 2007;13(2):198-203.
240. Greer EL, Oskoui PR, Banko MR, Maniar JM, Gygi MP, Gygi SP, et al. The energy sensor AMP-activated protein kinase directly regulates the mammalian FOXO3 transcription factor. J Biol Chem. 2007;282(41):30107-19.
241. Takabe W, Warabi E, Noguchi N. Anti-atherogenic effect of laminar shear stress via Nrf2 activation. Antioxid Redox Signal. 2011;15(5):1415-26.
242. Munzel T, Steven S, Frenis K, Lelieveld J, Hahad O, Daiber A. Environmental Factors Such as Noise and Air Pollution and Vascular Disease. Antioxid Redox Signal. 2020.
243. Jansen T, Kroller-Schon S, Schonfelder T, Foretz M, Viollet B, Daiber A, et al. alpha1AMPK deletion in myelomonocytic cells induces a pro-inflammatory phenotype and enhances angiotensin II-induced vascular dysfunction. Cardiovasc Res. 2018;114(14):1883-93.
244. Tummala PE, Chen XL, Sundell CL, Laursen JB, Hammes CP, Alexander RW, et al. Angiotensin II induces vascular cell adhesion molecule-1 expression in rat vasculature: A potential link between the renin-angiotensin system and atherosclerosis. Circulation. 1999;100(11):1223-9.
245. Werner C, Furster T, Widmann T, Poss J, Roggia C, Hanhoun M, et al. Physical exercise prevents cellular senescence in circulating leukocytes and in the vessel wall. Circulation. 2009;120(24):2438-47.
246. Laufs U, Werner N, Link A, Endres M, Wassmann S, Jurgens K, et al. Physical training increases endothelial progenitor cells, inhibits neointima formation, and enhances angiogenesis. Circulation. 2004;109(2):220-6.
247. Bourque SL, Davidge ST, Adams MA. The interaction between endothelin-1 and nitric oxide in the vasculature: new perspectives. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2011;300(6):R1288-95.
248. Li H, Xia N. The role of oxidative stress in cardiovascular disease caused by social isolation and loneliness. Redox Biol. 2020;37:101585.
249. Statistisches Bundesamt (Destatis). Ausblick auf die Bevölkerungsentwicklung in Deutschland und den Bundesländern nach dem Corona-Jahr 2020, Erste mittelfristige Bevölkerungsvorausberechnung 2021 bis 2035. 2021.

10 Anhang

Tabelle A-1: Die wichtigsten Genänderungen in der Aorta nach viertägiger Fluglärmexposition (WT vs. Noise)

Die Gene sind in fünf Untergruppen unterteilt: Regulierung der Redox-Homöostase, des zirkadianen Rhythmus, der AMPK-Signaltransduktion, der NO-Signaltransduktion und der Inflammation Die RNA-Sequenzierung, die NGS-Bibliotheksvorbereitung, NovaSeq pe150 Sequenzierung, die Qualitätskontrolle der RNA-Proben und der Daten sowie die Datenanalyse wurden von Novogene Bioinformatics Technology Co. in Cambridge durchgeführt.

Redox-Homöostase				
Gen ID	Genname	log2Fold	padj	Beschreibung
ENSMUSG00000074218	Cox7a1	-1.07286613387	0.0132346646138074	cytochrome c oxidase subunit 7A1
ENSMUSG00000052305	Hbb-bs	-1.66342141336	0.079836663925121	hemoglobin, beta adult s chain
ENSMUSG00000073940	Hbb-bs	-1.69979491494	0.0754041745293058	hemoglobin, beta adult t chain
ENSMUSG00000032496	Ltf	-2.77344001453	0.0775847176003907	lactotransferrin
ENSMUSG00000000120	Ngfr	-1.95033101253	0.0313002649408074	nerve growth factor receptor (TNFR superfamily, member 16)
ENSMUSG00000034160	Ogt	-0.31143839052	0.0780734130625601	O-linked N-acetylglucosamine (GlcNAc) transferase (UDP-N-acetylglucosamine:polypeptide-N- acetylglucosaminyl transferase)
ENSMUSG00000062729	Ppox	-0.29812909386	0.094261663008121	protoporphyrinogen oxidase
ENSMUSG00000015452	Ager	1.41259324167	0.0877958120378016	advanced glycosylation end product-specific receptor
ENSMUSG00000024292	Cyp4f14	0.69066638124	0.0962444849181366	cytochrome P450, family 4, subfamily f, polypeptide 14
ENSMUSG00000031987	Egln1	0.13749480604	0.0428260878812879	egl-9 family hypoxia-inducible factor 1
ENSMUSG00000040170	Fmo2	0.44101894607	0.0299900829178096	flavin containing monooxygenase 2
ENSMUSG00000059923	Grb2	0.12334772886	0.0383734598421831	growth factor receptor bound protein 2
ENSMUSG00000063358	Mapk1	0.12460239344	0.0877886990562928	mitogen-activated protein kinase 1
ENSMUSG00000026335	Pam	0.17346956924	0.0944906799961924	peptidylglycine alpha-amidating monooxygenase
ENSMUSG00000006998	Psmd2	0.14593148587	0.0782089868015296	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 2
ENSMUSG00000026869	Psmd5	0.18994410990	0.0644026237833429	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 5
ENSMUSG00000072941	Sod3	0.24063959813	0.0644026237833429	superoxide dismutase 3, extracellular
ENSMUSG00000091896	Ub2d2a	0.16561681391	0.0897135538165689	ubiquitin-conjugating enzyme E2D 2A
Zirkadianer Rhythmus				
ENSMUSG00000020182	Ddc	-2.10452371430	0.0144081030146455	dopa decarboxylase

ENSMUSG00000000120	Ngfr	-1.95033101253	0.0313002649408074	nerve growth factor receptor (TNFR superfamily, member 16)
ENSMUSG00000028072	Ntrk1	-3.73625201099	0.0996487504793547	neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 1
ENSMUSG00000034160	Ogt	-0.31143839052	0.0780734130625601	O-linked N-acetylglucosamine (GlcNAc) transferase (UDP-N-acetylglucosamine:polypeptide-N- acetylglucosaminyl transfer-ase)
ENSMUSG00000078816	Prkcg	-0.50607021700	0.0878450662484469	protein kinase C, gamma
ENSMUSG00000033760	Rbm4b	-0.31697026727	0.073767797180164	RNA binding motif protein 4B
ENSMUSG00000039231	Suv39h1	0.30282217047	0.0461784084217933	suppressor of variegation 3-9 1
AMPK-Signaltransduktion				
ENSMUSG00000047789	Slc38a9	-0.25600769533	0.0548064507824245	solute carrier family 38, mem-ber 9
ENSMUSG00000031987	Egln1	0.13749480604	0.0428260878812879	egl-9 family hypoxia-inducible factor 1
ENSMUSG00000063358	Mapk1	0.12460239344	0.0877886990562928	mitogen-activated protein kinase 1
ENSMUSG00000070934	Rraga	0.21625810226	0.0523924044976938	Ras-related GTP binding A
NO-Signaltransduktion				
ENSMUSG00000020263	Appl2	-0.31193116141	0.0264799985669975	adaptor protein, phosphotyro-sine interaction, PH domain and leucine zipper containing 2
ENSMUSG00000022235	Cmbl	-0.61748308614	0.0423216409401655	carboxymethylenebutenolidase-like (Pseudomonas)
ENSMUSG00000074218	Cox7a1	-1.07286613387	0.0132346646138074	cytochrome c oxidase subunit 7A1
ENSMUSG00000022555	Dgat1	-0.28440139718	0.0469926333315874	diacylglycerol O-acyltransferase 1
ENSMUSG00000040265	Dnm3	-0.64179691818	0.0213856960139509	dynamin 3
ENSMUSG00000052305	Hbb-bs	-1.66342141336	0.079836663925121	hemoglobin, beta adult s chain
ENSMUSG00000073940	Hbb-bt	-1.69979491494	0.0754041745293058	hemoglobin, beta adult t chain
ENSMUSG00000062960	Kdr	-0.86760434292	0.0453348928879663	kinase insert domain protein re-ceptor
ENSMUSG00000046709	Mapk10	-1.94068432766	0.0968929743830777	mitogen-activated protein kinase 10
ENSMUSG00000054387	Mdm4	-0.34356829730	0.0849003437447201	transformed mouse 3T3 cell double minute 4
ENSMUSG00000074604	Mgst2	-1.00064075339	0.0897135538165689	microsomal glutathione S-trans-ferase 2
ENSMUSG00000005373	Mlxipl	-0.59932600524	0.00308117936817693	MLX interacting protein-like
ENSMUSG00000027201	Myef2	-0.22839739686	0.0906795349055292	myelin basic protein expression factor 2, repressor
ENSMUSG00000000120	Ngfr	-1.95033101253	0.0313002649408074	nerve growth factor receptor (TNFR superfamily, member 16)
ENSMUSG00000021868	Ppif	-0.30978604565	0.0500857531998788	peptidylprolyl isomerase F (cy-clophilin F)
ENSMUSG00000032940	Rbm11	-1.27965840595	0.0751541109886294	RNA binding motif protein 11
ENSMUSG00000040943	Tet2	-0.46923393490	0.0364654219469752	tet methylcytosine dioxygenase 2
ENSMUSG00000001175	Calm1	0.18626700374	0.0703731198537805	calmodulin 1
ENSMUSG00000019370	Calm3	0.19597119570	0.0703731198537805	calmodulin 3
ENSMUSG00000007655	Cav1	0.24635265002	0.071566348707475	caveolin 1, caveolae protein

ENSMUSG00000024292	Cyp4f14	0.69066638124	0.0962444849181366	cytochrome P450, family 4, subfamily f, polypeptide 14
ENSMUSG00000031987	Egln1	0.13749480604	0.0428260878812879	egl-9 family hypoxia-inducible factor 1
ENSMUSG00000040170	Fmo2	0.44101894607	0.0299900829178096	flavin containing monooxygenase 2
ENSMUSG00000026691	Fmo3	0.72488212498	0.0446664253912137	flavin containing monooxygenase 3
ENSMUSG00000055932	Fto	0.17812600086	0.0856761550913166	fat mass and obesity associated
ENSMUSG00000028124	Gclm	0.16678117627	0.0811091284078236	glutamate-cysteine ligase, modifier subunit
ENSMUSG00000001663	Gstt1	0.25977372362	0.0858206785708032	glutathione S-transferase, theta 1
ENSMUSG00000023944	Hsp90ab1	0.42731434599	0.0434917703957729	heat shock protein 90 alpha (cytosolic), class B member 1
ENSMUSG00000063358	Mapk1	0.12460239344	0.0877886990562928	mitogen-activated protein kinase 1
ENSMUSG00000038615	Nfe2l1	0.15922998659	0.0280320525964586	nuclear factor, erythroid derived 2,-like 1
ENSMUSG00000022206	Npr3	0.66618139483	0.0534580102813992	natriuretic peptide receptor 3
ENSMUSG00000030101	Sumf1	0.14151656960	0.0549416852267423	sulfatase modifying factor 1
Inflammation				
ENSMUSG00000020263	Appl2	-0.31193116141	0.0264799985669975	adaptor protein, phosphotyrosine interaction, PH domain and leucine zipper containing 2
ENSMUSG00000022914	Brwd1	-0.23088453916	0.0252181346178603	bromodomain and WD repeat domain containing 1
ENSMUSG00000000982	Ccl3	-2.41369356134	0.0295764662112481	chemokine (C-C motif) ligand 3
ENSMUSG00000110206	Flt3l	-0.57794947397	0.0166892292964036	FMS-like tyrosine kinase 3 ligand
ENSMUSG00000039521	Foxp3	-1.21563783667	0.0986120455520371	forkhead box P3
ENSMUSG00000032496	Ltf	-2.77344001453	0.0775847176003907	lactotransferrin
ENSMUSG00000046709	Mapk10	-1.94068432766	0.0968929743830777	mitogen-activated protein kinase 10
ENSMUSG00000003847	Nfat5	-0.31961481862	0.0822592197290521	nuclear factor of activated T cells 5
ENSMUSG00000005057	Sh2b2	-0.90305346426	0.0697427418045943	SH2B adaptor protein 2
ENSMUSG00000007207	Stx1a	-0.42716806765	0.0974537509382744	syntaxin 1A (brain)
NSMUSG00000015452	Ager	1.41259324167	0.0877958120378016	advanced glycosylation end product-specific receptor
ENSMUSG00000007655	Cav1	0.24635265002	0.071566348707475	caveolin 1, caveolae protein
ENSMUSG00000059923	Grb2	0.12334772886	0.0383734598421831	growth factor receptor bound protein 2
ENSMUSG00000021922	Itih4	0.46446012320	0.00965767513405113	inter alpha-trypsin inhibitor, heavy chain 4
ENSMUSG00000063358	Mapk1	0.12460239344	0.0877886990562928	mitogen-activated protein kinase 1
ENSMUSG00000017837	Nkiras2	0.19887075683	0.0617867110812653	NFKB inhibitor interacting Ras-like protein 2
ENSMUSG00000007564	Ppp2r1a	0.16517094860	0.0996487504793547	protein phosphatase 2, regulatory subunit A, alpha
ENSMUSG00000006998	Psmd2	0.14593148587	0.0782089868015296	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 2
ENSMUSG00000026869	Psmd5	0.18994410990	0.0644026237833429	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 5
ENSMUSG00000024098	Twsg1	0.20715607297	0.0501879283866491	twisted gastrulation BMP signaling modulator 1
ENSMUSG00000091896	Ube2d2a	0.16561681391	0.0897135538165689	ubiquitin-conjugating enzyme E2D 2A

Tabelle A-2: Die wichtigsten Genänderungen in der Aorta nach viertägiger Fluglärmexposition und vorheriger Ausführung von Ausdauersport für sieben Wochen (Noise vs. Noise+Exercise)

Die Gene sind in fünf Untergruppen unterteilt: Regulierung der Redox-Homöostase/des oxidativen Stresses, des zirkadianen Rhythmus, der AMPK-Signaltransduktion, der NO-Signaltransduktion und der Inflammation. Die Daten sind als log2fold Veränderungen aufgelistet. Die RNA-Sequenzierung, die NGS-Bibliotheksvorbereitung, NovaSeq pe150 Sequenzierung, die Qualitätskontrolle der RNA-Proben und der Daten sowie die Datenanalyse wurden von Novogene Bioinformatics Technology Co. in Cambridge durchgeführt.

Redox-Homöostase/ des oxidativen Stresses				
Gen ID	Genname	log2Fold	padj	Beschreibung
ENSMUSG00000031987	Egln1	-0.265085809	0.00992286132896333	egl-9 family hypoxia-inducible factor 1
NSMUSG00000063358	Mapk1	-0.219681368	0.0471129589691392	mitogen-activated protein kinase 1
ENSMUSG00000026826	Nr4a2	-1.0794307344	0.0188610071207211	Nuclear Receptor Subfamily 4 Group A Member 2
ENSMUSG00000000805	Car4	3.0168464015	0.0122667017116275	carbonic anhydrase 4
ENSMUSG00000034160	Ogt	0.546760189	0.0408296042212968	O-linked N-acetylglucosamine (GlcNAc) transferase (UDP-N-acetylglucosamine:polypeptide-N- acetylglucosaminyl transferase)
Zirkadianer Rhythmus				
ENSMUSG00000020182	Ddc	3.1764866910	0.0223465893016731	dopa decarboxylase
ENSMUSG00000034160	Ogt	0.546760189	0.0408296042212968	O-linked N-acetylglucosamine (GlcNAc) transferase (UDP-N-acetylglucosamine:polypeptide-N- acetylglucosaminyl transferase)
AMPK-Signaltransduktion				
ENSMUSG00000063358	Mapk1	-0.219681368	0.0471129589691392	mitogen-activated protein kinase 1
ENSMUSG00000031987	Egln1	-0.265085809	0.00992286132896333	egl-9 family hypoxia-inducible factor 1
NO-Signaltransduktion				
ENSMUSG00000031987	Egln1	-0.26508580946	0.00992286132896333	egl-9 family hypoxia-inducible factor 1
ENSMUSG00000063358	Mapk1	-0.21968136808	0.0471129589691392	mitogen-activated protein kinase 1
ENSMUSG00000026826	Nr4a2	-1.0794307344	0.0188610071207211	Nuclear Receptor Subfamily 4 Group A Member 2
ENSMUSG00000028601	Echdc2	0.5237391123	0.0146067781305722	enoyl Coenzyme A hydratase domain containing 2
ENSMUSG00000005373	Mlxipl	1.1153643217	0.0183605061464963	MLX interacting protein-like
Inflammation				
ENSMUSG00000063358	Mapk1	-0.219681368	0.0471129589691392	mitogen-activated protein kinase 1
ENSMUSG00000110206	Fltl3	0.794535944	0.0427352358580554	FMS-like tyrosine kinase 3 ligand