
Aus dem Walter-Brendel-Zentrum für experimentelle Medizin
Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. U.Pohl

Die Rolle der AMP-Kinase bei der Regulation des Vasotonus

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Claus-Peter Kreutz
aus
München

2013

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. U. Pohl

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Eberhard Standl
Prof. Dr. med. Jochen Seißler

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. hc M. Reiser FACR FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 19.12.2013

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	8
1.1	Die Regulation des Blutkreislaufs	8
1.1.1	Allgemeine Prinzipien	8
1.1.2	Die Rolle von Widerstandsgefäßen	9
1.1.3	Glattmuskuläre Kontraktion	9
1.1.4	Beeinflussung der Kontraktion durch das Membranpotential	11
1.1.5	Endothelialer hyperpolarisierender Faktor EDHF	13
1.2	Adenosinmonophosphat-abhängige Proteinkinase AMPK	16
1.2.1	Entdeckung einer AMP-abhängigen Proteinkinase	16
1.2.2	Aktivierung und Regulation der AMP-Kinase	16
1.2.3	Funktionen der AMP-Kinase	18
1.3	Fragestellung und Ziele der Arbeit	20
2	Material und Methoden	21
2.1	Lösungen und Chemikalien	21
2.1.1	Pufferlösungen	21
2.1.2	Leibovitz L15 Medium	23
2.1.3	Vorbereitung der Agonisten und Inhibitoren	24
2.1.4	Chemikalien und Medikamente	24
2.1.5	Antikörper und Plasmide	26
2.2	Präparation und Kanülierung der Widerstandsgefäße	28
2.2.1	Präparation der Gefäße	28
2.2.2	Kanülierung der Gefäße	29
2.3	Messung der intrazellulären Kalziumkonzentration	30
2.3.1	Funktionsprinzip der fluoreszenzmikroskopischen Kalziummessung	30
2.3.2	Beladung der Gefäße mit Fura2	33
2.3.3	Aufbau des Kalziummessplatzes	33
2.4	Registrierung des Gefäßdurchmessers	34

2.5	Transfektion der glatten Muskulatur	36
2.6	Western Blot	36
2.7	Versuchsprotokolle	38
2.7.1	Applikation und Auswaschen von Agenzien	38
2.7.2	Kriterien der endothelialen und glattmuskulären Reaktivität	38
2.7.3	Blockade der NO-Synthase und der Cyclooxygenase	39
2.7.4	Effekte von A76 und Dosiswirkungskurven	39
2.7.5	Effekte von AICAR und Metformin	40
2.7.6	Vordepolarisation mit Kalium	40
2.7.7	Effekte verschiedener Inhibitoren	40
2.8	Technische Geräte, Verbrauchsmaterial und Sonstiges	41
2.9	Auswertung und Darstellung der Ergebnisse	44
3	Ergebnisse	47
3.1	Allgemeine Gefäßcharakteristiken	47
3.2.	Nachweis der AMP-Kinase in den Gefäßen der Versuchstiere	48
3.3	A76 induzierte Dilatation	50
3.4	Herabsetzung der AMPK-Aktivität durch Transfektion	54
3.5	Effekte von AICAR	56
3.6	Effekte von Metformin	57
3.7	A76 Effekte nach Vordepolarisation mit hohem extrazellulärem Kalium	59
3.8	Pharmakologische Blockade verschiedener Kaliumkanäle	61
3.9	Blockade der Na⁺-K⁺-ATPase	66

4	Diskussion	68
4.1	Auswahl des Versuchsmodells	68
4.2	Aktivierung der AMPK durch A76	70
4.3	Die Rolle des Endothels	75
4.4	Aktivierung der AMPK durch weitere Agonisten	76
4.4.1	AICAR als Aktivator der AMPK	76
4.4.2	Metformin als Aktivator der AMPK	77
4.5	Blockade von Kaliumkanälen	79
4.5.1	Blockade von Kaliumkanälen durch Erhöhung der extrazellulären Kaliumkonzentration	79
4.5.2	Blockade spannungs- und kalziumabhängiger Kaliumkanäle (K_{Ca})	80
4.5.3	Blockade ATP-abhängiger Kaliumkanäle (K_{ATP})	83
4.6	Bedeutung einer Kalziumdesensitivierung	84
4.7	Aktivierung der AMPK als therapeutische Option bei metabolischem Syndrom und arterieller Hypertonie?	86
5	Zusammenfassung	88
6	Literaturverzeichnis	90
7	Danksagung	101
8	Lebenslauf	102
	Anhang	103

Abkürzungsverzeichnis

A./Aa.	Arteria(e)
$A_{340\text{nm}}$, $A_{380\text{nm}}$	Autoeffloreszenz bei einer Anregung mit der Wellenlänge 340 bzw. 380nm
A76	A769662, Stimulator der AMP-abhängigen Proteinkinase
Abb.	Abbildung
Ach	Acetylcholin
ADP	Adenosindiphosphat
AICAR	5-Aminoimidazol-4-Carboxamid-1- β -D-Ribofuranosid
AMP	5'-Adenosinmonophosphat
AMPK	AMP-abhängige Proteinkinase
AMPKK	AMP-abhängige Proteinkinase Kinase
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua dest	Aqua destillata, destilliertes Wasser
ATP	Adenosintriphosphat
AUC	Fläche unter der Kurve (Area under the curve)
BCA	Bicinchoninsäure
BK	Bradykinin
BK_{Ca}	large (big) conductance Kaliumkanäle
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Celsius
$CaCl_2(2H_2O)$	Calciumchloriddihydrat
$[Ca^{2+}]_e$	extrazelluläre Kalziumkonzentration
$[Ca^{2+}]_i$	intrazelluläre Kalziumkonzentration
CaM	Calmodulin
CaMMK β	Kalzium-Calmodulin-Kinase β
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CFTR	Cystis Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
COX	Cyclooxygenase
CTX	Charybdotoxin
d	Durchmesser
D/A-Wandler	Digital-Analog Wandler
DMSO	Dimethylsulfoxid

DNA	Desoxyribonucleinsäure („acid“)
EC ₅₀	Mittlere effektive Konzentration zum Erreichen halbmaximaler Effekte
EDHF	endothelialer hyperpolarisierender Faktor (endothelium-derived hyperpolarizing factor)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EETs	Epoxy-Eicosatriensäuren
Em	Emissionsmaximum
eNOS	endotheliale NO-Synthase
f	Frequenz
F	Faraday-Konstante
F _{340nm/380nm}	Fluoreszenzintensität bei einer Anregung mit der Wellenlänge 340 bzw. 380nm
Fura2-AM	Fura2-acetoxymethylester
GFP	Green fluorescence protein
Glib	Glibenclamid
h	Höhe
HCl	Chlorwasserstoff „Salzsäure“
HMG-CoA	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym A
HRP	horse radish peroxidase (Meerrettichperoxidase)
Hz	Herz
I	Stromstärke bzw. Blutfluss
IbTX	Iberiotoxin
IgG	Immunglobulin G
IK _{Ca}	intermediate conductance Kaliumkanäle
IP ₃	Inositoltriphosphat
K ⁺	Kaliumion
K _{ATP}	ATP-abhängige Kaliumkanäle
K _{Ca}	Spannungs- und kalziumabhängige Kaliumkanäle
KCl	Kaliumchlorid
K _d	Dissoziationskonstante
kDa	Kilodalton
K _{ir}	einwärtsgerichtete Kaliumkanäle (inward rectifier)
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
K _v	spannungsabhängige Kaliumkanäle
l	Liter

L-NAME	N _ω -Nitro-L-Arginin-Methyl-Ester-Hydrochlorid
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgSO ₄ (7H ₂ O)	Magnesiumsulfatseptahydrat
ml	Milliliter
MLCK	Myosin-leichte-Kette-Kinase MLCK (Myosin Light Chain Kinase)
MLCP	Myosinphosphatase (Myosin Light Chain Phosphatase)
mM	Millimolar
mmHg	Milimeter Quecksilbersäule
MnCl ₂	Manganchlorid
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	messenger RNA
mV	Milivolt
MW	Molekulare Masse (molecular weight)
n	Anzahl durchgeführter Experimente
Na ⁺	Natriumion
NA	Noradrenalin
NaCl	Natriumchlorid "Kochsalz"
NaF	Natriumfluorid
NaH ₂ PO ₄ (1H ₂ O)	Natriumdihydrogenphosphatmonohydrat
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid "Natronlauge"
Na ₄ P ₂ O ₇	Tetranatriumdiphosphat
NaPyruvat	Natriumpyruvat
Na ₃ VO ₄	Natriumorthovanadat
Nif	Nifedipin
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	NO-Synthase
ns	nicht signifikant
Ouab	Ouabain
P	Druck (pressure)
PGI ₂	Prostacyclin
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PKG	Proteinkinase G

PP2C α	Proteinphosphatase 2C α
r	Radius
R	Kalziumratio
R	(Strömungs-)Widerstand
R	allgemeine Gaskonstante
RNA	Ribonucleinsäure („acid“)
RNS	Reaktive Stickstoffverbindungen (reactive nitrogen species)
ROS	Reaktive Sauerstoffverbindungen (reactive oxygen species)
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SEM	Standard error of the mean
Ser	Serin
SK _{Ca}	small conductance Kaliumkanäle
SP	Substanz P
T	Temperatur
Tab.	Tabelle
TAK1	transforming-growth-factor β aktivierten Kinase 1
TBS	Tris-buffered saline, Tris gepufferter salziger Puffer
TBS-T	TBS-Puffer mit Tween
TEMED	N,N,N', N'-Tetramethylethyldiamin
Thr	Threonin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Spannung
U	Units
UV	ultraviolett
W	Watt
z. B.	zum Beispiel
ZMP	5-Amino-4-Imidazolcarboxamid-5-Monophosphat
$\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$	relative Veränderung der intrazelluläre Kalziumkonzentration
Δd	relative Veränderung des Außendurchmessers
λ_A	Anregungswellenlänge
λ_E	Emissionswellenlänge
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
μM	Mikromolar

1 Einleitung

1.1 Die Regulation des Blutkreislaufs

1.1.1 Allgemeine Prinzipien

Der Blutkreislauf des Menschen besteht aus einem geschlossenen System von parallel und seriell angeordneten Blutgefäßen. Durch zwei funktionell hintereinander liegende Pumpen, den rechten und den linken Ventrikel, wird in beiden Teilkreisläufen (Körper oder Peripherie und Lunge) jeweils ein Druckgefälle erzeugt, das eine gerichtete Strömung im gesamten Kreislauf ermöglicht. Unter Ruhebedingungen befördert das Herz dabei etwa fünf Liter Blut pro Minute in den peripheren Kreislauf, das die Organe einerseits mit lebenswichtigen Nährstoffen und Sauerstoff versorgt und andererseits nicht benötigte Stoffwechselprodukte und Kohlendioxid abtransportiert. Sehr stoffwechselintensive Organe wie die Leber, das Gehirn oder aber die Nieren wegen ihrer Reinigungsfunktion bzw. besonders große Organsysteme wie die Skelettmuskulatur beanspruchen dabei schon in Ruhe einen großen Anteil am Herzminutenvolumen. In Anpassung an den jeweiligen Bedarf kann das Herzzeitvolumen unter Belastung bis auf das etwa Vier- bis Fünffache gesteigert werden und beträgt dann beim Erwachsenen etwa 20-25 Liter pro Minute. Da aber selbst das höchstmöglich gesteigerte Herzzeitvolumen nicht ausreichen würde, um alle Organe gleichzeitig maximal zu durchbluten, unterliegt das Herz-Kreislauf-System einer komplexen zentralen und lokalen Regulation, um den wechselnden Bedürfnissen der Organe gerecht zu werden. Dabei ist für die übergeordnete Regulation der Herzleistung und des peripheren Widerstands neben einer Vielzahl von Hormonen vor allem das Zusammenspiel des sympathischen und des parasympathischen Anteils des vegetativen Nervensystems verantwortlich. Komplizierte Steuerungsmechanismen wie die Autoregulation der Durchblutung durch myogene Gefäßantworten sowie die Anpassung des Vasotonus durch Gewebismetabolite und sogenannte Autakoide, eine heterogene Gruppe para- und autokrin wirkender vasoaktiver Endothelsubstanzen, tragen zudem zur peripheren Kontrolle der Regulation des Blutflusses zu den einzelnen Organen bei.

1.1.2 Die Rolle von Widerstandsgefäßen

Gerade im Skelettmuskel ist eine hohe Anpassungsfähigkeit der Organperfusion nötig, da die Stoffwechselaktivität in hohem Maße von der Aktivität der Muskelfasern abhängt. Dabei ist unter körperlicher Belastung je nach Fasertyp ein Anstieg des Blutflusses auf das 10- bis 50-fache des Ruhewertes möglich [6].

Allgemein ist der Blutfluss (I) gemäß dem Ohmschen Gesetz (s. Anhang) eine Funktion sowohl der treibenden Druckdifferenz ΔP als auch des Strömungswiderstands R:

$$I = \Delta P / R$$

Unter physiologischen Bedingungen lässt sich die Druckdifferenz ΔP durch eine Erhöhung des arteriellen Blutdrucks bei annähernd konstantem venösen Druck allenfalls verdoppeln. Eine derart massive Veränderung des Blutflusses, wie sie in der Skelettmuskulatur möglich ist, muss also vornehmlich auf einer Änderung des Strömungswiderstandes R beruhen. Unter der Annahme einer laminaren Strömung hängt R nach dem Hagen-Poiseuilleschen Gesetz (s. Anhang) in einem zylindrischen Gefäß umgekehrt von der 4. Potenz des Gefäßradius r ab. Der größte Teil des Strömungswiderstandes wird demnach in den kleinen Gefäßen, also den kleinen Arterien und Arteriolen des Blutkreislaufs generiert, weswegen diese auch als Widerstandsgefäße bezeichnet werden. Damit wird klar, dass der Kontraktionszustand der glatten Gefäßmuskulatur und der hauptsächlich davon abhängige Durchmesser dieser Gefäße zu einem wesentlichen Teil die lokale Perfusion in einem Stromgebiet bestimmen.

1.1.3 Glattmuskuläre Kontraktion

Ebenso wie bei der Skelettmuskulatur beruht die Verkürzung glatter Muskelzellen auf einem teleskopartigen Übereinandergleiten von Aktin- und Myosinfilamenten durch zyklische Querbrückentätigkeit. Ein wichtiger Auslöser für die Kontraktion ist ein Anstieg der Kalziumkonzentration im Myoplasma $[Ca^{2+}]_i$. Anders als im Skelettmuskel wird der Querbrückenzyklus in der glatten Muskulatur, die kein Troponin enthält, jedoch durch eine kovalente Modifikation initiiert. Steigt der zytosolische Kalziumspiegel über einen bestimmten Grenzwert an, so kommt es nach Bindung

von Calmodulin an das Enzym Myosin-leichte-Kette-Kinase MLCK (Myosin Light Chain Kinase) zu einer Phosphorylierung der regulatorischen leichten Kette des Myosins durch die MLCK und damit zur Kontraktion. Bei einem Abfall der Kalziumkonzentration sinkt dagegen die Aktivität der MLCK und es kommt durch das Überwiegen des Effektes einer spezifischen Myosinphosphatase MLCP (Myosin Light Chain Phosphatase) zu einer Dephosphorylierung des Myosins und folglich zur Relaxation [7-8].

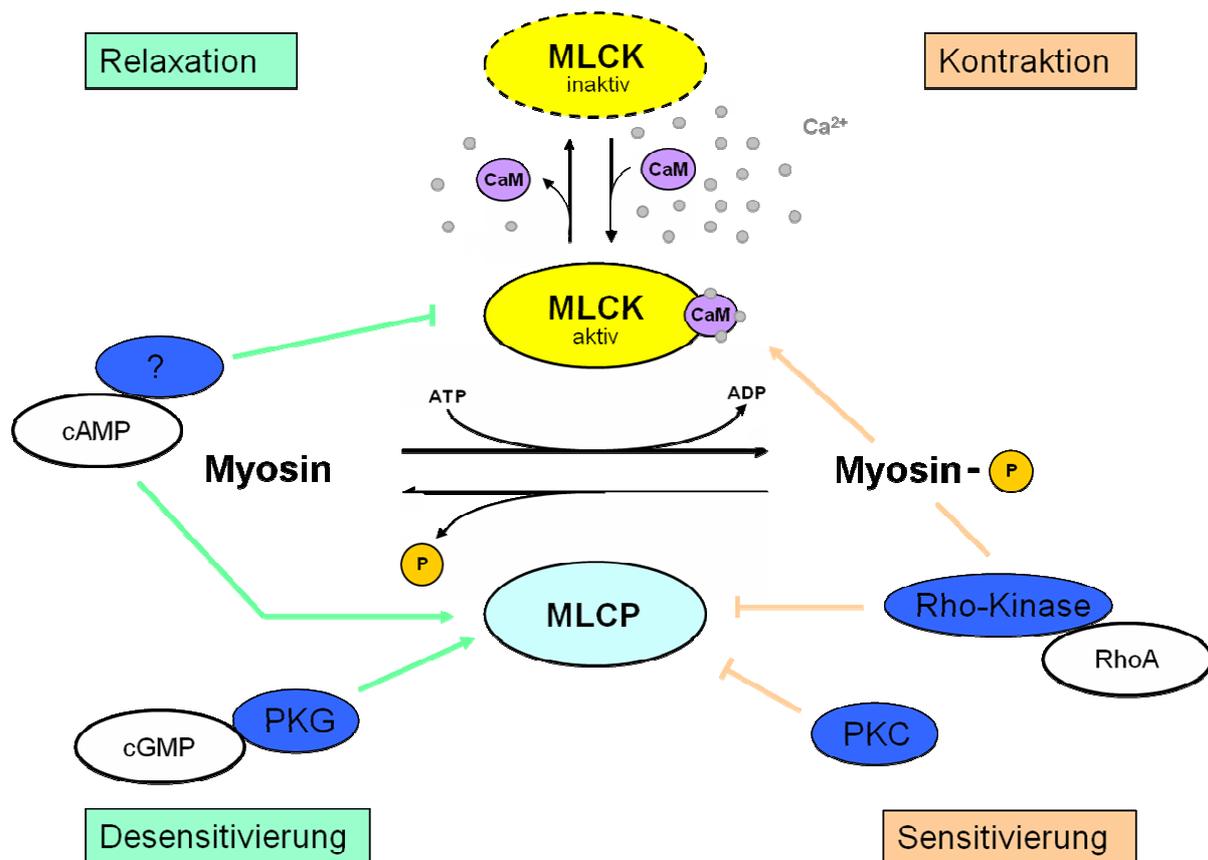


Abb 1.1: Regulation des Kontraktionszustandes der glatten Muskulatur

Kalziumionen binden bei Anstieg der zytosolischen Kalziumkonzentration an Calmodulin (CaM). Der Ca²⁺-Calmodulin-Komplex aktiviert die Myosin-leichte-Kette-Kinase (MLCK), die eine Phosphatgruppe auf die leichte Kette des Myosin überträgt. Hierdurch werden der Querbrückenzyklus und damit eine Kontraktion initiiert. Bei Abfall der Kalziumkonzentration kommt es dagegen wegen verminderter Aktivität der MLCK netto zu einer Dephosphorylierung des Myosins durch eine spezifische Myosinphosphatase (MLCP). Der glatte Gefäßmuskel relaxiert. Durch verschiedene Proteinkinasen können die MLCK und die MLCP darüber hinaus kalziumunabhängig reguliert werden. Dies wird als Desensitivierung bzw. Sensitivierung bezeichnet.

Beispielsweise führt die Bindung von Noradrenalin an α_1 -Rezeptoren von vaskulären glatten Muskelzellen zur Bildung des Second-messengers IP_3 , wodurch es zu einer Freisetzung von Kalzium aus intrazellulären Speichern des sarkoplasmatischen Retikulums und damit zu einer Vasokonstriktion kommt. Freies intrazelluläres Kalzium kann nun durch verschiedene Transportmechanismen wie die Ca^{2+} -ATPasen der Zellmembran und des sarkoplasmatischen Retikulums oder durch einen Na^+ - Ca^{2+} -Austauscher wieder aus dem Zytosol entfernt werden.

Neben diesen kalziumabhängigen Mechanismen kann der Kontraktionszustand der glatten Muskulatur zusätzlich auch durch Änderungen der Kalziumsensitivität des kontraktile Apparates reguliert werden. Dabei kommt es über externe Signale, vor allem durch die Aktivierung G-Protein gekoppelter Rezeptoren, zur Bildung von Second-messengern, die über die Aktivierung oder Hemmung verschiedener Proteinkinasen wie der Rho-Kinase oder der Proteinkinasen C und G die Aktivität der beiden Enzyme MLCK und MLCP beeinflussen können [9-16]. Eine Aktivierung der MLCK sowie eine Hemmung der MLCP bewirken dabei Kontraktionsänderungen ohne vorherige Änderungen der aktuellen Kalziumkonzentrationen, in diesem Falle also z.B. eine verstärkte Kontraktion bereits bei niedrigeren Kalziumkonzentrationen. Demgegenüber resultieren eine Hemmung der MLCK und/oder eine Aktivierung der MLCP folglich in einer Kalziumdesensitivierung mit abgeschwächter Kontraktion.

1.1.4 Beeinflussung der Kontraktion durch das Membranpotential

Ein wichtiger Mechanismus, der zu einem raschen Anstieg von $[Ca^{2+}]_i$ in den Myozyten führt, ist die Aktivierung von spannungsabhängigen Kalziumkanälen der Plasmamembran (Ca^{2+} -Kanäle vom L-Typ). Die Öffnungswahrscheinlichkeit dieser Kanäle wird vornehmlich durch das vorliegende Membranpotential der Zelle bestimmt. Bei einer Depolarisation der Zellmembran erhöht sich die Öffnungswahrscheinlichkeit der L-Typ Kalziumkanäle, wodurch es zu einem Einstrom von Kalziumionen aus dem Extrazellulärraum und damit zur Kontraktion kommt. Im Gegensatz dazu hemmt eine Hyperpolarisation der Plasmamembran einen Kalziumeinstrom über die L-Typ Kalziumkanäle, was sekundär - da in kleinen Gefäßen ständig Kalzium aus dem Zytosol der glatten Muskelzellen entfernt wird - zu einem Abfall des Kalziumspiegels und damit zur Vasorelaxation führt [17].

Das Ruhemembranpotential glatter Muskelzellen beträgt in Widerstandsgefäßen etwa -60 bis -30 mV und wird durch die unterschiedliche Durchlässigkeit der in der Plasmamembran lokalisierten Ionenkanäle bedingt [18-19]. Glatte Muskelzellen exprimieren neben den angesprochenen spannungsabhängigen Kalziumkanälen unter anderem Chloridkanäle und unspezifische, durch mechanischen Zug aktivierbare Kationenkanäle [4, 20-22]. Den Hauptanteil zur Entstehung des Ruhemembranpotentials steuern jedoch Kaliumkanäle bei, von denen sich vier übergeordnete Klassen unterscheiden lassen [23-25]:

- 1) Spannungsabhängige Kaliumkanäle (K_V -Kanäle) öffnen bei einer Depolarisation und führen durch einen Kaliumeinstrom zu einer Repolarisation des Membranpotentials.
- 2) Kalziumabhängige Kaliumkanäle werden durch die intrazelluläre Kalziumkonzentration beeinflusst und spielen vor allem bei der Aufrechterhaltung des Membranpotentials eine Rolle. Je nach Größe des Ionenstroms unterscheidet man SK_{Ca} - (small conductance), IK_{Ca} - (intermediate conductance) und BK_{Ca} (large/big conductance)-Kanäle. SK_{Ca} und IK_{Ca} -Kanäle werden allerdings vornehmlich in Endothelzellen exprimiert.
- 3) ATP-abhängige Kaliumkanäle (K_{ATP}) stellen vermutlich einen funktionellen Zusammenhang zwischen dem metabolischen Zustand der Zelle und ihrem Membranpotential her.
- 4) Einwärtsgerichtete Kaliumkanäle K_{ir} (inward rectifier) werden vor allem in glatter Muskulatur kleinerer Arterien exprimiert und tragen dort zur Stabilisierung des Membranpotentials bei.

Der elektrochemische Gradient für Kalium verursacht bei einer Öffnung der Kanäle einen vermehrten Kaliumausstrom. Der damit verbundene intrazellulären Verlust von positiver Nettoladung führt zu einer Hyperpolarisation. Ein vermehrtes "Schließen" der Kanäle hat demgegenüber eine Depolarisation der Zellmembran zur Folge [4].

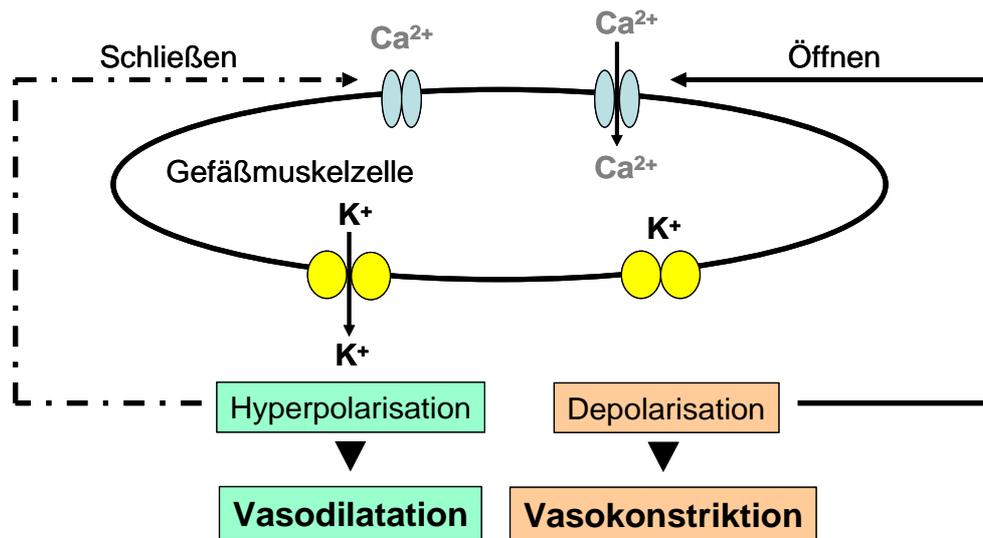


Abb. 1.2: Regulation des Membranpotentials durch Kaliumkanäle

Das Öffnen von Kaliumkanälen führt über den Verlust intrazellulärer positiver Ladung zu einer Hyperpolarisation der Membran. Hierdurch kommt es zum Schließen spannungsabhängiger Kalziumkanäle und damit zur Vasodilatation. Analog kommt es nach Blockade von Kaliumkanälen über eine Depolarisation zu einer Vasokonstriktion (modifiziert nach [4]).

Die Öffnungswahrscheinlichkeit der Kanäle wird durch eine Reihe vasoaktiver Substanzen beeinflusst. Meist kommt es dabei über die Bindung an membranständige, G-Protein-gekoppelte Rezeptoren zur Bildung von second messengern, die ihrerseits zur Aktivierung verschiedener Proteinkinasen führen, wodurch es zur Modulation von Aktivitätszustand und Eigenschaften der Kaliumkanäle kommen kann [26].

1.1.5 Endothelialer hyperpolarisierender Faktor EDHF

Ende der 80er Jahre wurde erstmals ein aus dem Endothel stammender Vasodilatator beschrieben, der seine Wirkung über eine Beeinflussung des Membranpotentials im Sinne einer Hyperpolarisation der glatten Muskulatur entfaltete und aufgrund dieser Tatsache als endothelialer hyperpolarisierender Faktor, kurz EDHF (engl.: endothelium derived hyperpolarizing factor) bezeichnet wurde [27-29]. Seine Produktion lässt sich durch Inhibitoren der NO-Synthase und der Cyclooxygenase nicht hemmen, so dass EDHF neben den bereits bekannten NO und Prostacyclin (PGI₂) inzwischen als eigenständiger Mediator (oder eigenständige Mediatorengruppe) Endothel-vermittelter Vasodilatation angesehen wird [30]. Der

Beitrag von EDHF an der Dilatation variiert dabei mit der betrachteten Spezies, dem eingesetzten Stimulus und mit der Gefäßgröße. Während EDHF in den großen Leitungsgefäßen wie der Aorta keinen Einfluss zu haben scheint, lässt sich in kleinen Arterien und Widerstandsgefäßen eine sehr ausgeprägte EDHF Antwort auf die Stimulation von muskarinergen Acetylcholinrezeptoren oder von Bradykininrezeptoren verzeichnen [31-33]. Der genaue Mechanismus der EDHF-medierten Dilatation konnte noch nicht abschließend geklärt werden. Eine Reihe von Autoren favorisiert die Existenz eines im Endothel gebildeten, diffusiblen Mediators. Die genaue chemische Natur des EDHF scheint dabei mit dem untersuchten Gefäßbett zu variieren. Vieles deutet jedoch darauf hin, dass von einer Cytochrom P450-Epoxygenase gebildete Derivate der Arachidonsäure, die Epoxy-Eicosatriensäuren (EETs) vielfach als EDHF wirken. Durch die EETs kommt es dabei zu einer Erhöhung der Öffnungswahrscheinlichkeit von calciumabhängigen Kaliumkanälen der glatten Muskelzellmembran und dadurch wie oben beschrieben zu einer Vasodilatation [34-37]. In einigen Studien erfolgte inzwischen jedoch sogar eine Abkehr von der Vorstellung, dass es sich beim EDHF zwingend um einen diffusiblen Faktor handeln müsse. Dabei könnte eine durch SK_{Ca} (small conductance K^+ -channels) und IK_{Ca} (intermediate conductance K^+ -channels) hervorgerufene Hyperpolarisation des Endothels direkt über myoendotheliale Gap Junctions auf die glatte Muskulatur übergeleitet werden [38]. Andererseits könnte es durch das aus dem Endothel in den myoendothelialen Raum ausgetretene Kalium auch zu einer Aktivierung der Na^+K^+ -ATPase und von einwärtsgerichteten Kaliumkanälen K_{ir} der Muskelzellmembran und somit zur Hyperpolarisation kommen [5, 39]. Abb. 1.3 gibt eine Übersicht über mögliche, der EDHF-Wirkung zu Grunde liegende Mechanismen.

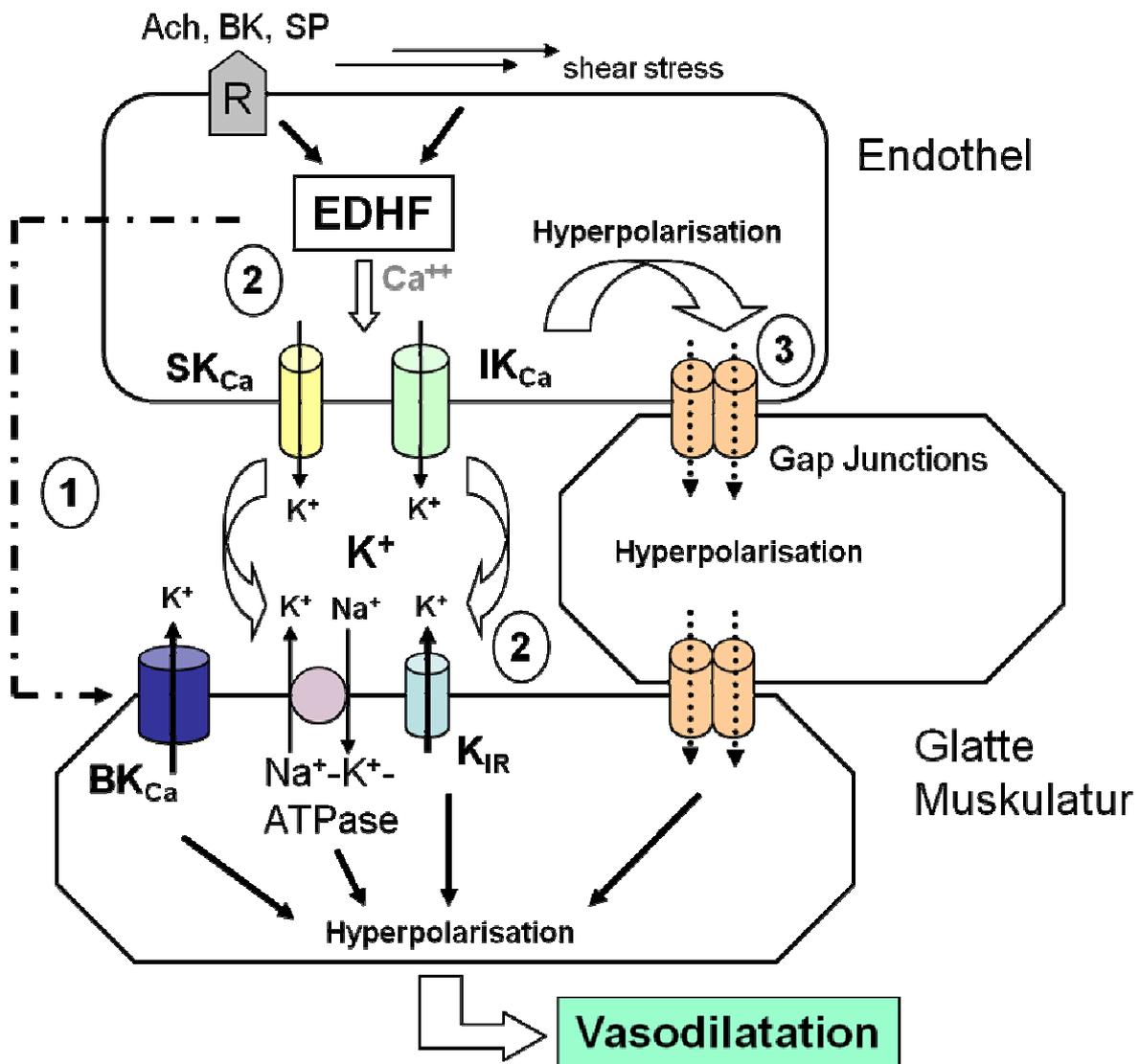


Abb. 1.3: Übersicht über mögliche Mechanismen EDHF-medierter Vasodilatation

Über Bindung von Acetylcholin (Ach), Bradykinin (BK) und Substanz P (SP) an endotheliale Rezeptoren oder shear stress vermittelt kommt es zu gesteigerter EDHF-Bildung im Endothel. EDHF kann prinzipiell über verschiedene Mechanismen zu einer Hyperpolarisation der glatten Muskulatur und damit zur Vasodilatation führen (modifiziert nach [5]):

- (1) Über Diffusion gelangt EDHF zu BK_{Ca}-Kanälen der glatten Muskulatur und aktiviert diese.
- (2) Es kommt zur autokrinen Aktivierung endothelialer SK_{Ca}- und IK_{Ca}-Kanäle. Durch den lokalen extrazellulären Kaliumanstieg werden Na-K-ATPase und K_{ir} aktiviert.
- (3) Die Hyperpolarisation des Endothels durch SK_{Ca} und IK_{Ca} wird über Gap Junctions direkt auf den glatten Muskel fortgeleitet.

1.2 Adenosinmonophosphat-abhängige Proteinkinase AMPK

1.2.1 Entdeckung einer AMP-abhängigen Proteinkinase

Mitte der 80er Jahre gelang es einer Arbeitsgruppe um Albert Ferrer erstmals das Nukleotid 5'-Adenosinmonophosphat (5'-AMP) als spezifischen allosterischen Aktivator einer Proteinkinase zu identifizieren, die bis dahin aufgrund ihrer Funktion in der Literatur nur als 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA (HMG-CoA)-Reduktase-Kinase zu finden war. Dies war die Geburtsstunde der von da an als „Adenosinmonophosphat-abhängige Proteinkinase“ oder kurz AMP-Kinase (AMPK) bezeichneten Proteinkinase [40]. Schnell wurde klar, dass sich die Funktion der AMPK jedoch nicht auf die Phosphorylierung und damit Inaktivierung der HMG-CoA-Reduktase, dem geschwindigkeitsbestimmenden Enzym der Cholesterinbiosynthese, beschränkte. Inzwischen gilt die AMPK als eines der wichtigsten Schlüsselenzyme bei der Regulation des Energiestoffwechsels.

1.2.2 Aktivierung und Regulation der AMP-Kinase

Strukturell handelt es sich bei der AMPK um eine heterotrimere Serin/Threonin-Kinase bestehend aus einer katalytischen α -Untereinheit sowie den zwei regulatorischen Untereinheiten β und γ , von denen jeweils mehrere Isoformen existieren ($\alpha_{1/2}$, $\beta_{1/2}$, $\gamma_{1/2/3}$) [41-42]. Eine Aktivierung setzt die Phosphorylierung der α -Untereinheit an der Aminosäure Thr¹⁷² voraus [43]. In der Zwischenzeit konnten verschiedene Proteinkinasen als AMP-Kinase Kinasen identifiziert werden, von denen dem LKB1-Strad-MO25-Komplex die bedeutendste Rolle zukommt [44-49]. Demgegenüber kann die AMP-Kinase durch verschiedene Protein-Phosphatasen dephosphoryliert und damit inaktiviert werden. Der Großteil der Aktivität wird dabei der PP2C α zugeschrieben [50-51].

Wie der Name bereits besagt spielt das Molekül AMP bei der Regulation des Aktivitätszustandes der AMP-Kinase eine entscheidende Rolle. Neben einer direkten allosterischen Aktivierung führen hohe AMP-Spiegel zu einer verminderten Dephosphorylierung der AMPK durch die Protein Phosphatase 2C α [52-54]. Beide Mechanismen scheinen durch hohe ATP-Konzentrationen gehemmt zu werden [55]. Auf diese Weise kann die AMPK sehr sensitiv Veränderungen des AMP/ATP-

Verhältnisses und damit des metabolischen Zustandes einer Zelle detektieren. In der Tat konnte bereits mehrfach gezeigt werden, dass die Aktivität der AMPK in Situationen mit Energiemangel wie Nahrungskarenz oder im Anschluss an körperliche Betätigung signifikant erhöht ist [56-59]. Ischämie am Herzen und Hypoxie konnten als pathophysiologische Aktivatoren der AMPK identifiziert werden [60-62].

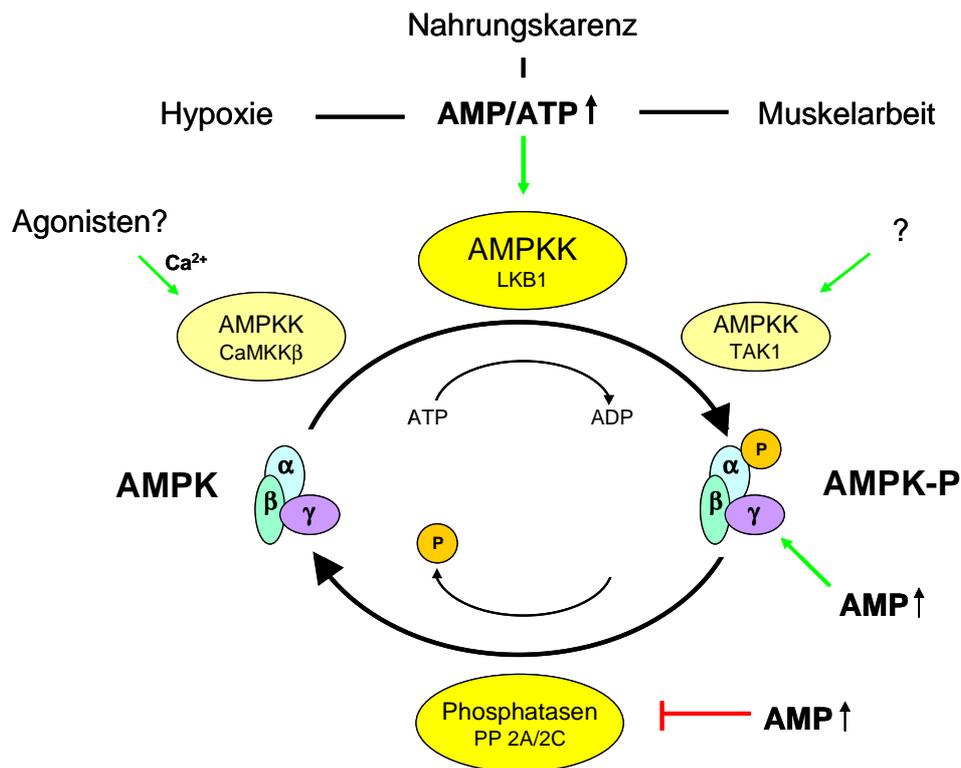


Abb. 1.4: Aktivierung und Regulation der AMP-Kinase

Über sogenannte AMP-Kinase Kinasen (AMPKK) wie die LKB1, die Kalzium-Calmodulin-Kinase β (CaMKK β) oder die transforming-growth-factor β aktivierte Kinase 1 (TAK1) kommt es zur Phosphorylierung und damit Aktivierung der AMPK. Die Dephosphorylierung erfolgt größtenteils durch die Proteinphosphatase 2A/2C. Hohe intrazelluläre AMP-Spiegel führen neben einer allosterischen Aktivierung der AMPK zu einer verminderten Dephosphorylierung.

In den letzten Jahren wurde eine Reihe von Aktivatoren der AMP-Kinase entdeckt, die zur pharmakologischen Aktivierung der AMPK Verwendung finden und sich somit bei der Erforschung und der Entschlüsselung AMPK medierter Funktionen als große Hilfe erweisen. Die erste Substanz die hierbei zum Einsatz kam war das 5-Aminoimidazol-4-Carboxamide Ribonucleosid, kurz AICAR, dessen Metabolite aufgrund Strukturhomologie zum AMP dessen Effekte bei der Aktivierung der AMP-Kinase nachahmen ohne dabei jedoch den zellulären Adenosinnukleotidhaushalt der Zelle zu stören [63-64]. Desweiteren konnte unlängst gezeigt werden, das Metformin,

der Hauptvertreter der bereits seit vielen Jahren in der Therapie des Diabetes mellitus Typ 2 eingesetzten Biguanide neben einer Reihe weiterer Antidiabetika vom Typ der Glitazone, eine Vielzahl seiner Wirkungen ebenfalls über eine Aktivierung der AMP-Kinase entfaltet [65]. Auf der Suche nach neuen spezifischen Aktivatoren wurde 2004 zudem erstmals in einem breit angelegten Screening an über 700000 Wirkstoffen eine neue Substanzklasse, die Thienopyridon-Familie identifiziert. Als potentester Aktivator der AMP-Kinase stellte sich hierbei ein als A769662 (A76) bezeichneter Agonist heraus, der an gereinigter Rattenleber zu einer deutlich stärkeren AMPK-Aktivierung führte als AMP [66-67].

1.2.3 Funktionen der AMP-Kinase

Die AMPK ist eines der wichtigsten Schlüsselenzyme bei der Regulation des Energiestoffwechsels. Wie bereits geschildert wird die AMPK in Situationen mit erhöhtem ATP-Verbrauch oder vermindertem ATP-Angebot aktiviert. Zur Schonung und Wiederherstellung der zellulären Energiereserven bewirkt die AMPK eine Umstellung von anabolen zu katabolen Stoffwechselwegen vor allem im Glucose- und Fettstoffwechsel.

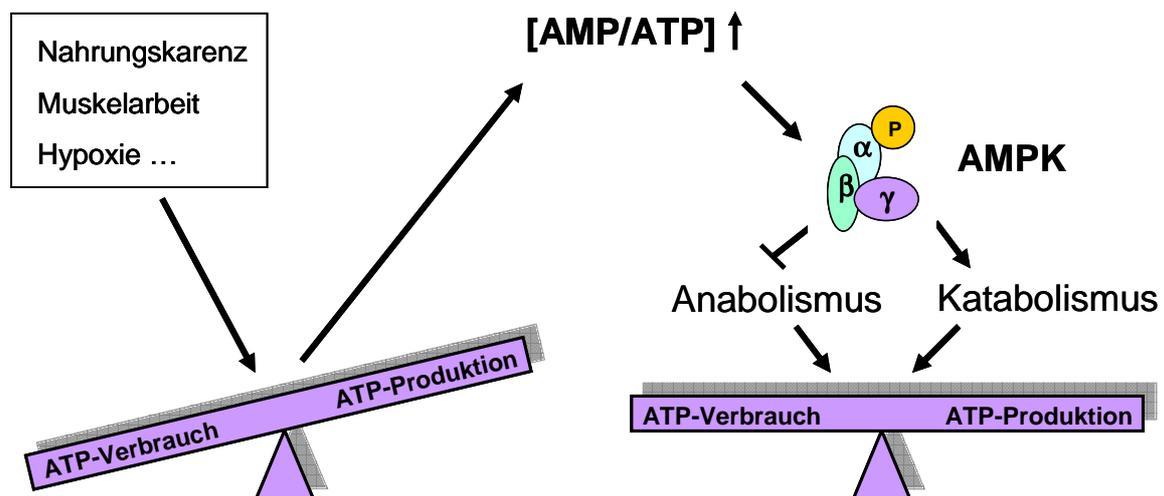


Abb. 1.5: Die AMPK als Schlüsselenzym der zellulären Energiebalance

In Situationen mit gesteigertem ATP-Verbrauch kommt es über einen Anstieg der AMP/ATP-Ratio zu einer Aktivierung der AMPK. Diese bewirkt über eine Hemmung anaboler Stoffwechselwege bei gleichzeitiger Aktivierung ATP-bereitstellender Stoffwechselwege eine Regenerierung der zellulären Energiedepots.

Dies gelingt zum Einen über eine Inaktivierung von Enzymen, die bei ATP-verbrauchenden Prozessen wie Fettsäure-, Cholesterinsynthese und Glukoneogenese eine Rolle spielen und zum Anderen über eine Aktivierung solcher Stoffwechselwege, die der Energiebereitstellung dienen, wie Glykolyse, Fettsäureoxidation oder Glucoseaufnahme in die Zelle [68-71]. Nach neueren Erkenntnissen beschränkt sich die Funktion der AMPK im Energiestoffwechsel aber nicht allein auf die zelluläre Ebene. Demnach trägt die AMPK auch beispielsweise über die Regulation des Hungergefühls im Hypothalamus entscheidend zur Steuerung der Nahrungsaufnahme und damit zur metabolischen Homöostase des gesamten Organismus bei [72-73]. Aufgrund der herausragenden Bedeutung der AMPK im Energiestoffwechsel wurde sogar bereits vorgeschlagen die AMPK in *Proteinkinase E* für „energy“ umzubenennen [74].

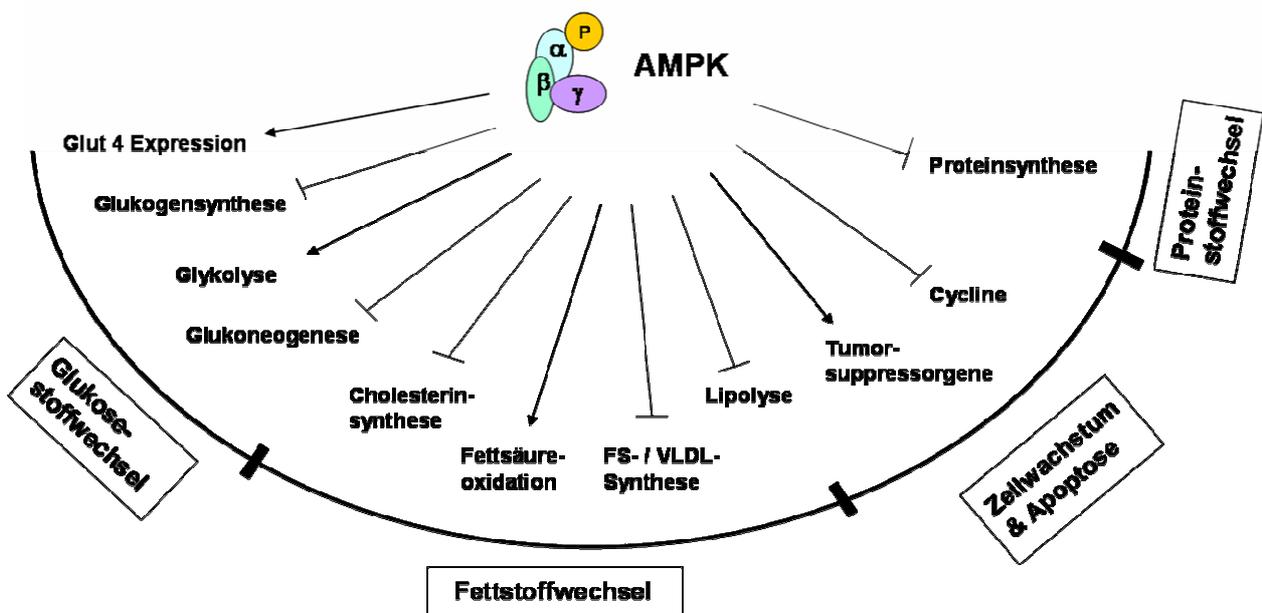


Abb. 1.6: Übersicht über wichtige Funktionen der AMPK

Hemmung ATP-verbrauchender und Aktivierung ATP-erzeugender Prozesse durch die AMPK vor allem im Glukose- und Fettstoffwechsel. Zudem beeinflusst die AMPK über Regulation von Tumorsuppressorgenen und Cyclinen das Zellwachstum.

1.3 Fragestellung und Ziele der Arbeit

Wie beschrieben ist die AMPK eines der wichtigsten Schlüsselenzyme wenn es darum geht, Stoffwechselfvorgänge längerfristig auf den zellulären Energiebedarf abzustimmen. Diese Aufgabe erfordert bekanntermaßen eine bedarfsadaptierte Anpassung der lokalen Durchblutung.

Das übergeordnete Ziel dieser Arbeit war es deshalb herauszufinden, ob die AMPK hierbei als eine Art Schnittstelle im Sinne einer direkten Beeinflussung des Vasotonus auf Höhe der Widerstandsgefäße in der Muskulatur dienen kann.

Im Einzelnen wurde deshalb zunächst folgende zentrale Frage untersucht:

- *Kommt es durch eine Aktivierung der AMPK mithilfe verschiedener Agonisten zu einer relevanten Vasodilatation von Widerstandsgefäßen?*

Nach Beantwortung dieser Frage wurden im folgenden Teil der Arbeit mögliche zugrunde liegende Mechanismen untersucht:

- *Spielt bei der AMPK-vermittelten Dilatation das intakte Endothel eine Rolle oder handelt es sich um glattmuskuläre Effekte?*
- *Ist eine Beteiligung des EDHF nachweisbar?*
- *Inwieweit sind Kaliumkanäle in die durch AMPK vermittelte Dilatation involviert?*
- *Ist der Mechanismus der Kalziumdesensitivierung für die AMPK vermittelte Dilatation von Bedeutung?*

2 Material und Methoden

2.1 Lösungen und Chemikalien

2.1.1 Pufferlösungen

Standard-MOPS-Puffer

Aqua dest			<p>Zugabe von CaCl_2 erst nach Lösen aller anderen Inhaltsstoffe zur Vermeidung eines unlöslichen Komplexes mit NaH_2PO_4.</p> <p>Einstellung des pH auf 7,4 mit Hilfe einer pH-Elektrode durch Zugabe von 1 N NaOH.</p> <p>Sterilfiltration und Abfüllung in autoklavierte Flaschen.</p> <p>Lagerung: maximal 6 Wochen bei 4°C.</p>
$\text{CaCl}_2(2\text{H}_2\text{O})$	3,0	mM	
EDTA	0,02	mM	
Glucose	5,0	mM	
KCl	4,7	mM	
$\text{MgSO}_4(7\text{H}_2\text{O})$	1,17	mM	
MOPS	3,0	mM	
NaCl	145	mM	
$\text{NaH}_2\text{PO}_4(1\text{H}_2\text{O})$	1,2	mM	
NaPyruvat	2,0	mM	

Fura2-AM-Inkubationslösung

Aqua dest			<p>Lagerung: Fura2-AM als 1mM Stamm-lösung in DMSO, aliquotiert bei -20°C.</p> <p>Das hierzu verwendete DMSO hatte in der vorliegenden Verdünnung von 1:500 in der Inkubationslösung nach Auswaschen keinen Einfluss auf die endotheliale oder glattmuskuläre Funktion der untersuchten Widerstandsarterien.</p>
$\text{CaCl}_2(2\text{H}_2\text{O})$	3,0	mM	
EDTA	0,02	mM	
Fura2-AM	2	μM	
Glucose	5,0	mM	
KCl	4,7	mM	
$\text{MgSO}_4(7\text{H}_2\text{O})$	1,17	mM	
MOPS	3,0	mM	
NaCl	145	mM	
$\text{NaH}_2\text{PO}_4(1\text{H}_2\text{O})$	1,2	mM	
NaPyruvat	2,0	mM	

Lysepuffer – Proteingewinnung

EDTA (pH 8,0)	1	mM
KH ₂ PO ₄	18	mM
Leupeptin	1	µg/ml
NaF	50	mM
Na ₄ P ₂ O ₇ (10H ₂ O)	40	mM
Na ₃ VO ₄ (pH 7,5)	1	mM
Pepstatin	1	µg/ml

Auftragspuffer – Western Blot

Bromophenol blau	0,02	%
Glycerin	40	%
β-Mercaptoethanol	400	mM
SDS	8	%
TRIS (pH 6,8)	250	mM

Polyacrylamid-Trenngel 10% – Western Blot

Acrylamid/Bisacrylamid 30%/0,8% (w/v)	33	%
APS	0,05	%
SDS	0,1	%
TEMED	0,05	%
TRIS (pH 8,8)	375	mM

Elektrophoresepuffer – Western Blot

Glycin	960	mM
SDS	0,5	%
TRIS	124	mM

Transferpuffer – Western Blot

Glycin	39	mM
Methanol	10	%

SDS	0,037	%
TRIS	48	mM

TBS-T-Puffer (pH 7,5) – Western Blot

NaCl	150	mM
TRIS	50	mM
Tween 20 (Polysorbat 20)	0,1	%

2.1.2 Leibovitz L-15 Kulturmedium

Leibovitz L-15 (s.a. [75]):

CaCl ₂	139,6	mg/l	L-Leucin	125	mg/l
KCl	400	mg/l	L-Lysin	93,7	mg/l
KH ₂ PO ₄	60	mg/l	L-Methionin	75	mg/l
MgCl ₂	93,66	mg/l	L-Phenylalanin	125	mg/l
MgSO ₄	97,67	mg/l	L-Serin	200	mg/l
NaCl	8000	mg/l	L-Threonin	300	mg/l
Na ₂ HPO ₄	190	mg/l	L-Tryptophan	20	mg/l
D(+)-Galaktose	900	mg/l	L-Tyrosin	300	mg/l
Phenolrot (pH-Indikat.)	11	mg/l	L-Valin	100	mg/l
Na-Pyruvat	550	mg/l	D,L-Ca Pantothenat	1	mg/l
L-Alanin	225	mg/l	Cholinchlorid	1	mg/l
L-Arginin (freie Base)	500	mg/l	Folsäure	1	mg/l
L-Asparagin	250	mg/l	myo-Inositol	2	mg/l
L-Cystein (freie Base)	120	mg/l	Nikotinamid	1 l	mg/l
L-Glutamin	300	mg/l	Pyridoxal HCl	1	mg/l
L-Glycin	200	mg/l	Flavinmononucleotid-Na	0,1	mg/l
L-Histidin (freie Base)	250	mg/l	Thiaminmonophosphat	1	mg/l
L-Isoleucin	125	mg/l			

Das Medium wurde als Pulver geliefert, in bidestilliertem Wasser gelöst, sterilfiltriert und bei 4°C gelagert. An den Versuchstagen wurde diesem Stammmedium 15% hitzeinaktiviertes (50min bei 56-58°C) Kälberserum, 20000 U/l Penicillin, 20 mg/l

Streptomycin und 0,4 $\mu\text{M/l}$ L-Glutamin zugesetzt, der pH-Wert durch Zugabe von HCl auf 7,4 eingestellt und das auf diese Weise hergestellte Kulturmedium erneut sterilfiltriert.

2.1.3 Vorbereitung der Agonisten und Inhibitoren

Alle Agonisten und Inhibitoren wurden, sofern nicht anders angegeben, jeweils erst unmittelbar vor Versuchsbeginn aus Stammlösungen in Standard-MOPS Puffer auf die benötigten Konzentrationen verdünnt und in das Organbad zugegeben.

Substanz	Stammlösung	Lagerung
A 769662	100mM in DMSO	4°C
Acetylcholin	10mM in Aqua dest	-20°C
AICAR	10mM in Standard-MOPS-Puffer	-20°C
Charybdotoxin	1mM in Aqua dest	-20°C
Glibenclamid	10mM in DMSO	-20°C
Iberiotoxin	0,1mM in Aqua dest	-20°C
	Zur Inkubation wurde Iberiotoxin in Standard-MOPS-Puffer mit 0,1% BSA verdünnt.	
Indomethacin	100mM in Ethanol	-20°C
	Das Ethanol hatte in der vorliegenden Verdünnung von 1:3000 keinen Einfluss auf die in der Arbeit untersuchten Parameter	
Metformin	100mM in Aqua dest	-20°C
L-NAME	10mM in Standard-MOPS-Puffer	-20°C
Noradrenalin	Ausgangssubstanz: 1mg Norepinephrin / ml	4°C
Ouabain	10mM in Aqua dest	-20°C

2.1.4 Chemikalien und Medikamente

Substanz	Bezugsquelle
A 769662 (A76)	Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Grahame Hardie, Division of Molecular Physiology, University of

	Dundee, Scotland (Eigensynthese durch das Labor)
Acetylcholin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Acrylamid/Bisacrylamid	Genaxxon Bioscience, Ulm
AICAR	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ammoniumpersulfat APS	AppliChem, Darmstadt
Aqua dest (ad injectabilia)	Braun, Melsungen
BCA TM Protein Assay Reagent A/B	Perbio (Thermo Fisher Scientific Germany), Bonn
Bovines Serumalbumin BSA	Boehringer, Mannheim
Bromophenol blau	Sigma-Aldrich, Steinheim
CaCl ₂	AppliChem, Darmstadt
Chemilumineszenz Kit für HRP (horse radish peroxidase)	AppliChem, Darmstadt
Charybdotoxin	Sigma-Aldrich, Steinheim
DMSO (wasserfrei)	AppliChem, Darmstadt
EDTA	AppliChem, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Fura2-AM	Molecular Probes, Vertrieb durch Mo Bi Tec, Göttingen
Glibenclamid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Glucose	AppliChem, Darmstadt
(L-) Glutamin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Glycerin	AppliChem, Darmstadt
Glycin	AppliChem, Darmstadt
Iberiotoxin	Bachem, Weil am Rhein
Indomethacin	Fluka, Vertrieb durch Sigma-Aldrich, Steinheim
Kälberserum (fetales)	Sigma-Aldrich, Steinheim
KCl	AppliChem, Darmstadt
KH ₂ PO ₄	AppliChem, Darmstadt
Leibovitz L-15	Sigma-Aldrich, Steinheim
Leupeptin	AppliChem, Darmstadt
L-NAME	Sigma-Aldrich, Steinheim
Metformin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Methanol	AppliChem, Darmstadt
MgSO ₄	AppliChem, Darmstadt
MnCl ₂	Merck, Darmstadt
MOPS	AppliChem, Darmstadt
NaCl	AppliChem, Darmstadt

NaF	Merck, Darmstadt
NaH ₂ PO ₄	AppliChem, Darmstadt
NaOH	Merck, Darmstadt
Na ₄ P ₂ O ₇	AppliChem, Darmstadt
NaPyruvat:	Sigma-Aldrich, Steinheim
Na ₃ VO ₄	Alexis Corporation, Lausen (Schweiz)
Noradrenalin	Arterenol [®] , Aventis, Frankfurt a. Main
Ouabain	Sigma-Aldrich, Steinheim
Penicillin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Pentobarbital-Natrium	Narcoren [®] , Rhone Merieux, Laupheim
Pepstatin	AppliChem, Darmstadt
Proteingößenmarker für Western Blot	Spectra Multicolor High Range Protein Ladder # SM1851 (43-300kD) / #SM0671 (10-170kD) Fermentas Life Sciences, St. Leon-Rot
Sodium dodecylsulfat SDS	AppliChem, Darmstadt
Streptomycin	Sigma-Aldrich, Steinheim
TEMED	AppliChem, Darmstadt
Transfektionskit	Effectene [®] , Qiagen, Hilden
TRIS	AppliChem, Darmstadt
Tween 20	AppliChem, Darmstadt
β-Mercaptoethanol	AppliChem, Darmstadt

2.1.5 Antikörper und Plasmide

Antikörper

Antigen	MW	Isotyp	Verdünnung	Bezugsquelle
AMPK α ₁	62 kDa	Kaninchen monoklonal, IgG	1:500	Freundlicherweise erhalten von B. Fisslthaler, Universität Frankfurt a. Main
AMPK α ₂	62 kDa	Kaninchen monoklonal, IgG	1:1000-1:500	Freundlicherweise erhalten von B. Fisslthaler, Universität Frankfurt a. Main
AMPK β ₁ / β ₂	34/38 kDa	Kaninchen, monoklonal IgG	1:500	Cell signaling (57C12), Vertrieb durch New England Biolabs, Frankfurt a. Main

Plasmide

AMPK α_1 (konstitutiv aktiv)	Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Graham Hardie, Division of Molecular Physiology, University of Dundee, Scotland (Eigene Herstellung durch das Labor)
AMPK α_1 (dominant negativ)	

2.2 Präparation und Kanülierung der Widerstandsgefäße

2.2.1 Präparation der Gefäße

Männliche Syrische Goldhamster (Körpergewicht: ca. 90-140g, Bezugsquelle s. 2.8) wurden zunächst durch intraperitoneale Injektion von 50mg/kg Körpergewicht Pentobarbital-Natrium getötet. Das Versuchstier wurde von der Körpermitte abwärts mit einem elektrischen Kleintierrasierer (s. 2.8) gründlich rasiert, um einer Kontamination durch die keimhaltigen Tierhaare vorzubeugen. Anschließend wurde der Hamster in Rückenlage auf einem eigens von der Institutswerkstatt angefertigten Präparationstisch mit abduzierten Hinterläufen fixiert, die Haut mit einem Flächendesinfektionsmittel (s. 2.8) desinfiziert und das Präparationsgebiet großzügig mit Inzisionsklebefolie (s. 2.8) abgeklebt. Während der gesamten folgenden Präparation wurde das Präparationsgebiet mit gekühltem (4°C) Standard-MOPS-Puffer (s. 2.1.1) mit 10-20ml/h superfundiert, um ein Austrocknen des Gewebes zu vermeiden. Nach Entfernung der Haut wurde das darunter liegende Fettgewebe nach lateral abpräpariert, bis die Oberschenkelmuskulatur freilag. Unter einem Präparationsmikroskop (s. 2.8) wurde nun mit Hilfe von mikrochirurgischen Instrumenten (s. 2.8) die Sehne des *M. gracilis* nahe ihres Ursprungs durchtrennt und der Muskel vorsichtig nach distal vom darunterliegenden *M. quadriceps femoris* gelöst, ohne dabei das Gefäßbett der *A. femoralis* zu schädigen.

Für die Experimente wurden die den *M. gracilis* und die Adduktoren versorgenden Äste (2. oder 3. Generation) der *A. femoralis* verwendet. Dazu musste ein Gefäßsegment von 2-3 mm Länge aufgesucht werden, das in seinem Verlauf keine Abgänge aufweisen durfte. Die parallel verlaufende Vene wurde dabei je nach Gefäßverlauf nur von der Arterie separiert, zumeist jedoch mit einem chirurgischen Faden 9-0 (s. 2.8) doppelt ligiert und entfernt und daraufhin die frei liegende Arterie in hoher Vergrößerung (30-40fach) mit größter Sorgfalt unter Vermeidung jeder mechanischer Schädigung von dem sie umgebenden Bindegewebe befreit und schließlich exzidiert.

Auf diese Weise gewonnene Gefäßsegmente (Länge 2-3mm, durchschnittliche Durchmesser s. 3.1) wurden entweder sofort kanüliert (s. 2.2.2) oder zunächst für maximal 24 Stunden bei 4°C in Standard-MOPS-Puffer aufbewahrt und anschließend erst zur Kanülierung weiterverwendet. In systematischen Vorversuchen früherer

Arbeiten hatte sich gezeigt, dass die Widerstandsgefäße durch diese Vorgehensweise in ihrem physiologischen Verhalten nicht verändert wurden.

2.2.2 Kanülierung der Gefäße

Die Kanülierung im mit Standard-MOPS gefüllten Organbad (s. 2.8) erfolgte an einem speziellen von der Institutswerkstatt angefertigten Set up (s. Abb. 2.1). Glasmikropipetten (s. 2.8), die auf Mikromanipulatoren (s. 2.8) montiert werden konnten, ermöglichten eine präzise Manövrierung der Pipettenspitze in allen drei Raumbenen des Organbades. Das stumpfe Ende der Pipette war über einen dünnen Silikonschlauch (s. 2.8) mit einem Dreiwegehahn (s. 2.8) verbunden. Ein in ca. 60cm Höhe angebrachtes mit Badlösung gefülltes Reservoir wurde mittels Perfusorleitung (s. 2.8) nun ebenfalls mit dem Dreiwegehahn verbunden und somit im distal verschlossenen Gefäßsegment ein hydrostatischer Druck von 45mmHg erzeugt.

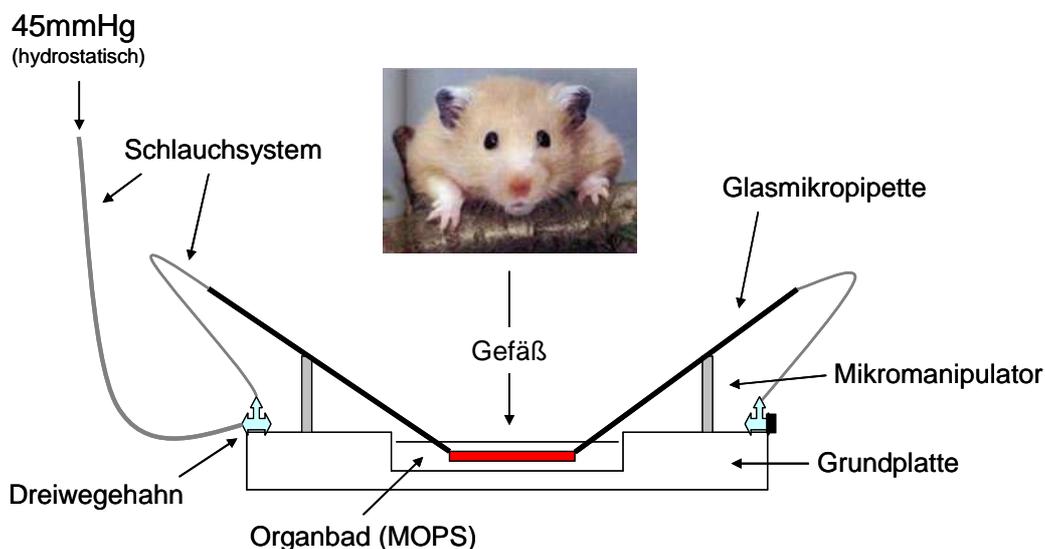


Abb. 2.1: Schematischer Aufbau eines Mess-Set-ups

Zwei Mikromanipulatoren ermöglichten die freie Manövrierung der Mikropipetten in allen drei Raumbenen des im Zentrum der Platte eingelassenen Organbades. Durch ein halboffenes Schlauchsystem (distaler Dreiwegehahn verschlossen) wurde ein hydrostatischer Druck von 45mmHg über dem Gefäß erzeugt.

Nach erfolgter Entlüftung des Systems wurde nun zunächst die eine Seite des Gefäßes vorsichtig mit feinen Pinzetten auf die Pipette aufgezogen und mit chirurgischem Faden 11-0 (s. 2.8) durch einen doppelten Knoten fixiert. Das noch im Gefäß befindliche Blut wurde heraus gespült, wobei gleichzeitig vorher eventuell nicht entdeckte kleine Gefäßabgänge oder Leckagen durch seitlichen Blutaustritt detektiert werden konnten. In diesem Fall musste das Gefäß entweder gekürzt oder verworfen werden. Die zweite Seite des Gefäßes wurde entsprechend auf die gegenüberliegende Mikropipette aufgezogen und fixiert, so dass das Gefäß ca. 1 mm oberhalb des UV-durchlässigen gläsernen Bodens des Organbades aufgezogen war. Mit Hilfe der Mikromanipulatoren konnte das durch seine Eigenelastizität retrahierte Gefäß wieder auf seine in-situ Länge gedehnt werden.

2.3 Messung der intrazellulären Kalziumkonzentration

2.3.1 Funktionsprinzip der fluoreszenzmikroskopischen Kalziummessung

Zur Messung der intrazellulären Konzentration von freiem Kalzium [Ca^{2+}]_i wurde eine erstmals von Grynkiewicz et al [2] beschriebene Methode verwendet. Diese bedient sich des kalziumsensitiven Fluoreszenzfarbstoffs Fura2. Der als Ausgangssubstanz verwendete Fura2-Acetoxy-methylester diffundiert als lipophiler Ester frei durch die Zellmembran. In der Zelle wird durch unspezifische Esterasen die hydrophile und damit impermeable Säure Fura2 abgespalten, wodurch es zu einer intrazellulären Akkumulation kommt. Fura2 besitzt vier Carboxylgruppen, die als Chelatbindungsstellen mit hoher Affinität und Spezifität für Kalzium dienen.

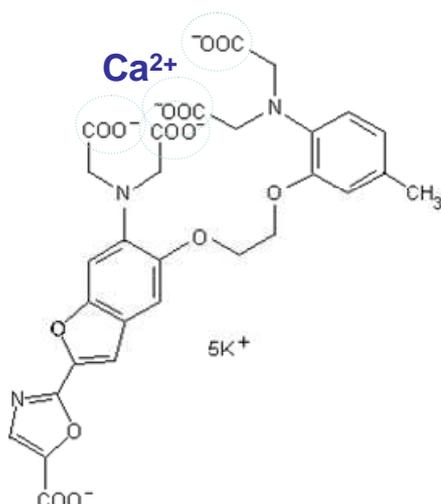


Abb. 2.2: Strukturformel der Säure Fura2

Das Fura2 Molekül ist so aufgebaut, dass die 4 Carboxylgruppen einen Hohlraum bilden, in den genau ein Ca^{2+} -Ion hineinpasst. Es ergibt sich somit ein stöchiometrisches Bindungsverhältnis von 1:1 [1-3].

Durch Kalziumbindung kommt es zu einer Veränderung im Energieniveau des Moleküls und damit zu einem geänderten Absorptionsverhalten. Das Absorptionsmaximum wird dabei zu kürzeren Anregungswellenlängen hin verschoben. Bei hoher Kalziumsättigung des Farbstoffes führt somit eine Anregung mit UV-Licht der Wellenlänge $\lambda_A=340\text{nm}$ zu einer maximalen Fluoreszenz, während in kalziumfreier Lösung ein Emissionsmaximum bei Anregung mit $\lambda_A=380\text{nm}$ erreicht wird [76]. Die Lichtemission erfolgt jeweils mit einer Wellenlänge von $\lambda_E=510\text{nm}$.

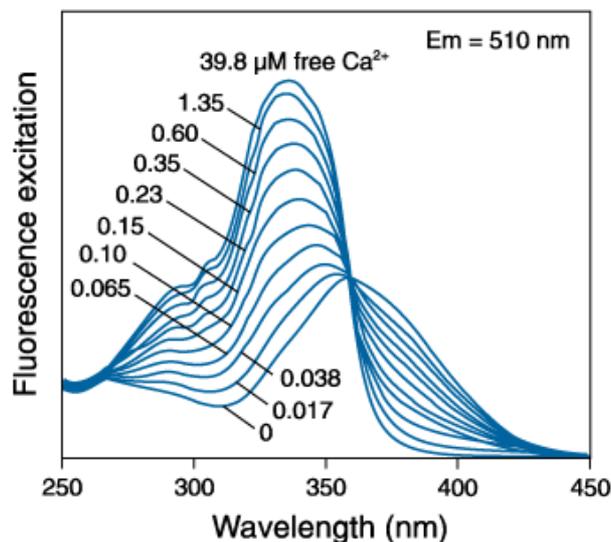


Abb. 2.3: Emissionsspektrum von Fura2

Das Emissionsspektrum von Fura2 variiert in Abhängigkeit von der freien Kalziumkonzentration und der Anregungswellenlänge. Durch Kalziumbindung erfolgt eine Verschiebung des Absorptionsmaximums mit maximaler Emission hin zu kürzeren Anregungswellenlängen (übernommen aus dem Produktinformationsblatt der Fa. Molecular Probes).

Die gemessenen absoluten Emissionsintensitäten für eine bestimmte Anregungswellenlänge hängen jedoch nicht nur von der Konzentration an freiem Kalzium ab, sondern auch von schwer beeinflussbaren Größen, wie der mit der Zeit abnehmenden intrazellulären Fura2-Konzentration, der Bleichung des Farbstoffes, der in der „region of interest“ detektierbaren Zellzahl oder dem durch Dilatation und Konstriktion des Gefäßes variierenden Abstand zur Fokusebene. Da es durch derartige Artefakte jedoch in der Regel zu gleichsinnigen Verschiebungen der Emissionsintensitäten bei unterschiedlichen Anregungswellenlängen kommt, können sie bei Division vernachlässigt werden [77]. Betrachtet man also das Verhältnis zweier Fluoreszenzintensitäten, so hängt die Ratio R ($F_{340\text{nm}}/F_{380\text{nm}}$) allein von der intrazellulären Kalziumkonzentration ab.

Im zellfreien System lässt sich eine beliebige Ratio in absolute Kalziumkonzentrationen umrechnen. Hierfür benötigt man zum einen die Ratios zweier genau definierter Kalziumkonzentrationen bei minimaler und maximaler Farbstoffsättigung und zum anderen die Dissoziationskonstante K_d von Fura2 bezüglich Kalziums [2]. Mehrere Arbeitsgruppen konnten jedoch zeigen, dass in biologischen Systemen die Ratiomessungen unter kalziumfreier Lösung zwar gut reproduzierbar sind, nicht jedoch die absoluten Ratiowerte unter hoher Farbstoffsättigung [77-78]. Die für die Umrechnung erforderliche Dissoziationskonstante K_d für Ca^{2+} von Fura2 hätte zudem für die hier vorliegenden isolierten Widerstandsgefäße erst bestimmt werden müssen, da auch diese von verschiedenen Einflussfaktoren abhängt [79]. Für die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Fragestellungen waren die absoluten Kalziumkonzentrationen jedoch ohnehin nicht von übergeordnetem Interesse. Auf die Umrechnung in Absolutwerte wurde daher verzichtet und stattdessen jeweils die Veränderung der Ratio als Maß für qualitative Änderungen im intrazellulären Kalziumspiegel gewertet.

Zur Artefaktminimierung wurde die zum Teil erheblich variierende Autofluoreszenz der Skelettmuskelarterien jeweils am Ende des Versuches bestimmt und von der gemessenen Effluoreszenz subtrahiert [80]. Hierzu wurden die Fluoreszenzeigenschaften des intrazellulären Fura-2 durch Zugabe von MnCl_2 (8mM) aufgehoben („gequencht“) und die um die Autofluoreszenz bereinigte Ratio wie folgt berechnet:

$$R = (F_{340\text{nm}} - A_{340\text{nm}}) / (F_{380\text{nm}} - A_{380\text{nm}})$$

R: bereinigte Ratio

$F_{340\text{nm}}$, $F_{380\text{nm}}$: gemessene Fluoreszenzintensitäten bei Anregung mit den Wellenlängen 340 bzw. 380nm

$A_{340\text{nm}}$, $A_{380\text{nm}}$: gemessene Autofluoreszenzen bei Anregung mit den Wellenlängen 340 bzw. 380nm 10 Minuten nach Zugabe von MnCl_2 (8mM)

Alle in die Auswertung eingegangenen Daten beziehen sich auf solchermaßen bereinigte Ratios.

2.3.2 Beladung der Gefäße mit Fura2

Zum Beladen der Gefäße mit Fura-2-AM wurde das zwischen den Pipettenspitzen aufgezogene Gefäß nun mitsamt der Messapparatur zum Kalziummessplatz transferiert. Dort wurde wie oben beschrieben ein hydrostatischer Druck von 45mmHg aufgebaut und das Organbad auf dem beheizbaren Objektisch eines inversen Mikroskops (s. 2.8) langsam auf 37°C erwärmt. Anschließend erfolgte die Inkubation des Gefäßes über insgesamt zwei Stunden in 3ml Fura-2-AM-Inkubationslösung (s. 2.1.1). Nach der ersten Stunde wurde mit einer Pipette 1ml aus dem Organbad entnommen und 2ml Inkubationslösung zugegeben, um Flüssigkeitsverluste durch Verdunstung auszugleichen. Zum Schutz des Farbstoffes vor Ausbleichung erfolgten die gesamte Inkubation sowie alle weiteren Schritte der Messung im abgedunkelten Versuchslabor. Nach Ende der Inkubationszeit wurde das Organbad insgesamt zweimal mit Standard-MOPS-Puffer gespült, um sämtliche extrazellulär verbliebenen Reste des Fura2-Methylesters zu entfernen.

Durch die Art der Beladung der Gefäße von abluminal wurde eine Beladung der Gefäßmuskulatur gefördert, aber gleichzeitig eine Beladung des Endothels größtenteils verhindert [37], so dass eventuell gegensinnige Kalziumveränderungen der Endothelzellen nur zu einer vernachlässigbaren Beeinflussung des Kalziumsignals führen konnten. Damit spiegeln Veränderungen der Fluoreszenzratio nahezu ausschließlich Änderungen im Kalziumspiegel der glatten Gefäßmuskelzellen wieder.

2.3.3 Aufbau des Kalziummessplatzes

Für die Messung des intrazellulären freien Kalziums wurde das Messsystem „Delta Scan“ der Firma PTI, Wedel verwendet. Durch eine 75W Xenonlampe wurde dabei Licht mit einem hohen UV-Anteil erzeugt und auf eine rotierende ($f = 50\text{Hz}$) Spiegelsektorenscheibe („Chopper-Wheel“) geleitet. Je nach Stellung der Scheibe passierte das Licht einen freien Sektor und traf direkt auf den ersten Monochromator (380nm) oder wurde von einem Spiegelsegment zu einem Umlenkspiegel geleitet und von dort zu einem zweiten Monochromator (340nm) reflektiert. Über zwei Quarzlichtleiter gelangte das monochromatische Licht in den Strahlengang eines invertierten Mikroskops (s. 2.8) und durch ein spezielles UV-durchlässiges Objektiv

(s. 2.8) zum Gefäß. Das durch die Anregung des Fura-Kalzium-Komplexes emittierte Licht der Wellenlänge 510nm fiel über das Objektiv zurück und wurde mit Hilfe eines dichroitischen Teilerspiegels über einen Beobachtungs- und Messtunnel zu einem analogen Photomultiplier geleitet. Ein spezieller, zwischengeschalteter Bandpassfilter sorgte dafür, dass nur das emittierte Licht der Wellenlänge 510nm, nicht aber das Anregungslicht vom Photomultiplier detektiert werden konnte. Das elektrische Signal des Photomultipliers wurde in einer Byte Box zunächst digitalisiert und dann auf einem Computer mit der kommerziell erhältlichen Software Felix 32[®] (s. 2.8) ausgewertet. Dabei wurden jeweils 5 Messwerte pro Sekunde aufgezeichnet, der entsprechenden Anregungswellenlänge zeitlich zugeordnet sowie die entsprechende Ratio ($R = F_{340nm} / F_{380nm}$) gebildet. Aus dieser Ratio wurde anschließend - wie unter Kapitel 2.3.1 näher beschrieben - nach Subtraktion der Autofluoreszenz die bereinigte Ratio berechnet. Eine von der Software gesteuerte Blende („Shutter“) verhinderte eine Beleuchtung des Präparats während der Messpausen und somit ein schnelleres Ausbleichen des Farbstoffes. Mit Hilfe von Aperturblenden im Beobachtungs- und Messtunnel konnte der zu beobachtende Gefäßabschnitt genau definiert sowie Mikropipetten- und Fadenanteile zur Minimierung von Artefakten ausgeblendet werden (Anordnung s. Abb. 2.4).

2.4 Registrierung des Gefäßdurchmessers

Zur Registrierung des Gefäßdurchmessers diente eine parallel an das Okular des inversen Mikroskops aufgesetzte hochauflösende, monochrome CCD-Kamera (s. 2.8). Das wenige für die Kamera benötigte Licht wurde mit einer Halogenlampe erzeugt, wobei durch einen Rotglasfilter Licht mit Wellenlängen unter 610nm absorbiert wurde, so dass das verbleibende rote Licht zwar für die Durchmesserregistrierung ausreichte, mit der fluoreszenzmikroskopischen Kalziummessung jedoch nicht interferierte. Die Aufzeichnung sowohl vom Außen- als auch vom Innendurchmesser der Widerstandsarterie erfolgte kontinuierlich mit einer Messung pro Sekunde mithilfe der kommerziell erhältlichen Software Blood Vessel Analyzer 300 (s. 2.8) auf einem separaten PC. Da vor allem bei stark kontrahiertem Gefäß die Registrierung des Außendurchmessers im Vergleich zum Innendurchmesser wesentlich exaktere Ergebnisse lieferte wurde nur dieses Signal durch einen D/A-Wandler zunächst in ein Analogsignal konvertiert. Dieses wurde

ebenfalls der Bryte Box zugeführt und zusammen mit dem Kalziumsignal mit der oben genannten Software Felix 32[®] (s. 2.8) synchron aufgezeichnet (Anordnung s. Abb. 2.4). Für die Auswertungen wurden die in der Einheit Millivolt vorliegenden Analogsignale auf die Einheit μm zurückgerechnet.

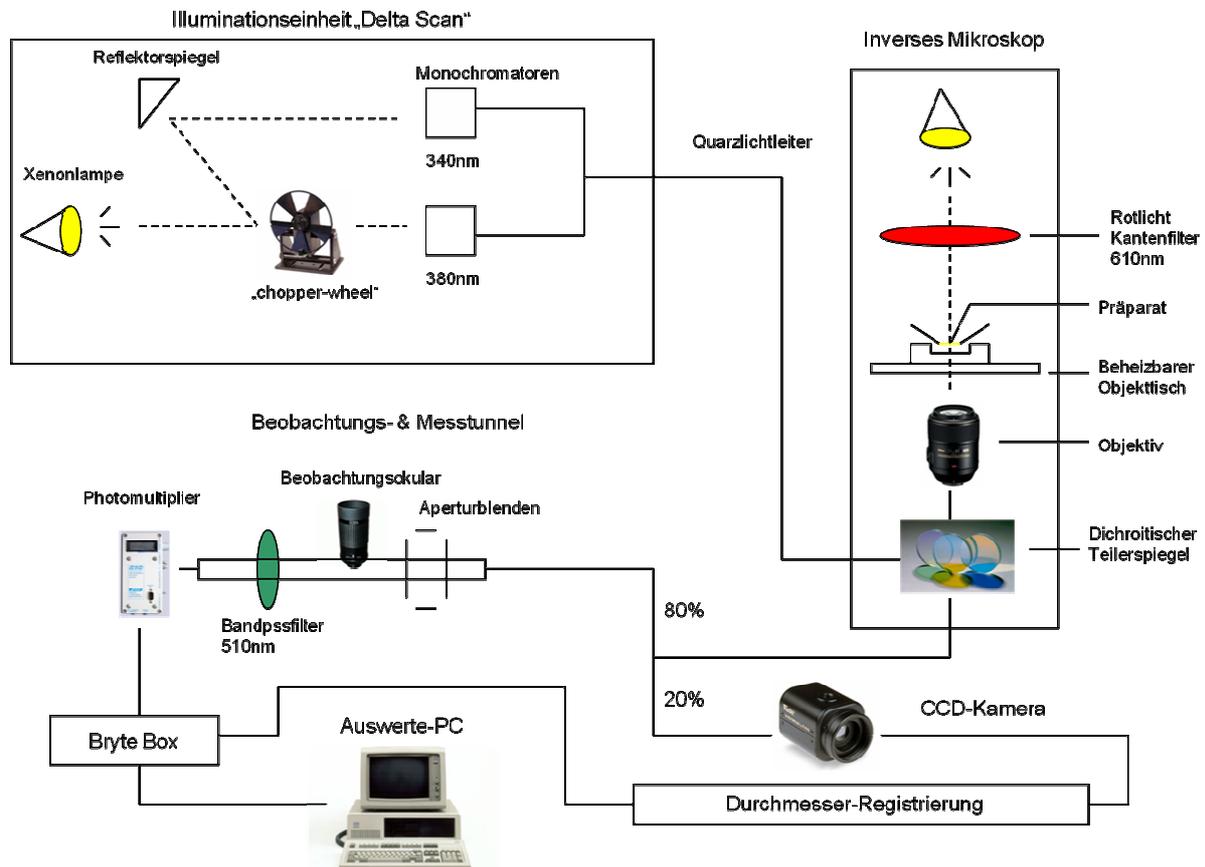


Abb. 2.4: Schematischer Aufbau von Kalziummessplatz und Durchmesserregistriersystem

Die Illuminationseinheit erzeugt alternierend monochromatisches Licht der Wellenlängen 340nm und 380nm zur Anregung des mit Fura-2 beladenen Gefäßes. Mithilfe eines Bandpassfilters wird nur die entstehende Emission (510nm) über einen Messtunnel zu einem Photomultiplier fortgeleitet und detektiert. Simultan erfolgt die Durchmesserregistrierung durch eine hochauflösenden CCD-Kamera. Der Beleuchtung dient ein mittels Kantenfilter erzeugtes Rotlicht, um eine Interferenz mit der simultanen Kalziummessung zu minimieren. Beide Analogsignale werden zunächst in der Bryte Box digitalisiert und anschließend an einem Computer ausgewertet.

2.5 Transfektion der glatten Muskulatur

Zur Transfektion der glatten Gefäßmuskulatur mit Plasmid-DNA wurde ein kommerziell erhältlicher Transfektionskit (Effectene[®], s. 2.1.4) verwendet.

Der MOPS-Puffer im Organbad wurde zunächst durch 4ml Leibovitz-L15 Kulturmedium (s. 2.1.2) ersetzt. Die jeweilige Plasmid-DNA wurde nach Herstellerangaben in Kondensationspuffer (Endkonzentration im Organbad: 37,5µl/ml), Enhancer (10µl/ml) und Effectene Reagens (15µl/ml) des Transfusionskits gelöst und dem Medium in einer Konzentration von 1,25 µl/ml zugegeben.

Anschließend wurde das zu untersuchende Gefäß unter Aufrechterhaltung eines transmuralen Druckes von 45mmHg mit einer Flussrate von 1ml/h mit Leibovitz-L15 Medium im Dunkeln über einen Zeitraum von 24 Stunden perfundiert. Nach zweimaligem Auswaschen des Organbads wurde das Gefäß daraufhin mit dem Farbstoff Fura2 von abluminal beladen, wobei gleichzeitig das von der Perfusion intraluminal verbliebene Kulturmedium durch kurzzeitige Perfusion mit MOPS-Puffer ausgewaschen wurde.

2.6 Western Blot

Der Western Blot, auch Immunblot genannt, ist ein Verfahren zum spezifischen Nachweis von Proteinen. Nach elektrophoretischer Auftrennung der Proteine entsprechend ihrer Größe werden diese zunächst auf eine Nitrozellulosefolie transferiert und anschließend mithilfe spezieller Antikörper detektiert und visualisiert. Zur Proteingewinnung wurden die *Aa. femorales* der auch für die anderen Versuche dieser Arbeit verwendeten Versuchstiere (s. 2.8) präpariert, exzidiert und mittels Lysispuffer (s. 2.1.1) verdaut.

Die Messung der Proteinkonzentrationen in den Lysaten erfolgte mit dem BCA Protein Assay Reagent Kit (s. 2.1.4). Bei diesem Verfahren entsteht aus zweiwertigen Kupferionen durch Reaktion mit Proteinen monovalentes Kupfer. Dieses reagiert in einem zweiten Schritt mit zwei Molekülen Bicinchoninsäure (BCA) zu einem violetten BCA-Kupfer-Komplex, dessen Absorption bei 562nm mithilfe eines Photometers detektiert werden kann. Da die Menge des Komplexes proportional zur eingesetzten Proteinmenge ist, konnte das zu bestimmende Protein mithilfe einer aus 0,2%er BSA-Lösung hergestellten Eichgeraden quantifiziert werden.

Die Auftrennung der Proteine erfolgte mittels SDS-Gelelektrophorese. Hierzu wurde die entsprechende Menge Protein im Verhältnis 1:4 mit Auftragspuffer (s. 2.1.1) gemischt und für 5 Minuten auf 95°C erhitzt. Das im Puffer enthaltene anionische SDS führt durch eine Zerstörung der Sekundär- und Tertiärstruktur zu einer Entfaltung des Proteins und verleiht dem Protein eine definierte, zur Molekülgröße proportionale negative Ladung. Auf diese Weise denaturierte Proteinproben wurden nun zur Auftrennung, neben einem kommerzieller Größenmarker (s. 2.8) zur späteren Bestimmung der Proteingrößen auf ein 10%-Polyacrylamidgel aufgetragen (denaturierende, diskontinuierliche Methode [81]). Nach Zugabe des Laufpuffers (s. 2.1.1) erfolgte die eigentliche Elektrophorese durch Anlage der Laufspannung. Die aufgetrennten Proteine wurden anschließend in einer eigens angefertigten blotting-Kammer durch Anlage eines relativ zur Gelgröße berechneten Stromes ($I[\text{mA}] = A[\text{cm}^2] \times 0,8$) in Transferpuffer (s. 2.1.1) über einen Zeitraum von eineinhalb Stunden auf eine Nitrozellulosemembran transferiert (s. 2.8).

Zur Blockade unspezifischer Bindungsstellen wurde die Nitrozellulosemembran eine Stunde lang in mit 5%-Magermilchpulver versetztem TBS-T-Puffer (s. 2.1.1) unter leichtem Schwenken inkubiert.

Anschließend folgte die Inkubation mit dem entsprechenden spezifischen Primärantikörper (s. 2.1.5) über Nacht ebenfalls auf dem Schüttler bei 4°C. Der Antikörper wurde hierzu vorher in TBS-T-Puffer zusammen mit BSA in fünfprozentiger Verdünnung gelöst. Zur Entfernung unspezifisch gebundener Antikörper wurde die Membran im Anschluss an die Inkubation insgesamt dreimal für jeweils 5min mit TBS-T-Puffer gewaschen.

Zur Detektion wurde ein Chemilumineszenz-Kit für HRP (horse radish peroxidase, s. 2.1.4) verwendet. Dazu wurde ein mit HRP-markierter Sekundärantikörper (1:2000) auf die Membran gegeben, für eineinhalb Stunden bei Raumtemperatur unter leichtem Schwenken inkubiert und anschließend wieder dreimal für jeweils 5 Minuten gewaschen. Das Kit enthält zwei Lösungen, wobei die eine Luminol und die andere stabiles Peroxid enthält. Diese wurden im Verhältnis 1:1 gemischt und nach Herstellerangabe auf die Membran gegeben. Durch die HRP des gebundenen Zweitantikörpers wird Wasserstoffperoxid abgebaut und Luminol oxidiert, das dadurch in einen angeregten Zustand übergeht. Die entstehende Lumineszenz wurde mithilfe einer CCD-Kamera (s. 2.8) aufgezeichnet und die Bilder mit der Bildbearbeitungssoftware Wasabi (s. 2.8) ausgewertet.

2.7 Versuchsprotokolle

2.7.1 Applikation und Auswaschen von Agenzien

Zur Applikation der verwendeten Agenzien wurde mithilfe einer 1000 μ l Eppendorfpipette an einer Seite des Organbades 1ml des Badvolumens entnommen und minimal zeitlich versetzt mit einer zweiten Pipette am anderen Ende des Organbades die gewünschte Substanz - in einer 3-fach höheren Konzentration als der gewünschten Endkonzentration - zu den verbleibenden 2 ml ins Organbad appliziert. Diese Methode wurde gewählt um eine mechanische Irritation des Gefäßes durch einen vollständigen Austausch des Organbadvolumens während der Versuche zu minimieren. Alle im Folgenden verwendeten Konzentrationen beziehen sich jeweils auf die so erreichte Endkonzentration im Organbad.

Zum Auswaschen der Agenzien wurde das gesamte Organbadvolumen zweimal vollständig durch Standard-MOPS-Puffer ausgetauscht. Vor Beginn der nächsten Messung wurde dann eine fünfminütige Äquilibrationszeit eingehalten.

Alle verwendeten Lösungen wurden vorher in einem Wasserbad erwärmt, so dass bei Zugabe von gelösten Agonisten und Inhibitoren die resultierende Temperatur im Organbad konstant bei 37°C gehalten wurde.

2.7.2 Kriterien der endothelialen und glattmuskulären Reaktivität

In die statistische Auswertung wurden nur Gefäße einbezogen, die eine entsprechende Vitalitätsprüfung bestanden.

Zur Kontrolle des Kontraktionsverhaltens und damit der funktionellen Integrität der glatten Muskulatur wurde das Gefäß steigenden Noradrenalin-Konzentrationen (0,03 μ M, 0,1 μ M, 0,3 μ M) ausgesetzt. Gefäße, die bei der Konzentration von 0,3 μ M nicht eine anhaltende Kontraktion auf unter 70% des Ausgangswertes aufwiesen, wurden verworfen.

Die Endothelfunktion wurde analog dazu über eine Acetylcholin vermittelte Vasodilatation überprüft. Als Einschlusskriterium diente eine Dilatation vorkontrahierter Gefäße auf mindestens 90% des Ausgangsdurchmessers nach Zugabe von Acetylcholin 1 μ M.

Insgesamt 13 von 146 Gefäßen mussten aufgrund der genannten Kriterien von den Messungen ausgeschlossen werden, da sie die erforderlichen Bedingungen nicht erfüllten (s. 3.1).

2.7.3 Blockade der NO-Synthase und der Cyclooxygenase

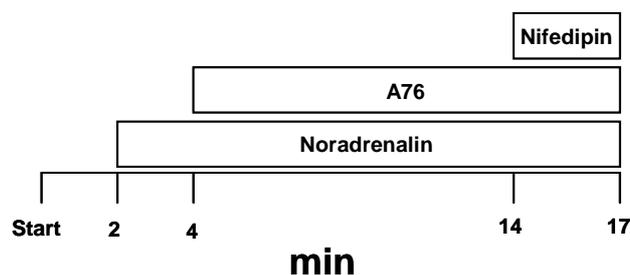
Zur Blockade NO vermittelter Effekte wurden alle Gefäße vor Versuchsbeginn, parallel zur Inkubation mit Fura2, mit dem irreversiblen Inhibitor der NO-Synthase L-NAME (30 μ M) für einen Zeitraum von 60 Minuten vorbehandelt.

Analog dazu wurde die Cyclooxygenase durch Applikation von Indomethacin (30 μ M) gehemmt.

Aufgrund der Irreversibilität der beiden Inhibitoren war durch das gewählte Vorgehen ein repetitives Zumischen der Inhibitoren während der Versuche nicht erforderlich.

2.7.4 Effekte von A76 und Dosiswirkungskurven

Die Effekte von A76 (0,1mM) wurden zunächst an mit Noradrenalin (0,3 μ M) vorkontrahierten Gefäßen studiert. Als Beobachtungszeitraum wurden 10 Minuten ausgewählt. Am Versuchsende erfolgte die Applikation des potenten Vasodilatators Nifedipin (5 μ M), um einen Bezugswert für eine maximale Gefäßdilatation zu schaffen.



Die Erhebung der Dosiswirkungskurven von A76 erfolgte kumulativ (1 μ M bis 0,3mM) an mit Noradrenalin (0,3 μ M) vorkontrahierten Gefäßen. Als Beobachtungszeitraum wurde hier pro Stufe eine Zeitspanne von 5 Minuten gewählt.

Bei einem Teil der Gefäße wurde vor Versuchsbeginn das Endothel mittels Perfusion von Luft (1ml) zerstört. Dabei kommt es beim Vorbeifließen der Luftblasen durch die entstehenden Scherkräfte zu einem Zerreißen der Endothelzellmembranen. Der

Erfolg dieser Maßnahme wurde anhand einer erloschenen Reaktion des vorkontrahierten Gefäßes auf Stimulation mit Acetylcholin ($1\mu\text{M}$) überprüft.

Zum Ausschluss von Zeiteffekten, Pipettierartefakten und Eigenwirkung des Lösungsmittels DMSO diente eine Versuchsreihe mit korrespondierenden Konzentrationen von DMSO.

2.7.5 Effekte von AICAR und Metformin

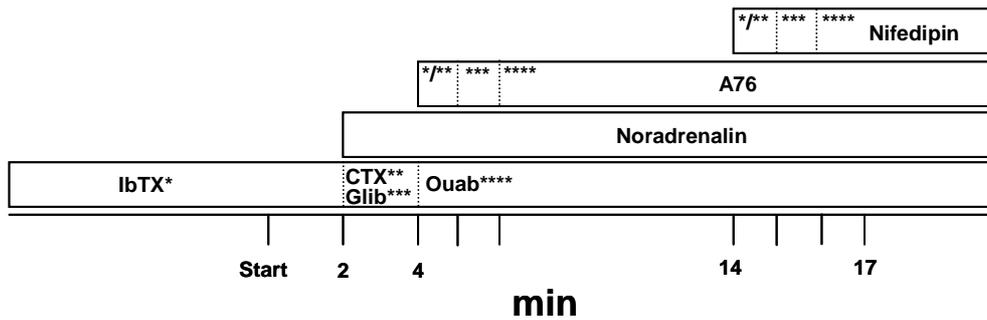
Die Evaluation der weiteren AMPK-Aktivatoren erfolgte ebenfalls an vorkontrahierten (NA $0,3\mu\text{M}$) Gefäßen. Der maximale Beobachtungszeitraum bei den AICAR-Versuchen (3mM) entsprach dabei 54 Minuten. Die Metformineffekte wurden kumulativ für die Konzentrationen $0,3\text{mM}$ und 3mM über jeweils 5 Minuten untersucht. In dieser Versuchsanordnung war dem zugegebenen Metformin ausnahmsweise Noradrenalin in einer höheren ($1\mu\text{M}$) als der gewohnten Konzentration ($0,3\mu\text{M}$) beigefügt, so dass es zu einem schrittweisen Anstieg der Noradrenalkonzentration im Organbad kam. Dieses Vorgehen wurde gewählt, um in diesem speziellen Fall auch einen kleinen Kalziumabfall im Vergleich zur Kontrollgruppe besser detektieren zu können (s. auch Kap. 4.1 und Kap. 4.4.2)

2.7.6 Vordepolarisation mit Kalium

Bei dieser Versuchsgruppe wurden die Gefäße zur Vorkontraktion mit hohen extrazellulären Kaliumkonzentrationen (100mM) depolarisiert. Der Beobachtungszeitraum nach Stimulation mit A76 ($0,1\text{mM}$) betrug 7 Minuten.

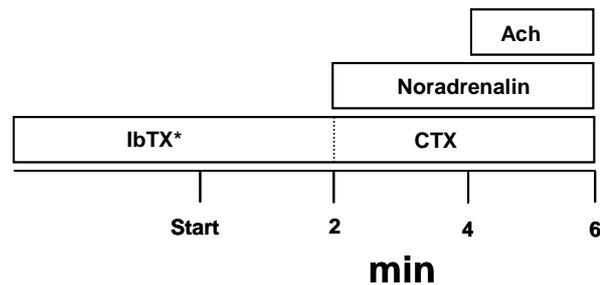
2.7.7 Effekte verschiedener Inhibitoren

Die Auswirkungen verschiedener Inhibitoren von Ionenkanälen und der $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPase wurden separat in einzelnen Versuchsanordnungen untersucht. Dazu wurde das Gefäß wahlweise mit Iberiotoxin ($0,1\mu\text{M}$), Charybdotoxin ($1\mu\text{M}$), Glibenclamid ($0,1\text{mM}$) oder Ouabain ($0,1\text{mM}$) behandelt und anschließend der A76 Effekt auf das vorkontrahierte Gefäß 10 Minuten lang aufgezeichnet.



- * : IbTX: Inkubationsbeginn 30 min vor Start der Messung
- ** : CTX: Zugabe bei 2 min
- *** : Glib: Zugabe bei 2min, A76 bei 5min, Nif bei 15min
- **** : Ouabain: Zugabe bei 4min, A76 bei 6min, Nif bei 16min

Zur Charakterisierung der EDHF-abhängigen Dilatation von Widerstandsgefäßen wurde in einer kleinen Gruppe von Gefäßen der Einfluss der Kaliumkanalblocker Charybdotoxin ($1\mu\text{M}$) und Iberiotoxin ($0,1\mu\text{M}$) auf die Acetylcholin induzierte Dilatation untersucht.



- * : IbTX: Inkubationsbeginn 30 min vor Start der Messung

2.8 Technische Geräte, Verbrauchsmaterial und Sonstiges

Technische Geräte

CCD-Kamera (Durchmesserregistrierung)	Modell WAT-902B, Watec
CCD-Kamera (Western Blot)	Hamamatsu Photonics
Inverses Mikroskop	Modell Diaphot 300, Nikon, Düsseldorf Objektiv: D-APO 20 UV / 340, Olympus
Kleintierrasierer	Andis, Wisconsin; Vertrieb durch Hauptner-Herberholz, Solingen

Perfusoren	Braun, Melsungen
Präparationsmikroskop	Operationsstereomikroskop Stemi SV11, Gesamtvergrößerung 6-66-fach, Zeiss, Jena Kaltlichtquelle: KL 1500 LCD, Zeiss, Jena
Vertikalpuller für die Glasmikropipetten	Puller P-2000 Sutter instrument Co.; Vertrieb durch Science Products, Hofheim

Verbrauchsmaterial

Chirurgische Fäden	Ethilon Polyamid monofil 9-0 bzw. 11-0; Ethicon, Norderstedt
Dreiwegehahnsysteme	Braun, Melsungen
Flächendesinfektionsmittel	Bacillol®, Bode Chemie, Hamburg
Glasmikropipetten	Borosilikatglasmikropipetten (l=100mm, d _{außen} =1,00mm, d _{innen} =0,58mm, Science Products, Hofheim) wurden in einem Vertikalpuller durch einen Laser in der Mitte erhitzt und auseinandergezogen, so dass zwei Mikropipetten mit extrem feinen Spitzen entstanden.
Inzisionsklebefolie	Mönlycke Health Care, Göteborg
Nitrozellulosemembran	Peqlab Biotechnologie, Erlangen
Perfusorleitungen	Braun, Melsungen
Silikonschlauch	Tygon®, Vertrieb durch Neolab, Heidelberg
Spritzen	5 und 10ml: Braun, Melsungen 50ml für Perfusor: BD, Drogheda Irland
Sterilfilter	Porendurchmesser 0,22µm, Millipore, Schwalbach

Sonstiges

Mikrochirurgische Instrumente	Scheren: Nachstarschere n. Vannas (aufgewinkelt), Bausch & Lomb, Berlin; Vannas-Tübingen (spring-scissor aufgewinkelt und gerade), F.S.T., Heidelberg; Pinzetten: Dumont 4&5, F.S.T., Heidelberg
Mikromanipulatoren	World Precision Instruments, Berlin
Organbad	d=32mm, h=5 mm, Arbeitsvolumen=3ml austauschbare Bodenplatte (UV-durchlässig): H. Saur, Reutlingen

Pipetten	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Software BVA 300	<u>B</u> lood <u>V</u> essel <u>A</u> nalyzer 300, Hasotec, Rostock
Software Felix 32 [®]	Felix 32 [®] : PTI, Wedel
Software Wasabi [®]	Hamamatsu Photonics
Versuchstiere	Syrische Goldhamster, Janvier, Le Genest-Saint-Ile, Frankreich

2.9 Auswertung und Darstellung der Ergebnisse

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden als Mittelwerte \pm SEM (standard error of the mean) für n (Anzahl der Experimente) dargestellt.

Die Veränderungen des Gefäßdurchmessers bzw. der Kalziumratio nach Applikation von vasoaktiven Agenzien wurden entweder/oder auch

(1) als relative Veränderungen in Bezug auf eine maximal mögliche Dilatation bzw. den maximalen Abfall der Kalziumratio unter Nifedipin (5 μ M) angegeben.

(2) als Prozentsatz des resultierenden Durchmessers/Kalziumratio nach Zugabe vasoaktiver Substanzen im Vergleich zum Ausgangsdurchmesser d_{basal} bzw. zur Ausgangskalziumratio Ca_{basal} vor Zugabe vasoaktiver Substanzen angegeben.

Im Einzelnen wurden dabei folgende Formeln verwendet:

Zu (1):

$$\Delta d^{\text{Nif}} = [(d_x - d_{\text{ss}}) / (d_{\text{max}} - d_{\text{ss}})] * 100$$

$$\Delta [Ca^{2+}]_i^{\text{Nif}} = -[(R_{\text{ss}} - R_x) / (R_{\text{ss}} - R_{\text{min}})] * 100$$

R_{ss} : Kalziumratio im stady state nach Vorkontraktion mit NA oder K^+

R_x : Kalziumratio im stady state nach Zugabe eines Agonisten wie z.B. A76

R_{min} : minimale Kalziumratio nach Zugabe von Nifedipin (5 μ M)

d_{ss} : Gefäßdurchmesser im stady state nach Vorkontraktion mit NA oder K^+

d_x : Gefäßdurchmesser im stady state nach Zugabe eines Agonisten wie z.B. A76

d_{max} : maximaler Gefäßdurchmesser nach Zugabe von Nifedipin (5 μ M)

zu (2):

$$d_{\text{Dil/Kon}} [\% \text{ von } d_{\text{basal}}] = d_x / d_{\text{basal}} * 100$$

$$Ca_{\text{Dil/Kon}} [\% \text{ von } Ca_{\text{basal}}] = R_x / R_{\text{basal}} * 100$$

- d_x : Gefäßdurchmesser im stady state nach Zugabe einer vasoaktiven Substanz, entweder eines Konstriktors (Kon), z.B. NA, Kalium) oder eines Dilatators (Dil), z.B. A76, Ach
- d_{basal} : Gefäßdurchmesser zu Versuchsbeginn vor Zugabe vasoaktiver Substanzen
- R_x : Kalziumratio im stady state nach Zugabe einer vasoaktiven Substanz, entweder eines Konstriktors (Kon), z.B. NA, Kalium oder eines Dilatators (Dil), z.B. A76, Ach
- R_{basal} : Kalziumratio zu Versuchsbeginn vor Zugabe vasoaktiver Substanzen

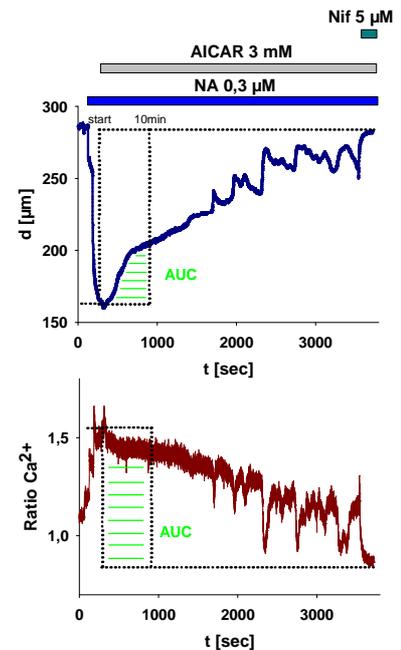
Bei der Interpretation ist zu beachten:

- $d_{\text{Dil}} [\% \text{ von } d_{\text{basal}}] = 100$ bedeutet ein vorkontrahiertes Gefäß erreicht wieder genau den Ausgangsdurchmesser, z.B nach Zugabe eines Dilatators
- $d_{\text{Dil}} [\% \text{ von } d_{\text{basal}}] > 100$: ein Dilatator führt zu einer Dilatation auf über 100% des Ausgangswertes
- $d_{\text{Kon}} [\% \text{ von } d_{\text{basal}}] < 100$ (z.B. 60) bedeutet ein Konstriktor führt zu einer Konstriktion des Gefäßes auf einen bestimmten Prozentsatz des Ausgangsdurchmessers (z.B. 60%)

Analog hierzu gilt:

- $Ca_{\text{Dil}} [\% \text{ von } Ca_{\text{basal}}] = 100$ bedeutet die Kalziumratio erreicht den Ausgangswert, z.B. nach Zugabe eines Dilatators an ein vorkontrahiertes Gefäß
- $Ca_{\text{Dil}} [\% \text{ von } Ca_{\text{basal}}] < 100$ bedeutet die Kalziumratio sinkt nach Zugabe eines Dilatators sogar unter den Ausgangswert
- $Ca_{\text{Kon}} [\% \text{ von } Ca_{\text{basal}}] > 100$ (z.B. 140) bedeutet die Zugabe eines Konstriktors führt zu einem Anstieg der Kalziumratio auf einen bestimmten Prozentsatz des Ausgangswertes (z.B. 140%)

Da es bei den Versuchen mit AICAR besonders nach längerer Versuchsdauer zu stärkeren Oszillationen sowohl von Durchmesser als auch der Kalziumratio kam, wurde bei dieser Versuchsgruppe jeweils die Fläche unter den entsprechenden Kurven (Area under the curve AUC) während eines bestimmten Messintervalls berechnet und diese als Maß für die Dilatation bzw. den Kalziumabfall verwendet.



Die Berechnung der bereinigten Ratio R (s. 2.3.1) sowie die Umrechnung der im Programm Felix 32[®] als Analogsignal aufgezeichneten Außendurchmesser auf die Einheit µm (s. 2.4) erfolgte in Microsoft Office Excel (Version 11).

Zur Erstellung der im Ergebnisteil gezeigten Graphen wurde das Graphikprogramm SigmaPlot (Version 10) verwendet.

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm SigmaStat (Version 2.0). Der Einfluss unterschiedlicher Stimulatoren und Inhibitoren wurde jeweils mit dem t-Test für gepaarte oder ungepaarte Messwerte analysiert. Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von unter 5 % ($p < 0,05$) wurde von einem signifikanten Unterschied der Mittelwerte ausgegangen. Der Vergleich der Dosiswirkungskurven von A76 vor und nach einer Behandlung erfolgte nach dem Two way repeated Measure Analysis ANOVA mit Student-Newman-Keuls post hoc Test. Dieser Test findet Verwendung beim Vergleich zweier oder mehrerer Gruppen, bei denen eine abhängige Variable (hier: Gefäßdurchmesser bzw. Kalziumkonzentration) sowie ein mehrstufiger Faktor als unabhängige Variablen (hier: titrierte A76 Konzentration) vorliegen. Unterschiede zwischen den Kanalblockern wurden mittels ANOVA on Ranks für unverbundene Stichproben nach Kruskal-Wallis mit Student-Newman-Keuls post hoc Test ausgewertet. Mit dem Kruskal-Wallis Test werden zwar keine Unterschiede zwischen Mittelwerten (nicht-parametrischer Test) sondern zwischen Verteilungen geprüft, dennoch wurden aus Gründen der Vergleichbarkeit jeweils die Mittelwerte angegeben

3 Ergebnisse

3.1 Allgemeine Gefäßcharakteristiken

Der experimentelle Teil der vorliegenden Arbeit umfasste den Zeitraum von August 2007 bis Februar 2010. Die ersten sechs Monate dienten dabei dem Erlernen der Präparationstechnik sowie dem Aufbau des Kalziummessplatzes und der Installation der Durchmesserregistrierung.

Nach Abschluss dieser Einarbeitungsphase wurden insgesamt 146 Gefäße zu Versuchszwecken präpariert. In die folgende Darstellung der Ergebnisse flossen Messungen an insgesamt 70 dieser Gefäße ein, die den unter Kapitel 2.7.2 genannten Einschlusskriterien entsprachen. 49 Gefäße wurden zu Vorversuchen verwendet, die der Generierung der im Folgenden dargestellten oder im Verlauf der Arbeit wieder verworfenen Hypothesen dienten. 13 Gefäße erfüllten nicht die Einschlusskriterien für eine intakte endotheliale oder glattmuskuläre Funktion und mussten verworfen werden. Bei 14 Gefäßen konnten die Versuche aufgrund methodischer oder technischer Schwierigkeiten nicht wie geplant durchgeführt werden und wurden deshalb nicht in die Wertung mit einbezogen.

Die Tabelle 3.1 zeigt eine Übersicht über die basalen Gefäßdurchmesser d_{basal} , die Enddurchmesser nach titrierter Vorkontraktion mit Noradrenalin d_{NA} (0,03 μM ; 0,1 μM ; 0,3 μM) sowie die Dilatation nach Applikation von Acetylcholin d_{Ach} (1 μM) in allen Gruppen von Gefäßen mit intaktem Endothel ($n=65$) und der Gruppe von Arterien, in denen das Endothel vorher zerstört wurde ($n=5$).

	d_{basal} [μm]	d_{NA} [μm]	% von d_{basal}	d_{Ach} [μm]	% von d_{basal}
intakt	262,4	154,1	58,6	251,7	97,3
($n=65$)	$\pm 3,5$	$\pm 2,9$	$\pm 0,7$	$\pm 3,6$	$\pm 0,4$
zerstört	253,4	158,2	62,5	153,0	60,3
($n=5$)	$\pm 10,0$	$\pm 6,4$	$\pm 1,8$	$\pm 9,1$	$\pm 2,1$

Tab. 3.1: Gefäßcharakteristika

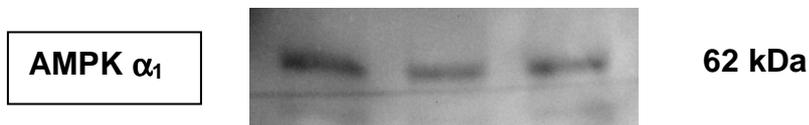
Durchschnittlicher basaler Gefäßdurchmesser (d_{basal}), Gefäßdurchmesser nach Vorkontraktion mit Noradrenalin (d_{NA}) und nach Dilatation mit Acetylcholin (d_{Ach}). Der minimale Durchmesser nach NA bzw. der Maximaldurchmesser nach Ach sind außerdem in % des Ausgangsdurchmessers (d_{basal}) angegeben. Verglichen wurden Arterien mit intaktem Endothel („intakt“) und solche mit zerstörtem Endothel („zerstört“).

Beide Gruppen zeigten als Reaktion auf den Vasokonstriktor Noradrenalin eine vergleichbare Konstriktion auf durchschnittlich ungefähr 60% des Ausgangsdurchmessers. Während die Gefäße mit intaktem Endothel nach Applikation von Acetylcholin nach zwei Minuten wieder annähernd den Ausgangsdurchmesser erreicht hatten, bewirkte Acetylcholin bei Arterien mit zerstörtem Endothel keine signifikante Dilatation mehr.

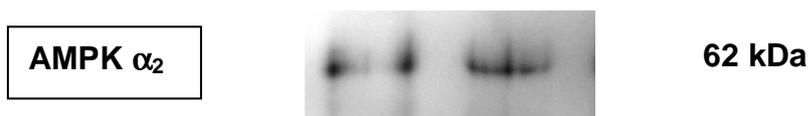
3.2 Nachweis der AMP-Kinase in den Gefäßen der Versuchstiere

Um zu zeigen, dass die AMPK auch tatsächlich in den arteriellen Gefäßen der Versuchstiere exprimiert wird, erfolgte der immunologische Nachweis einzelner Untereinheiten der AMPK in Hamstergefäßen mittels Western Blot. Zu genaueren Angaben bezüglich der verwendeten Antikörper sei auf Kapitel 2.1.5 verwiesen.

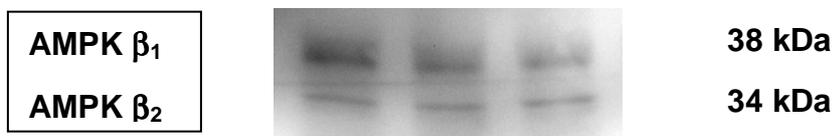
Unter Verwendung eines Antikörpers gegen die α_1 -Isoform der katalytischen α -Untereinheit (n=4) zeigte sich eine deutliche Proteinbande bei 62kDa. Gezeigt sind die Ergebnisse einer Gefäßprobe für unterschiedlich aufgetragene Proteinmengen:



Die α_2 -Isoform ließ sich demgegenüber nur sehr schwach nachweisen. Verschiedene Antikörperverdünnungen (1:500, 1:1000, je n=2) wurden dabei getestet. Gezeigt ist das Ergebnis für die Verdünnung 1:500 für die beiden Gefäße:



Die regulatorische β -Untereinheit wurde mit einem Antikörper nachgewiesen, der gegen beide Isoformen der β -Untereinheit gerichtet war ($n=2$). Wie aus der Abbildung zu ersehen ist werden beide Isoformen (gleiches Molekulargewicht von etwa 30 kDa, aber bekanntermaßen unterschiedliches Wanderungsverhalten in der SDS-Gelelektrophorese [82]) in den Gefäßen exprimiert, wobei sich die Bande der β_1 -Isoform deutlich kräftiger darstellt. Gezeigt ist das Ergebnis unterschiedlicher aufgetragener Proteinmengen aus einem der beiden Gefäße:



3.3 A76 induzierte Dilatation

Zu Beginn der Arbeit sollten die Effekte des spezifischen Stimulators der AMP-Kinase, A769662 (A76), an isolierten Widerstandsgefäßen studiert und mit den Effekten des Vasodilatators Acetylcholin verglichen werden.

Das Ausmaß der Vorkontraktion (NA 0,3µM) vor Zugabe der vasodilatativen Substanzen war dabei in beiden Gruppen gut vergleichbar:

(n=5)	vor Ach	vor A76	
d_{NA} [% von d _{basal}]	61,7 ± 4,8	57,2 ± 3,3	ns
Ca_{NA} [% von Ca _{basal}]	143,5 ± 3,0	140,3 ± 4,9	ns

Unter Blockade der NO-Synthase und der Cyclooxygenase führten sowohl Acetylcholin (1µM) als auch A76 (0,1mM) an vorkontrahierten Gefäßen zu einer maximalen Vasodilatation bis etwa auf das Niveau des basalen Ausgangsdurchmessers. Die korrespondierenden Kalziumratios fielen sogar leicht unter die Ausgangswerte, tendenziell in der A76 Gruppe stärker, jedoch nicht signifikant (p=0,077):

(n=5)	Ach	A76	
d_{Dil} [% von d _{basal}]	97,9 ± 0,5	96,6 ± 2,1	ns
Ca_{Dil} [% von Ca _{basal}]	94,6 ± 3,4	85,2 ± 3,1	ns

Die Reaktion setzte bei Zugabe von Acetylcholin bereits unmittelbar nach Applikation der Substanz in das Organbad ein und erreichte nach ungefähr 30s annähernd maximale Werte. Demgegenüber waren nach Stimulation der vorkontrahierten Gefäße mit A76 erste Effekte erst nach ca. 10-20s zu beobachten. Die maximal mögliche Dilatation war in der Regel erst nach etwa 5min erreicht. Charakteristisch war hierbei ein zunächst rascher Abfall der Kalziumlevel gefolgt von einer langsameren Phase, so dass sich eine annähernd stufenförmige Kinetik im Kalziumabfall beschreiben lässt.

Am Ende des Beobachtungszeitraumes wurde dem Organbad in der A76 Versuchsgruppe der starke Vasodilatator Nifedipin ($5\mu\text{M}$) hinzugefügt, um ein Maß für eine maximal mögliche Dilatation und einen maximal möglichen Kalziumabfall zu erhalten. Durch Nifedipin kam es zu einer Dilatation auf die Ausgangsdurchmesser ($99,9 \pm 0,3\%$ von d_{basal}), bei einem assoziierten Kalziumabfall auf Werte deutlich unter denen in Ruhebedingungen ($78,3 \pm 2,0\%$ von Ca_{basal}).

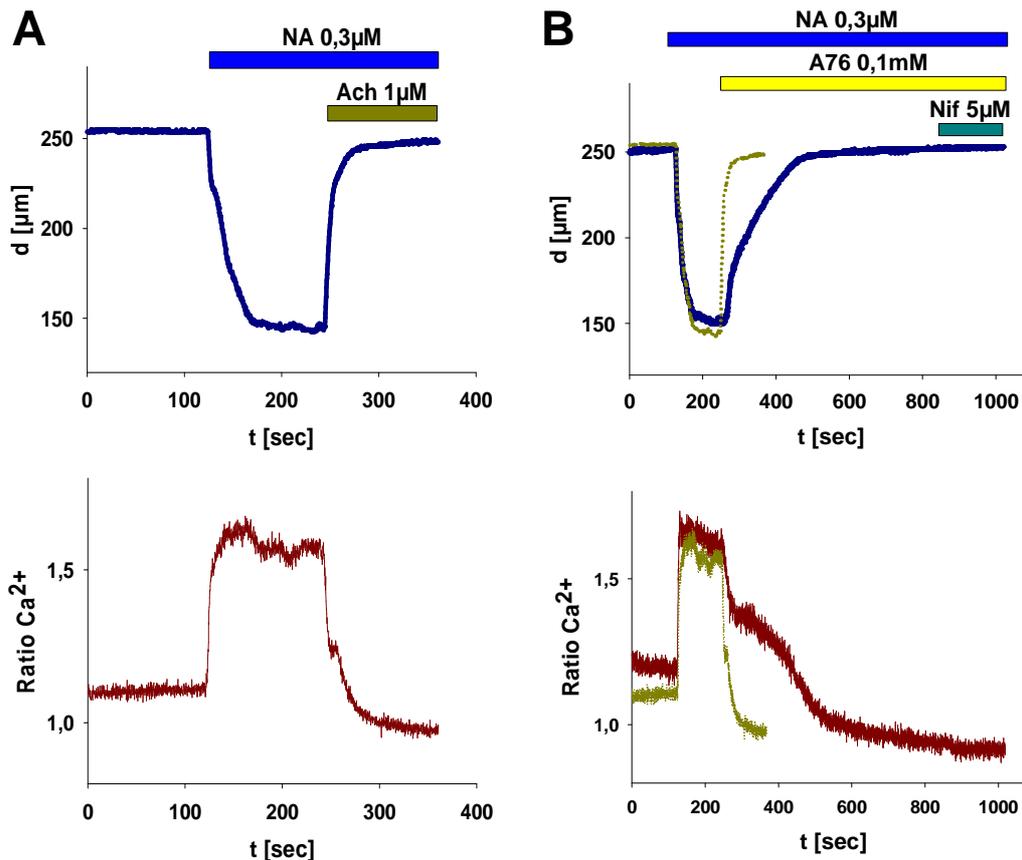


Abb. 3.1: Effekte von Acetylcholin vs. A76 an isolierten Widerstandsgefäßen

Dilatation und Kalziumabfall vorkontrahierter Widerstandsgefäße durch Stimulation mit Acetylcholin (A) und A76 (B). Zum besseren Vergleich der verschiedenen Kinetiken ist in (B) zusätzlich noch einmal die Antwort auf Acetylcholin aus (A) eingezeichnet (gelbe Kurven). Gezeigt sind Originalaufzeichnungen jeweils einer repräsentativen Messung.

Normiert auf diese maximalen vasodilatatorischen Effekte durch Nifedipin betragen die A76 induzierten Reaktionen:

(n=5)	A76
Δd^{Nif} [%]	$96,7 \pm 1,8$
$\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i^{\text{Nif}}$ [%]	$-88,0 \pm 3,2$

Die durch A76 induzierte Dilatation sowie der gemessene Abfall der Kalziumratio in isolierten Widerstandsgefäßen des Hamsters waren dosisabhängig. Erste signifikante Effekte traten bei einer Konzentration von $3\mu\text{M}$ auf, annähernd maximale Effekte bei einer Konzentration von $100\mu\text{M}$. Die mittlere effektive Konzentration (EC_{50}) für A76 bezüglich der beobachteten Vasodilatation in den untersuchten Gefäßen lag in grober Annäherung bei etwa $20\text{-}30\mu\text{M}$.

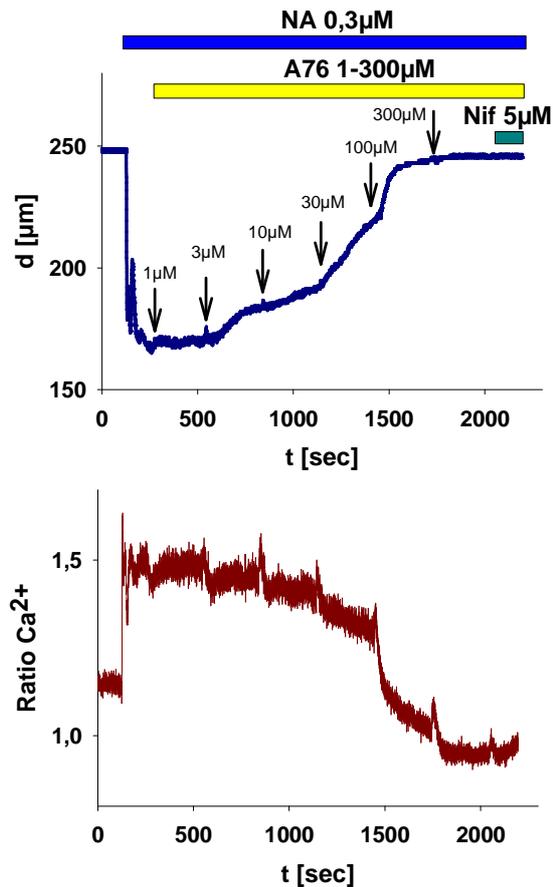


Abb. 3.2: A76 Dosis-Wirkungskurve

Dosisabhängige Dilatation (oben) und assoziierter Kalziumabfall (unten) bei Applikation von A76 in steigender Dosierung (1-300 μM).

Zur Untersuchung der Rolle des Endothels wurde bei einem Teil der Arterien wie in Kapitel 2.7.4 beschrieben vor Versuchsbeginn das Endothel zerstört. Es zeigte sich dabei in Hinblick auf die induzierte Dilatation und den Abfall der Kalziumratio kein signifikanter Unterschied zwischen der Gruppe mit intaktem Endothel und der Gruppe mit zerstörtem Endothel.

In den Kontrollexperimenten, die mit korrespondierenden Konzentrationen des Lösungsmittels DMSO über den gleichen Zeitraum durchgeführt wurden (s.2.7.4), ließen sich ebenfalls eine Dilatation von maximal $27,5 \pm 3,3\%$ bzw. ein Kalziumabfall von $26,5 \pm 3,8\%$ beobachten. Im Vergleich zu den durch A76 hervorgerufenen Veränderungen (mit vs. ohne Endothel für A76 (0,3mM): $\Delta d = 98,1 \pm 2,5\%$ vs. $94,4 \pm 2,5\%$; $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i = 99,0 \pm 2,3\%$ vs. $96,6 \pm 1,0\%$) fielen diese Effekte jedoch eher gering aus.

In der Kontrollgruppe wurde darauf verzichtet den relativen Anteil des DMSO-Effekts von reinen Zeiteffekten zu unterscheiden. Eine zusätzliche Zeitkontrolle im selben Gefäß ohne DMSO hätte den ohnehin bereits langen Versuchsablauf noch weiter verlängert und eine eindeutige Interpretation erschwert.

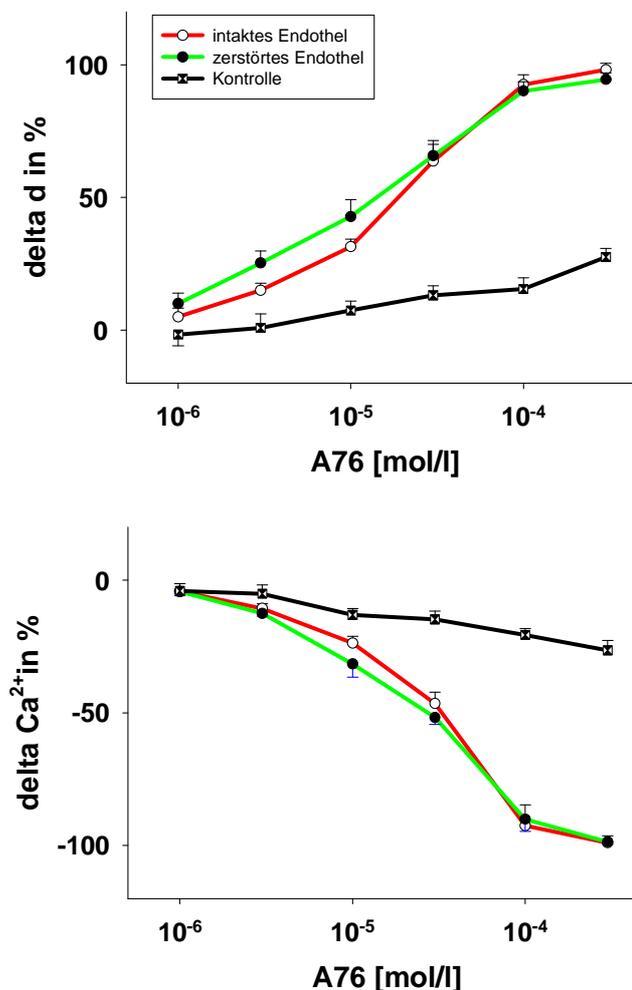


Abb. 3.3: Vergleich der A76 Dosis-Wirkungskurven in Arterien mit intaktem und zerstörtem Endothel

Die A76 Dosiswirkungskurven in Arterien mit intaktem und zerstörtem Endothel unterscheiden sich nicht signifikant voneinander (jeweils n=5). Die obere Kurve zeigt die relative Dilatation, die untere den relativen Kalziumabfall in den Gefäßen normalisiert zur maximalen Dilatation der Gefäße durch Nifedipin (5 μ M). Die Kontrolle (n=5) quantifiziert den Anteil der Effekte, die auf das Lösungsmittel DMSO sowie Zeiteffekte zurückzuführen sind.

3.4 Herabsetzung der AMPK-Aktivität durch Transfektion

Zur Evaluation der Beteiligung der AMPK-Kinase an den A76 vermittelten Effekten wurde eine kleine Versuchsgruppe isolierter Gefäße mit dominant-negativer Plasmid-DNA der α_1 -Untereinheit der AMPK transfiziert (s.2.5). Als Kontrolle dienten Widerstandsgefäße, die mit dem Wildtyp der AMPK α_1 -Untereinheit transfiziert wurden.

Die basalen Gefäßdurchmesser wurden in keiner der beiden Gruppen durch die Transfektion wesentlich verändert und betragen nach Transfektion jeweils ca. 96% vom Vortagesdurchmesser (vor Transfektion).

Beide Versuchsgruppen zeigten vor Transfektion eine nahezu gleiche Antwort auf Noradrenalin (0,3 μ M). Während das Ausmaß der Konstriktion in der dominant-negativ Gruppe nach erfolgter Transfektion ein nahezu identisches Level zu vorher erreichte, zeigte sich in der Wildtyp-Gruppe eine signifikante Abschwächung der Noradrenalin induzierten Konstriktion. Acetylcholin (1 μ M) führte in beiden Gruppen vor Transfektion zu einer vollständigen Dilatation. Diese Dilatatorantwort wurde durch die Transfektion nicht signifikant verändert.

Bezüglich der durch A76 (0,1mM) induzierten Effekte war in der dominant-negativ Gruppe nach Transfektion eine im Vergleich zur Wildtyp-Kontrolle auffallend später einsetzende und mit ca. 20% signifikant geringere Dilatation zu beobachten. Der Kalziumabfall fiel ebenfalls mit ca. 10% signifikant geringer aus als unter Kontrollbedingungen:

(jeweils n=4)	AMPK α_1 dom-neg	AMPK α_1 WT	*p<0,05	
d_{basal} (nach Tr) / d_{basal} (vor Tr) in %	96,0 \pm 1,9	96,2 \pm 2,2		
d_{NA}	vor Transf. 52,9 \pm 3,6	50,4 \pm 2,4	ns	
[% von d _{basal}]	nach Transf. 53,8 \pm 3,3	66,3 \pm 5,6	*	
	ns	*	*	
d_{Ach}	vor Transf. 96,8 \pm 1,1	95,4 \pm 2,9	ns	
[% von d _{basal}]	nach Transf. 98,6 \pm 0,1	102,4 \pm 3,1	ns	
	ns	ns	ns	
A76	Δd^{Nif} [%]	73,1 \pm 5,8	96,9 \pm 1,1	*
	Δ[Ca²⁺]_i^{Nif} [%]	-80,3 \pm 1,5	-90,7 \pm 2,3	*

In beiden Versuchsgruppen kam es bei jeweils einem Versuchsgefäß zu einem vollständigen Ausbleiben einer Dilatation trotz eines adäquaten Kalziumabfalls, der sich in dem für die jeweilige Gruppe typischen Bereich bewegte. Beide Versuche wurden in der Auswertung nicht berücksichtigt.

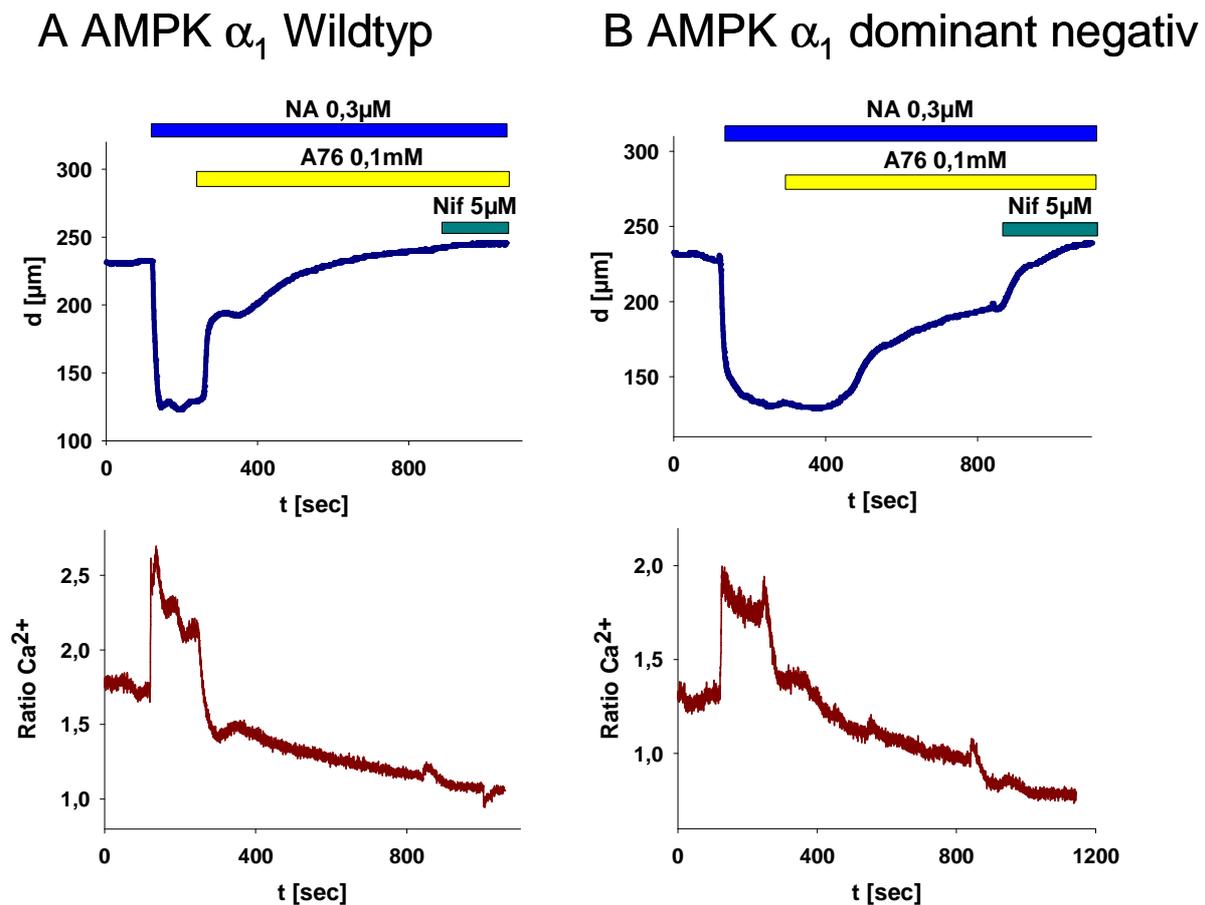


Abb. 3.4: Partielle Herabsetzung der AMPK-Aktivität nach A76 Gabe durch Transfektion

Nach Transfektion mit einem dominant negativen Plasmid der katalytischen α_1 -Untereinheit der AMPK setzte die A76 induzierte Dilatation erst verzögert ein und war im Ausmaß abgeschwächt (B). Ebenso kam es nur zu einem unvollständigen Kalziumabfall. Als Kontrolle diente ein α_1 -Wildtyp Plasmid. In dieser Gruppe kam es zu einer raschen, vollständigen Dilatation (A).

3.5 Effekte von AICAR

Ein weiterer bekannter Aktivator der AMP-Kinase ist AICAR. Dieser führte an vorkontrahierten Widerstandsgefäßen in einer Konzentration von 3mM nur zu einer geringen, jedoch zu allen ausgewerteten Zeitpunkten (2, 5, 10, 50min) statistisch signifikanten Vasodilatation im Vergleich zu Kontrollbedingungen. Der jeweils zu beobachtende assoziierte Abfall der Kalziumratio war ebenfalls signifikant. Da es in beiden Versuchsgruppen mit zunehmender Versuchsdauer zu teilweise ausgeprägten Oszillationen der Gefäße kam, welche die Beurteilung erschwerten, erfolgte die Auswertung mittels Area under the curve als Maß für die Dilatation bzw. den Kalziumabfall (s.2.9).

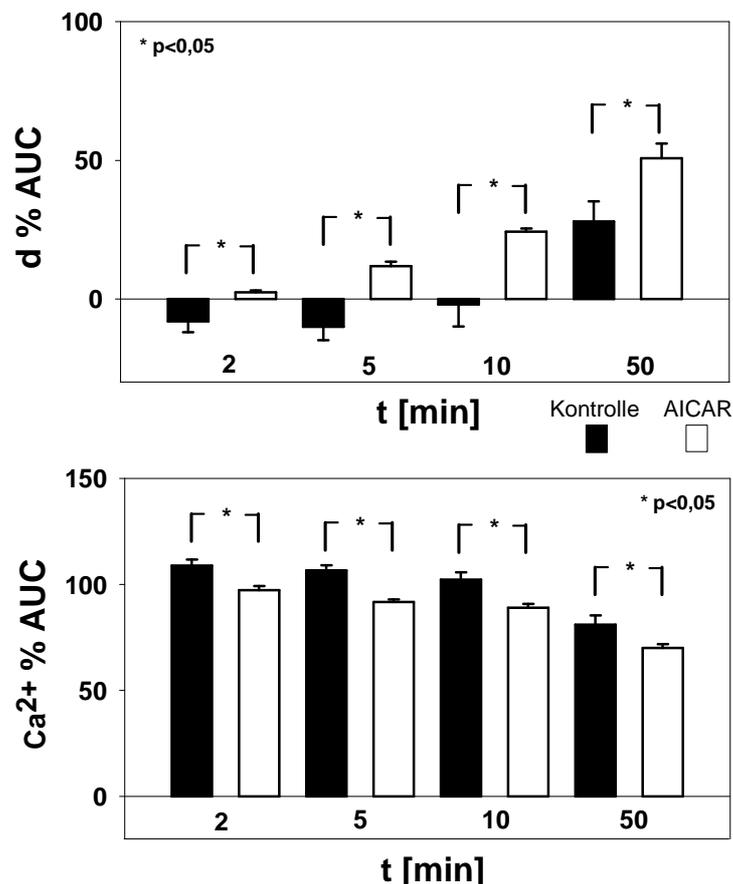


Abb. 3.5: Geringe jedoch signifikante Vasodilatation durch AICAR

Vergleich der „Area under the curve“ (s.2.9) als Maß für Dilatation (oben) und Kalziumabfall (unten) nach Applikation von AICAR im Vergleich zu Kontrollbedingungen (jeweils n=5). Demnach führte AICAR zu allen Messzeitpunkten zu geringer jedoch signifikanter Dilatation mit begleitendem Kalziumabfall.

3.6 Effekte von Metformin

In einer weiteren Testreihe wurden die Effekte von Metformin in den Konzentrationen 0,3 mM und 3mM auf den Vasotonus untersucht. Zu beachten ist, dass es wie unter 2.7.5 beschrieben aufgrund des besonderen Versuchsprotokolls zu einem sukzessiven Anstieg der Noradrenalkonzentration im Organbad kam.

Bei einer Metforminkonzentration von 0,3mM zeigte sich unter diesen Bedingungen eine Zunahme der Vasokonstriktion, die sich im Ausmaß nicht von der Kontrolle unterschied. Auffällig hierbei war jedoch das Fehlen eines persistierenden Kalziumanstiegs wie er unter Kontrollbedingungen feststellbar war.

Nach Zugabe von Metformin 3mM konnte im Gegensatz zur Kontrollgruppe eine Dilatation von knapp 50% beobachtet werden. Die intrazellulären Kalziumlevels sanken in beiden Gruppen jeweils um ca. 10% im Vergleich zum Endpunkt der vorherigen Konzentration.

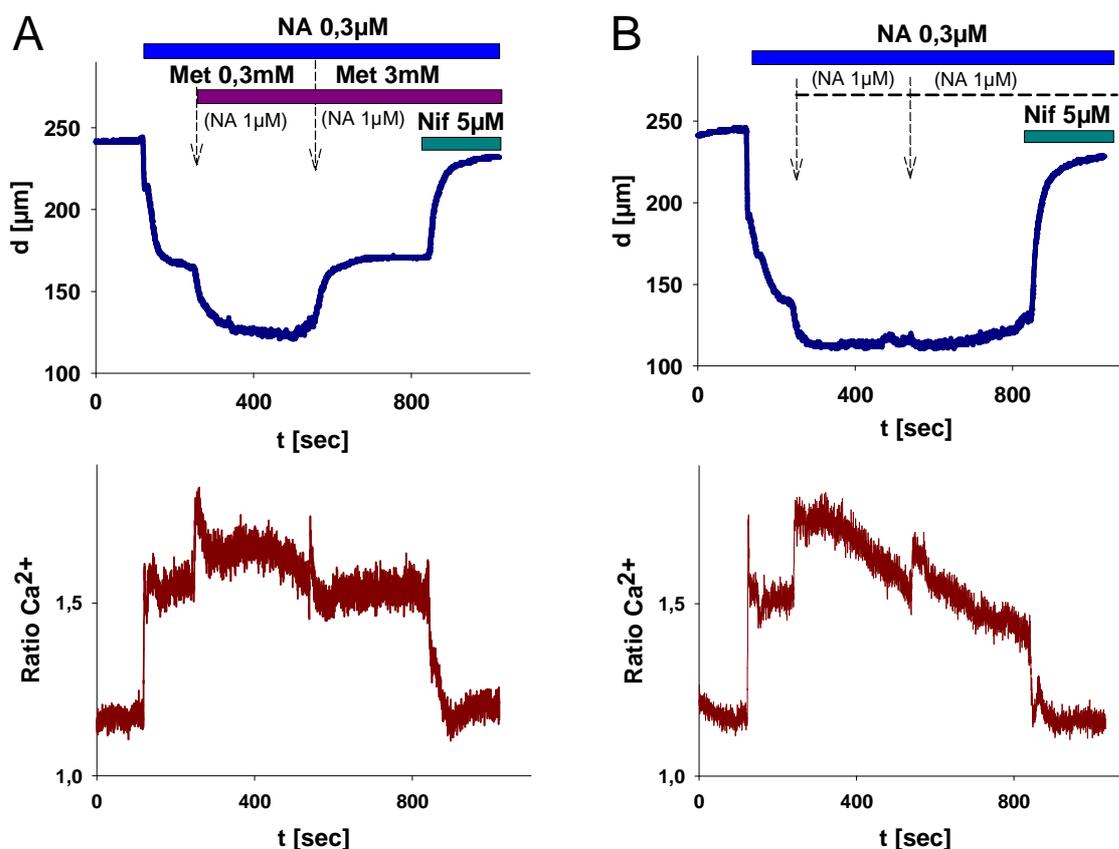


Abb. 3.6: Wirkung von Metformin an Widerstandsgefäßen

Diese repräsentative Originalaufzeichnung zeigt eine signifikante Dilatation nach Zugabe von Metformin (A, 3mM), die in der Kontrollaufzeichnung (B) nicht zu beobachten war.

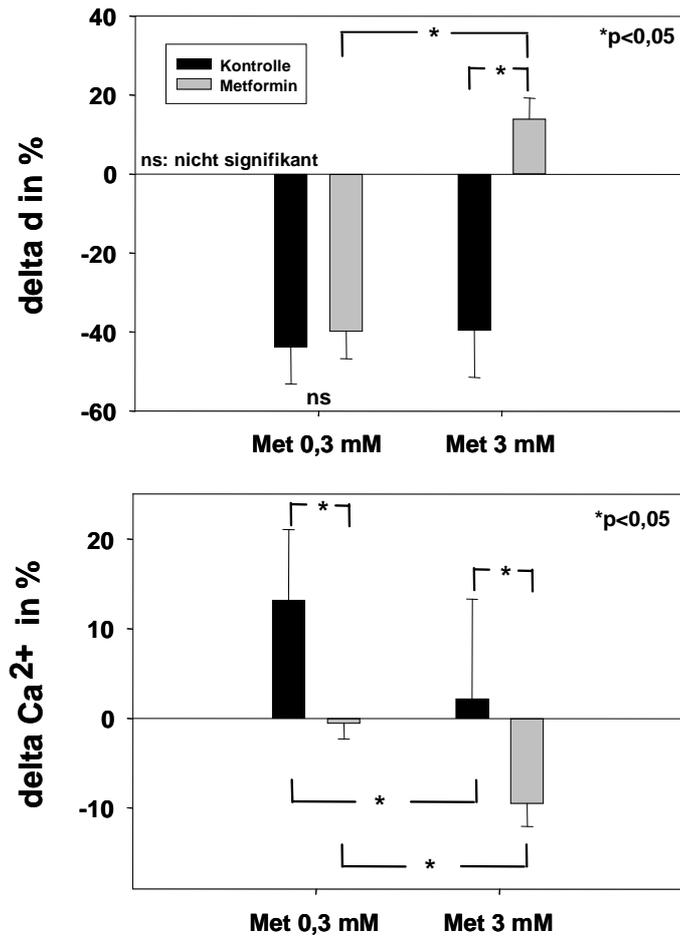


Abb. 3.7: Vasodilatation durch Metformin

Nur die Zugabe von Metformin (3mM) führte zu einer deutlichen Vasodilatation (ca. 50%) vorkontrahierter Gefäße. Der assoziierte Kalziumabfall betrug circa 10%. Ein vergleichbarer Kalziumabfall ließ sich jedoch auch in der Kontrollgruppe feststellen (jeweils n=5).

3.7 A76 Effekte nach Vordepolarisation mit hohem extrazellulärem Kalium

Zur Eingrenzung möglicher, der Dilatation zugrunde liegender Mechanismen wurden die A76 Effekte anschließend an Arterien studiert, die anstatt mit Noradrenalin mit einem kaliumreichen MOPS-Puffer depolarisiert und damit vorkontrahiert wurden. Die Stimulation mit 100mM Kalium verursachte in dieser Versuchsgruppe eine stärkere (jedoch statistisch nicht signifikant, $p=0,136$) Konstriktion und einen signifikant höheren Kalziumanstieg im Vergleich zu Noradrenalin ($0,3 \mu\text{M}$):

(n=5)	Noradrenalin	Kalium	
d_{Kon} [% von d_{basal}]	$65,8 \pm 2,3$	$57,1 \pm 4,7$	ns
Ca_{Kon} [% von Ca_{basal}]	$144,0 \pm 6,2$	$208,1 \pm 9,1$	$p<0,05$

Die Applikation von A76 ($0,1\text{mM}$) löste in diesen Arterien weder eine signifikante Dilatation, noch einen signifikanten Abfall der Kalziumratio aus. Durch die Zugabe von Nifedipin ($5\mu\text{M}$) wurden demgegenüber sowohl die basalen Ausgangsdurchmesser wie auch die basalen Kalziumratios wieder erreicht.

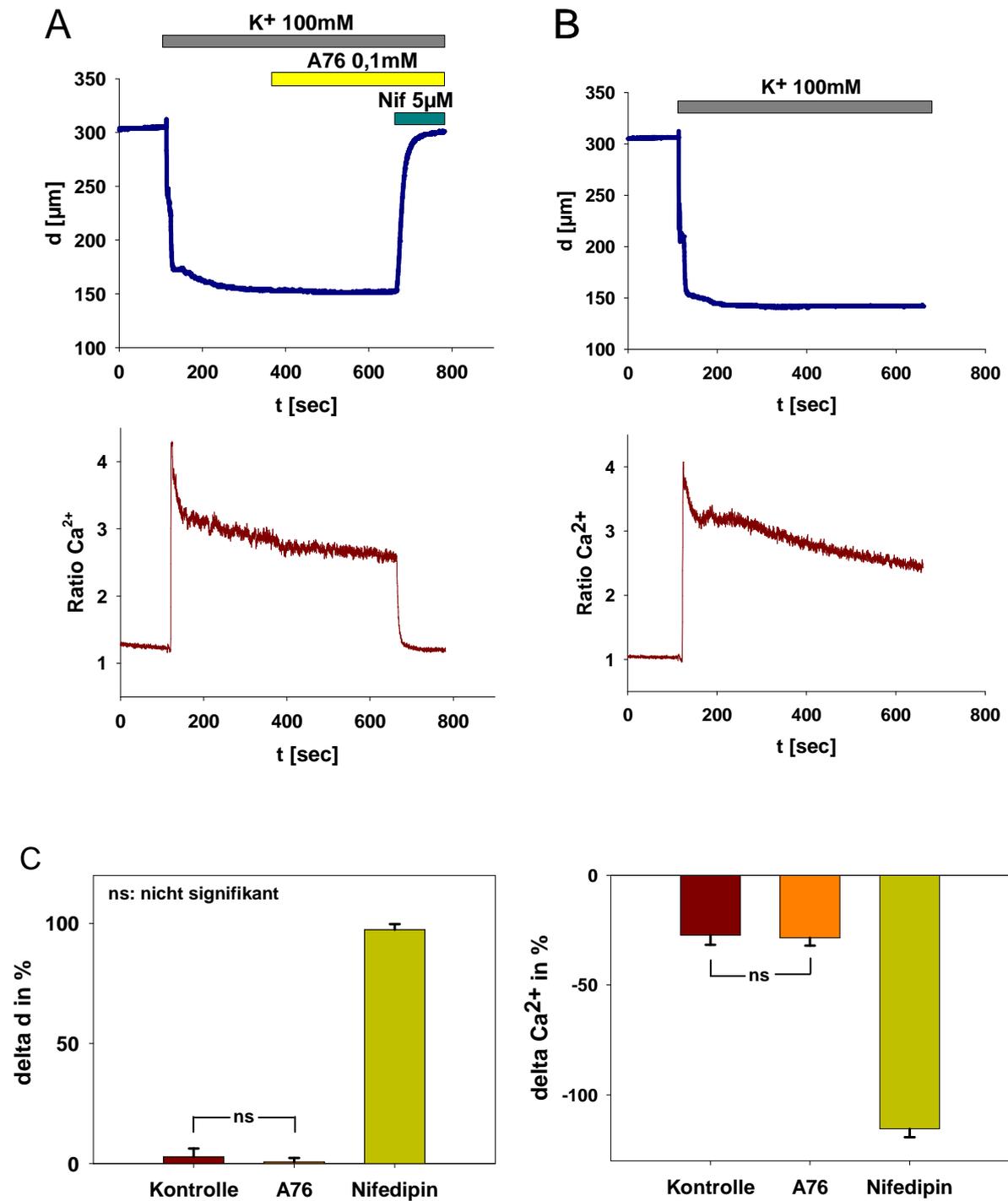


Abb. 3.8: Ausbleiben der Dilatation bei Vordepolarisation mit kaliumreichen MOPS-Puffer

Repräsentative Originalaufzeichnungen der Effekte von A76 (A) in Arterien nach Vorkontraktion mit hoher Kaliumkonzentration (100mM). A76 führte unter diesen Bedingungen weder zu signifikanter Dilatation, noch zu einem signifikanten Kalziumabfall im Vergleich zur Kontrolle (B), (C). Im Gegensatz dazu dilatierten die Gefäße unter Nifedipin wieder bis auf Ausgangswerte (A), (C).

3.8 Pharmakologische Blockade verschiedener Kaliumkanäle

Um die potentielle Rolle verschiedener Kaliumkanal-Typen der glatten Muskelzellmembran bei der A76-induzierten Dilatation zu untersuchen wurden diese in weiteren Versuchen pharmakologisch blockiert. Die Dilatation bzw. der Abfall der Kalziumratio nach Stimulation mit Acetylcholin sowie mit A76 (0,1mM) wurden vor und nach Behandlung mit den Blockern in denselben Gefäßen untersucht.

Die selektive Blockade von BK_{Ca}-Kanälen mit Iberiotoxin (0,1µM) führte zu einer signifikanten Steigerung der Vorkontraktion mit Noradrenalin (0,3µM), während die Applikation von Acetylcholin (1µM) auch nach Hemmung weiterhin zu einer vollständigen Dilatation führte.

Ebenso führte die Zugabe des unselektiven Kaliumkanalblockers (IK_{Ca}, BK_{Ca}, K_v) Charybdotoxin (1µM) in Verbindung mit Noradrenalin zu einer Zunahme der Vorkontraktion (nur Kalziumanstieg signifikant) im Vergleich zu Noradrenalin allein. Die vasodilatatorischen Effekte des Acetylcholins wurden durch Charybdotoxin im Gegensatz zum Iberiotoxin jedoch - abgesehen von einer schwachen, transienten Dilatation - vollständig aufgehoben:

(jeweils n=5) * p < 0,05	IbTX			CTX		
	NA	NA + IbTX	*	NA	NA + CTX	ns
d_{Kon} [% von d _{basal}]	59,4 ± 3,4	50,2 ± 1,6	*	64,1 ± 2,6	57,9 ± 3,3	ns (p=0,176)
Ca_{Kon} [% von Ca _{basal}]	141,0 ± 5,3	160,4 ± 7,7	ns (p=0,072)	144,7 ± 2,3	164,7 ± 2,4	*
d_{Ach} [% von d _{basal}]	93,4 ± 1,8	97,1 ± 1,3	ns	97,4 ± 1,0	53,7 ± 2,3	*
Ca_{Ach} [% von Ca _{basal}]	100,4 ± 5,1	89,1 ± 3,8	ns	97,9 ± 4,2	164,2 ± 5,6	*

Tab. 3.2: Effekte von Iberiotoxin und Charybdotoxin auf die Konstriktion durch Noradrenalin und die anschließende Dilatation durch Acetylcholin

Konstriktion und Kalziumanstieg isolierter Widerstandsarterien durch Noradrenalin (0,3µM) jeweils vor (NA) und nach (NA + IbTX / CTX) Blockade verschiedener Kaliumkanäle sowie Beeinflussung der acetylcholinergen Vasodilatation (Ach 1µM, „Dilatation“ und „Ca-Abfall“) in der jeweiligen Gruppe.

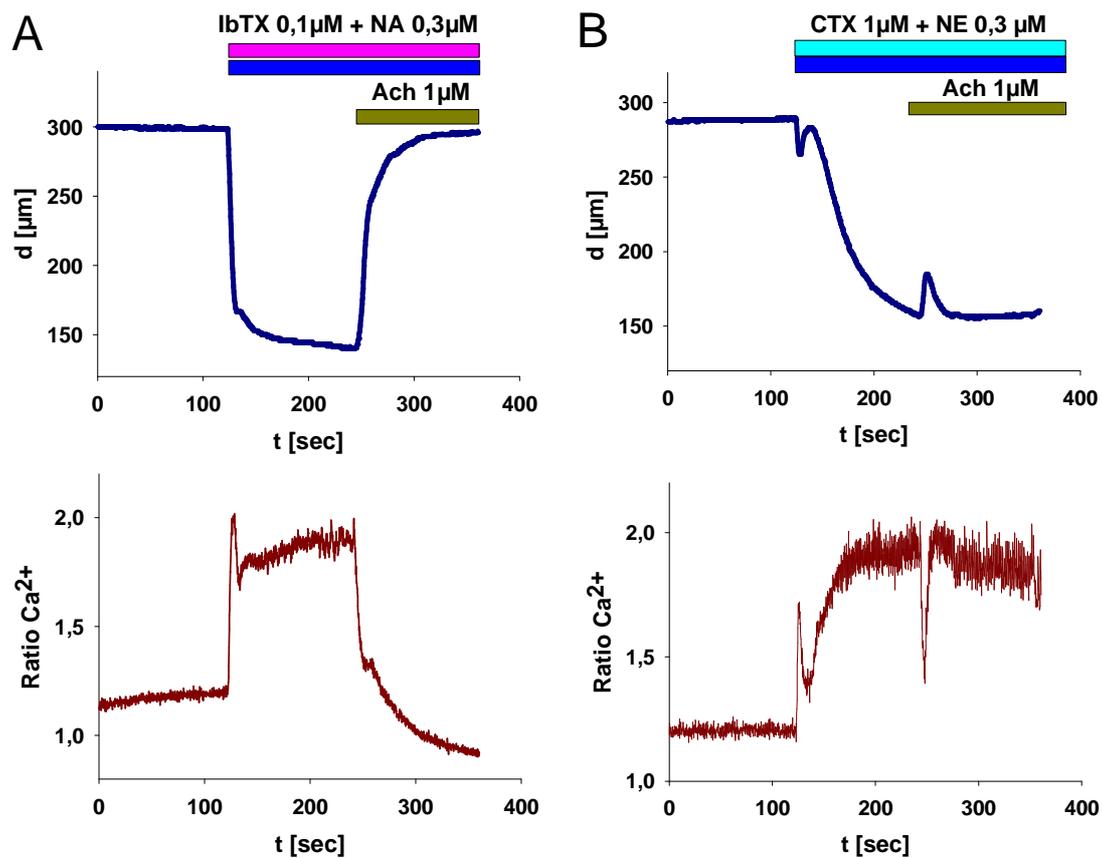


Abb. 3.9: Blockade Acetylcholin induzierter Vasodilatation durch Charybdotoxin

Verhalten der cholinergen Vasodilatation nach spezifischer Blockade von BK_{Ca}-Kanälen mit Iberitoxin (A) bzw. unspezifischer Blockade von Kaliumkanälen durch Charybdotoxin (B). Originalregistrierung der Durchmesser- (oben) und Kalziumveränderungen (unten) repräsentativer Beispiele aus beiden Gruppen.

Im Gegensatz zu Acetylcholin wurden die Effekte von A76 weder durch Iberitoxin noch durch Charybdotoxin an vorkontrahierten Arterien signifikant abgeschwächt. In beiden Versuchsgruppen kam es weiterhin im Vergleich zur Maximalantwort durch Nifedipin zu einer annähernd vollständigen Vasodilatation, der ein massiver Kalziumabfall vorausging:

	A76	A76 + IbTX	A76 + CTX	
Δd^{Nif} [%]	96,7 ± 1,8	96,9 ± 1,5	93,5 ± 5,1	ns
$\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i^{\text{Nif}}$ [%]	-88,0 ± 3,2	-88,9 ± 3,7	-90,9 ± 1,5	ns

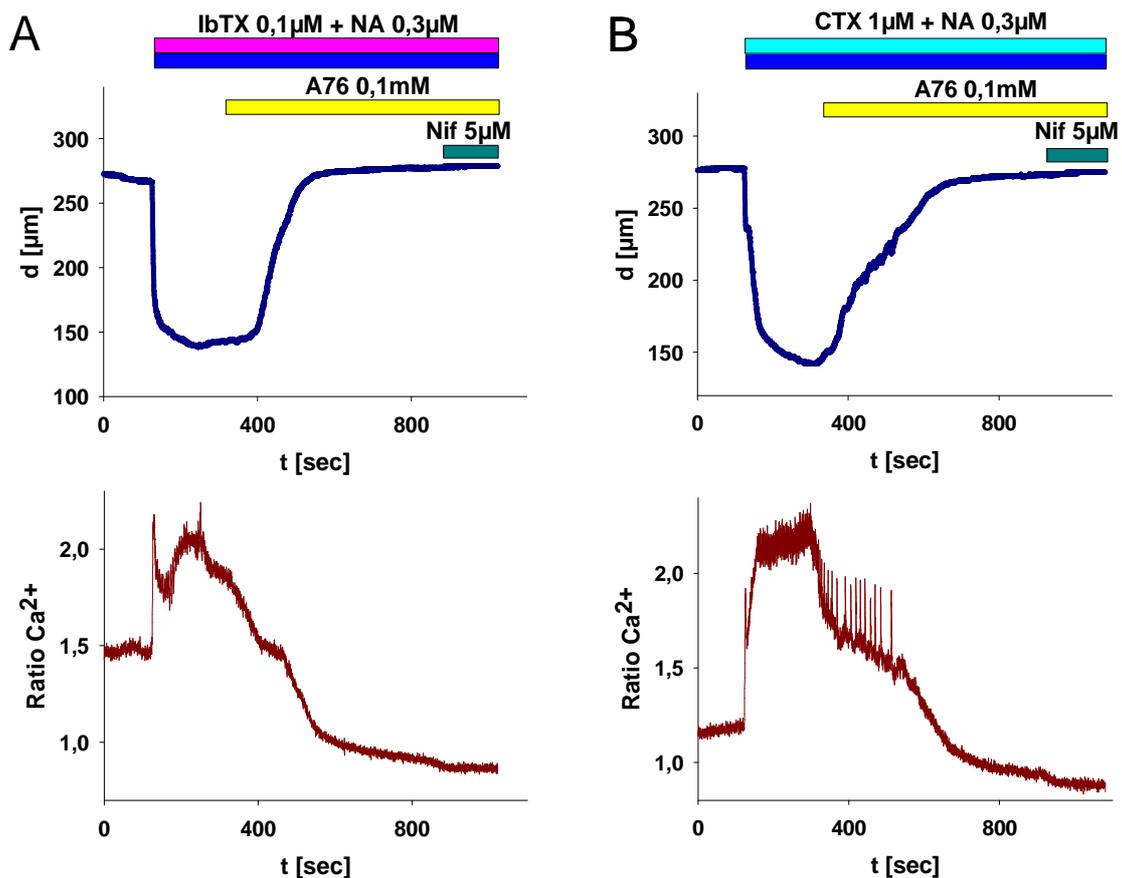


Abb. 3.10: Unbeeinflusste A76 Effekte durch Iberiotoxin und Charybdotoxin

Erhaltene A76 induzierte Dilatation mit Abfall der Kalziumratio nach Blockade von Kaliumkanälen mit Iberiotoxin (A) und Charybdotoxin (B). Die Gefäße zeigten nach Blockade mit CTX während der Dilatation charakteristische Oszillationen der Kalziumratio. Es handelt sich jeweils um Originalregistrierungen repräsentativer Beispiele.

Auffällig war dabei, dass es nach unspezifischer Blockade von Kaliumkanälen durch Charybdotoxin während des Kalziumabfalls in vier von fünf Gefäßen zu starken Oszillationen des Kalziumspiegels kam. Im Mittel fiel das Kalzium jedoch stark ab. Den Kalziumschwankungen entsprachen Durchmesserchwankungen, die jedoch nur eine sehr geringe Amplitude aufwiesen. Im Mittel nahm der Durchmesser dabei zu.

Dasselbe Phänomen ließ sich nach Hemmung der BK_{Ca} -Kanäle mit Iberiotoxin nur in einem von fünf Gefäßen beobachten, während derartige Oszillationen während des A76 induzierten Kalziumabfalls in den Kontrollgefäßen niemals auftraten.

Abb. 3.11 zeigt eine repräsentative Originalaufzeichnung einer Messung an einer isolierten Widerstandsarterie nach Blockade ATP-abhängiger Kaliumkanäle mit Glibenclamid (0,1mM):

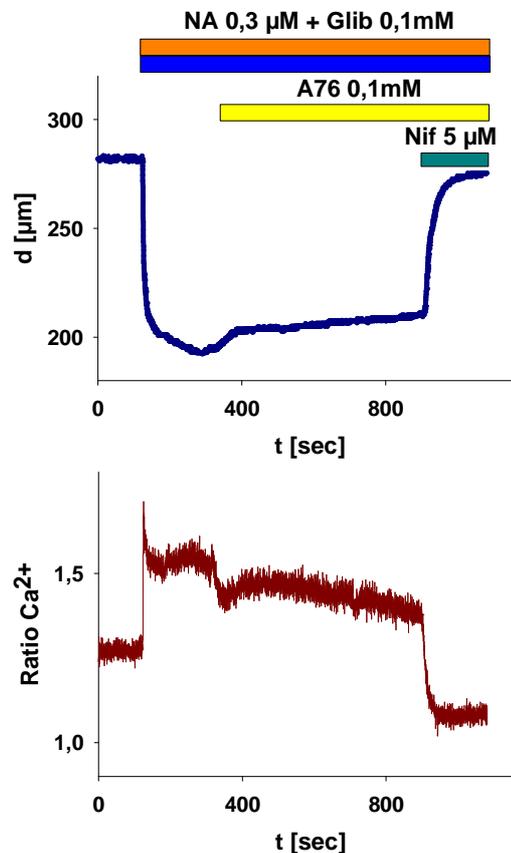


Abb. 3.11: Hemmung der A76 induzierten Dilatation durch Glibenclamid

Repräsentative Originalaufzeichnungen eines isolierten Gefäßes nach Applikation von A76 (0,1mM) unter Inhibition ATP-abhängiger Kaliumkanäle durch Glibenclamid (0,1mM). Es zeigen sich sowohl eine deutliche Hemmung der Dilatation (oben) wie auch ein deutlich reduzierter Kalziumabfall (unten) nach Blockade.

Während das Ausmaß der Vorkontraktion durch Glibenclamid nicht signifikant beeinflusst wurde, zeigte sich nach Applikation von A76 nur mehr eine deutlich reduzierte Vasodilatation sowie ein deutlich reduzierter Abfall der Kalziumratio im Vergleich zum Effektniveau ohne Inhibitor:

(n=5)	NA	NA + Glib	
d_{Kon} [% von d _{basal}]	63,4 ± 4,3	67,3 ± 6,2	ns
Ca_{Kon} [% von Ca _{basal}]	135,1 ± 4,3	133,6 ± 4,6	ns

(n=5)	A76	A76 + Glib	
Δd^{Nif} [%]	96,7 \pm 1,8	21,1 \pm 7,0	p<0,05
$\Delta[Ca^{2+}]_i^{Nif}$ [%]	-88,0 \pm 3,2	31,5 \pm 2,2	p<0,05

Einen Überblick auf den Einfluss der getesteten Kanalinhhibitoren auf A76 induzierte Gefäßreaktionen gibt Abb. 3.12:

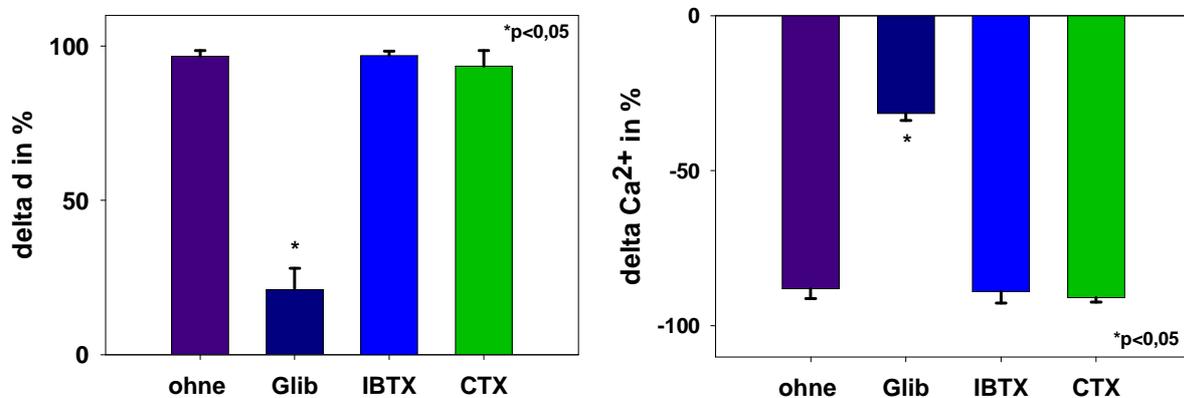


Abb. 3.12: Einfluss verschiedener Kaliumkanalblocker auf A76 induzierte Effekte

Inhibition verschiedener Kaliumkanäle. Während sich durch IbTX und CTX keine signifikanten Veränderungen hervorrufen ließen, führte eine Behandlung mit Glibenclamid (putative Blockade ATP-abhängiger Kaliumkanäle) zu einer deutlichen Abschwächung A76 induzierter Effekte. Die linke Grafik zeigt jeweils relative Veränderungen im Außendurchmesser, die rechte den relativen Abfall der Kalziumratio normalisiert auf maximale vasodilatatorische Effekte durch Nifedipin (5 μ M)

3.9 Blockade der $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$

Um eine Beteiligung der $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ an den A76 vermittelten Effekten zu untersuchen, wurde diese in einer kleinen Versuchsgruppe (n=5) mittels Ouabain blockiert.

Eine durch Noradrenalin ($0,3\mu\text{M}$) hervorgerufene Konstriktion wurde durch die Zugabe von Ouabain ($0,1\text{mM}$) nicht signifikant verändert. Dies galt ebenfalls für die gemessene Kalziumratio:

(n=5)	NA	NA + Ouabain	
d_{Kon} [% von d_{basal}]	$58,5 \pm 1,7$	$55,8 \pm 1,7$	ns
Ca_{Kon} [% von Ca_{basal}]	$133,5 \pm 3,7$	$137,5 \pm 3,3$	ns

Die durch A76 vermittelten Reaktionen unterschieden sich nach auf diese Weise erfolgter Blockade der $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ bezüglich der induzierten Dilatation sowie des Abfalls der Kalziumratio ebenfalls nicht signifikant von der Versuchsgruppe ohne Hemmung der Ionenpumpe:

(n=5)	A76	A76 + Ouabain	
Δd^{Nif} [%]	$96,7 \pm 1,8$	$95,2 \pm 1,8$	ns
$\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i^{\text{Nif}}$ [%]	$-88,0 \pm 3,2$	$-88,3 \pm 5,4$	ns

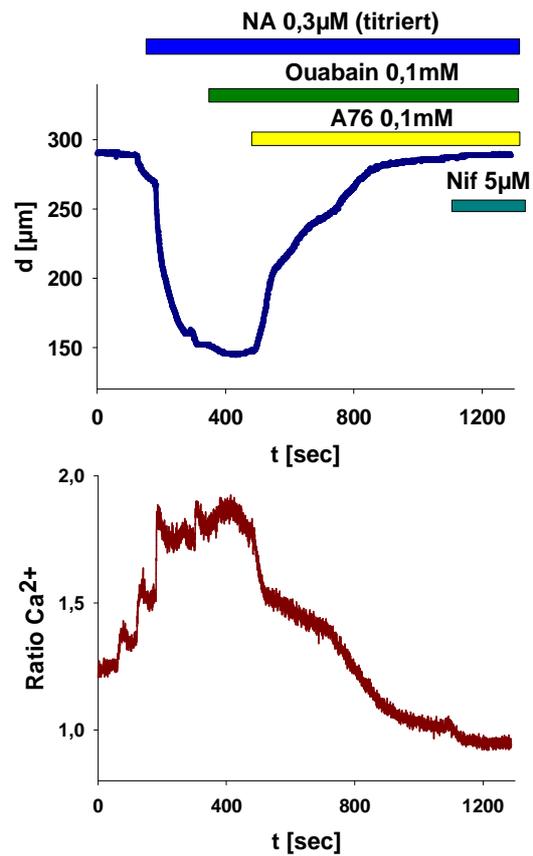


Abb. 3.13: Unbeeinflusste A76 Effekte durch Ouabain

Die A76 induzierten Effekte blieben durch eine Hemmung der Na⁺-K⁺-ATPase mittels Ouabain (0,1mM) unbeeinflusst. Diese repräsentative Originalaufzeichnung zeigt weiterhin eine vollständige Dilatation des Widerstandsgefäßes mit begleitendem Abfall des intrazellulären glattmuskulären Kalziums nach Blockade der Ionenpumpe.

4 Diskussion

4.1 Auswahl des Versuchsmodells

Die hier vorgestellten Untersuchungen mit dem AMPK-Stimulator A76 sprechen prinzipiell für eine modulierende Rolle der AMPK bei der Kontrolle des Tonus kleiner Widerstandsarterien in der Skelettmuskulatur, die man quantitativ mit der des potenten Dilatators EDHF vergleichen kann. Bisherige Erkenntnisse zu einer möglichen Rolle der AMPK im Gefäßsystem basierten vornehmlich auf Versuchen entweder an Makrogefäßen, vor allem der Aorta, oder an isolierten Endothelzellen. Bekanntermaßen hängen der Blutzufuß zu den Organen wie auch der periphere Gefäßwiderstand in hohem Maße vom Tonus kleiner Arterien und Arteriolen ab. Da die komplexen, an der Vasoregulation beteiligten Mechanismen zwischen den verschiedenen Abschnitten des Gefäßsystems jedoch meist erheblich variieren [33, 83], lassen sich an großen Gefäßen oder isolierten Zellen gewonnene Erkenntnisse nicht einfach auf Widerstandsgefäße übertragen.

In der vorliegenden Arbeit wurden deshalb als Modell isolierte Widerstandsgefäße des Hamsters gewählt. Mit einer im Labor über mehrere Jahre hinweg etablierten Methode, die eine gleichzeitige Registrierung von Veränderungen des Außendurchmessers sowie der intrazellulären Kalziumkonzentration an intakten Mikrogefäßen ermöglicht, konnten in der jüngeren Vergangenheit unter anderem bereits wertvolle Erkenntnisse zur Aufklärung der molekularen Vorgänge EDHF-vermittelter Vasodilatation gesammelt werden [37, 84]. Dabei kann das isolierte, funktionell intakte Gefäß als Bindeglied zwischen in vitro Versuchen in kultivierten Gefäßzellen und in vivo Versuchen verstanden werden. Einerseits ist durch die Integrität des Zellverbandes der Aussagewert am intakten Organsystem Gefäß insgesamt höher zu bewerten als Erkenntnisse an isolierten Einzelzellen. Andererseits fallen im Vergleich zu in vivo Versuchen systemische Einflüsse weg, die die Interpretation von Beobachtungen zunächst deutlich erschweren können. Zur Evaluation der physiologischen Relevanz von Ergebnissen, die in vitro erhoben wurden, sollte dann jedoch in einem nachgeschalteten Schritt stets ein Transfer auf in vivo Modelle erfolgen.

Ähnliche Modelle zur kontinuierlichen Durchmesserregistrierung an isolierten Widerstandsgefäßen der Maus oder der Ratte sind mehrfach beschrieben [85-88].

Ohne Zweifel würden sich gerade Mausgefäße aufgrund der Verfügbarkeit bzw. Generierbarkeit von Knockout-Modellen für derartige Untersuchungen anbieten.

Andererseits steht beim Hamster mit der Präparation des Cremastermuskels ein häufig verwendetes [89-90] und gerade auch in unserer Arbeitsgruppe gut charakterisiertes in vivo-Modell zur Verfügung, mit dem bereits zahlreiche Voruntersuchungen durchgeführt wurden [91-93].

Ein weiterer Pluspunkt des Hamsters ist die insgesamt gute Auswertbarkeit der Kalziumsignale, da die Beladung der glatten Gefäßmuskulatur mit dem Farbstoff Fura2 problemlos funktioniert, wohingegen bei der Maus durch die geringere Gewebsmenge sowie durch eine schlechtere Beladbarkeit mit dem Farbstoff die Auswertbarkeit der Kalziumsignale wegen des schlechteren Signal-Rauschabstandes gerade im Hinblick auf schnelle Reaktionen erschwert ist (Schubert et al, unveröffentlicht). Zudem erwiesen sich in orientierenden Experimenten Hamstergefäße in der für die Transfektion benötigten Organkultur als wesentlich langlebiger als die entsprechenden Mausgefäße.

Einige generelle Probleme der Kalziummessung seien an dieser Stelle ebenfalls angesprochen. Trotz der gewählten Technik mit Austausch von nur einem Drittel des Organbadvolumens bei Zugabe einer vasoaktiven Substanz lassen sich mechanische Effekte am Gefäß bei der Zugabe der Substanzen nicht vollends ausschließen. Gerade innerhalb der ersten Sekunden nach Austausch waren kurzzeitige Änderungen der Kalziumratio in beide Richtungen zu beobachten, welche am ehesten als Mischeffekt aus mechanischer Irritation der Zellen und der raschen Konzentrationsänderung der Substanzen bis zur vollständigen Durchmischung des Organbads zu deuten waren. Um eine Verfälschung der Ergebnisse durch diese Effekte jedoch bestmöglich zu vermeiden, wurden deshalb Veränderungen der Kalziumratio und der Gefäßdurchmesser immer erst frühestens zwei Minuten nach Zugabe einer Substanz und Erreichen eines steady states bewertet. Des Weiteren ließ sich nach Stimulation mit einem Vasokonstriktor auch über kurze Messperioden von wenigen Minuten regelhaft ein Abfall der Kalziumratio trotz gleich bleibender Konstriktion feststellen, weshalb die dargestellten Ergebnisse immer im Vergleich mit den Kontrollen zu interpretieren sind. Eine Ursache für dieses Phänomen könnte in einem mit zunehmender Dauer der NA Exposition asynchronen Verhalten von Kalziumoszillationen in der glatten Muskulatur zu suchen sein [94].

4.2 Aktivierung der AMPK durch A76

Zur Aktivierung der AMP-Kinase wurde in der vorliegenden Arbeit vorrangig die Substanz A76 verwendet. Für diesen noch relativ neuen AMPK-Agonisten aus der Gruppe der Thienopyridone konnte bereits gezeigt werden, dass eine direkte potente Enzymaktivierung sowohl von gereinigter AMPK im zellfreien Milieu wie auch in isolierten Zellen erfolgt [95-96]. Dabei scheinen zwei Mechanismen eine Rolle zu spielen. Zum einen eine direkte allosterische Aktivierung der AMPK und zum anderen eine Hemmung der Dephosphorylierung, was zu einer Verschiebung des Gleichgewichts zugunsten der aktiven, phosphorylierten Form des Enzyms führt [97]. In mehreren Studien ergaben sich dabei Hinweise, dass bei der Aktivierung der AMPK durch A76 im Gegensatz zu AMP jedoch nicht die Anwesenheit der regulatorischen γ -Untereinheit, sondern die der β -Untereinheit von entscheidender Bedeutung ist. Im speziellen stellte sich sogar heraus, dass A76 nur zu einer Aktivierung der AMPK führt, wenn das heterotrimere Enzym die β_1 -Isoform enthält [53, 98-99]. Aus diesem Grund war es nötig zunächst mittels Western Blot nachzuweisen, dass in Hamstergefäßen die β_1 -Isoform tatsächlich exprimiert wird. Dies gelang mithilfe von Kaninchenantikörpern - vermutlich aufgrund der hohen Homologie zwischen den Spezies - auch im Hamstergewebe. Auch wenn für die Blots aufgrund der benötigten Proteinmengen Material aus der *A. femoralis* verwendet werden musste und damit nicht Material aus den kleineren Gefäßen, die für die funktionellen Versuche verwendet wurden, erscheint ein Vorliegen dieser Untereinheit auch in diesen Gefäßen, die ja aus der *A.femoralis* hervorgehen, sehr wahrscheinlich. Neben der β_1 -Isoform ließ sich in der glatten Gefäßmuskulatur des Hamsters zusätzlich noch die β_2 -Isoform nachweisen. Da der im Blot verwendete Antikörper gegen beide Isoformen gerichtet war und diese laut Herstellerangabe mit gleicher Affinität bindet, kann die deutlich stärkere Proteinbande für die β_1 -Isoform als Hinweis auf eine Prädominanz dieser Isoform in der glatten Gefäßmuskulatur gewertet werden. Somit war diese grundlegende Voraussetzung für eine A76 induzierte Aktivierung der AMPK am untersuchten Organsystem gegeben.

An mit Noradrenalin vorkontrahierten isolierten kleinen Hamsterarterien führte A76 ähnlich wie der bekannte Vasodilatator Acetylcholin ab einer Dosierung von 100 μ M zu einer maximalen Dilatation der Gefäße, die mit einem ausgeprägten, vorangehenden Kalziumabfall assoziiert war. Unterschiede zeigten sich jedoch in der

Kinetik der durch beide Substanzen verursachten Effekte. Während der Kalziumabfall bei Acetylcholin eher stetig und jeweils nahezu unmittelbar nach Zugabe der Substanz auftrat, setzte dieser bei A76 zeitlich leicht verzögert ein und ließ einen meist deutlichen zweiphasigen Verlauf erkennen. Dies erbrachte bereits einen ersten Hinweis darauf, dass der beobachteten Dilatation vermutlich unterschiedliche zelluläre Mechanismen zugrunde liegen könnten.

Der aus der Dosiswirkungskurve näherungsweise abzulesende EC_{50} -Wert für A76 lag dabei etwa 10- bis 100-mal über den in der Literatur beschriebenen Werten [67, 95]. Diese Werte wurden jedoch an gereinigtem Enzym unter Messung der Phosphorylierung eines direkten Zielproteins, des so genannten SAMS Peptides gemessen [100]. In Bezug auf die Gefäßversuche ist jedoch die tatsächliche intrazelluläre Wirkkonzentration nicht abschätzbar. Zudem ist der analysierte Effekt der Vasodilatation nach Stimulation mit A76 als Resultat einer komplexen Kaskade zu sehen.

Auch wenn A76 insgesamt als sehr spezifischer Aktivator der AMPK einzustufen ist [101], gab es in letzter Zeit doch zunehmend Hinweise, dass A76 auch direkte, AMPK unabhängige Effekte aufweist [99, 102-103].

Um abzuklären inwieweit die beobachtete Vasodilatation tatsächlich auf eine Aktivierung der AMP-Kinase zurückzuführen ist, sollten die Effekte einer pharmakologischen Blockade der AMP-Kinase untersucht werden.

Der derzeit einzige etablierte Inhibitor der AMP-Kinase ist die Substanz Compound C, die kompetitiv zu ATP zu einer Hemmung der AMPK führt [65, 104]. An isolierten Gefäßringen ließen sich mit Compound C von der Arbeitsgruppe von Jennifer Rush auch tatsächlich vasodilatatorische Effekte einer AMPK-Aktivierung antagonisieren [105]. In unseren Gefäßen führte Compound C jedoch bei Applikation ($1\mu\text{M}$) zu einer ausgeprägten Abschwächung der Noradrenalin vermittelten Kontraktion, so dass eine sinnvolle Auswertung der Versuche nicht möglich erschien und deshalb nicht im Ergebnisteil aufgeführt wurde. Die zum Erhalt einer stabilen Vorkontraktion benötigten Noradrenalkonzentrationen mussten bei gleichzeitiger Gabe von Compound C auf das 3- bis 10-fache ($1\text{-}3\mu\text{M}$) erhöht werden. Die anschließend zu beobachtenden Effekte von A76 waren zwar unter diesen Bedingungen in der Tat etwas abgeschwächt, jedoch lässt sich so kaum eine valide Aussage dazu treffen, ob dies wirklich auf einer Hemmung der AMPK beruhte oder der höheren

Vasokonstriktorendosis geschuldet war. Diese unterschiedlichen Beobachtungen bezüglich der vasoaktiven Wirkung von Compound C sind vermutlich den unterschiedlichen Spezies sowie vor allem den unterschiedlichen untersuchten Gefäßtypen geschuldet. In den oben genannten Versuchen der Arbeitsgruppe Rush [105] wurden anstatt von Widerstandsgefäßen isolierte Aortenringe von Ratten verwendet, in denen die A76 induzierte Vasodilatation im Gegensatz zu den Widerstandsgefäßen des Hamsters primär abhängig ist von endotheliale NO.

Berücksichtigt man, dass es sich bei der Substanz Compound C keinesfalls um einen spezifischen Hemmer der AMP-Kinase handelt [106], sondern ganz im Gegenteil noch mindestens zehn weitere Proteinkinasen teilweise sogar stärker gehemmt werden als die AMPK [107], dann wird klar, dass mit Compound C nur schwer eine eindeutige Aussage bezüglich einer spezifischen Rolle der AMPK herzuleiten ist. Aus diesem Grund ist die Suche nach spezifischeren AMPK-Hemmern derzeit Gegenstand intensiver Forschung [108].

Hinzu kommt, dass in der Literatur mehrere Veröffentlichungen zu finden sind, in denen eine Blockade des AMPK-Komplexes durch Compound C beschrieben wird, wenn dieser die α_2 -Isoform enthält [109-111]. Analysen an Endothelzellen wie auch an vaskulären glatten Muskelzellen erbrachten jedoch starke Hinweise, dass die α_1 -Isoform die tragende Rolle für die katalytische Gesamtaktivität der AMPK in vaskulärem Gewebe zu spielen scheint [60, 112]. Der deutlich positive Nachweis der α_1 -Untereinheit bei sehr schwacher α_2 -Bande im Western Blot der hier verwendeten Femoralarterien des Hamsters würde diese These stützen. Insgesamt erwies sich Compound C somit nicht als brauchbares Tool zur Hemmung der AMP-Kinase in den in dieser Arbeit untersuchten Widerstandsgefäßen.

Stattdessen wurde auf ein zuvor in unserer Arbeitsgruppe von Steffen Bolz entwickeltes Transfektionsmodell zurückgegriffen: nach Entwicklung einer Organkultur für isolierte Widerstandsgefäße gelang es ihm isolierte intakte Gefäße mithilfe des nicht-liposomalen Lipidtransfektionsreagens Effectene hocheffizient mit verschiedenen Plasmid-DNAs zu transfizieren [113-114].

Plasmide sind kleine, meist ringförmige, doppelsträngige DNA-Moleküle, die insbesondere in Bakterien vorkommen. Sie können mehrere Gene enthalten und vermitteln dem Wirtsbakterium dadurch verschiedene zusätzliche Eigenschaften wie beispielsweise Antibiotikaresistenzen. Der Vorteil der Plasmide für die Transfektion

ist, dass sie extrachromosomal liegen und unabhängig vom Chromosomensatz der Wirtszelle repliziert werden können.

In dieser Arbeit wurden hierauf aufbauend die A76 medierte Effekte an Gefäßen studiert, in denen die Funktion der katalytischen α -Untereinheit der AMPK durch Transfektion mit einer dominant-negativen Mutante der α_1 -Isoform herabgesetzt wurde. Dabei wird anstatt der von der Zelle exprimierten intakten α_1 -Untereinheit die über das Plasmid exprimierte α_1 -Mutante in den trimeren AMPK-Komplex eingebaut, der dann keine katalytische Aktivität aufweist. Als Kontrolle diente eine mit einer konstitutiv aktiven α_1 -Isoform transfizierte Vergleichsgruppe.

Als Ergebnis zeigte sich ein signifikanter Unterschied mit sowohl reduzierter Dilatation wie auch vermindertem Kalziumabfall in der dominant negativ Gruppe, jedoch bei weitem keine vollständige Aufhebung der A76 Effekte.

Hierfür gibt es verschiedene Erklärungsansätze. Zwar scheint die α_1 -Isoform wie oben besprochen die tragende Rolle für die katalytische Gesamtaktivität der AMPK in vaskulärem Gewebe, insbesondere eben auch in den hier untersuchten Widerstandsgefäßen zu spielen. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass Komplexe mit der α_2 -Isoform gerade bei herabgesetzter α_1 -Expression kompensatorisch überexprimiert werden und unter diesen Bedingungen relevant zur Gesamtaktivität der AMPK beitragen können [115-116].

Zum anderen wurde in den vorliegenden Versuchen kein direkter Nachweis der Transfektionseffizienz für die verwendeten Plasmide oder den Grad der Restaktivität der AMPK nach Transfektion erbracht. Dies liegt vor allem an der geringen Masse der verwendeten Gefäße, die allenfalls für einen Pool von gleichartigen Gefäßen einen Proteinnachweis erlaubt, der dann für das Einzelgefäß jedoch keine Aussagekraft hätte.

Bolz et al beobachteten für die auch in dieser Arbeit verwendeten kleinen Arterien eine Transfektionsausbeute bei Transfektion eines für GFP kodierenden Plasmids (1045 Basenpaare) von mehr als 90% [114]. Andere Arbeitsgruppen beschreiben die Transfektionsraten der Lipidtransfektion von Plasmid-DNA dagegen schon bei Transfektion von isolierten Gefäßmuskelzellen als gering im Vergleich zu anderen Zelllinien [117-118]. Bei der Transfektion der hier vorliegenden Widerstandsgefäße ist somit wohl nur von einer inkompletten Ausschaltung der AMPK-Aktivität auszugehen.

Die Hemmung der AMPK Wirkung, die bei Transfektion des "Kontrollplasmids" nicht auftrat, weist also darauf hin, dass die beobachtete Wirkung zumindest zu einem Teil qualitativ auf eine Aktivierung der AMP-Kinase zurückzuführen ist. Quantitative Aussagen lassen sich jedoch nicht treffen.

Ein interessanter Nebenaspekt bei den Transfektionsversuchen spricht überdies, dafür, dass die Transfektion zumindest teilweise erfolgreich war. Die durch Noradrenalin ausgelöste Konstriktion war nach Transfektion des dominant negativen Plasmids signifikant stärker als in Gefäßen mit stimulierter α_1 -Expression. Ein erhöhter Aktivitätsgrad der AMPK, hervorgerufen durch die Expression der konstitutiv aktiven α_1 -Untereinheit, würde mit hoher Wahrscheinlichkeit den Effekt des Vasokonstriktors Noradrenalin herabsetzen. Dieser Mechanismus könnte auch erklären, dass einmal mit A76 behandelte Gefäße auch nach Auswaschen von A76 zunächst eine deutlich geringere Kontraktionsantwort auf Noradrenalin aufwiesen, die sich erst nach wiederholtem, intensivem Auswaschen normalisierte (Ergebnisse nicht dargestellt). Eine dazu passende Erkenntnis konnte aktuell an AMPK-Knockout-Mäusen gewonnen werden. In diesen Tieren führte Noradrenalin zu einer signifikant stärkeren Vasokonstriktion im Vergleich zum Wildtyp [111].

Die inkomplette Hemmung des vasodilatatorischen Effektes von A76 durch die Transfektion könnte aber auch dadurch erklärt werden, dass direkte, AMPK-unabhängige pharmakologische Effekte der Substanz A76 einen Kalziumabfall bzw. eine Vasodilatation auslösen. So ist seit kurzem bekannt, dass A76 durch direkte Bindung an die α_1 -Untereinheit der Na-K-ATPase zu einer Hemmung der Ionenpumpe führen kann [102]. Nun würde eine Hemmung der Na-K-ATPase zwar zu einer Depolarisation und Vasokonstriktion führen. Da es sich bei der Na-K-ATPase jedoch um ein dimeres Enzym mit jeweils verschiedenen möglichen Isoformen handelt [119], ist es durchaus denkbar, dass A76 an einer anderen Isoform anstatt einer Inhibition eine Aktivierung bewirkt, was dann zu einer Vasodilatation führen würde. Eine Hemmung der Na-K-ATPase mittels Ouabain (eine unterschiedliche Sensitivität der Hemmung in Abhängigkeit von der α -Untereinheit der Na-K-ATPase ist allerdings beschrieben [120-121]) hatte jedoch in den von uns untersuchten Gefäßen keinerlei Abschwächung der A76 induzierten Dilatation zur Folge.

4.3 Die Rolle des Endothels

Wie aus dem Vergleich der beiden Dosiswirkungskurven hervorgeht, waren sowohl der von uns untersuchte A76 induzierte Kalziumabfall wie auch die Dilatation in Widerstandsgefäßen des Hamsters endothelunabhängig. Dies deckt sich mit Untersuchungen an isolierten Ringen aus der Aorta von Mäusen, an denen die Aktivierung der AMPK ebenfalls in einer endothelunabhängigen Vasorelaxation resultierte [122]. Demgegenüber führte der AMPK Aktivator AICAR an der Aorta von Ratten bei intaktem Endothel zu einer stärkeren Vasorelaxation als nach Deendothelialisierung. Besonders ausgeprägt war dieser Unterschied bei hypertensiven Tieren [123]. Als Hauptmechanismus der Endothelkomponente wurde hierbei eine endotheliale NO-Freisetzung identifiziert. Auch in weiteren Studien an isolierten Endothelzellen konnte eine AMPK-abhängige Aktivierung der endothelialen NO-Synthase beobachtet werden. Als Mechanismus konnte eine durch die AMPK-vermittelte Phosphorylierung von Ser 1177 und/oder Ser 633 der eNOS identifiziert werden, welche zu einer Aktivierung des Enzyms und damit zu einer erhöhten NO-Produktion führt [112, 123-125]. Demgegenüber kann eine Phosphorylierung an Thr 495 zu einer Herabsetzung der eNOS-Aktivität führen [124-125]. Interessanterweise wurde die *in vitro* Phosphorylierung der aktivierenden Ser 1177 und Ser 633 praktisch ausschließlich durch den AMPK α_2 -Komplex bewerkstelligt, der in vaskulärem Gewebe wie bereits mehrfach erwähnt jedoch nur von untergeordneter Bedeutung zu sein scheint [123].

In der vorliegenden Arbeit wurden alle Gefäße mit L-NAME vorinkubiert. Nach Ausschaltung der NO-Synthase und auch der Produktion von endothelalem Prostacyclin (COX-Hemmung durch Indomethacin) war kein Unterschied zwischen Gefäßen mit und ohne Endothel festzustellen. Somit scheint neben NO (und ggf. Prostacyclin) kein weiterer Endothelfaktor eine Rolle bei der AMPK induzierten Vasodilatation zu spielen. Inwieweit endotheliales NO in den von uns untersuchten Gefäßen die Vasodilatation allerdings überhaupt verstärkt hätte und ob es in diesen Gefäßen bei der AMPK induzierten Dilatation eine Rolle spielt wurde nicht untersucht.

Alles in allem scheint das Ausmaß einer endothelialen Komponente AMPK vermittelter Vasodilatation nicht nur von der untersuchten Spezies sondern zudem auch von pathologischen Zuständen wie arterieller Hypertonie abzuhängen.

4.4 Aktivierung der AMPK durch weitere Agonisten

4.4.1 AICAR als Aktivator der AMPK

Mithilfe weiterer bekannter Agonisten der AMPK sollte die aus den A76 Versuchen generierte Vorstellung einer Vasodilatation bei Aktivierung der AMP-Kinase überprüft werden.

AICAR ist ein Ribonucleosidderivat das nach Aufnahme in die Zelle durch die Adenosinkinase in das Monoribonucleosid ZMP umgewandelt wird [126]. Intrazelluläres ZMP imitiert aufgrund der hohen Strukturhomologie zum AMP dessen Aktivierungsmechanismen, so dass es einerseits zur allosterischen Aktivierung und andererseits zur gesteigerten Phosphorylierung der AMPK kommt [63, 127].

An den isolierten vorkontrahierten Hamstergefäßen führte AICAR zu einer zwar signifikanten Dilatation und Kalziumabsenkung. Diese war jedoch deutlich geringer als bei Stimulation mit A76. Die gewählte Dosierung mit 3mM war dabei so hoch angesetzt, dass unter Berücksichtigung der oben genannten Literatur und bestehenden Erkenntnissen an isolierten Gefäßen [105] eine weitere Dosiserhöhung von AICAR keine signifikante Effektverstärkung mehr erwarten ließe.

Eine mögliche Erklärung für die Diskrepanz in der vasodilatatorischen Potenz zwischen AICAR und A76 liegt vermutlich im beschriebenen Aktivierungsmechanismus von AICAR. Im Gegensatz zu Trimeren mit der katalytischen α_2 -Isoform konnte für die in vaskulärem Gewebe vorherrschende α_1 -Untereinheit ein deutlich geringeres Aktivierungspotential durch hohe intrazelluläre AMP-Spiegel nachgewiesen werden [59]. Dies könnte erklären, dass AICAR zu einer deutlich geringeren AMPK-Aktivierung führte als A76. Diese Hypothese wird durch Befunde von Rubin et al gestützt. Hier bewirkte AICAR an isolierten Karotiden aus Miniaturschweinen ebenfalls nur eine geringe Vasodilatation, wohingegen eine metabolische Aktivierung der AMPK durch 2-Deoxy-Glucose an den gleichen Gefäßen zu einer annähernd vollständigen Relaxation führte [128]. Hinzu kommt, dass der Einfluss der AMP/ATP-Ratio auf den Aktivitätszustand der AMPK neben der Isoform der α -Untereinheit zudem noch in Abhängigkeit von der vorliegenden γ -Untereinheit variiert, welche in unseren Gefäßen bisher noch nicht analysiert wurde [129].

Neuere Studien lassen zudem Zweifel an der Selektivität von AICAR aufkommen. Gerade in höheren Konzentrationen kann AICAR demnach eine direkte Blockade von Enzymen bewirken, was sich unter anderem auf den mitochondrialen Stoffwechsel der Zelle auswirken kann [130-131]. Eingriffe in den Adenosinstoffwechsel sind ebenfalls beschrieben [132]. Auch ist es möglich, dass es beispielsweise durch die Anwesenheit von Proteinkinasehemmern oder Inhibitoren von Nukleosidtransportern zu einer unzureichenden AICAR Aufnahme in die Zelle kommt und somit eine intrazelluläre ZMP-Akkumulation und folglich eine AMPK-Aktivierung ausbleibt [132-133].

4.4.2 Metformin als Aktivator der AMPK

Als weiterer Aktivator der AMP-Kinase wurde in dieser Arbeit das orale Antidiabetikum Metformin verwendet [134]. Das Ausmaß der maximal induzierten Dilatation in der höchsten verwendeten Konzentration (3mM) lag dabei in etwa zwischen dem der beiden anderen Aktivatoren AICAR und A76.

Hierbei ist jedoch zu beachten, dass durch das gewählte Protokoll die tatsächliche Noradrenalkonzentration im Organbad bei den Metforminversuchen höher war als bei den Versuchen mit den beiden anderen Aktivatoren. Durch die geringgradige schrittweise Erhöhung der Noradrenalkonzentration bei jeder Zugabe von Metformin (s. 2.7.5.) sollte vor allem ein zeitbedingter Abfall der Kalziumratio wie er bei längerdauernder Noradrenalinstimulation gewöhnlich zu beobachten war (s.a. 4.1.) ausgeglichen werden, um so auch einen potentiell geringen, Metformin induzierten Kalziumabfall besser detektieren zu können. Ein Vergleich der absoluten Werte für die erreichte Dilatation bzw. den Kalziumabfall ist bei diesem Vorgehen nicht möglich. Ob eine Reduktion der A76 Antwort unter höheren Noradrenalkonzentrationen zu beobachten wäre, wurde an dieser Stelle nicht explizit untersucht. Was dennoch zweifelsfrei festgehalten werden kann ist, dass Metformin an den untersuchten Gefäßen in einer Konzentration von 3mM ein wesentlich potenterer Vasodilatator war als AICAR.

Im Gegensatz zu AICAR spielt bei der Aktivierung der AMPK durch Metformin die intrazelluläre AMP/ATP-Ratio wohl keine entscheidende Rolle [134-135], wodurch der stärkere vasorelaxierende Effekt erklärt werden könnte. Stattdessen wurde zumindest in Endothelzellen ein Anstieg mitochondrialer reaktiver

Stickstoffverbindungen (RNS) als Voraussetzung Metformin induzierter AMPK-Aktivierung ausgemacht. Diese blieb nach Blockade der eNOS beziehungsweise Überexpression der Superoxiddismutase mit konsekutiv verminderter RNS Bildung aus [136]. Interessanterweise konnten analoge Beobachtungen zuvor bereits für eine AMPK-Aktivierung unter Hypoxie beobachtet werden [137]. Inzwischen scheint klar, dass es unter Hypoxie darüber hinaus zu einer Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) in der mitochondrialen Atmungskette kommt [138]. Die resultierende Aktivierung der AMP-Kinase ist auch hier, wie mehrfach gezeigt werden konnte, unabhängig vom Phosphorylierungsgrad der zellulären Adenosinnukleotide [139-141]. Die dargelegten Parallelen legen somit einen sehr ähnlichen Aktivierungsmechanismus der AMPK durch Metformin und Hypoxie nahe. Möglicherweise wird dabei durch Metformin eine Art mitochondriale Hypoxie simuliert, bei der es in der Folge über Bildung reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffverbindungen zu einer Aktivierung der AMPK kommt. Sicherlich kommt es durch diesen Mechanismus sekundär in der Zelle ebenfalls zu einer Reduktion der ATP-Spiegel zugunsten von AMP, welches seinerseits zu einer weiteren Aktivierung der AMPK führt. Es ist somit denkbar, dass eben genau der Unterschied in der vasodilatatorischen Potenz zwischen Metformin und AICAR auf die dargelegte zusätzliche, Adenosinnukleotid unabhängige, rein Radikal vermittelte Aktivierung der AMPK durch Metformin zurückzuführen ist.

In den Experimenten der vorliegenden Studie wurde die NO-Synthase durch Zugabe von L-Name gehemmt, ein Zustand unter dem in der angeführten Literatur eine AMPK-Aktivierung durch Metformin zumindest in Endothelzellen ausblieb. Fraglich ist somit, inwieweit sich die beschriebenen, häufig an Endothelzellen gewonnenen Erkenntnisse auf glatte Muskelzellen übertragen lassen, die nach den A76 Versuchen als Protagonisten der Dilatation in den isolierten Widerstandsgefäßen des Hamsters ausgemacht wurden.

4.5 Blockade von Kaliumkanälen

4.5.1 Blockade von Kaliumkanälen durch Erhöhung der extrazellulären Kaliumkonzentration

Ein derart schneller und ausgeprägter Kalziumabfall in glatten Muskelzellen, wie er nach Applikation von A76 zu beobachten war, ist am ehesten durch die Inaktivierung spannungsabhängiger Kalziumkanäle der Zellmembran zu erklären.

Gerade in kleinen Gefäßen hängt das für die Initiierung der Kontraktion entscheidende intrazelluläre Kalzium - im Gegensatz zur Aorta - in hohem Maße vom extrazellulären Kalzium ab. Durch Öffnen von spannungsabhängigen L-Typ Kalziumkanälen kommt es durch das elektrische und chemische Konzentrationsgefälle ($[Ca^{2+}]_i \sim 0,1 \mu M$ vs. $[Ca^{2+}]_e \sim 1-2 mM$) zu einem schnellen Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration. Verschiedene Transportsysteme wie der Na^+Ca^{2+} -Austauscher der Plasmamembran, Ca^{2+} -ATPasen und andere Ca^{2+} -Transportsysteme des sarkoplasmatischen Retikulums sind demgegenüber für die rasche Eliminierung des intrazellulären Kalziums verantwortlich (Kalziumhaushalt glatter Gefäßmuskelzellen s. [142-144]). Eine Hemmung des Kalziumeinstroms durch eine Inaktivierung der Kalziumkanäle der Plasmamembran führt somit zu einem raschen Absinken der intrazellulären Kalziumspiegel und damit zur Relaxation. Anschaulich wird dies am raschen Kalziumabfall vorkontrahierter Gefäße nach Zugabe des spezifischen L-Typ-Kalziumkanalblockers Nifedipin.

Prinzipiell könnte es sich in den A76 Versuchen um eine direkte allosterische oder enzymatische, durch Phosphorylierung induzierte Hemmung der Kanäle handeln oder aber um eine indirekte Hemmung durch Verschiebung des Membranpotentials zu negativeren Werten im Sinne einer Hyperpolarisation [145]. Wie bereits in Kap. 1.1.4 beschrieben kann eine Hyperpolarisation der Zellmembran vor allem durch eine Aktivierung von Kaliumkanälen ausgelöst werden. Um diese beiden Möglichkeiten voneinander abzugrenzen wurden Gefäße in einer kleinen Versuchsgruppe anstatt mit Noradrenalin durch Erhöhung der extrazellulären Kaliumkonzentration auf 100mM vorkontrahiert.

Eine Änderung der extrazellulären Kaliumkonzentration beeinflusst zunächst einmal das Gleichgewichtspotential für Kalium. Das jeweilige Gleichgewichtspotential lässt sich mit Hilfe der Nernst'schen Gleichung berechnen [146]:

$$E_{\text{Membran}} = R \cdot T \cdot F^{-1} \cdot \ln([K^+]_e/[K^+]_i)$$

R: Gaskonstante

T: absolute Temperatur

F: Faraday-Konstante

$[K^+]_{i/e}$: intra- bzw. extrazelluläre Kaliumkonzentration

Durch eine Erhöhung der extrazellulären Kaliumkonzentration kommt es folglich zu einem positiveren Gleichgewichtspotential. Da das Ruhemembranpotential nicht negativer als das Kaliumgleichgewichtspotential sein kann, kommt es spätestens dann zu einer Depolarisation der Zellen, wenn ein Gleichgewichtspotential erreicht wird, das positiver ist als das vorbestehende Ruhemembranpotential. Es kommt bei einer Erhöhung der extrazellulären Kaliumkonzentration also zu einer Depolarisation der Zellmembran und auf dem zuvor beschriebenen Weg zur Kontraktion. Auch eine verstärkte Aktivierung kann nun keine Hyperpolarisation im ursprünglichen Sinne mehr bewirken.

Das Ausbleiben der A76 mediierten Vasodilatation in den Gefäßen (bei erhaltener Kalziumsenkung und Dilatation durch Nifedipin), die durch eine hohe extrazelluläre Kaliumkonzentration vorkontrahiert wurden, ist somit als Hinweis darauf zu werten, dass die durch A76 mediierte Kalziumsenkung in den mit Noradrenalin vorkontrahierten Gefäßen durch eine Aktivierung von Kaliumkanälen und die damit verbundene Hyperpolarisation ausgelöst wird.

4.5.2 Blockade spannungs- und kalziumabhängiger Kaliumkanäle (K_{Ca})

Die für die Vasoregulation wohl bedeutendsten Kaliumkanäle sind die bereits unter 1.1.4 erwähnten kalziumabhängigen Kaliumkanäle BK_{Ca} [147]. Die Pore des Kanals wird von einem Tetramer aus α -Untereinheiten gebildet, die jeweils im stöchiometrischen Verhältnis von 1:1 mit β -Untereinheiten assoziiert sind. Diese liegen in verschiedenen Isoformen vor und beeinflussen die Kalziumsensitivität des Kanals [148-152]. Die Aktivität der BK_{Ca} kann über verschiedenen Proteinkinasen reguliert werden [153-154]. Eine derartige Regulation von Kaliumkanälen ist auch für die AMP-Kinase bekannt. In Typ I Zellen des Glomus caroticum konnte gezeigt

werden, dass es über eine Hypoxie induzierte Aktivierung der AMP-Kinase zu einer Hemmung von Kaliumkanälen kommt. Dabei konnte eine Phosphorylierung der α -Untereinheit des Kanals durch die AMPK nachgewiesen werden [155-157]. Eine nachfolgende Studie zeigte sogar, dass diese Hemmung an eine bestimmte Splice-Variante der α -Untereinheit des Kanals gebunden ist [158]. Somit könnte ein alternatives Splicing von pre-mRNA einen möglichen Mechanismus für eine gewebsspezifische Regulation von BK_{Ca} -Kanälen darstellen. Eine gewebsspezifische Regulation der BK_{Ca} Aktivität durch alternatives Splicing der codierenden mRNA konnte im Übrigen schon früher für die Hypoxie als Regulator ausgemacht werden [159]. Neben der jeweiligen Splice-Variante kann die Kanalaktivität zudem vom Ausmaß und Lokalisation der Phosphorylierung der Porenregion abhängen. Während eine Phosphorylierung aller vier α -Untereinheiten zu einer Kanalaktivierung führt, kommt es bei Phosphorylierung nur einer Untereinheit zu einer Kanalblockade [160]. Ein wichtiger Unterschied zwischen den Zellen des Glomus caroticums und glatten Gefäßmuskelzellen liegt darüber hinaus in der Isoformenstruktur des AMPK-Komplexes: während in glatter Gefäßmuskulatur vor allem der $\alpha_1\beta_1\gamma_x$ -Komplex dominiert, wurde in Glomuszellen der $\alpha_1\beta_2\gamma_1$ Komplex als vorherrschend identifiziert [60, 161]. Auch wenn es sich in Typ I Zellen des Glomus caroticums um eine AMPK induzierte Blockade des BK_{Ca} handelt, ist eine Aktivierung der BK_{Ca} -Kanäle durch die AMPK in glatter Gefäßmuskulatur in Anbetracht der beschriebenen Regulationsmöglichkeiten sehr wohl denkbar.

Zur Untersuchung, welche Kaliumkanäle die AMPK Effekte vermitteln, wurden Versuche mit verschiedenen Kaliumkanalblockern durchgeführt. Zur Blockade der Kanäle steht eine Reihe von Peptiden zur Verfügung, die aus dem Gift von Skorpionen isoliert werden können [162-163]. Der erste Vertreter dieser Substanzen war 1982 das Noxiustoxin [164]. Als wohl am besten charakterisierte Substanzen gelten inzwischen die beiden auch in dieser Arbeit verwendeten Toxine, Charybdotoxin und Iberiotoxin. Charybdotoxin wurde 1985 erstmals von Miller et al aus der Skorpiongattung *Leiurus quinquestriatus* isoliert. Es gilt als unspezifischer Inhibitor verschiedener kalziumabhängiger und spannungsabhängiger Kaliumkanäle [165-168]. Im Gegensatz dazu führt das wenige Jahre später aus dem Skorpion *Buthus tamulus* isolierte Iberiotoxin zu einer spezifischen Blockade von large conductance Kanälen (BK_{Ca}) [169-170]. Beide Toxine entfalten dabei ihre Wirkung

bei Applikation von der Außenseite der Membran her (Übersicht und pharmakologische Charakterisierung s. [171]).

Eine Wirksamkeit der beiden Toxine in unseren Versuchen darf angenommen werden. Es handelt sich zwar beispielsweise beim BK_{Ca} um einen sehr heterogenen Kanal, bei dem die Koexpression von unterschiedlichen β -Untereinheiten neben den biophysikalischen Kanaleigenschaften auch die pharmakologischen Eigenschaften der Pore [152, 172-173] beeinflussen kann. Auch ein alternatives Splicing der α -Untereinheit bewirkt wie schon erwähnt eine breite Variation der Kanaleigenschaften [174]. Da es durch beide Toxine allerdings zu einer signifikant verstärkten Noradrenalin induzierten Konstriktion kam, ist die Wirksamkeit der beiden Toxine an den in unseren Versuchen verwendeten Gefäßen gegeben. Zudem führte Charybdotoxin wie bei Bolz et al [37] beschrieben auch in dieser Arbeit zu einem annähernd vollständigen Ausbleiben sowohl von Acetylcholin induzierter Vasodilatation als auch des assoziierten Kalziumabfalls an vorkontrahierten kleinen Arterien. Iberiotoxin hingegen führte zu keiner signifikanten Veränderung der Acetylcholin medierten Dilatation. Die A76 vermittelte Vasodilatation und der Kalziumabfall blieben dagegen durch beide Inhibitoren, CTX und IbTX, unbeeinflusst, was eine Beteiligung der typischerweise durch die Toxine geblockten kalziumabhängigen Kaliumkanäle an der A76 Wirkung unwahrscheinlich werden lässt.

Eine Hyperpolarisation der glattmuskulären Membran durch Aktivierung von Kaliumkanälen wurde auch als Mechanismus bei der EDHF-vermittelten Vasodilatation vor allem in kleinen Arterien des Hamsters beschrieben [37], so dass ein Zusammenhang zwischen der AMPK und EDHF als interessante Möglichkeit in Betracht gekommen wäre. Und in der Tat haben Fisslthaler et al vor kurzem erstmals einen Zusammenhang zwischen der AMPK und der Cytochrom P450-Epoxygenase, deren Produkte wie in 1.1.5 beschrieben in einigen Gefäßbetten als EDHF wirken, herstellen können [175]. Das Ausbleiben der Acetylcholinantwort bei erhaltener A76 medierter Dilatation nach Inkubation mit Charybdotoxin liefert jedoch einen klaren Hinweis darauf, dass beide Agonisten über Beteiligung unterschiedlicher Ionenkanäle zu einer Vasodilatation führen. Zudem spielt das Endothel bei den A76 vermittelten Effekten im Gegensatz zu EDHF keine Rolle. Eine Beteiligung des EDHF

im AMPK-Signalweg kann somit zumindest in der Hamstermikrozirkulation mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden.

4.5.3 Blockade ATP-abhängiger Kaliumkanäle (K_{ATP})

Schon seit vielen Jahren besteht die Vorstellung, dass K_{ATP} -Kanäle bei der Tonusregulation vor allem in der Mikrozirkulation eine wichtige Rolle spielen [176-177]. Dabei sollen die Kanäle vor allem eine Anpassung an die metabolischen Anforderungen ermöglichen. Da die Kanäle durch ATP gehemmt werden [178-179], kommt es bei reduzierten Energiespeichern und fallenden ATP-Konzentrationen zu einer Aufhebung der Hemmung und somit zur Hyperpolarisation und Vasodilatation. In Studien an Hunden konnte beispielsweise gezeigt werden, dass es unter Beanspruchung zu einer K_{ATP} -abhängigen Koronardilatation kommt [180]. Entgegen dieser Vorstellung konnten Jackson et al eine Aktivierung von K_{ATP} -Kanälen unter Hypoxie in Muskelarteriolen aus dem Cremastermuskel des Hamsters jedoch nicht nachweisen [181].

Ein direkter Zusammenhang zwischen der AMPK und K_{ATP} -Kanälen ist beim Phänomen der ischämischen Präkonditionierung bekannt. Dies bezeichnet die Tatsache, dass das Myokard durch wiederholte kurze Ischämiephasen, die einer länger dauernden Ischämie vorausgehen, geschützt und das Infarktareal somit verkleinert wird [182]. Der Mechanismus beinhaltet die Aktivierung sarkolemmaler K_{ATP} -Kanäle [183-184]. An AMPK- α_2 -knockout Mäusen blieb diese Aktivierung und damit die Präkonditionierung aus [185].

K_{ATP} -Kanäle bestehen aus einem K_{ir} , der die Durchlässigkeit für Kaliumionen bestimmt und einer sogenannten SUR-Domäne (sulfonyl urea receptor). Diese existiert in gewebsspezifischen Isoformen und dient, wie der Name besagt, der Bindung von Sulfonylharnstoffen [186]. Der bekannteste Sulfonylharnstoff ist das Glibenclamid. Neben der Blockade pankreatischer K_{ATP} -Kanäle bei der Behandlung des Diabetes mellitus ist die Wirksamkeit auch für vaskuläre K_{ATP} -Kanäle belegt [187-189].

In den vorliegenden Experimenten führte Glibenclamid zu einer deutlichen Abschwächung der A76 medierten Reaktionen an vorkontrahierten Widerstandsgefäßen, was auf eine Beteiligung von K_{ATP} -Kanälen im Sinne einer AMPK vermittelten Aktivierung dieser Kanäle hinweist.

Einschränkend muss jedoch gesagt werden, dass Glibenclamid (100 μ M) in der gewählten hohen Konzentration nicht (mehr) nur selektiv auf K_{ATP} -Kanäle wirkt. So wurde für Glibenclamid eine dosisabhängige Inhibition von Na-K-ATPase, von L-Typ Kalziumkanälen (10-200 μ M) sowie von CFTR-Kanälen (10-100 μ M) beschrieben [190-192]. Eine Hemmung der Na-K-ATPase würde theoretisch zu einer Verschiebung des Membranpotentials in Richtung einer Depolarisation führen und damit zu einer Vasokonstriktion beitragen. Die A76 Effekte blieben jedoch nach Blockade der Na-K-ATPase mittels Ouabain wie weiter oben schon einmal erwähnt unbeeinflusst. Im Gegensatz dazu würde sowohl eine Hemmung von L-Typ-Kalziumkanälen als auch eine Hemmung von Chloridkanälen durch Glibenclamid eine Vasodilatation sogar eher noch begünstigen [4]. Weitere beschriebene Interaktionen des Glibenclamid sollten hingegen allein aufgrund der Gewebsspezifität der Zielstrukturen im vaskulären Gewebe keine Rolle spielen [193-195].

Dennoch bedarf es zur weiteren Absicherung der potentiellen Rolle von K_{ATP} -Kanälen bei der AMPK induzierten Vasodilatation unbedingt noch weiterer Abklärung, beispielsweise durch Patch-Clamp Versuche an glatten Muskelzellen dieser Arterien. Aufgrund der vorliegenden Versuche allein kann die spezifische Rolle von K_{ATP} -Kanälen bei der AMPK induzierten Dilatation nicht abschließend beurteilt werden. Erste Versuche dieser Art an isolierten glatten Muskelzellen erbrachten bisher keinen Hinweis auf eine Aktivierung von K_{ATP} -Kanälen durch A76 (Schubert M, Mederos Y Schnitzler M, Gudermann T, Pohl U, unveröffentlicht)

4.6 Bedeutung einer Kalziumdesensitivierung

Neben dem Abfall der intrazellulären Kalziumkonzentration gibt es noch weitere Mechanismen, die zu einer Dilatation in glatten Muskelzellen führen können. So führt eine Phosphorylierung der MLCK zur so genannten Kalziumdesensitivierung, so dass eine Muskelkontraktion erst bei höheren intrazellulären Kalziumkonzentrationen beginnt. In der Tat erbrachten Untersuchungen an Hühnermägen direkte Hinweise auf eine Kalziumdesensitivierung glatter Muskulatur über eine Phosphorylierung der MLCK via AMPK [196]. Darüber hinaus käme auch eine Hemmung der Proteinphosphatase in Frage, wobei hier ein direkter Zusammenhang mit der AMPK bisher noch nicht bekannt ist. Könnte einer dieser Mechanismen der

Kalziumdesensitivierung bei der AMPK-vermittelten Dilatation in Hamstergefäßen ebenfalls eine Rolle spielen?

Bei der Betrachtung der A76-Dosiswirkungskurven fällt auf, dass bei den niedrigeren Dosierungen die Dilatation im Vergleich zum Kalziumabfall eher überproportional hoch ausfällt. Dies könnte an eine Kalziumdesensitivierung zumindest als Teilmechanismus denken lassen. Da jedoch keine lineare Beziehung zwischen freiem Kalzium und Kontraktionsstärke besteht, kann im steilen Bereich der Kalzium-Kontraktionskurve bereits eine geringe Änderung der Kalziumkonzentration eine deutliche Tonusänderung auslösen.

Bei der Zugabe von Metformin zeigte sich bei 3mM eine deutliche Vasodilatation, während der relative Kalziumabfall nur annähernd dem Niveau der Kontrollversuche entsprach. Eine Kalziumdesensitivierung scheint somit möglich.

Dagegen spricht allerdings, dass nach Vorkontraktion mit hoher extrazellulärer Kaliumkonzentration der AMPK-Stimulator A76 in den Gefäßen bei unverändertem Kalziumspiegel keinerlei Dilatation mehr auslöste. Bei Vorliegen einer Kalziumdesensitivierung durch Aktivierung der AMPK wäre zunächst einmal jedoch zumindest eine "Restdilatation" zu erwarten gewesen. Möglicherweise waren die absoluten intrazellulären Kalziumkonzentrationen nach Kaliumdepolarisation aber so hoch, dass eine Desensitivierung gar nicht zum Tragen kommen konnte.

Zudem gibt es Hinweise, dass hohe Kaliumkonzentrationen zu einer Aktivierung der Rho-Kinase führen, welche dann ihrerseits über eine Hemmung der Myosinphosphatase eine Kalziumsensitivierung bewirkt [197-198]. Es ist also gut möglich, dass eine AMPK vermittelte Kalziumdesensitivierung in den Versuchen mit hoher extrazellulärer Kaliumkonzentration maskiert wurde.

Eine endgültige Klärung der Frage nach dem Vorliegen einer Kalziumdesensitivierung ist somit durch die vorliegenden Versuche zwar nicht möglich, insgesamt scheint dieser Mechanismus unter den gegebenen Bedingungen jedoch allenfalls eine untergeordnete Rolle zu spielen.

4.7 Aktivierung der AMPK als therapeutische Option bei metabolischem Syndrom und arterieller Hypertonie?

Das metabolische Syndrom beschreibt nach dem Konsens der International Diabetes Federation (IDF) von 2005 eine charakteristische Konstellation metabolischer Veränderungen, die mit einem erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen und einen Diabetes mellitus Typ 2 einhergehen [199]. Wesentliche Merkmale sind die abdominale Adipositas, Hypertriglyzeridämie, ein niedriges HDL-Cholesterin, eine Hyperglykämie mit peripherer Insulinresistenz sowie eine arterielle Hypertonie. Nicht alle Faktoren des metabolischen Syndroms erhöhen dabei in gleicher Weise das kardiovaskuläre Risikoprofil des Erkrankten. Das Vorhandensein einer arteriellen Hypertonie führt beispielsweise zu einer überproportionalen Erhöhung des Risikos [200]. Somit lassen sich sogar etwa 50% aller Schlaganfälle und ischämischer Herzerkrankungen auf eine arterielle Hypertonie zurückführen [201]. Großen epidemiologischen Studien zufolge liegt die Prävalenz des metabolischen Syndroms in der erwachsenen Bevölkerung bei etwa 20% und stellt somit bei steigender Tendenz nicht zuletzt auch ein großes ökonomisches Problem dar [201-204].

Betrachtet man die Stoffwechselwege, die die AMP-Kinase beeinflusst, fällt auf, dass ein Vielzahl davon in der Pathophysiologie des metabolischen Syndroms eine herausragende Rolle spielen. In Tiermodellen der Adipositas lässt sich jedoch eine reduzierte AMPK-Aktivität in einer Vielzahl von Geweben wie Herz, Skelettmuskel und Leber nachweisen [205-207]. Ursächlich hierfür sind möglicherweise die bei Adipositas bzw. dem metabolischen Syndrom erniedrigten Leptin- und Adiponectinspiegel [208]. Auf dieser reduzierten Aktivität basiert die schon seit einigen Jahren bestehende Hoffnung, dass eine Aktivierung der AMPK von therapeutischem Nutzen in der Therapie dieser epidemiologisch bedeutsamen Erkrankung sein könnte. Erste viel versprechende Versuche vor allem an Tieren, die dies belegen, existieren bereits. Bei diabetischer Stoffwechsellage ließ sich in einigen Studien durch den AMPK-Stimulator AICAR sowohl in Nagetieren [209-210] wie auch beim Menschen [211-213] eine vermehrte Glukoseaufnahme und Fettsäureoxidation nachweisen. Auch die Verabreichung von A76 führte an sogenannten „obesity“ Mäusen, also am Mausmodell für Adipositas, zu multiplen Stoffwechselverbesserungen wie einer verminderten Plasmaglukose, verminderten Triglyzeridspiegeln im Plasma und Lebergewebe sowie zu einer beträchtlichen

Körpergewichtsreduktion [67]. Für Metformin ließen sich zudem neben einer Reduktion von Plasmaglukose und -fetten sowie einer Verbesserung der Insulinsensitivität auch positive Effekte auf die Gefäßfunktion nachweisen [214]. Erst kürzlich ließ sich auch für die Salicylate, die Metabolite der als Aspirin seit Jahren tagtäglich in der Klinik eingesetzten Acetylsalicylsäure eine stimulierende Wirkung auf die AMPK belegen, so dass ein Teil der positiven Aspirinwirkungen möglicherweise ebenfalls auf eine AMPK-Wirkung zurückgeführt werden könnte [215]. Potente glattmuskuläre Dilatatoren sind jedoch weiterhin nicht hinreichend vorhanden. In dieser Arbeit wurden deshalb die Effekte einer AMPK-Aktivierung auf den Vasotonus untersucht, der bei der Entwicklung einer arteriellen Hypertonie zumindest in bestimmten Stadien pathologisch erhöht ist. Im Rahmen der Versuche konnte dabei eindeutig gezeigt werden, dass eine Aktivierung der AMP-Kinase zu einer Vasodilatation an isolierten kleinen Muskelarterien führt. Ergänzend hierzu zeigte sich nach Transfektion mit einer dominant-negativ Mutante der AMPK ein erhöhter Basaltonus der untersuchten Gefäße. Bei in-vivo Versuchen sowohl an der Maus wie auch an der Ratte konnte in Übereinstimmung hierzu bereits gezeigt werden, dass eine AMPK-Stimulation mit AICAR neben zahlreichen positiven Stoffwechselveränderungen auch zu einer Reduktion des Blutdrucks führte [216-217]. Inwieweit sich diese Erkenntnisse auf die in-vivo Situation im Menschen, insbesondere beim Vorliegen pathologischer Zustände wie des metabolischen Syndroms, übertragen lassen bleibt abzuwarten und wird sicherlich Gegenstand zukünftiger Forschung sein.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die potentielle Rolle der AMP-Kinase, eines der Schlüsselenzyme im Energiestoffwechsel, bei der Regulation des Vasotonus kleiner arterieller Blutgefäße untersucht und die Effekte einer AMPK-Stimulation mit der EDHF-vermittelten endothelialen Dilatation verglichen.

Mittels Western-Blot Technik wurde auf Proteinebene nachgewiesen, dass in Arterien des Hamsters sowohl die α_1 -Untereinheit der AMPK - als prädominante katalytische Untereinheit - sowie die β_1 -Untereinheit der AMPK exprimiert werden. Die funktionellen Untersuchungen erfolgten an isoliert perfundierten Widerstandsarterien aus der Skelettmuskulatur des Hamsters. An diesen wurden gleichzeitige Registrierungen des Außendurchmessers als Maß für den Vasotonus sowie der intrazellulären Kalziumkonzentration in der glatten Gefäßmuskulatur (Kalziumindikator Fura 2) nach Zugabe verschiedener vasoaktiver Substanzen durchgeführt.

An mit Noradrenalin vorkontrahierten isolierten Gefäßen führte der auf die β_1 -Untereinheit wirkende AMPK-Aktivator A769662 (A76) endothelunabhängig zu einer maximalen Dilatation der Gefäße, die mit einem erheblichen Abfall des glattmuskulären Kalziumspiegels einherging. Die beobachteten A76 Effekte auf Gefäßtonus und Kalziumspiegel waren dosisabhängig. Der Vasodilatator Acetylcholin löste ebenfalls einen ausgeprägten Kalziumabfall in der glatten Muskulatur aus. Dies war jedoch nur bei einem intakten Endothel zu beobachten. Eine Transfektion kultivierter Gefäße mit einer dominant negativ Variante der α_1 -Untereinheit der AMPK führte zu einer partiellen Herabsetzung der Dilatation und des Kalziumabfalls. Zwei weitere Aktivatoren der AMPK, AICAR und Metformin, bewirkten an den Widerstandsgefäßen ebenfalls eine statistisch signifikante Dilatation und einen Kalziumabfall. An Gefäßen, welche anstelle von Noradrenalin durch eine hohe extrazelluläre Kaliumkonzentration vorkontrahiert wurden, ließ sich nach Stimulation mit A76 weder eine Dilatation noch ein Kalziumabfall feststellen, welches als ein Hinweis auf eine Beteiligung von Kaliumkanälen an den A76 medierten Effekten zu werten war. Zur genaueren Evaluation dieser Hypothese wurden daraufhin die A76 Effekte nach pharmakologischer Blockade verschiedener Kaliumkanäle untersucht. Hierbei zeigte sich, dass Iberiotoxin, ein selektiver Inhibitor von BK_{Ca} -Kanälen keinen Einfluss auf eine A76 vermittelte Dilatation hatte. Ebenso wenig wurde eine

Acetylcholin vermittelte Vasodilatation blockiert. Demgegenüber führte Charybdotoxin, ein Hemmer von BK_{Ca} -Kanälen und IK_{Ca} -Kanälen, zwar zu einer Blockade der Acetylcholinantwort, ließ die A76 Effekte jedoch weitgehend unbeeinflusst. Die Blockade von ATP-abhängigen Kaliumkanälen K_{ATP} durch Glibenclamid in hohen Konzentrationen bewirkte hingegen eine deutliche Reduktion sowohl der Dilatation als auch des Kalziumabfalls nach Gabe von A76.

Insgesamt konnte im Rahmen dieser Arbeit damit gezeigt werden, dass eine Aktivierung der AMPK in isolierten Widerstandsgefäßen des Hamsters zu einer schnellen und ausgeprägten Vasodilatation führt, welche durch einen vorhergehenden Abfall der intrazellulären Kalziumkonzentration in der glatten Gefäßmuskulatur initiiert wird. Die Hemmwirkung von Glibenclamid weist darauf hin, dass dieser Dilatation ein Effekt der AMPK auf K_{ATP} -Kanäle in der glatten Muskulatur zu Grund liegen könnte.

6 Literaturverzeichnis

1. Bush, D.S. and R.L. Jones, *Measuring intracellular ca levels in plant cells using the fluorescent probes, indo-1 and fura-2 : progress and prospects*. Plant Physiol, 1990. **93**(3): p. 841-5.
2. Grynkiewicz, G., M. Poenie, and R.Y. Tsien, *A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties*. J Biol Chem, 1985. **260**(6): p. 3440-50.
3. Tsien, R.Y., *Fluorescent probes of cell signaling*. Annu Rev Neurosci, 1989. **12**: p. 227-53.
4. Jackson, W.F., *Ion channels and vascular tone*. Hypertension, 2000. **35**(1 Pt 2): p. 173-8.
5. Bellien, J., C. Thuillez, and R. Joannides, *Contribution of endothelium-derived hyperpolarizing factors to the regulation of vascular tone in humans*. Fundam Clin Pharmacol, 2008. **22**(4): p. 363-77.
6. Segal, S.S. and D.T. Kurjiaka, *Coordination of blood flow control in the resistance vasculature of skeletal muscle*. Med Sci Sports Exerc, 1995. **27**(8): p. 1158-64.
7. Adelstein, R.S., et al., *Regulation of contractile proteins by reversible phosphorylation of myosin and myosin kinase*. Soc Gen Physiol Ser, 1982. **37**: p. 273-81.
8. Kamm, K.E. and J.T. Stull, *The function of myosin and myosin light chain kinase phosphorylation in smooth muscle*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 1985. **25**: p. 593-620.
9. Arner, A. and G. Pfitzer, *Regulation of cross-bridge cycling by Ca²⁺ in smooth muscle*. Rev Physiol Biochem Pharmacol, 1999. **134**: p. 63-146.
10. Eto, M., *Regulation of cellular protein phosphatase-1 (PPI) by phosphorylation of the CPI-17 family, C-kinase-activated PPI inhibitors*. J Biol Chem, 2009. **284**(51): p. 35273-7.
11. Mizuno, Y., et al., *Myosin light chain kinase activation and calcium sensitization in smooth muscle in vivo*. Am J Physiol Cell Physiol, 2008. **295**(2): p. C358-64.
12. Nishimura, J. and C. van Breemen, *Direct regulation of smooth muscle contractile elements by second messengers*. Biochem Biophys Res Commun, 1989. **163**(2): p. 929-35.
13. Somlyo, A.P. and A.V. Somlyo, *Signal transduction and regulation in smooth muscle*. Nature, 1994. **372**(6503): p. 231-6.
14. Somlyo, A.P. and A.V. Somlyo, *Ca²⁺ sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase*. Physiol Rev, 2003. **83**(4): p. 1325-58.
15. Tansey, M.G., et al., *Ca(2+)-dependent phosphorylation of myosin light chain kinase decreases the Ca²⁺ sensitivity of light chain phosphorylation within smooth muscle cells*. J Biol Chem, 1994. **269**(13): p. 9912-20.
16. Yang, J.X. and Y. Lin, *The action of PKA on smooth muscle myosin phosphorylation*. Life Sci, 2005. **77**(21): p. 2669-75.
17. Ledoux, J., et al., *Calcium-activated potassium channels and the regulation of vascular tone*. Physiology (Bethesda), 2006. **21**: p. 69-78.
18. Hirst, G.D. and F.R. Edwards, *Sympathetic neuroeffector transmission in arteries and arterioles*. Physiol Rev, 1989. **69**(2): p. 546-604.
19. Jackson, W.F., J.M. Huebner, and N.J. Rusch, *Enzymatic isolation and characterization of single vascular smooth muscle cells from cremasteric arterioles*. Microcirculation, 1997. **4**(1): p. 35-50.
20. Kitamura, K. and J. Yamazaki, *Chloride channels and their functional roles in smooth muscle tone in the vasculature*. Jpn J Pharmacol, 2001. **85**(4): p. 351-7.

21. Large, W.A. and Q. Wang, *Characteristics and physiological role of the Ca(2+)-activated Cl⁻ conductance in smooth muscle*. *Am J Physiol*, 1996. **271**(2 Pt 1): p. C435-54.
22. Setoguchi, M., et al., *Stretch-activated whole-cell currents in smooth muscle cells from mesenteric resistance artery of guinea-pig*. *J Physiol*, 1997. **501** (Pt 2): p. 343-53.
23. Jackson, W.F., *Potassium channels in the peripheral microcirculation*. *Microcirculation*, 2005. **12**(1): p. 113-27.
24. Nelson, M.T. and J.M. Quayle, *Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle*. *Am J Physiol*, 1995. **268**(4 Pt 1): p. C799-822.
25. Quayle, J.M., M.T. Nelson, and N.B. Standen, *ATP-sensitive and inwardly rectifying potassium channels in smooth muscle*. *Physiol Rev*, 1997. **77**(4): p. 1165-232.
26. Ko, E.A., et al., *Physiological roles of K⁺ channels in vascular smooth muscle cells*. *J Smooth Muscle Res*, 2008. **44**(2): p. 65-81.
27. Chen, G., H. Suzuki, and A.H. Weston, *Acetylcholine releases endothelium-derived hyperpolarizing factor and EDRF from rat blood vessels*. *Br J Pharmacol*, 1988. **95**(4): p. 1165-74.
28. Feletou, M. and P.M. Vanhoutte, *Endothelium-dependent hyperpolarization of canine coronary smooth muscle*. *Br J Pharmacol*, 1988. **93**(3): p. 515-24.
29. Taylor, S.G. and A.H. Weston, *Endothelium-derived hyperpolarizing factor: a new endogenous inhibitor from the vascular endothelium*. *Trends Pharmacol Sci*, 1988. **9**(8): p. 272-4.
30. Feletou, M. and P.M. Vanhoutte, *The third pathway: endothelium-dependent hyperpolarization*. *J Physiol Pharmacol*, 1999. **50**(4): p. 525-34.
31. Hwa, J.J., et al., *Comparison of acetylcholine-dependent relaxation in large and small arteries of rat mesenteric vascular bed*. *Am J Physiol*, 1994. **266**(3 Pt 2): p. H952-8.
32. Nagao, T., S. Illiano, and P.M. Vanhoutte, *Heterogeneous distribution of endothelium-dependent relaxations resistant to NG-nitro-L-arginine in rats*. *Am J Physiol*, 1992. **263**(4 Pt 2): p. H1090-4.
33. Hilgers, R.H., J. Todd, Jr., and R.C. Webb, *Regional heterogeneity in acetylcholine-induced relaxation in rat vascular bed: role of calcium-activated K⁺ channels*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2006. **291**(1): p. H216-22.
34. Campbell, W.B. and J.R. Falck, *Arachidonic acid metabolites as endothelium-derived hyperpolarizing factors*. *Hypertension*, 2007. **49**(3): p. 590-6.
35. Hecker, M., et al., *Characterization of endothelium-derived hyperpolarizing factor as a cytochrome P450-derived arachidonic acid metabolite in mammals*. *J Physiol*, 1994. **481** (Pt 2): p. 407-14.
36. Quilley, J., D. Fulton, and J.C. McGiff, *Hyperpolarizing factors*. *Biochem Pharmacol*, 1997. **54**(10): p. 1059-70.
37. Bolz, S.S., C. de Wit, and U. Pohl, *Endothelium-derived hyperpolarizing factor but not NO reduces smooth muscle Ca²⁺ during acetylcholine-induced dilation of microvessels*. *Br J Pharmacol*, 1999. **128**(1): p. 124-34.
38. Griffith, T.M., *Endothelium-dependent smooth muscle hyperpolarization: do gap junctions provide a unifying hypothesis?* *Br J Pharmacol*, 2004. **141**(6): p. 881-903.
39. Busse, R., et al., *EDHF: bringing the concepts together*. *Trends Pharmacol Sci*, 2002. **23**(8): p. 374-80.
40. Ferrer, A., et al., *Activation of rat liver cytosolic 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase kinase by adenosine 5'-monophosphate*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1985. **132**(2): p. 497-504.
41. Hardie, D.G. and D. Carling, *The AMP-activated protein kinase--fuel gauge of the mammalian cell?* *Eur J Biochem*, 1997. **246**(2): p. 259-73.

42. Stapleton, D., et al., *AMP-activated protein kinase isoenzyme family: subunit structure and chromosomal location*. FEBS Lett, 1997. **409**(3): p. 452-6.
43. Hawley, S.A., et al., *Characterization of the AMP-activated protein kinase kinase from rat liver and identification of threonine 172 as the major site at which it phosphorylates AMP-activated protein kinase*. J Biol Chem, 1996. **271**(44): p. 27879-87.
44. Hawley, S.A., et al., *Complexes between the LKB1 tumor suppressor, STRAD alpha/beta and MO25 alpha/beta are upstream kinases in the AMP-activated protein kinase cascade*. J Biol, 2003. **2**(4): p. 28.
45. Hawley, S.A., et al., *Calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta is an alternative upstream kinase for AMP-activated protein kinase*. Cell Metab, 2005. **2**(1): p. 9-19.
46. Momcilovic, M., S.P. Hong, and M. Carlson, *Mammalian TAK1 activates Snf1 protein kinase in yeast and phosphorylates AMP-activated protein kinase in vitro*. J Biol Chem, 2006. **281**(35): p. 25336-43.
47. Shaw, R.J., et al., *The tumor suppressor LKB1 kinase directly activates AMP-activated kinase and regulates apoptosis in response to energy stress*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(10): p. 3329-35.
48. Woods, A., et al., *Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta acts upstream of AMP-activated protein kinase in mammalian cells*. Cell Metab, 2005. **2**(1): p. 21-33.
49. Woods, A., et al., *LKB1 is the upstream kinase in the AMP-activated protein kinase cascade*. Curr Biol, 2003. **13**(22): p. 2004-8.
50. Marley, A.E., et al., *Biochemical characterization and deletion analysis of recombinant human protein phosphatase 2C alpha*. Biochem J, 1996. **320** (Pt 3): p. 801-6.
51. Wu, Y., et al., *Activation of protein phosphatase 2A by palmitate inhibits AMP-activated protein kinase*. J Biol Chem, 2007. **282**(13): p. 9777-88.
52. Davies, S.P., et al., *5'-AMP inhibits dephosphorylation, as well as promoting phosphorylation, of the AMP-activated protein kinase. Studies using bacterially expressed human protein phosphatase-2C alpha and native bovine protein phosphatase-2AC*. FEBS Lett, 1995. **377**(3): p. 421-5.
53. Sanders, M.J., et al., *Investigating the mechanism for AMP activation of the AMP-activated protein kinase cascade*. Biochem J, 2007. **403**(1): p. 139-48.
54. Suter, M., et al., *Dissecting the role of 5'-AMP for allosteric stimulation, activation, and deactivation of AMP-activated protein kinase*. J Biol Chem, 2006. **281**(43): p. 32207-16.
55. Hardie, D.G., et al., *AMP-activated protein kinase: an ultrasensitive system for monitoring cellular energy charge*. Biochem J, 1999. **338** (Pt 3): p. 717-22.
56. Carlson, C.L. and W.W. Winder, *Liver AMP-activated protein kinase and acetyl-CoA carboxylase during and after exercise*. J Appl Physiol, 1999. **86**(2): p. 669-74.
57. Vavvas, D., et al., *Contraction-induced changes in acetyl-CoA carboxylase and 5'-AMP-activated kinase in skeletal muscle*. J Biol Chem, 1997. **272**(20): p. 13255-61.
58. Witters, L.A., et al., *Hepatic 5'-AMP-activated protein kinase: zonal distribution and relationship to acetyl-CoA carboxylase activity in varying nutritional states*. Arch Biochem Biophys, 1994. **308**(2): p. 413-9.
59. Salt, I., et al., *AMP-activated protein kinase: greater AMP dependence, and preferential nuclear localization, of complexes containing the alpha2 isoform*. Biochem J, 1998. **334** (Pt 1): p. 177-87.

60. Evans, A.M., et al., *AMP-activated protein kinase couples mitochondrial inhibition by hypoxia to cell-specific Ca²⁺ signalling mechanisms in oxygen-sensing cells*. Novartis Found Symp, 2006. **272**: p. 234-52; discussion 252-8, 274-9.
61. Hardie, D.G., *Roles of the AMP-activated/SNF1 protein kinase family in the response to cellular stress*. Biochem Soc Symp, 1999. **64**: p. 13-27.
62. Marsin, A.S., et al., *Phosphorylation and activation of heart PFK-2 by AMPK has a role in the stimulation of glycolysis during ischaemia*. Curr Biol, 2000. **10**(20): p. 1247-55.
63. Corton, J.M., et al., *5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside. A specific method for activating AMP-activated protein kinase in intact cells?* Eur J Biochem, 1995. **229**(2): p. 558-65.
64. Merrill, G.F., et al., *AICA riboside increases AMP-activated protein kinase, fatty acid oxidation, and glucose uptake in rat muscle*. Am J Physiol, 1997. **273**(6 Pt 1): p. E1107-12.
65. Zhou, G., et al., *Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action*. J Clin Invest, 2001. **108**(8): p. 1167-74.
66. Anderson, S.N., et al., *Microarrayed compound screening (microARCS) to identify activators and inhibitors of AMP-activated protein kinase*. J Biomol Screen, 2004. **9**(2): p. 112-21.
67. Cool, B., et al., *Identification and characterization of a small molecule AMPK activator that treats key components of type 2 diabetes and the metabolic syndrome*. Cell Metab, 2006. **3**(6): p. 403-16.
68. Carling, D., V.A. Zammit, and D.G. Hardie, *A common bicyclic protein kinase cascade inactivates the regulatory enzymes of fatty acid and cholesterol biosynthesis*. FEBS Lett, 1987. **223**(2): p. 217-22.
69. Hardie, D.G., S.A. Hawley, and J.W. Scott, *AMP-activated protein kinase--development of the energy sensor concept*. J Physiol, 2006. **574**(Pt 1): p. 7-15.
70. Kemp, B.E., Stapleton, D., Campbell D.J., Chen, Z.-P., Murthy, S., Walter, M., Gupta, A., Adams, J.J., Katsis, F., van Denderen, B., Jennings, I.G., Iseli, T., Michell, B.J., Witters, L.A., *AMP-activated protein kinase, super metabolic regulator*. Independent Meeting AMPK 2002, 2002.
71. Long, Y.C. and J.R. Zierath, *AMP-activated protein kinase signaling in metabolic regulation*. J Clin Invest, 2006. **116**(7): p. 1776-83.
72. Minokoshi, Y., et al., *AMP-kinase regulates food intake by responding to hormonal and nutrient signals in the hypothalamus*. Nature, 2004. **428**(6982): p. 569-74.
73. Towler, M.C. and D.G. Hardie, *AMP-activated protein kinase in metabolic control and insulin signaling*. Circ Res, 2007. **100**(3): p. 328-41.
74. Witters, L.A., B.E. Kemp, and A.R. Means, *Chutes and Ladders: the search for protein kinases that act on AMPK*. Trends Biochem Sci, 2006. **31**(1): p. 13-6.
75. Leibovitz, A., *The growth and maintenance of tissue-cell cultures in free gas exchange with the atmosphere*. Am J Hyg, 1963. **78**: p. 173-80.
76. Tsien, R.Y., T.J. Rink, and M. Poenie, *Measurement of cytosolic free Ca²⁺ in individual small cells using fluorescence microscopy with dual excitation wavelengths*. Cell Calcium, 1985. **6**(1-2): p. 145-57.
77. Meininger, G.A., et al., *Calcium measurement in isolated arterioles during myogenic and agonist stimulation*. Am J Physiol, 1991. **261**(3 Pt 2): p. H950-9.
78. Benham, C.D., *Voltage-gated and agonist-mediated rises in intracellular Ca²⁺ in rat clonal pituitary cells (GH3) held under voltage clamp*. J Physiol, 1989. **415**: p. 143-58.

79. Konishi, M. and M. Watanabe, *Resting cytoplasmic free Ca²⁺ concentration in frog skeletal muscle measured with fura-2 conjugated to high molecular weight dextran*. J Gen Physiol, 1995. **106**(6): p. 1123-50.
80. Bolsover, S. and R.A. Silver, *Artifacts in calcium measurement: recognition and remedies*. Trends Cell Biol, 1991. **1**(2-3): p. 71-4.
81. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
82. Thornton, C., M.A. Snowden, and D. Carling, *Identification of a novel AMP-activated protein kinase beta subunit isoform that is highly expressed in skeletal muscle*. J Biol Chem, 1998. **273**(20): p. 12443-50.
83. Clifford, P.S. and Y. Hellsten, *Vasodilatory mechanisms in contracting skeletal muscle*. J Appl Physiol, 2004. **97**(1): p. 393-403.
84. Bolz, S.S., et al., *Sphingosine kinase modulates microvascular tone and myogenic responses through activation of RhoA/Rho kinase*. Circulation, 2003. **108**(3): p. 342-7.
85. Lucchesi, P.A., et al., *Involvement of metalloproteinases 2/9 in epidermal growth factor receptor transactivation in pressure-induced myogenic tone in mouse mesenteric resistance arteries*. Circulation, 2004. **110**(23): p. 3587-93.
86. Matrougui, K., et al., *Angiotensin II stimulates extracellular signal-regulated kinase activity in intact pressurized rat mesenteric resistance arteries*. Hypertension, 2000. **36**(4): p. 617-21.
87. Stapleton, P.A., et al., *Altered mechanisms of endothelium-dependent dilation in skeletal muscle arterioles with genetic hypercholesterolemia*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2007. **293**(3): p. R1110-9.
88. Trautner, S., et al., *Noradrenaline-induced increases in calcium and tension in skeletal muscle conductance and resistance arteries from rats with post-infarction heart failure*. Eur J Pharmacol, 2006. **537**(1-3): p. 143-54.
89. Armstrong, M.L., A.K. Dua, and C.L. Murrant, *Potassium initiates vasodilatation induced by a single skeletal muscle contraction in hamster cremaster muscle*. J Physiol, 2007. **581**(Pt 2): p. 841-52.
90. Hammer, L.W., A.L. Ligon, and R.L. Hester, *ATP-mediated release of arachidonic acid metabolites from venular endothelium causes arteriolar dilation*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2001. **280**(6): p. H2616-22.
91. de Wit, C., et al., *Nitric oxide opposes myogenic pressure responses predominantly in large arterioles in vivo*. Hypertension, 1998. **31**(3): p. 787-94.
92. de Wit, C., P. von Bismarck, and U. Pohl, *Mediator role of prostaglandins in acetylcholine-induced vasodilation and control of resting vascular diameter in the hamster cremaster microcirculation in vivo*. J Vasc Res, 1993. **30**(5): p. 272-8.
93. de Wit, C., P. von Bismarck, and U. Pohl, *Synergistic action of vasodilators that increase cGMP and cAMP in the hamster cremaster microcirculation*. Cardiovasc Res, 1994. **28**(10): p. 1513-8.
94. Koenigsberger, M., R. Sauser, and J.J. Meister, *Emergent properties of electrically coupled smooth muscle cells*. Bull Math Biol, 2005. **67**(6): p. 1253-72.
95. Goransson, O., et al., *Mechanism of action of A-769662, a valuable tool for activation of AMP-activated protein kinase*. J Biol Chem, 2007. **282**(45): p. 32549-60.
96. Oakhill, J.S., J.W. Scott, and B.E. Kemp, *Structure and function of AMP-activated protein kinase*. Acta Physiol (Oxf), 2009. **196**(1): p. 3-14.
97. Sanders, M.J., et al., *Defining the mechanism of activation of AMP-activated protein kinase by the small molecule A-769662, a member of the thienopyridone family*. J Biol Chem, 2007. **282**(45): p. 32539-48.
98. Scott, J.W., et al., *Thienopyridone drugs are selective activators of AMP-activated protein kinase beta1-containing complexes*. Chem Biol, 2008. **15**(11): p. 1220-30.

99. Treebak, J.T., et al., *A-769662 activates AMPK beta1-containing complexes but induces glucose uptake through a PI3-kinase-dependent pathway in mouse skeletal muscle*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2009. **297**(4): p. C1041-52.
100. Davies, S.P., D. Carling, and D.G. Hardie, *Tissue distribution of the AMP-activated protein kinase, and lack of activation by cyclic-AMP-dependent protein kinase, studied using a specific and sensitive peptide assay*. *Eur J Biochem*, 1989. **186**(1-2): p. 123-8.
101. Guigas, B., et al., *Beyond AICA riboside: in search of new specific AMP-activated protein kinase activators*. *IUBMB Life*, 2009. **61**(1): p. 18-26.
102. Benziane, B., et al., *AMP-activated protein kinase activator A-769662 is an inhibitor of the Na(+)-K(+)-ATPase*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2009. **297**(6): p. C1554-66.
103. Moreno, D., et al., *A769662, a novel activator of AMP-activated protein kinase, inhibits non-proteolytic components of the 26S proteasome by an AMPK-independent mechanism*. *FEBS Lett*, 2008. **582**(17): p. 2650-4.
104. Viollet, B., et al., *AMPK inhibition in health and disease*. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2010. **45**(4): p. 276-95.
105. Ford, R.J. and J.W. Rush, *Endothelium-dependent vasorelaxation to the AMPK activator AICAR is enhanced in aorta from hypertensive rats and is NO- and EDCF-dependent*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2010.
106. Emerling, B.M., et al., *Compound C inhibits hypoxic activation of HIF-1 independent of AMPK*. *FEBS Lett*, 2007. **581**(29): p. 5727-31.
107. Bain, J., et al., *The selectivity of protein kinase inhibitors: a further update*. *Biochem J*, 2007. **408**(3): p. 297-315.
108. Machrouhi, F., et al., *The rational design of a novel potent analogue of the 5'-AMP-activated protein kinase inhibitor compound C with improved selectivity and cellular activity*. *Bioorg Med Chem Lett*, 2010. **20**(22): p. 6394-9.
109. McCrimmon, R.J., et al., *Key role for AMP-activated protein kinase in the ventromedial hypothalamus in regulating counterregulatory hormone responses to acute hypoglycemia*. *Diabetes*, 2008. **57**(2): p. 444-50.
110. Randriamboavonjy, V., et al., *AMPK alpha2 subunit is involved in platelet signaling, clot retraction, and thrombus stability*. *Blood*, 2010. **116**(12): p. 2134-40.
111. Wang, S., et al., *Inhibition of the AMP-Activated Protein Kinase- α 2 Accentuates Agonist-Induced Vascular Smooth Muscle Contraction and High Blood Pressure in Mice*. *Hypertension*, 2011. **57**(5): p. 1010-7.
112. Morrow, V.A., et al., *Direct activation of AMP-activated protein kinase stimulates nitric-oxide synthesis in human aortic endothelial cells*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(34): p. 31629-39.
113. Bolz, S.S., et al., *Intact endothelial and smooth muscle function in small resistance arteries after 48 h in vessel culture*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2000. **279**(3): p. H1434-9.
114. Bolz, S.S. and U. Pohl, *Highly effective non-viral gene transfer into vascular smooth muscle cells of cultured resistance arteries demonstrated by genetic inhibition of sphingosine-1-phosphate-induced vasoconstriction*. *J Vasc Res*, 2003. **40**(4): p. 399-405.
115. Kim, M., et al., *AMPK isoform expression in the normal and failing hearts*. *J Mol Cell Cardiol*, 2012. **52**(5): p. 1066-73.
116. Wojtaszewski, J.F., et al., *5'AMP activated protein kinase expression in human skeletal muscle: effects of strength training and type 2 diabetes*. *J Physiol*, 2005. **564**(Pt 2): p. 563-73.
117. Felgner, P.L. and G.M. Ringold, *Cationic liposome-mediated transfection*. *Nature*, 1989. **337**(6205): p. 387-8.

118. Pickering, J.G., et al., *Liposome-mediated gene transfer into human vascular smooth muscle cells*. *Circulation*, 1994. **89**(1): p. 13-21.
119. Hickey, K.D. and M.M. Buhr, *Characterization of Na⁺K⁺-ATPase in bovine sperm*. *Theriogenology*, 2012.
120. Jaisser, F., [*Molecular and functional diversity of NA,K-ATPase and renal H,K-ATPases*]. *Nephrologie*, 1996. **17**(7): p. 401-8.
121. Silva, E. and P. Soares-da-Silva, *New insights into the regulation of Na⁺,K⁺-ATPase by ouabain*. *Int Rev Cell Mol Biol*, 2012. **294**: p. 99-132.
122. Goirand, F., et al., *Activation of AMP kinase alpha1 subunit induces aortic vasorelaxation in mice*. *J Physiol*, 2007. **581**(Pt 3): p. 1163-71.
123. Chen, Z., et al., *AMP-activated protein kinase functionally phosphorylates endothelial nitric oxide synthase Ser633*. *Circ Res*, 2009. **104**(4): p. 496-505.
124. Chen, Z.P., et al., *AMP-activated protein kinase phosphorylation of endothelial NO synthase*. *FEBS Lett*, 1999. **443**(3): p. 285-9.
125. Schulz, E., S. Schuhmacher, and T. Munzel, *When metabolism rules perfusion: AMPK-mediated endothelial nitric oxide synthase activation*. *Circ Res*, 2009. **104**(4): p. 422-4.
126. Sabina, R.L., D. Patterson, and E.W. Holmes, *5-Amino-4-imidazolecarboxamide riboside (Z-ribose) metabolism in eukaryotic cells*. *J Biol Chem*, 1985. **260**(10): p. 6107-14.
127. Vincent, M.F., F. Bontemps, and G. Van den Berghe, *Substrate cycling between 5-amino-4-imidazolecarboxamide riboside and its monophosphate in isolated rat hepatocytes*. *Biochem Pharmacol*, 1996. **52**(7): p. 999-1006.
128. Rubin, L.J., et al., *Metabolic activation of AMP kinase in vascular smooth muscle*. *J Appl Physiol*, 2005. **98**(1): p. 296-306.
129. Cheung, P.C., et al., *Characterization of AMP-activated protein kinase gamma-subunit isoforms and their role in AMP binding*. *Biochem J*, 2000. **346 Pt 3**: p. 659-69.
130. Guigas, B., et al., *AMP-activated protein kinase-independent inhibition of hepatic mitochondrial oxidative phosphorylation by AICA riboside*. *Biochem J*, 2007. **404**(3): p. 499-507.
131. Jacobs, R.L., et al., *Inhibition of hepatic phosphatidylcholine synthesis by 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-4-ribofuranoside is independent of AMP-activated protein kinase activation*. *J Biol Chem*, 2007. **282**(7): p. 4516-23.
132. Gadalla, A.E., et al., *AICA riboside both activates AMP-activated protein kinase and competes with adenosine for the nucleoside transporter in the CA1 region of the rat hippocampus*. *J Neurochem*, 2004. **88**(5): p. 1272-82.
133. Fryer, L.G., A. Parbu-Patel, and D. Carling, *Protein kinase inhibitors block the stimulation of the AMP-activated protein kinase by 5-amino-4-imidazolecarboxamide riboside*. *FEBS Lett*, 2002. **531**(2): p. 189-92.
134. Fryer, L.G., A. Parbu-Patel, and D. Carling, *The Anti-diabetic drugs rosiglitazone and metformin stimulate AMP-activated protein kinase through distinct signaling pathways*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(28): p. 25226-32.
135. Hawley, S.A., et al., *The antidiabetic drug metformin activates the AMP-activated protein kinase cascade via an adenine nucleotide-independent mechanism*. *Diabetes*, 2002. **51**(8): p. 2420-5.
136. Zou, M.H., et al., *Activation of the AMP-activated protein kinase by the anti-diabetic drug metformin in vivo. Role of mitochondrial reactive nitrogen species*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(42): p. 43940-51.

137. Zou, M.H., et al., *Activation of 5'-AMP-activated kinase is mediated through c-Src and phosphoinositide 3-kinase activity during hypoxia-reoxygenation of bovine aortic endothelial cells. Role of peroxynitrite.* J Biol Chem, 2003. **278**(36): p. 34003-10.
138. Clanton, T.L., *Hypoxia-induced reactive oxygen species formation in skeletal muscle.* J Appl Physiol, 2007. **102**(6): p. 2379-88.
139. Emerling, B.M., et al., *Hypoxic activation of AMPK is dependent on mitochondrial ROS but independent of an increase in AMP/ATP ratio.* Free Radic Biol Med, 2009. **46**(10): p. 1386-91.
140. Choi, S.L., et al., *The regulation of AMP-activated protein kinase by H(2)O(2).* Biochem Biophys Res Commun, 2001. **287**(1): p. 92-7.
141. Laderoute, K.R., et al., *5'-AMP-activated protein kinase (AMPK) is induced by low-oxygen and glucose deprivation conditions found in solid-tumor microenvironments.* Mol Cell Biol, 2006. **26**(14): p. 5336-47.
142. Akata, T., *Cellular and molecular mechanisms regulating vascular tone. Part 1: basic mechanisms controlling cytosolic Ca²⁺ concentration and the Ca²⁺-dependent regulation of vascular tone.* J Anesth, 2007. **21**(2): p. 220-31.
143. Matchkov, V.V., O. Kudryavtseva, and C. Aalkjaer, *Intracellular Ca(2)(+) signalling and phenotype of vascular smooth muscle cells.* Basic Clin Pharmacol Toxicol, 2012. **110**(1): p. 42-8.
144. Orallo, F., *Regulation of cytosolic calcium levels in vascular smooth muscle.* Pharmacol Ther, 1996. **69**(3): p. 153-71.
145. Nelson, M.T., et al., *Calcium channels, potassium channels, and voltage dependence of arterial smooth muscle tone.* Am J Physiol, 1990. **259**(1 Pt 1): p. C3-18.
146. Schmidt, R.F., F. Lang, and G. Thews, *Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie.* Springer Medizin Verlag Heidelberg, 2005. **29.Auflage.**
147. Eichhorn, B. and D. Dobrev, *Vascular large conductance calcium-activated potassium channels: functional role and therapeutic potential.* Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2007. **376**(3): p. 145-55.
148. Brenner, R., et al., *Vasoregulation by the beta1 subunit of the calcium-activated potassium channel.* Nature, 2000. **407**(6806): p. 870-6.
149. Knaus, H.G., et al., *Subunit composition of the high conductance calcium-activated potassium channel from smooth muscle, a representative of the mSlo and slowpoke family of potassium channels.* J Biol Chem, 1994. **269**(6): p. 3921-4.
150. Liu, G., et al., *Location of modulatory beta subunits in BK potassium channels.* J Gen Physiol, 2010. **135**(5): p. 449-59.
151. Wallner, M., P. Meera, and L. Toro, *Determinant for beta-subunit regulation in high-conductance voltage-activated and Ca(2+)-sensitive K⁺ channels: an additional transmembrane region at the N terminus.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(25): p. 14922-7.
152. Wu, R.S. and S.O. Marx, *The BK potassium channel in the vascular smooth muscle and kidney: alpha- and beta-subunits.* Kidney Int, 2010. **78**(10): p. 963-74.
153. Schubert, R. and M.T. Nelson, *Protein kinases: tuners of the BKCa channel in smooth muscle.* Trends Pharmacol Sci, 2001. **22**(10): p. 505-12.
154. Widmer, H.A., I.C. Rowe, and M.J. Shipston, *Conditional protein phosphorylation regulates BK channel activity in rat cerebellar Purkinje neurons.* J Physiol, 2003. **552**(Pt 2): p. 379-91.
155. Dallas, M.L., et al., *Modulation of O(2) sensitive K (+) channels by AMP-activated protein kinase.* Adv Exp Med Biol, 2009. **648**: p. 57-63.
156. Wyatt, C.N. and A.M. Evans, *AMP-activated protein kinase and chemotransduction in the carotid body.* Respir Physiol Neurobiol, 2007. **157**(1): p. 22-9.

157. Wyatt, C.N., et al., *AMP-activated protein kinase mediates carotid body excitation by hypoxia*. J Biol Chem, 2007. **282**(11): p. 8092-8.
158. Ross, F.A., et al., *Selective expression in carotid body type I cells of a single splice variant of the large conductance calcium- and voltage-activated potassium channel confers regulation by AMP-activated protein kinase*. J Biol Chem, 2011. **286**(14): p. 11929-36.
159. McCartney, C.E., et al., *A cysteine-rich motif confers hypoxia sensitivity to mammalian large conductance voltage- and Ca-activated K (BK) channel alpha-subunits*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(49): p. 17870-6.
160. Tian, L., et al., *Distinct stoichiometry of BKCa channel tetramer phosphorylation specifies channel activation and inhibition by cAMP-dependent protein kinase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(32): p. 11897-902.
161. Evans, A.M., et al., *Does AMP-activated protein kinase couple inhibition of mitochondrial oxidative phosphorylation by hypoxia to calcium signaling in O₂-sensing cells?* J Biol Chem, 2005. **280**(50): p. 41504-11.
162. Garcia, M.L., et al., *Potassium channels: from scorpion venoms to high-resolution structure*. Toxicon, 2001. **39**(6): p. 739-48.
163. Tytgat, J., et al., *A unified nomenclature for short-chain peptides isolated from scorpion venoms: alpha-KTx molecular subfamilies*. Trends Pharmacol Sci, 1999. **20**(11): p. 444-7.
164. Carbone, E., et al., *Selective blockage of voltage-dependent K⁺ channels by a novel scorpion toxin*. Nature, 1982. **296**(5852): p. 90-1.
165. Gao, Y.D. and M.L. Garcia, *Interaction of agitoxin2, charybdotoxin, and iberiotoxin with potassium channels: selectivity between voltage-gated and Maxi-K channels*. Proteins, 2003. **52**(2): p. 146-54.
166. Garcia, M.L., et al., *Charybdotoxin and its effects on potassium channels*. Am J Physiol, 1995. **269**(1 Pt 1): p. C1-10.
167. Knaus, H.G., et al., *Pharmacology and structure of high conductance calcium-activated potassium channels*. Cell Signal, 1994. **6**(8): p. 861-70.
168. Miller, C., et al., *Charybdotoxin, a protein inhibitor of single Ca²⁺-activated K⁺ channels from mammalian skeletal muscle*. Nature, 1985. **313**(6000): p. 316-8.
169. Candia, S., M.L. Garcia, and R. Latorre, *Mode of action of iberiotoxin, a potent blocker of the large conductance Ca(2+)-activated K⁺ channel*. Biophys J, 1992. **63**(2): p. 583-90.
170. Galvez, A., et al., *Purification and characterization of a unique, potent, peptidyl probe for the high conductance calcium-activated potassium channel from venom of the scorpion *Buthus tamulus**. J Biol Chem, 1990. **265**(19): p. 11083-90.
171. Garcia, M.L., et al., *Pharmacology of potassium channels*. Adv Pharmacol, 1997. **39**: p. 425-71.
172. Dworetzky, S.I., et al., *Phenotypic alteration of a human BK (hSlo) channel by hSlobeta subunit coexpression: changes in blocker sensitivity, activation/relaxation and inactivation kinetics, and protein kinase A modulation*. J Neurosci, 1996. **16**(15): p. 4543-50.
173. Orio, P. and R. Latorre, *Differential effects of beta 1 and beta 2 subunits on BK channel activity*. J Gen Physiol, 2005. **125**(4): p. 395-411.
174. Chen, L., et al., *Functionally diverse complement of large conductance calcium- and voltage-activated potassium channel (BK) alpha-subunits generated from a single site of splicing*. J Biol Chem, 2005. **280**(39): p. 33599-609.
175. Fisslthaler, B. and I. Fleming, *Activation and signaling by the AMP-activated protein kinase in endothelial cells*. Circ Res, 2009. **105**(2): p. 114-27.

176. Clapp, L.H. and A.M. Gurney, *ATP-sensitive K⁺ channels regulate resting potential of pulmonary arterial smooth muscle cells*. Am J Physiol, 1992. **262**(3 Pt 2): p. H916-20.
177. Jackson, W.F., *Arteriolar tone is determined by activity of ATP-sensitive potassium channels*. Am J Physiol, 1993. **265**(5 Pt 2): p. H1797-803.
178. Kovacs, R.J. and M.T. Nelson, *ATP-sensitive K⁺ channels from aortic smooth muscle incorporated into planar lipid bilayers*. Am J Physiol, 1991. **261**(2 Pt 2): p. H604-9.
179. Standen, N.B., et al., *Hyperpolarizing vasodilators activate ATP-sensitive K⁺ channels in arterial smooth muscle*. Science, 1989. **245**(4914): p. 177-80.
180. Ishibashi, Y., et al., *ATP-sensitive K⁺ channels, adenosine, and nitric oxide-mediated mechanisms account for coronary vasodilation during exercise*. Circ Res, 1998. **82**(3): p. 346-59.
181. Jackson, W.F., *Hypoxia does not activate ATP-sensitive K⁺ channels in arteriolar muscle cells*. Microcirculation, 2000. **7**(2): p. 137-45.
182. Murry, C.E., R.B. Jennings, and K.A. Reimer, *Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium*. Circulation, 1986. **74**(5): p. 1124-36.
183. Budas, G.R., et al., *Hypoxia-induced preconditioning in adult stimulated cardiomyocytes is mediated by the opening and trafficking of sarcolemmal KATP channels*. FASEB J, 2004. **18**(9): p. 1046-8.
184. Suzuki, M., et al., *Role of sarcolemmal K(ATP) channels in cardioprotection against ischemia/reperfusion injury in mice*. J Clin Invest, 2002. **109**(4): p. 509-16.
185. Sukhodub, A., et al., *AMP-activated protein kinase mediates preconditioning in cardiomyocytes by regulating activity and trafficking of sarcolemmal ATP-sensitive K(+) channels*. J Cell Physiol, 2007. **210**(1): p. 224-36.
186. Yokoshiki, H., et al., *ATP-sensitive K⁺ channels in pancreatic, cardiac, and vascular smooth muscle cells*. Am J Physiol, 1998. **274**(1 Pt 1): p. C25-37.
187. Ashcroft, F.M. and F.M. Gribble, *Tissue-specific effects of sulfonylureas: lessons from studies of cloned K(ATP) channels*. J Diabetes Complications, 2000. **14**(4): p. 192-6.
188. Bijlstra, P.J., et al., *Interaction of sulphonylurea derivatives with vascular ATP-sensitive potassium channels in humans*. Diabetologia, 1996. **39**(9): p. 1083-90.
189. Lawrence, C.L., et al., *Gliclazide produces high-affinity block of KATP channels in mouse isolated pancreatic beta cells but not rat heart or arterial smooth muscle cells*. Diabetologia, 2001. **44**(8): p. 1019-25.
190. Gupta, J. and P. Linsdell, *Point mutations in the pore region directly or indirectly affect glibenclamide block of the CFTR chloride channel*. Pflugers Arch, 2002. **443**(5-6): p. 739-47.
191. Lee, S.Y. and C.O. Lee, *Inhibition of Na⁺-K⁺ pump and L-type Ca²⁺ channel by glibenclamide in Guinea pig ventricular myocytes*. J Pharmacol Exp Ther, 2005. **312**(1): p. 61-8.
192. Sheppard, D.N. and K.A. Robinson, *Mechanism of glibenclamide inhibition of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl⁻ channels expressed in a murine cell line*. J Physiol, 1997. **503** (Pt 2): p. 333-46.
193. Chrabi, A. and J.D. Horisberger, *Stimulation of epithelial sodium channel activity by the sulfonylurea glibenclamide*. J Pharmacol Exp Ther, 1999. **290**(1): p. 341-7.
194. Hernandez-Benito, M.J., et al., *Suppression of transient outward potassium currents in mouse ventricular myocytes by imidazole antimycotics and by glibenclamide*. J Pharmacol Exp Ther, 2001. **298**(2): p. 598-606.
195. Rosati, B., et al., *Sulfonylureas blockade of neural and cardiac HERG channels*. FEBS Lett, 1998. **440**(1-2): p. 125-30.
196. Horman, S., et al., *AMP-activated protein kinase phosphorylates and desensitizes smooth muscle myosin light chain kinase*. J Biol Chem, 2008. **283**(27): p. 18505-12.

197. Ayman, S., et al., *Receptor-independent activation of Rho-kinase-mediated calcium sensitisation in smooth muscle*. Br J Pharmacol, 2003. **139**(8): p. 1532-8.
198. Janssen, L.J., et al., *KCl evokes contraction of airway smooth muscle via activation of RhoA and Rho-kinase*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2004. **287**(4): p. L852-8.
199. Alberti, K.G., P. Zimmet, and J. Shaw, *The metabolic syndrome--a new worldwide definition*. Lancet, 2005. **366**(9491): p. 1059-62.
200. Stamler, J., et al., *Diabetes, other risk factors, and 12-yr cardiovascular mortality for men screened in the Multiple Risk Factor Intervention Trial*. Diabetes Care, 1993. **16**(2): p. 434-44.
201. Lawes, C.M., S. Vander Hoorn, and A. Rodgers, *Global burden of blood-pressure-related disease, 2001*. Lancet, 2008. **371**(9623): p. 1513-8.
202. Assmann, G., P. Cullen, and H. Schulte, *Simple scoring scheme for calculating the risk of acute coronary events based on the 10-year follow-up of the prospective cardiovascular Munster (PROCAM) study*. Circulation, 2002. **105**(3): p. 310-5.
203. Assmann, G., et al., *Harmonizing the definition of the metabolic syndrome: comparison of the criteria of the Adult Treatment Panel III and the International Diabetes Federation in United States American and European populations*. Am J Cardiol, 2007. **99**(4): p. 541-8.
204. Scholze, J., et al., *Epidemiological and economic burden of metabolic syndrome and its consequences in patients with hypertension in Germany, Spain and Italy; a prevalence-based model*. BMC Public Health, 2010. **10**: p. 529.
205. Barnes, B.R., et al., *Isoform-specific regulation of 5' AMP-activated protein kinase in skeletal muscle from obese Zucker (fa/fa) rats in response to contraction*. Diabetes, 2002. **51**(9): p. 2703-8.
206. Liu, Y., et al., *High-fat diet feeding impairs both the expression and activity of AMPKa in rats' skeletal muscle*. Biochem Biophys Res Commun, 2006. **339**(2): p. 701-7.
207. Sriwijitkamol, A., et al., *LKB1-AMPK signaling in muscle from obese insulin-resistant Zucker rats and effects of training*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2006. **290**(5): p. E925-32.
208. Aguilera, C.M., et al., *Alterations in plasma and tissue lipids associated with obesity and metabolic syndrome*. Clin Sci (Lond), 2008. **114**(3): p. 183-93.
209. Barnes, B.R., et al., *The 5'-AMP-activated protein kinase gamma3 isoform has a key role in carbohydrate and lipid metabolism in glycolytic skeletal muscle*. J Biol Chem, 2004. **279**(37): p. 38441-7.
210. Bergeron, R., et al., *Effect of 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-ribofuranoside infusion on in vivo glucose and lipid metabolism in lean and obese Zucker rats*. Diabetes, 2001. **50**(5): p. 1076-82.
211. Chen, M.B., et al., *Impaired activation of AMP-kinase and fatty acid oxidation by globular adiponectin in cultured human skeletal muscle of obese type 2 diabetics*. J Clin Endocrinol Metab, 2005. **90**(6): p. 3665-72.
212. Cuthbertson, D.J., et al., *5-aminoimidazole-4-carboxamide 1-beta-D-ribofuranoside acutely stimulates skeletal muscle 2-deoxyglucose uptake in healthy men*. Diabetes, 2007. **56**(8): p. 2078-84.
213. Koistinen, H.A., et al., *5-amino-imidazole carboxamide riboside increases glucose transport and cell-surface GLUT4 content in skeletal muscle from subjects with type 2 diabetes*. Diabetes, 2003. **52**(5): p. 1066-72.
214. Katakam, P.V., et al., *Metformin improves vascular function in insulin-resistant rats*. Hypertension, 2000. **35**(1 Pt 1): p. 108-12.
215. Hawley, S.A., et al., *The ancient drug salicylate directly activates AMP-activated protein kinase*. Science, 2012. **336**(6083): p. 918-22.

-
216. Buhl, E.S., et al., *Long-term AICAR administration reduces metabolic disturbances and lowers blood pressure in rats displaying features of the insulin resistance syndrome*. *Diabetes*, 2002. **51**(7): p. 2199-206.
217. Ford, R.J., et al., *AMP-activated protein kinase activator AICAR acutely lowers blood pressure and relaxes isolated resistance arteries of hypertensive rats*. *J Hypertens*, 2012.

7 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei einer Reihe von Personen bedanken, durch deren hilfreiche und tatkräftige Unterstützung die erfolgreiche Durchführung dieser Arbeit erst ermöglicht wurde.

Allen voran gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. med. U. Pohl, Direktor des Walter Brendel Zentrums für experimentelle Medizin der Ludwig-Maximilians-Universität München, für die Aufnahme an sein Institut und die Vergabe dieses sehr interessanten Themas. Durch seine bereitwillige, kompetente Unterstützung und Anregung in zahlreichen Diskussionen sowie als unermüdlicher Motivator hat er in erheblichem Maße das Gelingen dieser Arbeit gefördert.

Zudem möchte ich mich bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Walter Brendel Instituts für die Unterstützung und Hilfsbereitschaft bei der Durchführung der Versuche bedanken. Allen voran bei Frau Gudrun Höbel für die Einarbeitung in die Präparationstechnik und Laborarbeit sowie für die Mithilfe beim Mischen der zahlreichen Agenzien und Lösungen.

Nicht zuletzt auch ein herzliches Dankeschön an meine Familie und Freunde für den wichtigen moralischen Beistand gerade während der schwierigen Phasen der Arbeit.

Anhang

Gesetz von Ohm:

$$I=U/R$$

I: Stromstärke
U: Spannung
R: Widerstand

Gesetz von Hagen-Poiseuille:

$$V/t= \pi r^4 \Delta p / 8 \eta l$$

V/t: Volumenstrom durch ein Rohr
 π : Kreiszahl pi
r: Innenradius des Rohres
 Δp : Druckdifferenz zwischen Anfang und Ende des Rohres
 η : dynamische Viskosität der strömenden Flüssigkeit
l: Länge des Rohres

Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Die Rolle der AMP-Kinase bei der Regulation des Vasotonus

selbstständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiterer Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Ort, Datum

Doktorand