

# **Regulierung endothelialer Funktionen durch Autophagie und den AMPK/Autophagie-Signalweg**

## **Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades  
„doctor rerum naturalium“ (Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Dipl.-Ing. (FH) Katrin Spengler

geboren am 01.04.1986 in Pirna

Gutachter:

1. Prof. Dr. Regine Heller, Friedrich-Schiller-Universität Jena
2. Prof. Dr. Lars-Oliver Klotz, Friedrich-Schiller-Universität Jena
3. Prof. Dr. Huige Li, Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Tag der öffentlichen Disputation: 17.03.2016



## ZUSAMMENFASSUNG

Endothelzellen bilden die innere Schicht von Blutgefäßen und sind für die Regulierung des Stoffaustausches zwischen Blut und Gewebe sowie für die Aufrechterhaltung der vaskulären Homöostase wichtig. Sie vermitteln auch den Prozess der Angiogenese, der durch Wachstumsfaktoren wie *vascular endothelial growth factor* (VEGF) induziert wird und die Vaskularisierung von Geweben und Organen sichert. Voraussetzung für die Gewährleistung dieser Funktionen sind protektive Mechanismen, die Endothelzellen vor schädigenden Einflüssen schützen.

Ein wichtiger zellulärer homöostatischer Prozess ist die Autophagie. Die Hauptfunktion der Autophagie ist es, alte und geschädigte Proteine und Organellen dem lysosomalen Abbau zuzuführen, um Produkte für die Energiegewinnung und für anabole Synthesewege bereitzustellen und so das zelluläre Gleichgewicht, insbesondere in Stresssituationen, aufrechtzuerhalten. Während der Autophagie wird das abzubauen Material durch ein Autophagosom umschlossen, welches anschließend mit einem Lysosom fusioniert. Die Initiierung der Autophagie wird im Wesentlichen durch die 5'AMP-aktivierte Proteinkinase (AMPK) und *mechanistic target of rapamycin* (mTOR) reguliert. AMPK stimuliert Autophagie durch Aktivierung des Autophagie-Initiators *uncoordinated 51-like kinase 1* (ULK1), während mTOR die ULK1-Aktivität unterdrückt. Für die Verlängerung der sich bildenden Membran spielt die Konjugation von *microtubule-associated protein light chain 3B* (LC3B) eine wichtige Rolle.

Die Bedeutung der basalen Autophagie für die Aufrechterhaltung der Endothelzellfunktion sowie Mechanismen zur Regulierung dieses Prozesses in Endothelzellen sind bisher kaum untersucht. Auch die Bedeutung der AMPK für die endotheliale Autophagie ist noch unklar, obwohl bekannt ist, dass AMPK Endothelzellen vor oxidativem und inflammatorischem Stress schützen kann und an der Regulation der Angiogenese beteiligt ist. Die vorliegende Arbeit sollte deshalb die Regulation und Funktion der Autophagie in Endothelzellen charakterisieren, ihre Notwendigkeit für angiogene Prozesse analysieren und auf die Rolle der AMPK als Regulator von Autophagie und Angiogenese eingehen.

Um diese Fragen zu klären, wurde Autophagie in primären humanen Endothelzellen aus der Nabelschnurvene (HUVEC) mittels spezifischer siRNA gegen die Autophagieproteine ULK1 und *B-cell lymphoma 2 (Bcl2)-interacting protein 1* (Beclin1) oder durch einen Inhibitor (Bafilomycin A1) gehemmt. Anschließend wurden die Einflüsse dieser Hemmung auf verschiedene Endothelzellfunktionen wie Proliferation, Überleben und *in vitro*-Angiogenese untersucht. Die Rolle der AMPK wurde mit Hilfe pharmakologischer (2-Deoxyglukose (2-DG), A769662, 5-Aminoimidazol-4-Carboxamid-Ribonukleotid (AICAR)) und physiologischer (VEGF) AMPK-Aktivatoren sowie durch Herunterregulierung der katalytischen AMPK-Untereinheiten  $\alpha 1$  bzw.  $\alpha 2$  mittels spezifischer siRNA charakterisiert.

Die Daten der vorliegenden Arbeit belegen, dass Endothelzellen über eine ausgeprägte basale Autophagie verfügen, die für den Schutz der Zellen sehr wichtig ist. Eine Hemmung der Autophagie führt zu einem Anstieg von oxidativem und inflammatorischem Stress und beeinträchtigt wichtige Endothelzellularfunktionen wie Proliferation, Überleben und Angiogenese. Diese Erkenntnisse tragen zum besseren Verständnis der Regulierung der Endothelzell-Homöostase bei. Sie lassen vermuten, dass eine Stimulierung der Autophagie die Ausbildung einer Endotheldysfunktion verhindern sowie kardiovaskuläre Erkrankungen vermindern kann und sind deshalb von großem medizinischem Interesse. Die vorliegende Arbeit zeigt zudem, dass AMPK-Aktivatoren eine Möglichkeit darstellen, endotheliale Autophagie zu stimulieren. 2-DG, A769662 und AICAR führen zur AMPK $\alpha$ 1-vermittelten Aktivierung von ULK1 und zur Hemmung von mTOR. Gleichzeitig kommt es zu einem Anstieg der LC3B-Konjugation, was einen erhöhten Autophagie-Flux anzeigt. AMPK $\alpha$ 2 scheint in diese Prozesse nicht einbezogen zu sein.

Ein wichtiges Ergebnis dieser Arbeit ist, dass VEGF als physiologischer AMPK-Aktivator ebenfalls zu einer Aktivierung von ULK1 und Stimulierung der Autophagie führt. Letzteres wurde anhand der verminderten Expression von p62, einem Protein, das spezifisch über den Autophagieweg abgebaut wird, nachgewiesen. Auch VEGF-induzierte Autophagie wird durch AMPK $\alpha$ 1, nicht aber durch AMPK $\alpha$ 2 vermittelt. Der VEGF/AMPK $\alpha$ 1/Autophagie-Signalweg ist für den Prozess der Angiogenese von essentieller Bedeutung, da VEGF in Zellen mit gehemmter AMPK $\alpha$ 1- oder Autophagie-Aktivität kaum mehr in der Lage ist, Angiogenese zu induzieren. Die vorliegende Arbeit erweitert damit frühere Beobachtungen über eine proangiogene Rolle der AMPK $\alpha$ 1, indem sie zugrundeliegende Mechanismen aufdeckt. Sie gibt damit neue Einblicke in die Regulierung der VEGF-stimulierten Angiogenese und charakterisiert den VEGF/AMPK $\alpha$ 1/Autophagie-Signalweg als einen neuen proangiogenen Mechanismus.

Insgesamt dienen die Ergebnisse dieser Arbeit dazu, die Regulation von Endothelzellfunktionen besser zu verstehen und damit die Basis für gezielte Maßnahmen zu liefern, die das Auftreten einer Endotheldysfunktion verhindern oder reduzieren können. Darüber hinaus können die gewonnenen Erkenntnisse zur Verbesserung pro- und antiangiogener Therapieansätze beitragen.

## SUMMARY

Endothelial cells forming the inner layer of blood vessels regulate the exchange of nutrients and oxygen between blood and surrounding tissues and maintain the vascular homeostasis. In addition, they mediate angiogenesis induced by growth factors such as vascular endothelial growth factor (VEGF) and ensure the vascularisation of tissues and organs. As a prerequisite for maintaining functionality endothelial cells require mechanisms that ensure protection from damaging factors.

One important cellular homeostatic process is autophagy. Its major function is the degradation of old and damaged proteins and organelles via the lysosomal pathway to provide precursors for energy production and anabolic synthesis pathways and to sustain intracellular balance, especially under stress situations. During the process of autophagy the cellular material to be degraded is engulfed by a so-called autophagosome that subsequently fuses with a lysosome. The initiation of autophagy is mainly regulated by 5'AMP-activated protein kinase (AMPK) and mechanistic target of rapamycin (mTOR). AMPK stimulates the process by activating the autophagy initiator uncoordinated 51-like kinase 1 (ULK1) whereas mTOR suppresses ULK1 activity. The elongation of the autophagosomal membrane is controlled by conjugation of microtubule-associated protein light chain 3B (LC3B).

So far, little is known about the significance of basal autophagy and regulatory mechanisms of autophagy in endothelial cells. In addition, the role of AMPK in endothelial autophagy is poorly understood although it is known that AMPK protects endothelial cells from oxidative and inflammatory stress and is involved in the regulation of angiogenesis. Therefore, the present study was aimed at investigating the regulation and function of autophagy in endothelial cells, the importance of this pathway for angiogenesis and in particular, the role of AMPK in regulating both, autophagy and angiogenic processes.

To address these issues, human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) were employed. Autophagy was suppressed via siRNA-mediated downregulation of the autophagy proteins ULK1 and B-cell lymphoma 2 (Bcl2)-interacting protein 1 (Beclin1) or by applying the inhibitor Bafilomycin A1. Subsequently, the effects of autophagy inhibition on several endothelial functions such as proliferation, survival and *in vitro* angiogenesis were investigated. The role of AMPK was characterised with the help of pharmacological (2-deoxyglucose (2-DG), A769662, 5-Aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide (AICAR)) and physiological (VEGF) AMPK activators and by downregulation of the catalytic AMPK subunits  $\alpha 1$  and  $\alpha 2$  via specific siRNA.

The data of the present study show that endothelial cells exhibit a substantial autophagic flux under basal conditions which plays an essential role in cellular protection. Inhibition of autophagy led to increased oxidative and inflammatory stress and impaired vital endothelial cell functions such as proliferation, survival and angiogenesis.

These results contribute to a better understanding of mechanisms underlying endothelial homeostasis. They suggest that stimulation of autophagy may prevent endothelial dysfunction and possibly repress related cardiovascular diseases thus highlighting the medical relevance of these findings. In addition, the present study demonstrates that AMPK activators represent an option to stimulate endothelial autophagy. 2-DG, A769662 and AICAR triggered AMPK $\alpha$ 1-mediated activation of ULK1 and inhibition of mTOR. In parallel, autophagic flux was enhanced as shown by increased conjugation of LC3B. AMPK $\alpha$ 2 did not seem to be involved in these processes.

An important result of this study is that VEGF, a physiological AMPK activator, was also able to activate ULK1 and stimulate autophagy. The latter was verified by reduced expression of p62, a protein that is specifically degraded via autophagy. VEGF-induced autophagy was mediated by AMPK $\alpha$ 1 but not by AMPK $\alpha$ 2. The VEGF/AMPK $\alpha$ 1/autophagy pathway was crucially involved in mediating angiogenic response since VEGF could hardly induce angiogenesis when AMPK $\alpha$ 1 or autophagy were blocked. These data add to previous findings on the proangiogenic role of AMPK $\alpha$ 1 by revealing the underlying mechanisms and provide new insights into the regulation of VEGF-stimulated angiogenesis.

Together, the results of this study contribute to a better understanding of how endothelial functions are regulated and of how the development of an endothelial dysfunction might be prevented by targeted strategies. This study characterises the VEGF/AMPK $\alpha$ 1/autophagy pathway as a novel proangiogenic process suggesting that these data can contribute to improve approaches for pro- and antiangiogenic therapies.

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Endothel .....</b>	<b>1</b>
1.1.1	Endothelfunktion .....	1
1.1.2	VEGF und Angiogenese .....	2
<b>1.2</b>	<b>AMPK .....</b>	<b>4</b>
1.2.1	Aufbau .....	4
1.2.2	Regulierung .....	5
1.2.3	Funktion .....	7
<b>1.3</b>	<b>Autophagie .....</b>	<b>10</b>
1.3.1	Mechanismus .....	10
1.3.2	Regulierung .....	11
1.3.3	Funktion .....	14
<b>1.4</b>	<b>Fragestellung .....</b>	<b>17</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>18</b>
<b>2.1</b>	<b>Material .....</b>	<b>18</b>
2.1.1	Zellen .....	18
2.1.2	Chemikalien und Reagenzien .....	18
2.1.3	Inhibitoren und Stimulanzen .....	21
2.1.4	Antikörper .....	21
2.1.5	siRNA .....	23
2.1.6	Materialien .....	23
2.1.7	Geräte .....	24
<b>2.2</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>25</b>
2.2.1	Zellkultur .....	25
2.2.1.1	Präparation von HUVEC .....	25
2.2.1.2	Passagieren .....	26
2.2.1.3	Aussaat .....	26
2.2.2	siRNA-Transfektion .....	27
2.2.3	Stimulationsbedingungen .....	27
2.2.4	Proteinanalytik .....	28
2.2.4.1	Zellyse .....	28
2.2.4.2	Proteinbestimmung nach Lowry .....	29
2.2.4.3	SDS-PAGE .....	29
2.2.4.4	Western-Blot .....	30
2.2.4.5	Immundetektion von Proteinen .....	30
2.2.4.6	Strippen von Membranen .....	31
2.2.4.7	Densitometrische Auswertung .....	31
2.2.5	Bestimmung von Stress-Parametern .....	32
2.2.5.1	GSH-Bestimmung .....	32
2.2.5.2	Proteinkarboxylierung .....	33
2.2.5.3	ATP-Bestimmung .....	33
2.2.5.4	Zytokin-Bestimmung .....	34
2.2.6	Funktionelle Methoden .....	35
2.2.6.1	Proliferation (BrdU-Inkorporation) .....	35
2.2.6.2	Zelltod (TUNEL-Färbung) .....	35

2.2.6.3	Zellzyklus-Analyse .....	36
2.2.6.4	<i>In vitro</i> -Angiogenesemessung durch Sphäroid-Assay .....	37
2.2.6.5	Metabolismus und Autophagie .....	39
2.2.7	Statistik .....	42
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>43</b>
<b>3.1</b>	<b>Bedeutung der Autophagie in Endothelzellen unter basalen Bedingungen .....</b>	<b>43</b>
3.1.1	Basale Autophagie .....	43
3.1.2	Genetische und pharmakologische Hemmung der Autophagie .....	44
3.1.3	Autophagie und intrazelluläre Energie-Homöostase.....	46
3.1.4	Einfluss von Autophagie auf Stressparameter .....	47
3.1.5	Bedeutung der Autophagie für endotheliale Proliferation .....	49
3.1.6	Einfluss der Autophagie auf das Überleben von Endothelzellen.....	50
<b>3.2</b>	<b>Bedeutung der Autophagie für VEGF-induzierte Angiogenese .....</b>	<b>52</b>
3.2.1	Proliferation.....	52
3.2.2	Überleben .....	54
3.2.3	VEGF-Signalwege .....	55
3.2.4	Angiogenese in Autophagie-defizienten Zellen.....	57
3.2.5	Angiogenese nach pharmakologischer Hemmung der Autophagie .....	58
<b>3.3</b>	<b>AMPK aktiviert Autophagie in Endothelzellen.....</b>	<b>60</b>
3.3.1	Metabolischer Stress, AMPK und Autophagie .....	60
3.3.2	Pharmakologische AMPK-Aktivierung und Autophagie.....	62
<b>3.4</b>	<b>AMPK-stimulierte Angiogenese und Autophagie .....</b>	<b>65</b>
3.4.1	Stimulierung der Angiogenese durch AMPK-Aktivator .....	65
3.4.2	AMPK-Aktivierung durch VEGF und A769662.....	66
3.4.3	AMPK und angiogene Signalwege.....	67
3.4.4	AMPK-induzierte Angiogenese und Autophagie.....	69
<b>3.5</b>	<b>Regulierung der endothelialen Autophagie durch oxidativen Stress ...</b>	<b>70</b>
3.5.1	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -induzierte Autophagie .....	70
3.5.2	Hypoxie-induzierte Autophagie .....	71
<b>3.6</b>	<b>Regulierung der endothelialen Autophagie durch VEGF .....</b>	<b>72</b>
3.6.1	VEGF-induzierte Autophagie.....	72
3.6.2	Beteiligung der AMPK an VEGF-induzierter Autophagie.....	73
<b>4</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>75</b>
<b>4.1</b>	<b>Beeinflussung der Autophagie in Endothelzellen.....</b>	<b>75</b>
<b>4.2</b>	<b>Autophagie ist für den Erhalt der Endothelzellfunktion wichtig .....</b>	<b>76</b>
4.2.1	Endothelzellen verfügen über eine aktive basale Autophagie .....	76
4.2.2	Autophagie hat wenig Bedeutung für die Energiehomöostase in Endothelzellen ..	77
4.2.3	Autophagie ist ein wichtiger Mechanismus zur Stressprotektion.....	78
4.2.4	Autophagie sichert Wachstum und Überleben der Endothelzellen .....	80
4.2.5	Autophagie reguliert die VEGF-induzierte Angiogenese .....	80
<b>4.3</b>	<b>AMPK aktiviert endotheliale Autophagie .....</b>	<b>83</b>
<b>4.4</b>	<b>Mechanismen der AMPK-stimulierten Angiogenese .....</b>	<b>86</b>
<b>4.5</b>	<b>Stress-induzierte Autophagie .....</b>	<b>88</b>
<b>4.6</b>	<b>VEGF-stimuliert AMPK-abhängig Autophagie und Angiogenese.....</b>	<b>90</b>

---

<b>5</b>	<b>SCHLUSSFOLGERUNG .....</b>	<b>93</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>94</b>
<b>7</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>104</b>
7.1	Abkürzungsverzeichnis.....	104
7.2	Abbildungsverzeichnis.....	106
7.3	Tabellenverzeichnis.....	107
7.4	Veröffentlichungen der Ergebnisse dieser Arbeit.....	108
7.5	Danksagung .....	109
7.6	Ehrenwörtliche Erklärung .....	110

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Endothel

Herz-Kreislauf-Erkrankungen und damit einhergehende vaskuläre Komplikationen wie Herzinfarkt oder Schlaganfall sind die häufigste Todesursache in Deutschland und anderen Industriestaaten [1]. Herz-Kreislauf-Erkrankungen basieren häufig auf atherosklerotischen Gefäßveränderungen. Solche Veränderungen werden durch ein dysfunktionales Endothel hervorgerufen, und sind durch die Ablagerung von Blutfetten und Zellen charakterisiert, die das Lumen der Gefäße verengen oder verschließen und damit zur Unterversorgung der betreffenden Gewebe führen. Das metabolische Syndrom, ein Zusammenwirken von Übergewicht, Fettstoffwechselstörungen, Bluthochdruck und Insulinresistenz, welches durch Fehlernährung, Bewegungsmangel, Diabetes mellitus und Alter begünstigt wird, gilt als bedeutender Risikofaktor für das Auftreten von atherosklerotischen Komplikationen und damit verbundenen Herz-Kreislauf-Erkrankungen.

### 1.1.1 Endothelfunktion

Endothelzellen kleiden das Innere von Lymph- und Blutgefäßen aus und sind für die vaskuläre Homöostase und Funktion essentiell. Das Endothel ist eine einzellige Schicht und bildet eine Barriere zwischen dem Blut und dem darunter liegenden Gewebe. Die Struktur des Endothels variiert in Abhängigkeit von der Größe des Gefäßes. Das Endothel großer Gefäße, das im Wesentlichen zur Blutverteilung und Regulierung des Blutflusses dient, ist für im Blut gelöste Substanzen nahezu undurchlässig. Die Aufgabe mikrovaskulärer Gefäße hingegen ist die Versorgung des umliegenden Gewebes mit Sauerstoff und Nährstoffen. Deshalb sind diese Gefäße semipermeabel. Das Endothel der Blut-Hirn-Schranke hingegen ist kaum durchlässig und weist viele *tight junctions* auf. Die Permeabilität dieser Kapillaren wird durch spezifische Transporter und Kanäle reguliert, um einen unkontrollierten Stoffaustausch und das Eindringen von Fremdstoffen in das zentrale Nervensystem zu verhindern. Neben der Gefäßpermeabilität reguliert das Endothel Vasotonus, Koagulation und Fibrinolyse und stellt unter physiologischen Bedingungen die Thrombozytenresistenz der Gefäßwand sicher. All diese Funktionen des Endothels sind für die Gesundheit von Blutgefäßen wichtig. Eine Endotheldysfunktion ist mit der Entstehung von pathologischen Gefäßveränderungen und vaskulären Komplikationen assoziiert. Sie kann durch ein Ungleichgewicht zwischen dem vasoprotektiven Stickstoffmonoxid (NO) und reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) entstehen. Ein Anstieg von ROS führt zur Oxidation von NO, wodurch zum einen dessen Bioverfügbarkeit gesenkt wird und zum anderen das zytotoxische Peroxynitrit (ONOO<sup>-</sup>) entsteht, welches zur Oxidation von Lipiden und anderen Makromolekülen führen kann, die zu Gefäßveränderungen beitragen. Des Weiteren führt

ONOO<sup>-</sup> zu einer Entkopplung der endothelialen NO-Synthase (eNOS) und zur verringerten NO-Produktion.

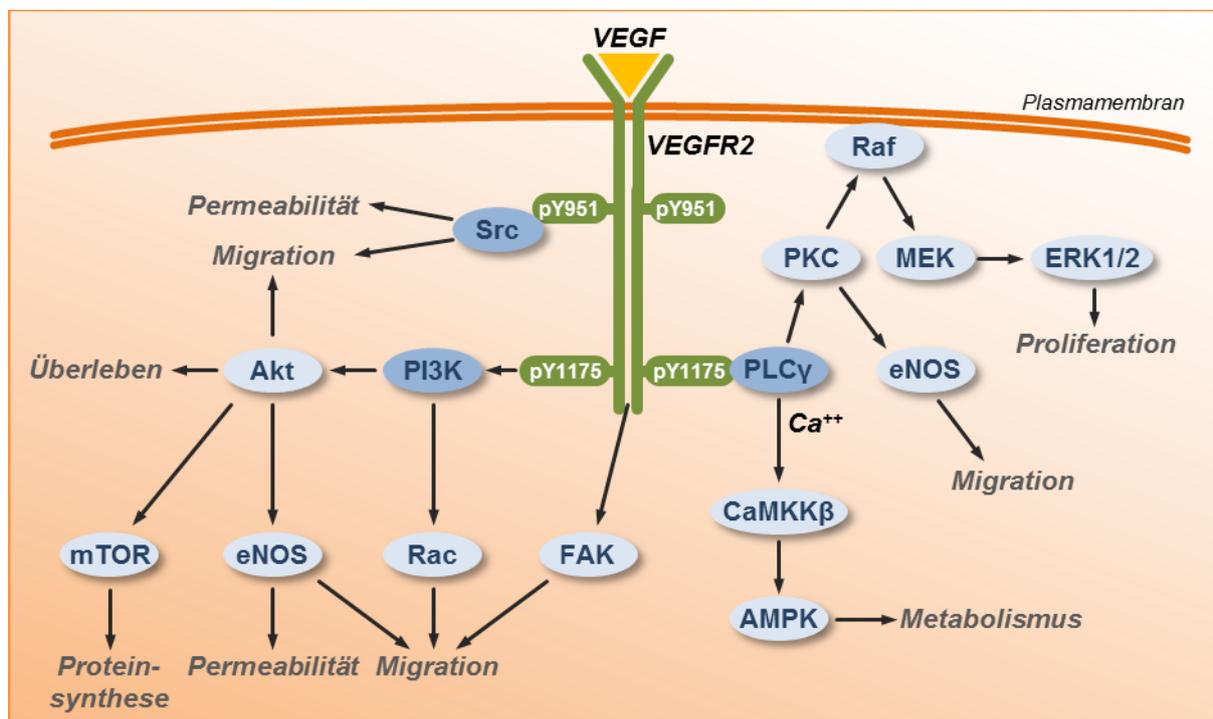
Endothelzellen gewinnen ihre Energie vorrangig durch aerobe Glykolyse, in deren Folge Laktat entsteht und abgegeben wird [2]. Dagegen erfolgt nur ein geringer Teil der Energiegewinnung über oxidative Stoffwechselwege. So kann ein großer Teil des aufgenommenen Sauerstoffs in das subendotheliale Gewebe diffundieren [3]. Durch den geringen Flux durch die Atmungskette entstehen relativ wenig mitochondriale ROS. ROS können auch durch NADPH-Oxidasen (NOX) produziert werden. NOX gelten als Hauptquelle für ROS nach Scherstress, wodurch es zur Bildung von Superoxid (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) und Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) kommt [4]. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> wird auch durch Leukozyten und andere Zellen gebildet und kann Endothelzellen schädigen. Ein Anstieg von ROS-Spiegeln kann zu einer Aktivierung des Endothels führen, was mit einer erhöhten Expression von Adhäsionsmolekülen und gesteigerter Gefäßpermeabilität verbunden ist [5]. Endothelzellen können ebenfalls durch inflammatorische Stimuli (Zytokine, Pathogene) während akuter und chronischer Entzündungsprozesse aktiviert werden, zum Beispiel nach einer Infektion oder bei Adipositas. Um all diesen Stressfaktoren zu entgehen und eine unkontrollierte Aktivierung des Endothels und die Ausbildung einer Endotheldysfunktion zu verhindern, sind Schutzmechanismen nötig. So verfügen Endothelzellen über antioxidative Enzyme wie zum Beispiel Katalase, Thioredoxin (TRX) und Peroxiredoxin (PRX) [6]. Daneben ist das Glutathionsystem ein wichtiger Schutzmechanismus, um oxidativen Stress zu reduzieren.

### 1.1.2 VEGF und Angiogenese

Neben der Aufrechterhaltung der Gefäßhomöostase sind Endothelzellen für die Neubildung von Gefäßen (Angiogenese) von essentieller Bedeutung. Angiogenese spielt bei physiologischen Vorgängen wie Organogenese und Wachstum und bei Regenerationsprozessen (Infarkte, Wundheilung) eine wichtige Rolle. Sie ist jedoch auch bei pathophysiologischen Prozessen wie rheumatoider Arthritis und Tumorwachstum beteiligt [7].

Endothelzellen können durch Wachstumsfaktoren, welche normalerweise unter hypoxischen Bedingungen freigesetzt werden, zur Angiogenese stimuliert werden. Der wichtigste angiogene Wachstumsfaktor für Endothelzellen ist der *vascular endothelial growth factor* (VEGF). VEGF kann von benachbarten Zellen, zum Beispiel von Tumorzellen und Endothelzellen selbst gebildet werden. Zu den angiogenen Prozessen, die durch VEGF vermittelt werden, zählen unter anderem Proliferation, Migration, Erhöhung der Permeabilität und die Sicherung des Überlebens von Endothelzellen (Abbildung 1). Diese Funktionen werden durch verschiedene Signalkaskaden vermittelt, die durch die Bindung von VEGF an

dessen Rezeptoren VEGFR1\*, VEGFR2 und VEGFR3 aktiviert werden. Dabei handelt es sich um Rezeptoren mit Tyrosinkinaseaktivität. Der wichtigste Rezeptor ist der VEGFR2. Nach Bindung von VEGF kommt es zur Dimerisierung und Autophosphorylierung dieses Rezeptors. Die Phosphorylierung am Tyrosinrest 1175 (Y1175) vermittelt dabei die Aktivierung der PI3K, wodurch der Akt/mTOR-Signalweg sowie eNOS und Rac aktiviert werden. Die Stimulierung dieser Signalproteine führt zu einer Steigerung der Permeabilität, der Proteinsynthese und des Überlebens der Zellen und initiiert Migration. Daneben führt die Aktivierung der PLC $\gamma$  und der nachgeschalteten Signalwege, zum Beispiel der Raf/MEK/ERK1/2-Signalkaskade, der eNOS und der AMPK, zu Proliferation, Migration bzw. Regulierung des Metabolismus. Die Phosphorylierung des VEGFR an Y951 induziert die Src-vermittelte Permeabilität und Migration. Der Anstieg der genannten zellulären Prozesse ist für die Vermittlung der Angiogenese essentiell.



**Abbildung 1. VEGF-Signalwege.**

Über die Aktivierung verschiedener Signalwege stimuliert VEGF wichtige angiogene Prozesse wie Proliferation, Migration und Überleben. Für nähere Informationen siehe Text. (adaptiert nach Olsson, 2006 [8])

AMPK: 5'AMP-aktivierte Proteinkinase, Akt: Proteinkinase B, CaMKK $\beta$ : Calcium/Calmoduin-abhängige Proteinkinase-Kinase  $\beta$ , ERK1/2: *extracellular signal-regulated kinase 1/2*, eNOS: endotheliale NO-Synthase, FAK: *focal adhesion kinase*, MEK: MAPK/ERK1/2-Kinase, mTOR: *mechanistic target of rapamycin*, PI3K: Phosphoinositid-3-Kinase, PKC: Proteinkinase C, PLC $\gamma$ : Phospholipase C $\gamma$ , Rac: *ras-related C3 botulinum toxin substrate*, Raf: *rapidly accelerated fibrosarcoma*, Src: *sarcom-family kinase*, VEGF: *vascular endothelial growth factor*, VEGFR2: VEGFR-Rezeptor 2

\* Um die Lesbarkeit des Textes zu erleichtern, werden die Abkürzungen der beteiligten Proteine hier nicht erläutert. Die Abkürzungen stehen für: VEGFR1/2/3: VEGF-Rezeptor 1/2/3, PI3K: Phosphoinositid-3-Kinase, Akt: Proteinkinase B (PKB), Rac: *ras-related C3 botulinum toxin substrate*, PLC $\gamma$ : Phospholipase C $\gamma$ , Raf: *rapidly accelerated fibrosarcoma*, MEK: MAPK/ERK1/2-Kinase, ERK1/2: *extracellular signal-regulated kinase 1/2*, Src: *sarcom-family kinase*

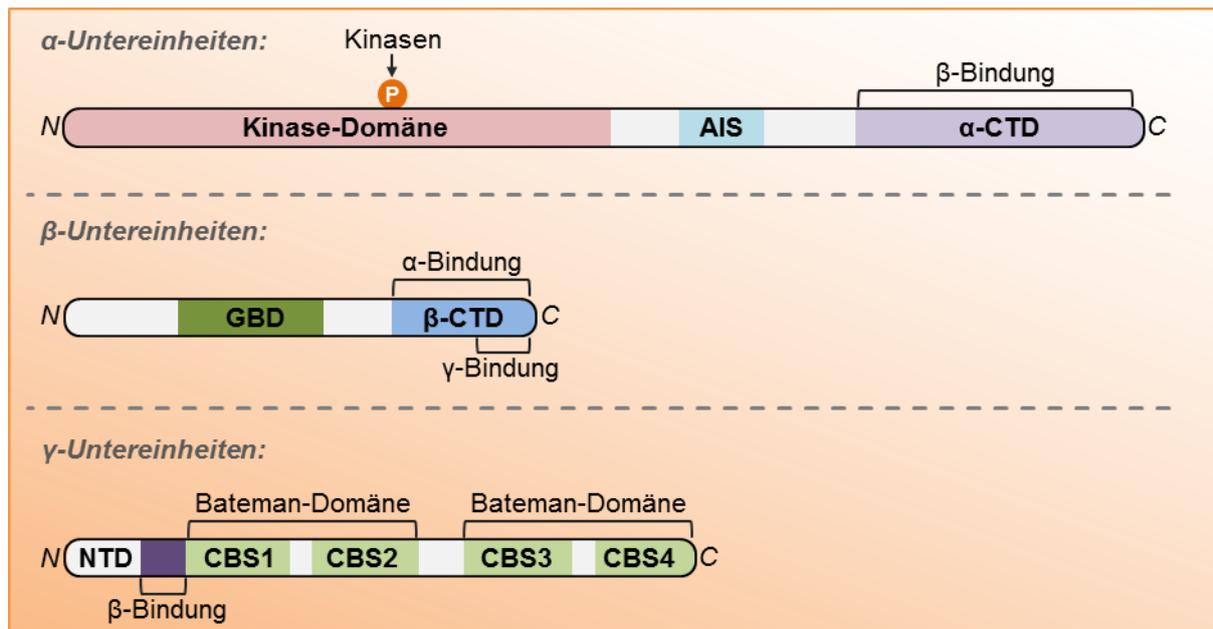
Während der Angiogenese werden durch die lokale Verteilung und Konzentration von VEGF bestimmte Endothelzellen, die sogenannten *tip*-Zellen aktiviert. Diese Zellen sind durch einen starken migratorischen Phänotyp gekennzeichnet, um die Gefäßneubildung zu initiieren. Gleichzeitig bilden diese Zellen *delta-like ligand 4* (DLL4), wodurch es zur Aktivierung des Notch-Signalweges in den umliegenden *stalk*-Zellen kommt. Dies führt zu einer verminderten VEGFR2-Expression in diesen Zellen, sodass diese nicht migrieren. Der Notch-Signalweg ist für eine kontrollierte Kapillarbildung und Angiogenese von großer Bedeutung.

## 1.2 AMPK

Die 5'AMP-aktivierte Proteinkinase (AMPK) ist eine Serin/Threonin-Proteinkinase, die eine wichtige Rolle bei der Regulierung von Metabolismus und Stressadaptation spielt. Sie wird ubiquitär exprimiert, wobei unterschiedliche Zelltypen und Gewebe eine differentielle Expression verschiedener Isoformen aufweisen [9].

### 1.2.1 Aufbau

Die AMPK besteht aus 3 Untereinheiten: einer katalytischen  $\alpha$ -Untereinheit und den beiden regulatorischen Untereinheiten  $\beta$  und  $\gamma$  [10]. Die beiden Isoformen der katalytischen Untereinheit  $\alpha 1$  und  $\alpha 2$  sind strukturell sehr ähnlich und bestehen aus einer N-terminalen Kinasedomäne, in deren Aktivierungsschleife sich ein konservierter Threoninrest (T172) befindet (Abbildung 2). Die Phosphorylierung dieses Threoninrestes ist für eine volle Aktivierung der AMPK essentiell [11]. C-terminal der Kinasedomäne schließt sich eine autoinhibitorische Sequenz (AIS) an. Am C-Terminus befindet sich eine Domäne, die für die Bindung an die  $\beta$ -Untereinheit wichtig ist. Die Untereinheiten  $\beta 1$  und  $\beta 2$  stellen *scaffold*-Proteine dar, welche Bindedomänen für die  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Untereinheiten aufweisen und daher die Komplexierung aller 3 Untereinheiten bewirken. Die 3 Isoformen der  $\gamma$ -Untereinheit unterscheiden sich strukturell in ihrem N-Terminus. Die Funktion der unterschiedlich langen N-Termini ist noch nicht geklärt. Alle  $\gamma$ -Untereinheiten bestehen aus 4 Cystathionin- $\beta$ -Synthase-Motiven (CBS1-4). Diese bilden paarweise jeweils eine Bateman-Domäne. Jede Bateman-Domäne kann ein Molekül AMP oder ATP binden, was für die allosterische Aktivierung der AMPK von Bedeutung ist. Die N-terminale Bateman-Domäne enthält zusätzlich eine Pseudosubstratsequenz, die der Konsensussequenz von AMPK-Substraten entspricht, jedoch kein phosphorylierbares Serin oder Threonin enthält. Unter basalen Bedingungen bindet diese Pseudosubstratsequenz der N-terminalen Bateman-Domäne an die Substrattasche der Kinase-Domäne in der  $\alpha$ -Untereinheit, wodurch die Aktivierung des Enzyms unterdrückt wird.



**Abbildung 2. Aufbau der AMPK.**

Die katalytische α-Untereinheit besteht aus einer Kinase-Domäne mit den konservierten Threoninrest T172 (P), einer AIS und einer Bindedomäne für die β-Untereinheit. Die β-Untereinheit bildet ein *Scaffold*-Protein und bewirkt die Komplexierung der AMPK. Die Bateman-Domänen der γ-Untereinheit sind für die AMP/ATP-Bindung und damit für die allosterische Aktivierung der AMPK wichtig. Für die verschiedenen AMPK-Untereinheiten ist jeweils nur eine repräsentative Struktur dargestellt, da sich deren jeweilige Isoformen stark ähneln. (adaptiert nach Hardie, 2007 [12])

AIS: autoinhibitorische Sequenz, CBS: Cystathionin-β-Synthase-Motiv, CTD: C-terminale Domäne, GBD: Glykogenbindedomäne, NTD: N-terminale Domäne

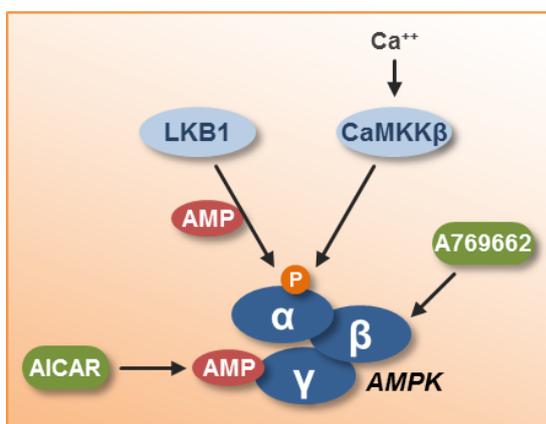
### 1.2.2 Regulierung

Die Aktivität der AMPK kann über verschiedene Wege reguliert werden (Abbildung 3). Zum einen führt die Bindung von AMP, welches zum Beispiel durch metabolischen Stress erhöht wird, an die Bateman-Domänen der γ-Untereinheit zu einer allosterischen Aktivierung des Enzyms. Dabei kommt es zur Loslösung der Pseudosubstratsequenz von der Kinase-Domäne [13]. Die Aktivität der AMPK wird dadurch etwa zehnfach erhöht [14]. Neben AMP kann auch ATP in einem kompetitiven Mechanismus an die γ-Untereinheit binden, wobei die Bindungsaffinität von AMP an die Bateman-Domäne jedoch fünffach höher ist als die von ATP [15]. Die Aktivität der AMPK wird somit über das Verhältnis von AMP- und ATP-Konzentration reguliert, welches eine Energiemangelsituation empfindlicher widerspiegelt als der alleinige Anstieg des AMP-Spiegels. Die AMPK stellt damit einen sehr empfindlichen Sensor für das Energiegleichgewicht der Zelle dar.

Zusätzlich zur allosterischen Aktivierung bewirkt die Bindung von AMP an die AMPK eine Phosphorylierung am konservierten Threoninrest 172 in der Kinasedomäne des Enzyms. Die Phosphorylierung dieses Restes ist für eine volle Aktivierung der Kinase essentiell [11]. Unter basalen Bedingungen wird T172 kontinuierlich durch die konstitutiv aktive *liver kinase B1* (LKB1) phosphoryliert. Gleichzeitig kommt es jedoch zu einer Dephosphorylierung dieses Restes durch Phosphatasen wie Proteinphosphatase 2Ca (PP2Ca) [16]. Die daraus

resultierende Netto-Phosphorylierung und AMPK-Aktivität sind daher unter basalen Bedingungen nur gering. Bei einem Anstieg des AMP:ATP-Verhältnisses bewirkt die Bindung von AMP, dass die AMPK zu einem schlechteren Substrat für ihre Phosphatasen wird, woraufhin die Dephosphorylierung abnimmt und die Phosphorylierung an T172 und damit die Aktivität der AMPK ansteigt [16]. Die Aktivierung der AMPK durch diese Phosphorylierung ist um den Faktor 10 höher als durch die reine allosterische Wirkung von AMP. Die Kombination beider Wege kann zu einem 1000-fachen Anstieg der AMPK-Aktivität führen [14]. Dabei reagiert die AMPK $\alpha$ 2-Isoform stärker auf Veränderungen der AMP-Spiegel als AMPK $\alpha$ 1 und wird dadurch hauptsächlich über den AMP/LKB1-Weg aktiviert [17, 18].

Neben den beschriebenen AMP-abhängigen Wegen der AMPK-Aktivierung ist auch eine Calcium-vermittelte Aktivierung beschrieben, die besonders für die Isoform AMPK $\alpha$ 1 von Bedeutung zu sein scheint [19]. Verschiedene Stimuli, die zu einem Rezeptor-gekoppelten Anstieg von intrazellulären Calciumspiegeln führen, wie zum Beispiel Thrombin (G-Protein-gekoppelter Rezeptor) oder VEGF (Rezeptortyrosinkinase) können auf diesem Weg eine Aktivierung der AMPK bewirken [20, 21]. Die Bindung von Liganden an die genannten Rezeptortypen führt zur Aktivierung der Phospholipase C $\beta$  bzw. C $\gamma$  (PLC $\beta/\gamma$ ). PLC spaltet das Membranphospholipid Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat in Inositoltriphosphat (IP $_3$ ) und Diacylglycerol (DAG), die als *second messenger* fungieren und zu einer Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern führen. Calcium bildet einen Komplex mit Calmodulin und stimuliert die Calcium/Calmodulin-abhängige Proteinkinase-Kinase  $\beta$  (CaMKK $\beta$ ), die daraufhin AMPK an T172 phosphoryliert und aktiviert. Dieser Weg ist jedoch nur in Zelltypen möglich, die CaMKK $\beta$  exprimieren, wie zum Beispiel in Endothelzellen, während die AMPK-Kinase LKB1 ubiquitär exprimiert wird [22].



**Abbildung 3. Regulierung der AMPK.**

AMPK kann durch Bindung von AMP an die  $\gamma$ -Untereinheit allosterisch aktiviert werden. Volle Aktivierung des Enzyms durch Phosphorylierung an T172 wird durch LKB1 in einem AMP-abhängigen Weg oder CaMKK $\beta$  in einem Calcium-abhängigen Weg vermittelt. Die pharmakologischen Aktivatoren AICAR und A769662 führen zur allosterischen Aktivierung der AMPK und unterstützen die Phosphorylierung durch LKB1.

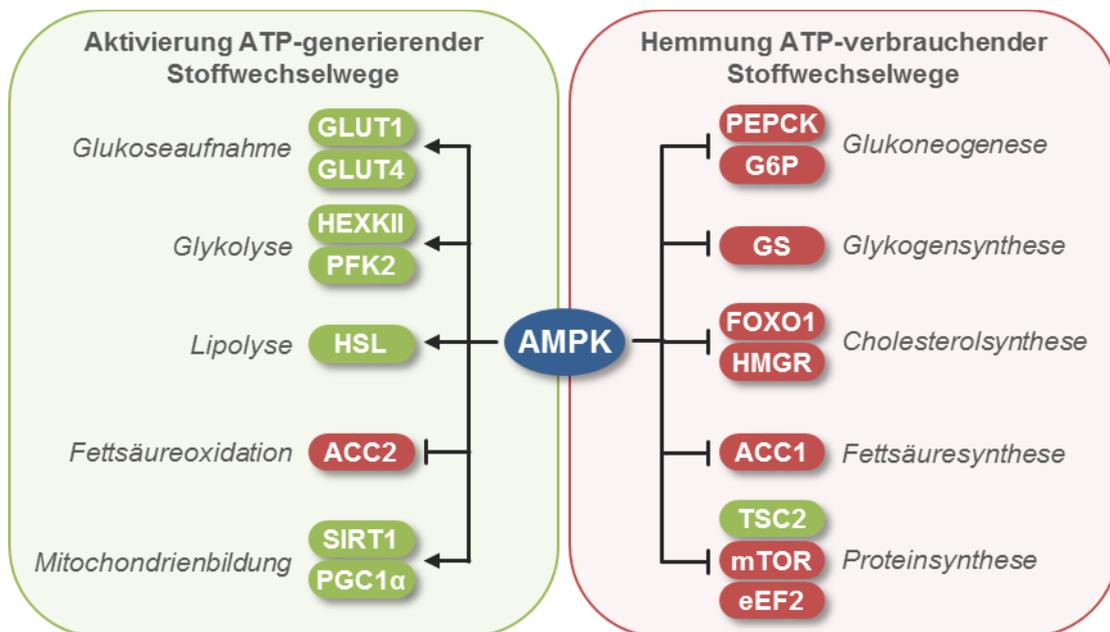
AICAR: 5-Aminoimidazol-4-Carboxamid-Ribonukleotid, AMPK: 5'AMP-aktivierte Proteinkinase, CaMKK $\beta$ : Calcium/Calmodulin-abhängige Proteinkinase-Kinase  $\beta$ , LKB1: *liver kinase B1*

Experimentell kann die AMPK durch pharmakologische Aktivatoren stimuliert werden. Die bekanntesten und spezifischsten dieser Aktivatoren sind 5-Aminoimidazol-4-Carboxamid-Ribonukleotid (AICAR) und A769662 (Abbildung 3), die auch in der vorliegenden Arbeit eingesetzt wurden. Nach Aufnahme von AICAR in die Zelle wird es durch die

Adenosinkinase phosphoryliert. Das entstandene ZMP ist ein AMP-Analogon und kann daraufhin die AMPK in einem AMP-abhängigen Weg aktivieren [23]. A769662 hingegen bindet an die  $\beta$ -Untereinheit der AMPK. Dies führt zur allosterischen Aktivierung des Enzyms, welche durch Verhinderung der Dephosphorylierung des aktivierenden T172-Restes zusätzlich unterstützt werden kann [24, 25].

### 1.2.3 Funktion

Die AMPK ist im Allgemeinen als Energiesensor bekannt, der für die Aufrechterhaltung der intrazellulären Energiehomöostase von Bedeutung ist. Unter dem Einfluss von metabolischem Stress werden durch AMPK energieverbrauchende Stoffwechselwege inhibiert und gleichzeitig ATP-generierende Prozesse aktiviert, um die Energiebalance der Zelle aufrecht zu erhalten (Abbildung 4).



**Abbildung 4. Regulierung des Metabolismus durch AMPK.**

Über die Regulierung verschiedener Zielproteine stimuliert AMPK ATP-generierende Stoffwechselwege während Energie-verbrauchende Prozesse gehemmt werden.

ACC1/2: Acetyl-Coenzym A-Carboxylase 1/2, eEF2: eukaryotischer Translations-Elongationsfaktor 2, FOXO1: *forkhead box protein O1*, G6P: Glukose-6-Phosphatase, GLUT1/4: Glukosetransporter 1/4, GS: Glykogensynthese, HEXKII: Hexokinase II, HMGR: 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym A-Reduktase, HSL: hormonsensitive Lipase, mTOR: *mechanistic target of rapamycin*, PEPCK: Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase, PFK2: 6-Phosphofrukto-2-Kinase, PGC1 $\alpha$ : *peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 $\alpha$* , SIRT1: Sirtuin 1, TSC2: *tuberous sclerosis complex 2*

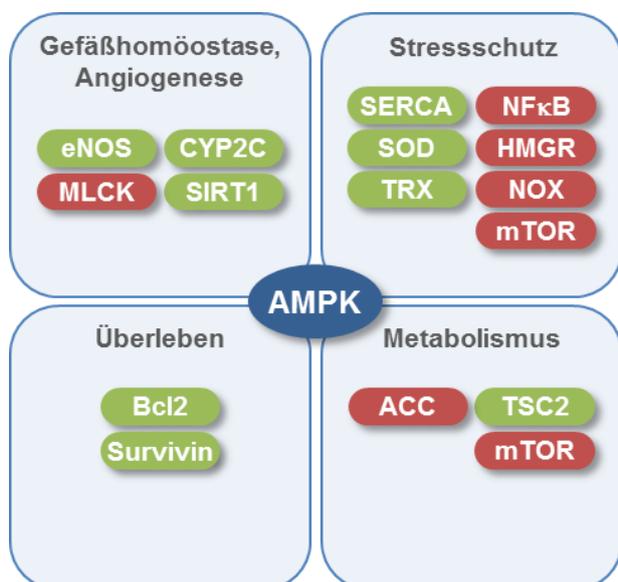
AMPK beeinflusst dabei sowohl die Aktivität von metabolischen Enzymen als auch deren Expression durch Phosphorylierung der entsprechenden Transkriptionsfaktoren. AMPK reguliert den Glukosestoffwechsel durch Stimulierung der Translokation der Glukosetransporter GLUT1 [26] und GLUT4 [27] und durch Erhöhung der Glykolyse über einen Anstieg der Hexokinase II (HEXKII)-Expression [28] und 6-Phosphofrukto-2-Kinase (PFK2)-Aktivität [29]. Parallel dazu werden die Glukoneogenese und Glykogensynthese über

die Regulierung der Expression von Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (PEPCK) und Glukose-6-Phosphatase (G6P) [30] bzw. der Phosphorylierung der Glykogensynthase (GS) [31] unterdrückt. Auch der Lipidstoffwechsel wird durch AMPK auf verschiedenen Ebenen reguliert. Während die Lipolyse und die Fettsäureoxidation durch Aktivierung der hormonsensitiven Lipase (HSL) [32] bzw. Hemmung der Acetyl-Coenzym A-Carboxylase 2 (ACC2) stimuliert werden, führt die Hemmung der ACC1 zu einer Inhibierung der Fettsäuresynthese [33]. Auch die 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym A-Reduktase (HMGR), das Schlüsselenzym der Cholesterolsynthese, wird durch AMPK negativ reguliert [34]. Weiterhin induziert AMPK die Mitochondrienbildung durch Aktivierung von *peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1α* (PGC1α), um die Energiegewinnung durch oxidative Stoffwechselwege zu fördern. Dies geschieht durch direkte Phosphorylierung von PGC1α und/oder durch Aktivierung von Sirtuin 1 (SIRT1) und SIRT1-vermittelte Deacetylierung von PGC1α [35]. Die Aktivierung von *tuberous sclerosis complex 2* (TSC2) [36] und die Hemmung von *mechanistic target of rapamycin* (mTOR) [37] und eukaryotischem Translations-Elongationsfaktor 2 (eEF2) [38] durch AMPK führen zu einer Hemmung der Proteinsynthese.

Über ihre zellulären Effekte hinaus ist die AMPK auch für die Regulierung des Energiehaushaltes des gesamten Organismus wichtig. Dabei wird die Nahrungsaufnahme über die hypothalamische AMPK reguliert [39]. Aufgrund der metabolischen Eigenschaften der AMPK, die zur Senkung der Blutspiegel von Glukose, Fettsäuren und Triglyceriden führen, wird ihr eine protektive Funktion bei der Entstehung des metabolischen Syndroms zugeschrieben [30, 40-42].

Die beiden Isoformen der katalytischen AMPK-Untereinheit  $\alpha 1$  und  $\alpha 2$  scheinen verschiedene Funktionen zu erfüllen. Dies ergibt sich unter anderem aus dem Phänotyp von AMPK-Knockout-Mäusen. AMPK $\alpha 2^{-/-}$ -Mäuse weisen einen metabolischen Phänotyp auf, der durch eine leichte Insulin-Resistenz und eine gestörte Glukosetoleranz gekennzeichnet ist [43]. Des Weiteren ist AMPK $\alpha 2$  die dominierende Isoform in metabolisch aktiven Geweben wie Skelettmuskel [44] und Herzmuskel [45] und wird vorwiegend über den AMP-abhängigen Weg aktiviert. Dies spricht für eine wichtige Rolle der AMPK $\alpha 2$  bei der Regulierung des Metabolismus. Dagegen zeigen AMPK $\alpha 1^{-/-}$ -Mäuse keinen metabolischen Phänotyp, sondern Defekte bei der VEGF-induzierten Angiogenese [21, 43]. AMPK $\alpha 1$  wird vorwiegend über den Calcium-abhängigen Weg stimuliert und ist Bestandteil von Wachstumsfaktor-Signalwegen, die für angiogene Prozesse von Bedeutung sind. AMPK $\alpha 1$  ist in Endothelzellen die dominierende Isoform und scheint hier vor allem für den Schutz vor intrazellulärem Stress und für die Aufrechterhaltung der Endothelzellfunktion von Bedeutung zu sein (Abbildung 5). Um vaskuläre Homöostase und Angiogenese sicher zu stellen, kann AMPK verschiedene Zielproteine wie eNOS [46] und Cytochrom P450 2C (CYP2C) [47] aktivieren. Außerdem

vermittelt sie eine Hemmung der *myosin light chain kinase* (MLCK), was Veränderungen des Zytoskeletts bewirkt, die sowohl für Angiogenese als auch für Vasodilatation wichtig sind [48]. Die Aktivierung von SIRT1 durch AMPK trägt ebenfalls zur Aufrechterhaltung der Gefäßhomöostase bei [49]. AMPK sichert darüber hinaus das Überleben der Endothelzellen, indem sie die Expression antiapoptotischer Proteine wie *B-cell lymphoma 2* (Bcl2) und Survivin [50] steigert. Auch intrazellulärer Stress wird durch AMPK unterdrückt. So kann sie inflammatorischen Stress durch Hemmung des *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells* (NFκB)-Signalweges reduzieren [50] und Stress, der vom endoplasmatischen Retikulum durch fehlerhaft gefaltete Proteine ausgeht, unterdrücken. Letzteres geschieht durch eine AMPK-abhängige Aktivierung der Calciumpumpe *Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase* (SERCA), wodurch intraluminale Calciumspiegel des endoplasmatischen Retikulums gewährleistet werden, die für die richtige Faltung und Prozessierung von Proteinen wichtig sind [51]. AMPK verringert außerdem die Bildung von ROS, indem sie NOX negativ reguliert [52] und die HMGR hemmt [19]. Gleichzeitig kann die AMPK durch Aktivierung von Komponenten des antioxidativen Systems wie Superoxiddismutase (SOD) [53] und TRX [54] ROS-Spiegel in der Zelle reduzieren und damit den oxidativen Stress senken. Ein weiterer Mechanismus oxidativen, aber auch anderen zellulären Stress zu reduzieren, ist die Aktivierung der Autophagie [55, 56], wodurch dysfunktionale Proteine und Organellen abgebaut werden. AMPK stimuliert diesen Prozess durch Hemmung von mTOR, einem negativen Regulator der Autophagie. Neben der primären Rolle der AMPK als Schutzfaktor in Endothelzellen, reguliert AMPK auch den Metabolismus dieser Zellen durch Hemmung von ACC [57] und mTOR. Inwieweit die Kontrolle des Energiestoffwechsels auch in Endothelzellen die Hauptfunktion der AMPK darstellt, ist jedoch noch umstritten [19].



**Abbildung 5. Funktion der AMPK in Endothelzellen.**

Die endotheliale AMPK vermittelt über die Regulierung verschiedener Zielproteine (grün: aktivierend, rot: inhibierend) wichtige Zellfunktionen wie Angiogenese und Überleben, reguliert den Metabolismus und kann vor verschiedenen Stressfaktoren schützen. Für nähere Informationen siehe Text.

ACC: Acetyl-Coenzym A-Carboxylase, AMPK: 5'AMP-aktivierte Proteinkinase, Bcl2: *B-cell lymphoma 2*, CYP2C: Cytochrom P450 2C, eNOS: endotheliale NO-Synthase, HMGR: 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym A-Reduktase, MLCK: *myosin light chain kinase*, mTOR: *mechanistic target of rapamycin*, NFκB: *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*, NOX: NADPH-Oxidase, SIRT1: Sirtuin1, SERCA: *sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase*, SOD: Superoxiddismutase, TRX: Thioredoxin, TSC2: *tuberous sclerosis complex 2*

### 1.3 Autophagie

Bei der Autophagie handelt es sich um einen evolutionär konservierten lysosomalen Abbauprozess, der für die Aufrechterhaltung der intrazellulären Homöostase von großer Bedeutung ist. Unter Stressbedingungen werden durch Autophagie selektiv oder nicht-selektiv Teile des Zytoplasmas dem lysosomalen Abbau zugeführt.

#### 1.3.1 Mechanismus

Man unterscheidet 3 Arten der Autophagie: (i) die Makroautophagie, die die Bildung von sogenannten Autophagosomen beinhaltet, (ii) die Mikroautophagie, bei der Komponenten des Zytoplasmas durch Ein- oder Ausstülpungen der Lysosomenmembran direkt aufgenommen werden und (iii) die Chaperon-vermittelte Autophagie (*chaperone-mediated autophagy*, CMA), bei der ausschließlich Proteine mit einer spezifischen Konsensussequenz (KFERQ) erkannt werden und mit Hilfe von Chaperonen in das Lysosom aufgenommen und dort abgebaut werden [58]. Dagegen können durch Makro- und Mikroautophagie neben Proteinen auch größere Strukturen, wie Proteinaggregate oder Zellorganellen, abgebaut werden. Die am besten untersuchte Form ist die Makroautophagie, die im Allgemeinen und in der vorliegenden Arbeit als Autophagie bezeichnet wird.

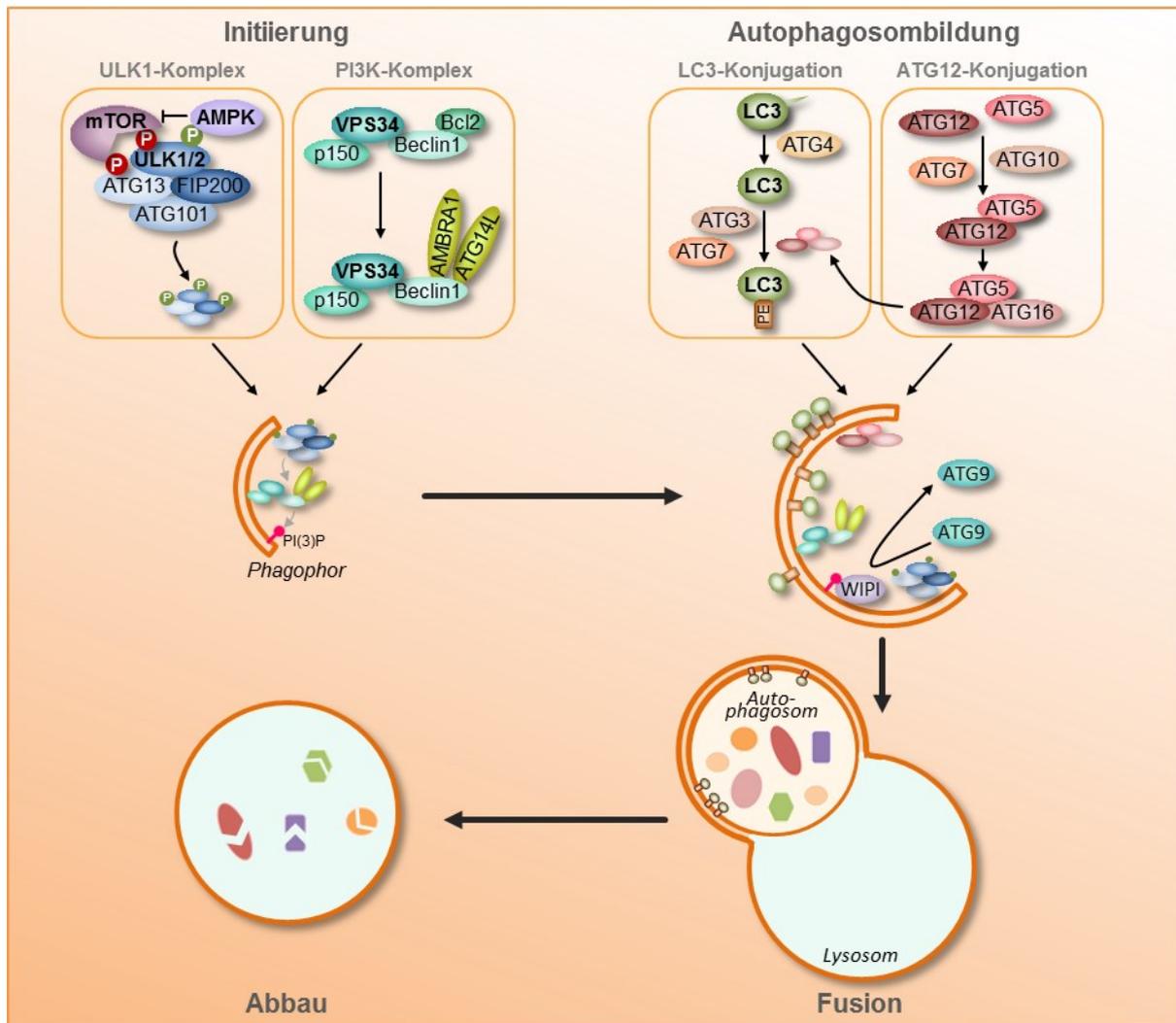
Bei der Autophagie kommt es nach Einwirkung von Stress, wie zum Beispiel Nährstoffentzug, zunächst zur Bildung von Omegasomen. Dies sind  $\Omega$ -förmige Ausstülpungen des endoplasmatischen Retikulums, die als Basis für die Bildung des Phagophors dienen. Das Phagophor besteht aus einem kurzen Stück Doppelmembran, welches im weiteren Verlauf der Autophagie um das abzubauen Material herum verlängert wird. Neben der Bildung von Omegasomen wird auch beschrieben, dass sich Phagophore an anderen Orten in der Zelle bilden können. Als Quelle der Doppelmembran werden das endoplasmatische Retikulum [59, 60], der Golgi-Apparat [61, 62], Mitochondrien [63] und die Plasmamembran [64] diskutiert. An den Phagophoren sind wichtige Regulatorproteine und Proteinkomplexe lokalisiert, die für die Initiierung und den weiteren Verlauf wichtig sind (Abbildung 6). Darüber hinaus wird die Verlängerung des Phagophors durch Anlagerung von oder Fusion mit anderen Membranen reguliert, wodurch sich die Doppelmembran letztendlich um einen Teil des Zytoplasmas schließt und ein Autophagosom bildet. Die Autophagosomen fusionieren zunächst mit Endosomen und bilden ein sogenanntes Amphisom [65]. Die Bedeutung dieses Vorgangs ist noch nicht gänzlich geklärt. Es wird jedoch vermutet, dass dies wichtig ist, um die Autophagosomen mit Komponenten zu versorgen, die für die spätere Fusion mit dem Lysosom wichtig sind. Bei der nachfolgenden Fusion des Amphisoms mit dem Lysosom verschmilzt die äußere Membran des Amphisoms mit der Lysosomenmembran. Die innere Membran inklusive des Inhaltes wird in das Lysosom abgegeben und dort durch lysosomale Enzyme abgebaut. Die entstehenden

Abbauprodukte wie Aminosäuren, Lipide, Nukleoside und Kohlenhydrate werden durch Membranpermeasen in das Zytoplasma abgegeben und stehen dort wieder als Ausgangsstoffe verschiedener zellulärer Prozesse zur Verfügung [66].

### 1.3.2 Regulierung

Die Regulierung der Autophagie ist sehr komplex und involviert viele Proteine und Proteinkomplexe. Obwohl dieser Prozess in Hefe bereits gut untersucht ist und die meisten beteiligten Proteine Homologe in Säugerzellen aufweisen, ist die Regulierung der Autophagie und die Funktionen und Interaktionen einiger dieser Proteine in Säuger- bzw. menschlichen Zellen noch nicht vollständig aufgeklärt. Es gilt jedoch als gesichert, dass bei diesem Prozess fünf wesentliche Komplexe bzw. Systeme beteiligt sind: der *uncoordinated 51-like kinase* (ULK)-Komplex, der PI3K-Komplex, zwei Ubiquitin-ähnliche Konjugationssysteme und das *autophagy-related protein 9* (ATG9)-Transportsystem (Abbildung 6).

Der ULK-Komplex ist ein wichtiger Initiator-Komplex der Autophagie. Er besteht aus den Kinasen ULK1 oder ULK2, den Adapterproteinen ATG12 und *200 kDa focal adhesion kinase family-interacting protein* (FIP200) sowie ATG101 als Stabilisator des Komplexes [67]. Die Aktivität des ULK-Komplexes wird im Wesentlichen durch mTOR, einem Nährstoffsensoren, und AMPK, einem Energiesensoren, reguliert. Unter basalen, nährstoffreichen Bedingungen ist mTOR aktiv und hemmt die Aktivität von ULK1 und ULK2 durch inhibitorische Phosphorylierungen an ULK1/2 selbst und an dessen Komplexpartner ATG13 [68, 69]. Durch Nährstoff- und/oder Energiemangel kommt es zum einen zur Inhibierung von mTOR, wodurch die Hemmung von ULK1/2 aufgehoben wird. Zum anderen wird AMPK aktiviert, was mit einer Stimulierung des ULK-Komplexes einhergeht. AMPK wirkt dabei über zwei Wege. Zum einen wird ULK1/2 durch AMPK an aktivierenden Resten phosphoryliert, zum anderen kann AMPK die Aktivität von mTOR zusätzlich unterdrücken. Die Beteiligung bestimmter AMPK-Isoformen an diesen Regulierungen ist kaum untersucht. Die Veränderungen des ULK-Phosphorylierungsstatus durch AMPK führen zur Autophosphorylierung von ULK1/2 und zur ULK-vermittelten Phosphorylierung von ATG13 und FIP200, wodurch der ULK1-Komplex aktiviert wird [68, 69]. Der aktive ULK1-Komplex ist am Phagophor lokalisiert und ist für die Initiierung der Autophagie von zentraler Bedeutung [70, 71]. Die genauen Funktionen von ULK1 sind noch nicht vollständig aufgeklärt. Es gibt jedoch Hinweise, dass ULK1 unter anderem zur Phosphorylierung von zwei Komponenten des PI3K-Komplexes, *Bcl2-interacting protein 1* (Beclin1) [72] und *activating molecule in Beclin1-regulated autophagy* (AMBRA1) [73], und damit zu einer Aktivierung der Autophagie führt.



**Abbildung 6. Übersicht über den Ablauf der Autophagie (vereinfacht).**

Bei der Initiierung der Autophagie wird der ULK1-Komplex durch AMPK und die Inhibition von mTOR aktiviert und zum Phagophor transloziert. Weiterhin wird der PI3K-Komplex durch die Bindung von ATG14L und AMBRA1 aktiviert. Der ULK1-Komplex kann diese Aktivierung durch Phosphorylierung von Beclin1 unterstützen. Es kommt zur Bildung von PI(3)P an der Autophagosomenmembran und damit zur Rekrutierung weiterer Autophagieproteine wie WIPI. Sowohl WIPI als auch der ULK1-Komplex sind für den ATG9-vermittelten Transport von Membrankomponenten wichtig. Gleichzeitig kommt es zur Bildung von ATG5-ATG12-ATG16-Komplexen, die am Phagophor lokalisiert sind und zur Konjugation von LC3 beitragen. Nach Verlängerung der Membran und Fertigstellung des Autophagosoms werden die beteiligten Proteine abgespalten und recycelt mit Ausnahme des an der inneren Membran befindlichen LC3, welches nach Fusion mit dem Lysosom zusammen mit dem Inhalt des Autophagosoms abgebaut wird.

AMBRA1: *activating molecule in Beclin1-regulated autophagy*, AMPK: *5'AMP-aktivierte Proteinkinase*, ATG: *autophagy-related*, ATG14L: *ATG14-like*, Bcl2: *B-cell lymphoma 2*, Beclin1: *Bcl2-interacting protein 1*, FIP200: *200 kDa focal adhesion kinase family-interacting protein*, LC3: *microtubule-associated protein light chain 3*, mTOR: *mechanistic target of rapamycin*, P: *Phosphorylierung* (rot – inhibierend, grün – aktivierend), PE: *Phosphatidylethanolamin*, ULK1/2: *uncoordinated 51-like kinase 1/2*, VPS34: *vacuolar protein sorting 34*, WIPI: *WD-repeat protein interacting with phosphoinositides*

Der PI3K-Komplex ist der zweite wichtige Regulator, der für die Initiierung der Autophagie essentiell ist. Der Kernkomplex besteht aus der Klasse III-PI3K *vacuolar protein sorting 34* (VPS34), Beclin1, welches VPS34 durch Bindung aktivieren kann und dem Adapterprotein p150 [74], das myristoyliert ist und dadurch den Komplex am Phagophor verankert [75].

Verschiedene Bindungspartner von Beclin1 können sowohl die Aktivität als auch die Funktion des PI3K-Komplexes regulieren. Als positive Regulatoren gelten *ATG14-like* (ATG14L), *AMBRA1* und *UV-irradiation resistance-associated gene* (UVRAG) [73, 76]. Die Bindung von ATG14L und AMBRA1 oder UVRAG steigert die Aktivität von VPS34 [77, 78] und somit die Produktion von Phosphatidylinositol-3-Phosphat (PI(3)P) am Phagophor, welches zur Rekrutierung zusätzlicher Autophagie-Proteine führt, die für den weiteren Prozess wichtig sind. Weiterhin ist UVRAG für die spätere Reifung der Autophagosomen und Fusion mit Endosomen wichtig [79]. Die wichtigsten negativen Regulatoren sind Bcl2 und *RUN domain Beclin1-interacting and cysteine-rich-containing protein* (Rubicon). Unter basalen Bedingungen bindet Bcl2 an Beclin1, um Autophagie zu unterdrücken [80]. Diese Bindung wird nach Nährstoffentzug gelöst und führt durch Freisetzung von Beclin1 zur Aktivierung der Autophagie. Die Bindung von Rubicon an den Komplex hemmt die Reifung der Autophagosomen [81]. Die Interaktionen der genannten Modulatoren werden durch posttranslationale Modifikationen, unter anderem durch Phosphorylierungen beteiligter Proteine, über verschiedene Signalwege reguliert [82]. Der PI3K-Komplex stellt somit einen Knotenpunkt dar, verschiedene zelluläre Bedingungen zu integrieren und Autophagie entsprechend zu regulieren.

Das produzierte PI(3)P an der Autophagosomenmembran führt zur Rekrutierung von *WD-repeat protein interacting with phosphoinositides* (WIPI). In Hefe ist die Rekrutierung der WIPI-Homologe Atg2 und Atg18 mit einer Translokation von Atg9-positiven Membranstrukturen zum Phagophor assoziiert. Nach Rekrutierung zum Phagophor wird Atg9 wieder freigesetzt und zur Peripherie transloziert. Dieser Vorgang ist von Atg1, dem ULK1-Homolog in Hefe, abhängig [83]. Das Pendeln von Atg9 ist vermutlich wichtig, um Membranbestandteile zum Phagophor zu liefern, die der Verlängerung der Membran dienen. In Säugerzellen wurde der ATG9-Transport ebenfalls beobachtet und eine ULK1-abhängige Freisetzung von ATG9 beschrieben [84]. Es ist jedoch noch nicht geklärt, ob die Rekrutierung von ATG9 zum Phagophor von WIPI abhängig ist. Es konnte dagegen gezeigt werden, dass WIPI2b zur Rekrutierung von ATG12 führt, einem Protein, das bei der Konjugation von *microtubule-associated protein light chain 3B* (LC3B) wichtig ist [85, 86].

Bei Stimulierung der Autophagie werden zwei Ubiquitin-ähnliche Konjugationssysteme aktiv, obwohl die an der Konjugation beteiligten Proteine keine Ähnlichkeit zu Ubiquitin haben. Die Konjugationen werden durch Enzyme mit E1-, E2- und E3-Aktivität vermittelt, ähnlich der Ubiquitinierung von Proteinen. Durch das erste System wird ATG12 kovalent an ATG5 gebunden. Dieser Prozess wird durch ATG7 und ATG10, welche E1- bzw. E2-Aktivität aufweisen, vermittelt [87]. Das ATG12-ATG5-Konjugat bindet anschließend an ATG16, welches für die Lokalisation am Phagophor verantwortlich ist [88]. Gleichzeitig kommt es zur Konjugation der Atg8-Homologe LC3A/LC3B/LC3C, *gamma-aminobutyric acid receptor-*

*associated protein* (GABARAP) und *Golgi-associated ATPase enhancer of 16 kDa* (GATE16). Das bekannteste und am besten untersuchte Atg8-Homolog ist LC3B. Der C-Terminus von proLC3B wird nach seiner Synthese zunächst durch ATG4 abgespalten. Daran erfolgt die Bindung von Phosphatidylethanolamin (PE) in einer ATG7 (E1-Aktivität)- und ATG3 (E2-Aktivität)-abhängigen Reaktion [89]. Der ATG12-ATG5-ATG16-Komplex weist hierbei eine E3-Aktivität auf, um die LC3B-Konjugation zu fördern [90]. Die Konjugation von LC3B spielt sowohl bei der Membranverlängerung als auch bei der Substraterkennung eine wichtige Rolle [91]. LC3B weist zum Beispiel eine Bindungsstelle für das Substratrezeptorprotein p62 auf. p62 kann ubiquitinierte Proteine erkennen, binden, durch gleichzeitige Interaktion mit LC3B zum Ort der Autophagosomenbildung bringen und dadurch ihren spezifischen Abbau gewährleisten.

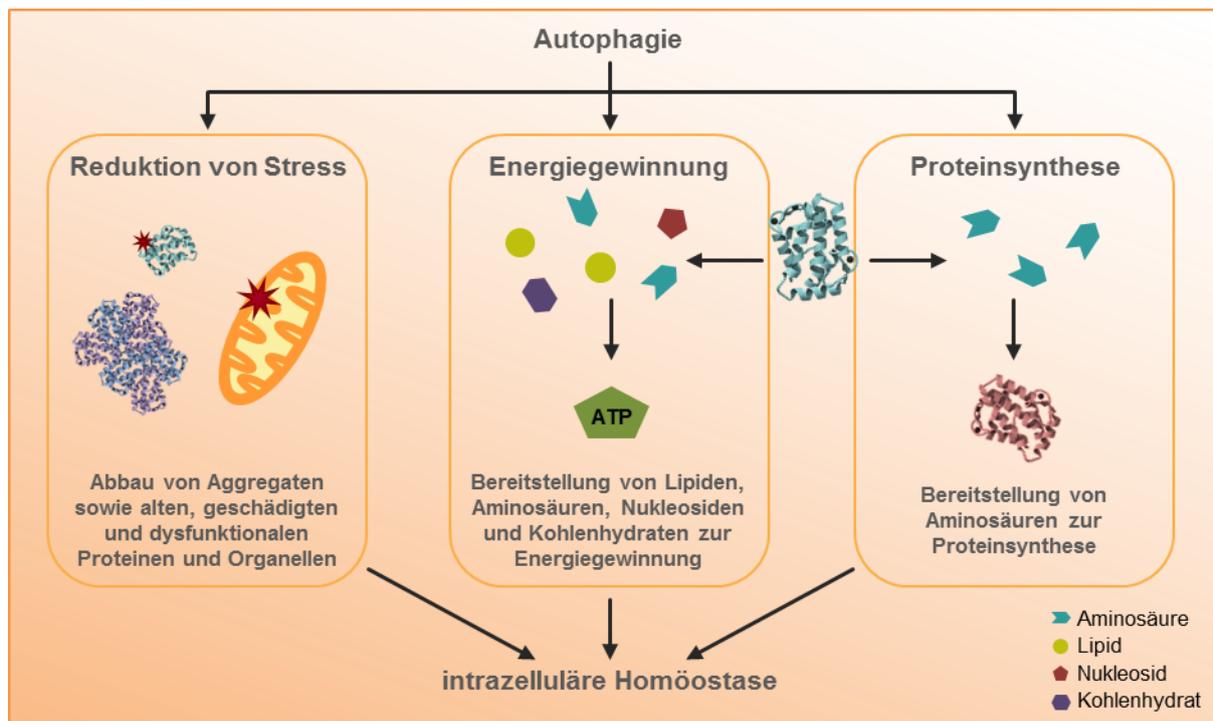
Nach Fertigstellung der Autophagosomen werden die beteiligten Proteine und Komplexe abgespalten und recycelt. Eine Ausnahme bildet dabei das LC3B, das sich an der inneren Autophagosomenmembran befindet. Dieses wird zusammen mit dem Inhalt des Vesikels in das Lysosom abgegeben und dort abgebaut [92].

### 1.3.3 Funktion

Die Autophagie stellt neben dem Proteasom den zweiten wichtigen Abbauprozess in Zellen dar. Während durch das Proteasom vorwiegend kurzlebige Proteine abgebaut werden, stellen langlebige Proteine vor allem ein Substrat für Autophagie dar. Ein weiterer wesentlicher Unterschied zwischen Proteasom und Autophagie besteht in der Größe der Substrate. Anders als beim Proteasom, durch das wegen der zylinderähnlichen Tertiärstruktur nur entfaltete Proteine abgebaut werden können [93], ist die Substratgröße und -struktur bei der Autophagie nicht limitierend. Durch Autophagie können deshalb auch Proteinkomplexe und -aggregate und sogar ganze Organellen umschlossen und abgebaut werden.

Die Hauptfunktion der Autophagie ist die Aufrechterhaltung der intrazellulären Homöostase (Abbildung 7). Unter basalen Bedingungen ist Autophagie wichtig, um geschädigte Proteine und dysfunktionale Organellen abzubauen und zu recyceln. Dies ist besonders in postmitotischen Zellen, wie zum Beispiel Neuronen von großer Bedeutung, da sich hier geschädigte Zellkomponenten anreichern und nicht durch Zellteilung verteilt werden [66]. Eine Aktivierung der Autophagie in Stresssituationen, zum Beispiel bei Nährstoffentzug oder oxidativem Stress, ist wichtig, um geschädigte Proteine und Organellen abzubauen, die unter diesen Bedingungen akkumulieren. Des Weiteren werden in Energiemangel-Situationen nicht-selektiv Teile des Zytoplasmas umschlossen, um durch deren Abbau Substrate zur Energiegewinnung bereitzustellen. Abbauprodukte, wie Nukleoside, Kohlenhydrate, Aminosäuren und Lipide können katabolen Stoffwechselwegen zugeführt werden, um den

erhöhten Energiebedarf in solchen Stresssituationen zu decken [66]. Die entstehenden Aminosäuren dienen zusätzlich als Bausteine für die Neusynthese von Proteinen [94]. Auch eine Neuprogrammierung des zellulären Zustandes, wie zum Beispiel die metabolische Umstellung unter inflammatorischen Bedingungen, kann Autophagie aktivieren und dient vor Allem zur Bereitstellung von Aminosäuren, die gebraucht werden, um das Proteom der Zelle anzupassen [66].



**Abbildung 7. Zelluläre Funktionen der Autophagie.**

Um die intrazelluläre Homöostase aufrechtzuerhalten, werden fehlerhaft gefaltete oder geschädigte Proteine und Proteinaggregate sowie dysfunktionale Organellen, wie zum Beispiel Mitochondrien durch Autophagie abgebaut. Darüber hinaus werden Abbauprodukte wie Aminosäuren, Kohlenhydrate, Lipide und Nucleoside als Ausgangsstoffe zur Energiegewinnung bereitgestellt. Aminosäuren dienen zudem als Bausteine für die Neusynthese von Proteinen.

Ist die Zelle aufgrund von zu lange anhaltendem Stress oder zu hohen Stressdosen nicht in der Lage, die Situation auszugleichen, kann es zu einer Überstimulierung der Autophagie kommen, was zu einem übermäßigen Abbau von Zellmaterial führt oder Apoptose induzieren kann und damit mit dem Autophagie-assoziierten Zelltod in Verbindung steht [95]. Autophagie stellt somit einen hormetischen Prozess dar, der einer genauen Kontrolle bedarf. Es ist noch nicht sicher geklärt, ob eine Überstimulierung der Autophagie und damit ein exzessiver Abbau intrazellulären Materials die direkte Ursache des Zelltodes ist oder ob parallel Apoptose aktiviert wird, um die betroffene Zelle kontrolliert sterben zu lassen [96]. Neben der nicht-selektiven Autophagie, bei der unspezifisch Teile des Zytoplasmas eingeschlossen und abgebaut werden, sind auch selektive Autophagieprozesse beschrieben. Dabei handelt es sich um einen regulierten Abbau spezifischer Organellen oder

anderer Zellbestandteile. So werden zum Beispiel dysfunktionale Mitochondrien, die eine Quelle von oxidativem Stress sind, bei der sogenannten Mitophagie spezifisch erkannt und abgebaut [97]. Auch Pexophagie (Peroxisomen), Ribophagie (Ribosomen), Retikulophagie (endoplasmatisches Retikulum) und Xenophagie (Krankheitserreger) sind Beispiele für selektive Wege der Autophagie.

Der Autophagie kommt auch eine wichtige Bedeutung bei der Entwicklung verschiedener Erkrankungen zu. Eine dysfunktionale Autophagie ist unter anderem mit der Entstehung von neurodegenerativen Erkrankungen, wie der Alzheimer-, Parkinson- und Huntington-Krankheit, aber auch mit Infektionskrankheiten und Tumorgenese assoziiert. Aggregatbildende Proteine wie *amyloid precursor protein* (APP) [98], Tau [99],  $\alpha$ -Synuklein [100] bzw. Huntingtin [101] akkumulieren eher und stärker, wenn Autophagie gestört ist und führen damit zur Ausbildung der genannten neurodegenerativen Erkrankungen. Weiterhin spielt Autophagie bei der intrazellulären Abwehr von Erregern eine Rolle. Mikroorganismen können ebenfalls in Autophagosomen eingeschlossen und abgebaut werden. Es sind jedoch auch Mikroorganismen, zum Beispiel Bakterien und Viren, bekannt, die den Autophagieweg ausnutzen, um sich innerhalb von Autophagosomen zu replizieren und sich so vor den Einflüssen der Zelle zu schützen. Gleichzeitig hemmen und verlangsamen sie den autophagosomalen Abbau [102]. Die Rolle der Autophagie bei der Tumorgenese ist vermutlich vielfältig. Auf der einen Seite kann Tumorzell-Autophagie die Tumorentwicklung begünstigen, indem sie Tumorzellen vor Stress, vor allem Nährstoffmangel schützt bis es zur Vaskularisierung des Tumors kommt [103]. Auf der anderen Seite sind Körperzellen in der Lage, sich durch Autophagie vor einer Akkumulation kanzerogener Mutationen zu schützen und somit eine Transformation in eine Tumorzelle zu verhindern.

#### 1.4 Fragestellung

Unter basalen Bedingungen wird die Autophagie als ein homöostatischer Prozess angesehen, durch den alte und geschädigte Zellkomponenten abgebaut und recycelt werden. Das Ausmaß der basalen Autophagie ist zelltypabhängig. Unter Stressbedingungen kann Autophagie stimuliert werden, um so Stress-assoziierte Schädigungen zu reduzieren und gleichzeitig Bausteine zur Energiegewinnung und für Syntheseprozesse zur Verfügung zu stellen. In verschiedenen Zellen wurde die AMPK, die durch Stressoren aktiviert werden kann, als eines der Autophagie-stimulierenden Signalproteine identifiziert. Die Regulierung der Autophagie in Endothelzellen unter basalen und unter Stressbedingungen sowie ihre Bedeutung für endotheliale Funktionen und Angiogenese ist bisher kaum untersucht. Genauso wenig ist bekannt, inwieweit AMPK die endotheliale Autophagie reguliert und ob Wachstumsfaktoren wie VEGF, die AMPK aktivieren, auch Autophagie beeinflussen.

Die Ziele dieser Arbeit sind deshalb, (i) die basale Autophagie in Endothelzellen zu beschreiben und deren Bedeutung für zelluläre Funktion aufzuklären, (ii) die Rolle der AMPK bei der Regulation der endothelialen Autophagie zu charakterisieren, (iii) den Einfluss von Stressfaktoren und VEGF auf die Autophagie in Endothelzellen zu prüfen und (iv) die Rolle von Autophagie und AMPK bei der Regulation der Angiogenese zu untersuchen.

Die hier erhaltenen Daten sollen dazu beitragen, die Bedeutung der Autophagie als Zellschutzsystem in Endothelzellen besser zu verstehen und diesen Prozess als ein mögliches Target zur Verhinderung oder Verbesserung einer Endotheldysfunktion zu charakterisieren. Darüber hinaus sollen die erworbenen Erkenntnisse zum Verständnis der Regulierung der Endothelzellularfunktion, insbesondere der Angiogenese, und zur Verbesserung von Therapieansätzen, bei denen die Beeinflussung der Angiogenese eine wichtige Rolle spielt, beitragen.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Zellen

Verwendeter Zelltyp:

- *human umbilical vein endothelial cells* (HUVEC, primäre, humane Endothelzellen aus der Nabelschnurvene)

Vergleichszellen:

- 786-O (Nierenzellkarzinom-Zelllinie, bereitgestellt von Anne Knierim)
- primäre Maus-Kardiomyozyten (bereitgestellt von Dr. Bernadin Ndongson Dongmo)

#### 2.1.2 Chemikalien und Reagenzien

Die verwendeten Chemikalien und Reagenzien sind den nachfolgenden Tabellen 1 bis 4 zu entnehmen.

**Tabelle 1. Zellkultur- und Transfektionsreagenzien**

Substanz	Bezugsquelle
Ciprofloxacin Kabi	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg v.d.H.
<i>endothelial mitogen</i>	Biomedical Technologies Inc., Stoughton, USA
Fötales Kälberserum (FKS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Gelatine	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
L-Glutamin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
<i>Hank's Balanced Salt Solution</i> (HBSS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Heparin-Natrium	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Humanserum	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Humanes Serum Albumin (HSA)	Bayer Vital GmbH, Leverkusen
Kollagenase II	Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, USA
M199	Lonza Walkersville Inc., Walkersville, USA
Penicillin/Streptomycin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
SAINT-RED	Synvolux Therapeutics B.V., Groningen, Belgien
Trypsin/EDTA (0,05 %/0,02 %)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Vitamin C	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

**Tabelle 2. Reagenzien für Zelllyse und Proteinanalytik**

Substanz	Bezugsquelle
Acrylamid 4K-Lösung 30 % Mix 29:1	AppliChem GmbH, Darmstadt
Ammoniumpersulfat	AppliChem GmbH, Darmstadt
Bio-Rad <i>D<sub>c</sub> Protein Assay</i>	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA

<b>Substanz</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Bovines Serumalbumin Fraktion V, pH 7,0 (BSA)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Bromphenolblau (BPB)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Calciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	AppliChem GmbH, Darmstadt
DL-Dithiotreitol (DTT)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
<i>ECL Western Blotting Detection Reagent</i>	GE Healthcare UK Limited, Buckinghamshire, UK
<i>ECL Prime Western Blotting Detection Reagent</i>	GE Healthcare UK Limited, Buckinghamshire, UK
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ethylenglycol-Bis(2-Aminoethylether)-N,N,N,N,- Tetraacetat (EGTA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Glukose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Glycerol	Carl Roth GmbH Co. KG, Karlsruhe
Glycin	AppliChem GmbH, Darmstadt
4-(2-Hydroxyethyl)-Piperazin-1-(Ethan-sulfonsäure)- Natriumsalz (HEPES)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Kaliumchlorid (KCl)	VEB Jenapharm-Laborchemie, Apolda
Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Riedel-De Haen AG, Hannover
Kodak GBX <i>developer and replenisher</i>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Kodak GBX <i>fixer and replenisher</i>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Magermilchpulver	AppliChem GmbH, Darmstadt
Magnesiumsulfat (MgSO <sub>4</sub> )	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
β-Mercaptoethanol (ME)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Methanol	AppliChem GmbH, Darmstadt
2-Methyl-1-Propanol (Isobutanol)	Carl Roth GmbH Co. KG, Karlsruhe
Natriumazid (NaN <sub>3</sub> )	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Natriumcarbonat (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	Merck Chemicals GmbH, Schwalbach
Natriumchlorid (NaCl)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Natriumfluorid (NaF)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O)	Carl Roth GmbH Co. KG, Karlsruhe
Natriumhydroxid (NaOH)	Carl Roth GmbH Co. KG, Karlsruhe
Salzsäure, 37% (HCl)	Carl Roth GmbH Co. KG, Karlsruhe
<i>Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder</i> (10-260kDa)	Fermentas life science, Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
N,N,N,N-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Tris(Hydroxymethyl)Aminomethan (Tris)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Triton® X-100	Ferak Berlin GmbH, Berlin
Tween® 20	AppliChem GmbH, Darmstadt
<i>Western Lightning® Plus-ECL, Enhanced Chemiluminescence Substrate</i>	Perkin Elmer, Waltham, USA

**Tabelle 3. Reagenzien zur Analyse von Stressparametern**

<b>Substanz/Kit</b>	<b>Bezugsquelle</b>
ATP-Kit SL	BioTherma AB, Handen, Schweden
<i>BD Cytometric Bead Array (CBA) Human Soluble Protein Master Buffer Kit</i>	BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey
<i>BD Cytometric Bead Array (CBA) Human Enhanced Sensitivity Master Buffer Kit</i>	BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey
5,5'-Dithiobis(2-Nitrobenzoesäure) (DTNB)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ethanol	Carl Roth GmbH Co. KG, Karlsruhe
L-Glutathione oxidiert (GSSG)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Glutathion-Reduktase	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
NADPH-Tetranatriumsalz	Carl Roth GmbH Co. KG, Karlsruhe
<i>OxyBlot Protein Oxidation Detection Kit</i>	Millipore Corporation, Billerica, USA
5-Sulfosalicylsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Rotiszint® eco plus	Carl Roth GmbH Co. KG, Karlsruhe

**Tabelle 4. Reagenzien für funktionelle Versuche**

<b>Substanz/Kit</b>	<b>Bezugsquelle</b>
<i>ApopTag® Plus Fluorescein In Situ Apoptosis Detection Kit S7111</i>	Millipore Corporation, Billerica, USA
Aprotinin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Biotin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
BSA-C	Aurion, Wageningen, Niederlande
BSA, fettsäurefrei	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
L-Carnitin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
<i>Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric)</i>	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
(4',6-Diamidin-2-Phenylindol) DAPI	Boehringer Mannheim, Mannheim
Essigsäure	Carl Roth GmbH Co. KG, Karlsruhe
Fibrinogen	Calbiochem®, La Jolla, USA
FluoroMount-G®	Southern Biotech, Birmingham, USA
Methylzellulose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
1- <sup>14</sup> C-Palmitinsäure	American Radiolabeled Chemicals, Inc., St. Louis, USA
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Propidiumiodid	Calbiochem®, La Jolla, USA
RNase A	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Thrombin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ziegenserum	Cell Signaling Technology® Inc., Danvers, USA

### 2.1.3 Inhibitoren und Stimulanzen

In den Versuchen wurden die Inhibitoren und Stimulanzen aus Tabelle 5 verwendet.

**Tabelle 5. Inhibitoren und Stimulanzen**

Substanz	Bezugsquelle
A769662	LC-Labs, Woburn, USA
AICAR	Abcam, Cambridge, USA
Akt 1/2 Kinase-Inhibitor (Akt-Inhibitor VIII)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Bafilomycin A1	Enzo Life Sciences GmbH, Lörrach
Buthionin-Sulfoximin (BSO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
2-Deoxyglukose (2-DG)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Etomoxir	Calbiochem®, La Jolla, USA
3-Methyladenin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Natriumdiphosphat tetrabasisch ( $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ )	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Natriumorthovanadat ( $\text{Na}_3\text{VO}_4$ )	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
PD98059	Calbiochem®, La Jolla, USA
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
<i>Complete, EDTA-free Protease inhibitor cocktail (PIC)</i>	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
<i>recombinant human VEGF 165</i>	R & D Systems Minneapolis, USA
Sunitinib	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

### 2.1.4 Antikörper

#### Für Western-Blot

Die verwendeten primären Antikörper für Western-Blot (Tabelle 6) wurden unter Berücksichtigung der jeweiligen Datenblätter in Tris/NaCl (TN)/Tween-Puffer (siehe Kapitel 2.2.4.4) mit 5 % BSA gelöst und bei 4 °C gelagert. Um Verkeimungen der Lösungen zu vermeiden und sie länger haltbar zu machen, wurde 0,02 % Natriumazid zugesetzt. Sekundäre Antikörper wurden in 5 % Milch in TN/Tween-Puffer verdünnt.

**Tabelle 6. Antikörper für Western-Blot**

Antigen	Typ	Verdünnung.	Katalognr.	Firma
phospho-ACC (S79)	Kaninchen, polyklonal	1:1000	3661	CST
ACC	Kaninchen, monoklonal	1:1000	3676	CST
$\beta$ -Aktin	Kaninchen, monoklonal	1:5000	4970	CST
phospho-AMPK $\alpha$ (T172)	Kaninchen, monoklonal	1:1000	2535	CST
AMPK $\alpha$	Kaninchen, polyklonal	1:2000	2532	CST
AMPK $\alpha$ 1	Kaninchen, polyklonal	1:1000	07-350	Upstate

Antigen	Typ	Verdünnung.	Katalognr.	Firma
AMPK $\alpha$ 2	Kaninchen, polyklonal	1:1000	2757	CST
phospho-Akt (S473)	Kaninchen, polyklonal	1:1000	9271	CST
Akt	Kaninchen, polyklonal	1:1000	9272	CST
Beclin1	Kaninchen, monoklonal	1:1000	3495	CST
phospho-ERK1/2 (T202/Y204)	Maus, monoklonal	1:5000	9106	CST
ERK1/2	Maus, monoklonal	1:2000	9107	CST
LC3B	Kaninchen, monoklonal	1:1000	3868	CST
phospho-eNOS (S1177)	Kaninchen, monoklonal	1:2000	9570	CST
eNOS Typ III	Maus, polyklonal	1:2000	610297	BD
p62	Kaninchen, monoklonal	1:1000	8025	CST
phospho-p70S6K (T389)	Kaninchen, polyklonal	1:1000	9205	CST
p70S6K	Kaninchen, polyklonal	1:1000	9202	CST
phospho-PLC $\gamma$ (Y783)	Kaninchen, polyklonal	1:1000	2821	CST
PLC $\gamma$	Kaninchen, polyklonal	1:1000	2822	CST
phospho-ULK1 (S555)	Kaninchen, monoklonal	1:1000	5869	CST
ULK1	Kaninchen, polyklonal	1:1000	4776	CST
phospho-VEGFR2 (Y1175)	Kaninchen, monoklonal	1:1000	2478	CST
VEGFR2	Kaninchen, monoklonal	1:1000	2479	CST
Vinculin	Kaninchen, polyklonal	1:2000	4650	CST
Anti- <i>rabbit</i> IgG (H+L)	Ziege, polyklonal, Peroxidase-gekoppelt	1:5000	074-1506	KPL
Anti- <i>mouse</i> IgG (H+L)	Ziege, polyklonal, Peroxidase-gekoppelt	1:5000	074-1806	KPL

CST: Cell Signaling Technology® Inc., Danvers, USA

Upstate: Upstate Cell Signaling Solutions, Charlottesville, USA

BD: BD Transduction Laboratories™, BD Biosciences-Pharmingen, Heidelberg

KPL: Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc., Gaithersburg, Maryland, USA

Die verwendeten Antikörper für Immunfluoreszenz-Färbungen und Zytokin-Messung mittels Multiplex-Methode sind den Tabellen 7 und 8 zu entnehmen.

**Tabelle 7. Antikörper für Immunfluoreszenz**

Antigen	Typ	Verdünnung.	Katalognr.	Hersteller
LC3B	Kaninchen, monoklonal	1:200	3868	CST
Anti- <i>rabbit</i> IgG (H+L)	Ziege polyklonal, AlexaFluor® 488- gekoppelt	1:500	A11034	LT

CST: Cell Signaling Technology® Inc., Danvers, USA

LT: Life Technologies GmbH, Carlsbad, Kalifornien, USA

**Tabelle 8. Antikörper für Multiplex-Zytokinmessung**

Antigen	Katalognr.	Hersteller
Human IL1 $\beta$ (Interleukin 1 $\beta$ ) Flex Set	558279	BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey
Human IL6 (Interleukin 6) Flex Set	558276	BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey
Human IL8 (Interleukin 8) Flex Set	558277	BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey
Human MCP1 ( <i>monocyte chemotactic protein 1</i> ) Flex Set	558287	BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey
Human TNF $\alpha$ (Tumornekrosefaktor $\alpha$ ) Flex Set	558273	BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey

### 2.1.5 siRNA

Bei den verwendeten siRNAs handelt es sich um *SMARTpool*-siRNAs. Das sind Pools aus 4 verschiedenen Sequenzen spezifisch für die jeweilige Ziel-mRNA. Bei Verwendung dieser *SMARTpools* ist die Konzentration jeder einzelnen siRNA so gering, dass unspezifische Effekte minimiert werden.

Alle verwendeten siRNAs wurden von GE Healthcare, Dharmacon RNAi & Gene Expression, Lafayette, USA bezogen und sind in Tabelle 9 aufgeführt.

**Tabelle 9. siRNA**

Zielprotein	Katalognr.	Bezeichnung
Kontrolle	#D-001810-10	ON-TARGET $plus$ Non-Targeting Pool
AMPK $\alpha$ 1	#M-005027-02	siGENOME Human PRKAA1 (5562) siRNA
AMPK $\alpha$ 2	#M-005361-02	siGENOME Human PRKAA2 (5563) siRNA
ULK1	#M-005049-00	siGENOME Human ULK1 (8408) siRNA
Beclin1	#M-010552-01	siGENOME Human BECN1 (8678) siRNA

### 2.1.6 Materialien

Alle Materialien des täglichen Laborbedarfs, wie Pipetten, Pipettenspitzen, Reaktionsgefäße und Handschuhe sind von den Firmen Eppendorf, Greiner Bio-One, Brand® und Meditrade®. Weitere Materialien sind der Tabelle 10 zu entnehmen.

**Tabelle 10. Materialien**

Bezeichnung	Bezugsquelle
Cell Scraper blue 25,0 cm	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Coverslips	Menzel-Gläser, Braunschweig
Einmal-Reagenz-Reservoirs	Carl Roth GmbH Co. KG, Karlsruhe
Filterpapier <i>Chrom-Paper Sheets</i>	Sortorius Stedim Biotech S.A., Aubagne Cedex, Frankreich

<b>Bezeichnung</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Fotofilm	Fujifilm Corporation, Tokio, Japan
Immobilon™-P Transfermembran	Millipore Corporation, Billerica, USA
Küvetten	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Minisart® (Sterilfilter)	Sartorius AG, Göttingen
Parafilm „M“	American Can Company, Greenwich
Saranfolie	Saran, Dow Chemical, Michigan, USA
<i>Whatman Paper, Grade 3</i>	Whatman International Ltd., Maidstone, England
Zellkulturgefäße cellstar®	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen

### 2.1.7 Geräte

Die verwendeten Geräte sind in Tabelle 11 aufgelistet.

**Tabelle 11. Geräte**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Axio Observer Inverses Mikroskop	Carl Zeiss AG, Jena
Biofuge primo R (Kühlzentrifuge)	Heraeus Holding GmbH, Hanau
BP 61 (Feinwaage)	Sartorius AG, Göttingen
BP 310P (Oberschalenwaage)	Sartorius AG, Göttingen
FACS Canto	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, New Jersey
Heracell 150 (Brutschrank, 37 °C, 5 % CO <sub>2</sub> )	Heraeus Holding GmbH, Hanau
KH-3 (Kühlung für Blottingapparatur)	Biometra® biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen
Kreisschüttler KS501 digital	IKA® Werke GmbH & Co KG, Staufen
Labofuge 400R	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Laminarbox Herasafe	Heraeus Holding GmbH, Hanau
MC1 Laboratory LC4200 (Waage)	Sartorius AG, Göttingen
Microprocessor ph-Meter pH537	WTW Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Weilheim
Magnetrührer	R3T GmbH, Taufkirchen
Membranvakuumpumpe MP20/ System II	Biometra® biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen
Nikon TMS-F (Mikroskop)	Nikon Corporation, Tokio, Japan
Olympus BX61 (Fluoreszenzmikroskop)	Olympus, Tokio, Japan
Pharmacia LKB MultiTemp II	GE Healthcar UK Limited, Buckinghamshire, UK
PowerPac 200, PowerPac 1000	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
Präzitherm Typ PZ 35	Störk-Tronic, Störk GmbH & Co KG, Stuttgart (Vaihingen)
Protean® II xi Cell	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
Spektrophotometer Uvicon 930	Tresser instruments, Groß-Zimmern
Taumelschüttler WT17	Biometra® biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen
Thermomixer 5437	Eppendorf AG, Hamburg
Thermostat Julabo	JULABO Labortechnik GmbH, Seelbach

Bezeichnung	Bezugsquelle
Trans-Blot™ Cell	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
Vortex	IKA® Werke GmbH & Co KG, Staufen
Wallac 1414 Win Spectral Liquid Scintillation Counter	Perkin Elmer, Waltham, USA
Wärmeinkubator Heraeus <i>function line</i>	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Wärmeinkubator OV3	Biometra® biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen
Wasserbad M6 Lauda	MS Laborgeräte, Wiesloch
Zentrifuge 5451C	Eppendorf AG, Hamburg

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellkultur

#### 2.2.1.1 Präparation von HUVEC

Für die Experimente dieser Arbeit wurden primäre Zellen aus der humanen Nabelschnurvene verwendet (HUVEC). Für die Präparation dieser Zellen wurden die Nabelschnüre äußerlich mit 70 % Ethanol gereinigt. Die Vene wurde mit physiologischer Kochsalzlösung gespült und mit 0,01 % Kollagenase-Lösung (Tabelle 12) gefüllt. Die enzymatische Ablösung der Endothelzellen erfolgte für 3 min im 37 °C-Wasserbad bei leichtem Massieren der Nabelschnur. Danach wurde die Vene nochmals mit M199/10 % FKS gespült. Die zellhaltige Suspension wurde zentrifugiert (500 x g, 6 min), das Zellpellet in M199/10 % FKS aufgenommen und in eine mit 0,2 % Gelatine beschichtete Zellkulturflasche ausgesät. Am nächsten Tag wurden nicht-adhärente Fremdzellen mit PBS gewaschen und die HUVEC in vollem Wachstumsmedium (Tabelle 12) bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Alle 2 bis 3 Tage erfolgte ein Halbmediumwechsel.

**Tabelle 12. Zusammensetzung der Lösungen und Medien zur Präparation und Kultivierung von Endothelzellen**

Lösung/Medium	Komponente	Konzentration
<b>0,01 % Kollagenase-Lösung</b>	Kollagenase	0,1 mg/ml in M199
<b>Wachstumsmedium</b>	M199	80 %
	FKS	17,5 %
	Humanserum	2,5 %
	Penicillin	5000 U/ml
	Streptomycin	5000 µg/ml
	Ciprofloxacin	10 µg/ml
	L-Glutamin	680 µM
	Heparin	25 µg/ml
	Vitamin C	100 µM
	<i>endothelial mitogen</i>	7,5 µg/ml

Lösung/Medium	Komponente	Konzentration
<b>20 mM Vitamin C-Stammlösung</b>	Vitamin C	3,5 mg / 800 µl M199
	neutralisieren mit 200 µl 0,1 N NaOH	
<b>PBS (pH 7,4)</b>	NaCl	145 mM
	KCl	2,7 mM
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,5 mM
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	8,1 mM

### 2.2.1.2 Passagieren

Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen passagiert. Dazu wurden sie zweimal mit PBS gewaschen und für 2 bis 3 min mit Trypsin/EDTA (0,05 %/0,02 %) abgelöst. Das Stoppen der Trypsin-Reaktion erfolgte mit M199/10 % FKS. Danach wurde die Zellsuspension zentrifugiert (500 x g, 6 min), das Zellpellet in Wachstumsmedium aufgenommen und zu gleichen Teilen in 2 bis 3 Gelatine-beschichtete T75-Zellkulturflaschen verteilt.

### 2.2.1.3 Aussaat

Für die Experimente wurden Zellen der 1. und 2. Subkultur verwendet. Das Ablösen der Zellen erfolgte mittels Trypsin, wie in Kapitel 2.2.1.2 beschrieben, und die Zellzählung in einer Neubauer-Zählkammer. Je nach Experiment wurden die Zellen in unterschiedlich große, Gelatine-beschichtete Zellkulturgefäße in einer spezifischen Zellzahl ausgesät (Tabelle 13) und, sofern nicht anders beschrieben, 2 bis 3 Tage nach Aussaat im Experiment eingesetzt. Im Aussaatmedium war kein Ciprofloxacin enthalten.

**Tabelle 13. Zellzahlen**

Zellkulturgefäß	Zellzahl	Mediumvolumen
24-Well-Platte	70.000	0,5 ml
Coverslips (in 24-Well-Platte)	90.000	0,5 ml
12-Well-Platte	100.000	1 ml
30 mm-Zellkulturschale	240.000	2 ml
60 mm-Zellkulturschale	360.000	4 ml
90 mm-Zellkulturschale	1.200.000	8 ml

Für Experimente zur Transfektion mit siRNA wurden jeweils 20 % weniger Zellen ausgesät.

### 2.2.2 siRNA-Transfektion

Um Effekte bestimmter Proteine auf die Zellen zu untersuchen, wurden diese mit Hilfe von siRNA herunterreguliert. HUVEC wurden am Vortag meist in 30 mm-Zellkulturschalen ausgesät und waren zum Zeitpunkt der Transfektion ca. 50 % bis 70 % konfluent. Die Transfektion der Zellen mit siRNA erfolgte mit dem Transfektionskit SAINT-RED (**S**ynthetic, **A**mphiphilic, **I**nteractive – **R**NAi-**E**nhanced **D**elivery) nach dem Standardprotokoll des Herstellers Synvolux Therapeutics. Dabei handelt es sich um eine Lipofektion. HUVEC wurden für 4 h mit der Transfektionslösung inkubiert. Anschließend wurden 2 ml komplettes Wachstumsmedium zugegeben. Falls nicht anders angegeben, wurden die Experimente 72 h nach Transfektion durchgeführt.

Die eingesetzte Konzentration der spezifischen siRNAs betrug 0,5 µg/ml. Zu 30 mm-Zellkulturschalen wurde 1 ml Transfektionslösung zugesetzt. Für die Transfektion von Zellen in anderen Zellkulturgefäßen wurden die Reagenzvolumina entsprechend der Fläche angepasst. Die Menge der eingesetzten Kontroll-siRNA entsprach der Konzentration der spezifischen siRNA bzw. der Summe der Konzentrationen der spezifischen siRNAs bei kombinierter Anwendung mehrerer siRNAs.

### 2.2.3 Stimulationsbedingungen

Für die Untersuchung der Effekte der basalen Autophagie auf Endothelzellparameter und -funktion wurden Zellen in vollem nährstoffreichem Wachstumsmedium kultiviert. Die Analyse der Autophagie nach Stimulation mit AMPK-Aktivatoren und Wachstumsfaktoren erfolgte im Allgemeinen nach Inkubation der Zellen in M199/0,25 % HSA für 2 h. Da die Analyse von p62 (Kapitel 3.6.1) eine Langzeit-Stimulation von 48 h notwendig machte, für die M199/0,25 % HSA nicht geeignet ist, wurde hier M199 mit 2 % FKS und Glutamin eingesetzt. Die Vorinkubation in diesem Medium erfolgte für 4 h bevor Stimuli zugesetzt wurden. Das gleiche Vorgehen galt für die funktionellen Untersuchungen wie Proliferation und Überleben (Kapitel 3.2.1 und 3.2.2).

**Tabelle 14. Hepes/CaCl<sub>2</sub>/HSA-Puffer**

<b>Puffer</b>	<b>Komponente</b>	<b>Konzentration</b>
<b>Hepes/CaCl<sub>2</sub>/HSA-Puffer (pH 7,4)</b>	Hepes	10 mM
	NaCl	145 mM
	Glukose	10 mM
	KCl	5 mM
	MgSO <sub>4</sub>	1 mM
	CaCl <sub>2</sub>	1,5 mM
	HSA	0,25 %

Für die Untersuchung der VEGF-Signalwege in Kapitel 3.2.3 wurden die Zellen für 4 h in M199/0,25 % HSA und anschließend für 30 min in HEPES/CaCl<sub>2</sub>/HSA-Puffer (Tabelle 14) gehungert, um den Einfluss von Serum und Mediumkomponenten auf das VEGF-Signal zu verhindern. Danach erfolgte die Stimulation mit VEGF. Bei Einsatz von in DMSO gelösten Inhibitoren wurde die entsprechende Menge an DMSO zu den Kontrollen zugesetzt.

## 2.2.4 Proteinanalytik

### 2.2.4.1 Zellyse

Um den Einfluss von Stimulanzien und Inhibitoren auf bestimmte Proteine zu untersuchen, wurden Zellen lysiert und anschließend mittels SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) und Western-Blot analysiert. Dabei wurden meist 30 mm-Zellkultur-schalen eingesetzt. Die Zellen wurden auf Eis zweimal mit 1 ml kaltem Lyse-Waschpuffer gewaschen und anschließend für 15 min mit 60 µl Lysepuffer (Tabelle 15) auf Eis inkubiert. Danach erfolgte das Abkratzen der Zellen und eine Zentrifugation (700 x g, 6 min, 4 °C), um Zellkerne und nicht-lysierte Bestandteile zu entfernen. Der Überstand wurde abgenommen und Aliquots für die spätere Proteinbestimmung nach Lowry (Kapitel 2.2.4.2) entnommen. Dem Überstand wurde Laemmli-Puffer in einer Verdünnung von 1:3 zugegeben und das Lysat für 5 min unter leichtem Schütteln bei 95 °C inkubiert, um Proteine zu denaturieren.

**Tabelle 15. Puffer für Zellyse**

<b>Puffer</b>	<b>Komponente</b>	<b>Konzentration</b>
<b>Lyse-Waschpuffer (pH 7,4)</b>	Tris	50 mM
	NaF	50 mM
	Na <sub>4</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	10 mM
	EDTA	2 mM
	EGTA	1 mM
	Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	1 mM
	DTT	1 mM
<b>Lysepuffer</b>	Lyse-Waschpuffer mit:	
	Triton X-100	1 %
	SDS	0,1 %
	PMSF	1 mM
	PIC	10 µl/ml
<b>Laemmli-Puffer (pH 6,8)</b>	Tris	186 mM
	EDTA	10 mM
	Glycerol	15 %
	SDS	9 %
	β-Mercaptoethanol	6 %
	Bromphenolblau	0,03 %

### 2.2.4.2 Proteinbestimmung nach Lowry

Aus den hergestellten Lysaten erfolgte eine Proteinbestimmung nach Lowry mit Hilfe des Bio-Rad D<sub>C</sub> Protein-Assays, um standardisierte Proteinmengen für die anschließende SDS-PAGE aufzutragen. Dafür wurden jeweils in Doppelbestimmung 2 µl Lysat in Wasser verdünnt und die Reagenzien des Kits nach Angaben des Herstellers zugegeben. Die Absorption wurde bei 750 nm gemessen. Die Proteinkonzentrationen wurden anhand eines mitgeführten Standards berechnet.

### 2.2.4.3 SDS-PAGE

Um den Phosphorylierungsstatus und die Expression von Proteinen zu untersuchen, wurden die zuvor hergestellten Lysate auf ein SDS-Gel aufgetragen und elektrophoretisch getrennt. Für die Elektrophorese wurden 35 bis 50 µg Protein pro Probe aufgetragen. Standardmäßig wurden 7,5 %ige Gele verwendet (Tabelle 16). Der Nachweis von LC3B erfolgte wegen des geringen Molekulargewichtes und der zu erwartenden Doppelbande auf 15 %igen Gelen (Tabelle 16). Die Elektrophorese lief unter Kühlung für 2 h mit einer Stromstärke von 45 mA pro Gel. Die Zusammensetzungen der benötigten Puffer sind in Tabelle 17 aufgeführt.

**Tabelle 16. Zusammensetzung der Polyacrylamid-Gele**

Gel	Komponente	Menge
<b>Trenngelansatz 7,5 %</b>	Wasser	16 ml
	Tris/HCl-Puffer (pH 8,8)	6 ml
	Acrylamid	7,6 ml
	10 % SDS	300 µl
	APS	100 µl
	rühren und 2 min entgasen	
	TEMED	15 µl
<b>Trenngelansatz 15 %</b>	Wasser	8,6 ml
	Tris/HCl-Puffer (pH 8,8)	6 ml
	Acrylamid	15 ml
	10 % SDS	300 µl
	APS	100 µl
	rühren und 2 min entgasen	
	TEMED	15 µl
<b>Sammelgelansatz</b>	Wasser	3,6 ml
	Tris/HCl-Puffer (pH 6,8)	0,5 ml
	Acrylamid	0,8 ml
	10 % SDS	50 µl
	APS	17 µl
	TEMED	5 µl

**Tabelle 17. Puffer für Elektrophorese**

<b>Puffer</b>	<b>Komponente</b>	<b>Konzentration</b>
<b>Tris/HCl-Puffer (pH 6,8)</b>	Tris	1,25 M
<b>Tris/HCl-Puffer (pH 8,8)</b>	Tris	1,875 M
<b>Elektrodenpuffer</b>	Tris	25 mM
	Glycin	192 mM
	SDS	1 %

#### 2.2.4.4 Western-Blot

Im Anschluss an die SDS-PAGE wurden die Proteine vom Gel auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran mittels Tankblotting transferiert. Dabei wurde ein vertikaler Puffertank mit Kühleinsatz und Platinelektroden verwendet. Der Transfer der Proteine erfolgte unter Kühlung bei 0,75 A pro Gel für 60 bis 100 min. Membranen wurden anschließend in 5 % Milch in TN/Tween-Puffer blockiert, in TN-Puffer gewaschen und mit dem primären Antikörper über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Zusammensetzungen der benötigten Puffer sind der Tabelle 18 zu entnehmen.

**Tabelle 18. Puffer für Western-Blot**

<b>Puffer</b>	<b>Komponente</b>	<b>Konzentration</b>
<b>Blottingpuffer</b>	Tris	25 mM
	Glycin	192 mM
	Methanol	10 %
<b>TN-Puffer</b>	Tris	10 mM
	NaCl	1,5 M
<b>TN/Tween-Puffer</b>	Tris	10 mM
	NaCl	1,5 M
	Tween® 20	0,1 %

#### 2.2.4.5 Immundetektion von Proteinen

Die Inkubation mit dem primären Antikörper gegen das jeweilige Zielprotein erfolgte über Nacht bei 4 °C. Danach wurde die Membran für ca. 20 min mit viermaligem Wechseln des Puffers mit TN/Tween-Puffer gewaschen und mit dem *Horseradish*-Peroxidase-gekoppelten sekundären Antikörper für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die

Membran dreimal mit TN/Tween-Puffer und einmal im letzten Waschschrift mit TN-Puffer ohne Tween gewaschen.

Der Nachweis der Proteine auf der Membran erfolgte durch die ECL (*enhanced chemiluminescence*)-Methode. Dies ist eine Technik, mit der Proteine mittels eines Lichtsignals nachgewiesen werden können. In dieser Arbeit wurde das System von GE Healthcare „Amersham™ ECL Western Blotting Reagents“ und „Amersham™ ECL prime Western Blotting Reagents“ bzw. „Western Lightning® Plus-ECL“ (Perkin Elmer) verwendet. Dafür wurde die Membran für 1 bis 2 min mit dem ECL inkubiert, wobei das Substrat Luminol durch die Antikörper-gekoppelte Peroxidase oxidiert wird und Licht emittiert. Dieses Lichtsignal wurde mit Hilfe eines fotosensitiven Films aufgezeichnet und mittels des Entwicklungssystems Kodak GBX Entwickler und Fixierer auf dem Film sichtbar gemacht. Die Expositionszeiten des Films richteten sich nach der Stärke des Lichtsignals.

#### 2.2.4.6 Strippen von Membranen

Als Strippen bezeichnet man das Entfernen des gebundenen Antikörpers, um die Anfärbung der Membran mit einem anderen Antikörper zu ermöglichen. Das ist besonders wichtig für den Nachweis phosphorylierter Proteine, bei dem eine nachfolgende Anfärbung gegen das Gesamtprotein für die Auswertung nötig ist. Die Membran wurde für 35 min in Strippingpuffer (Tabelle 19) bei 54 °C unter leichtem Schütteln inkubiert. Um den Strippingpuffer zu entfernen, wurde die Membran zweimal für je 10 min mit TN-Puffer gewaschen und anschließend für 1 h in 5 % Milch in TN/Tween-Puffer blockiert. Nach dreimaligem Waschen mit TN/Tween-Puffer wurde erneut ein primärer Antikörper zugegeben. Membranen wurden nicht öfter als dreimal gestrippt, da mit jedem Schritt auch ein Teil der gebundenen Proteine entfernt wird und die Signale schwächer werden.

**Tabelle 19. Strippingpuffer**

Puffer	Komponente	Konzentration
Strippingpuffer (pH 6,7)	Tris	62,5 mM
	SDS	2 %
	β-Mercaptoethanol	100 mM

#### 2.2.4.7 Densitometrische Auswertung

Für die Auswertung wurden die Filme mit den detektierten Proteinsignalen eingescannt und die Intensität der Banden mit dem Programm Image J (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA) gemessen. Die Differenzen zwischen Leerwert und den gemessenen Werten wurden als artifizielle Einheiten angegeben. Zur Beurteilung des Phosphorylierungsstatus wurde jeweils das Verhältnis des Phosphorylierungssignals mit

dem Signal des Gesamtproteins gebildet. Für Expressionsanalysen wurde  $\beta$ -Aktin (humane Zellen) bzw. Vinculin (Mauszellen) als interne Kontrollen zur Normierung verwendet. Die normierten Intensitäten liefern eine zuverlässige Aussage über den Verlauf der Phosphorylierung eines Proteins oder Veränderungen der Expression während des Experimentes.

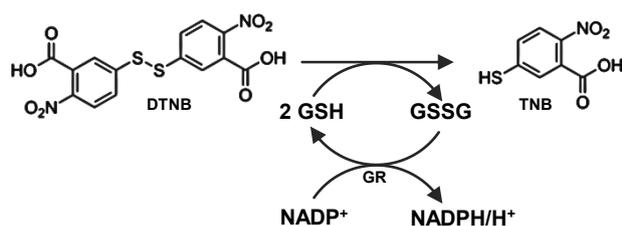
## 2.2.5 Bestimmung von Stress-Parametern

### 2.2.5.1 GSH-Bestimmung

Als Marker für oxidativen Stress wurden Glutathion (GSH)-Spiegel gemessen. Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und durch Zugabe von 90  $\mu$ l 0,01 N HCl pro 60 mm-Zellkulturschale lysiert und abgekratzt. Die Proben wurden für 10 min bei 15.000 x g zentrifugiert, danach wurden 80  $\mu$ l des Überstandes entnommen. Durch Zugabe von 27,2  $\mu$ l Sulfosalicylsäure und Inkubation auf Eis für 5 min wurden Proteine gefällt und nach Zentrifugation für 5 min bei 15.000 x g pelletiert. 40  $\mu$ l des Überstandes wurden mit 340  $\mu$ l Reaktionspuffer (Tabelle 20) und 20  $\mu$ l 5,5'-Dithiobis(2-Nitrobenzoesäure) (DTNB, 10 mM) gemischt und 100  $\mu$ l als Triplikat in eine 96-Well-Platte überführt. Nach Zugabe von 20  $\mu$ l Glutathion-Reduktase (10 U/ml) wurde die Absorption über einen Zeitraum von 12 min bei 412 nm gemessen. Der Reaktionspuffer enthält das farblose DTNB, welches unter GSH-Verbrauch zum gelben TNB (5-Thio-2-Nitrobenzoesäure) umgesetzt wird. Bei dieser Reaktion entsteht gleichzeitig Glutathiondisulfid (GSSG), das durch die Glutathion-Reduktase wieder zu GSH reduziert wird, sodass die Farbreaktion von neuem beginnt (Abbildung 8). Die Anzahl der durchlaufenen Zyklen und damit die Intensität der Farbentwicklung sind proportional zum GSH-Gehalt der Probe. Anhand des linearen Bereiches des Signalanstieges und mit Hilfe eines mitgeführten Standards erfolgte die Berechnung der GSH-Konzentrationen. Aus dem Lysat wurde parallel der Protein-Gehalt mittels Lowry-Methode bestimmt und die GSH-Werte auf den Protein-Gehalt normiert.

**Tabelle 20. Reaktionspuffer für GSH-Bestimmung**

Puffer	Komponente	Konzentration
Reaktionspuffer (pH 8,8)	Tris	200 mM
	EDTA	1 mM
	NADPH	1,5 mM



**Abbildung 8. Prinzip der GSH-Messung.**

Farbloses DTNB wird unter GSH-Verbrauch zum gelben TNB umgesetzt. Dabei entsteht GSSG, das durch GR wieder zu GSH reduziert wird. GSH geht erneut in die Reaktion ein.

DTNB: 5,5'-Dithiobis(2-Nitrobenzoesäure), GR: Glutathion-Reduktase, GSH: Glutathion, GSSG: Glutathiondisulfid, TNB: 5-Thio-2-Nitrobenzoesäure

### 2.2.5.2 Proteinkarboxylierung

Um die Karboxylierung von Proteinen nachzuweisen, wurden Zellen zunächst versuchsspezifisch behandelt und anschließend nach Protokoll in Kapitel 2.2.4.1 lysiert. Statt 60 µl Lysepuffer wurden jedoch nur 40 µl Lysepuffer zugegeben, um Proteine zu konzentrieren. Außerdem erfolgten keine Zugabe von Laemmli-Puffer und kein Kochen der Proben. Der Nachweis der Proteinkarboxylierung erfolgte nach Anleitung des *OxyBlot Protein Oxidation Detection Kits* von Millipore. Proteine wurden zunächst mittels SDS denaturiert. Durch Zugabe von 2,4-Dinitrophenylhydrazin wurden die Carbonylgruppen der Proteine für 15 min zu 2,4-Dinitrophenylhydrazon derivatisiert. Diese Proben wurden dann mittels SDS-PAGE getrennt und im Western-Blot mit einem spezifischen Antikörper gegen 2,4-Dinitrophenylhydrazon angefärbt.

### 2.2.5.3 ATP-Bestimmung

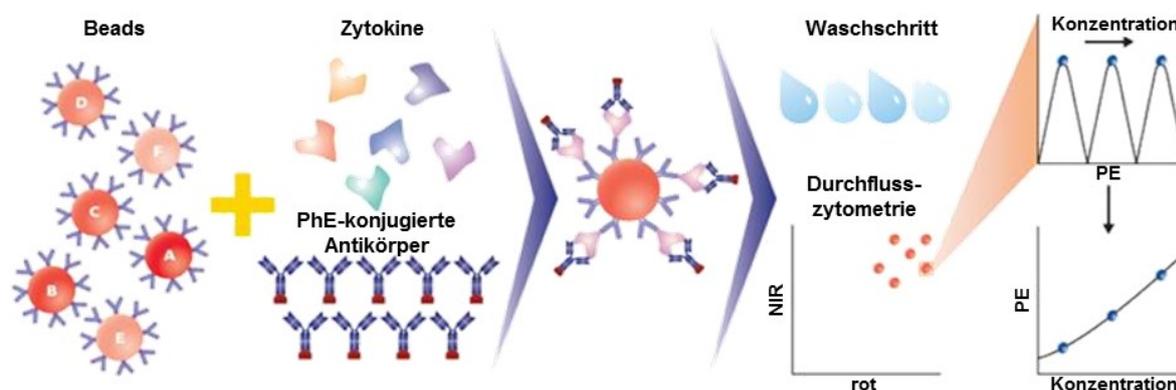
Um zu verfolgen, wie sich intrazelluläre ATP-Konzentrationen nach Stimulation verhalten, wurden Zellextrakte von 24-Well-Zellkulturplatten mit Hilfe der Ethanol-Präzipitation hergestellt. Nach der experimentellen Inkubation wurde das Medium abgesaugt und 500 µl kalter Ethanol zur Zellkulturschale zugegeben, um Zellen zu zerstören und zelluläre Proteine zu denaturieren. Nach vollständigem Abdampfen des Ethanols wurden 200 µl Tris/EDTA-Puffer (Tabelle 21) zugesetzt, um kleinmolekulare Zellbestandteile wie ATP zu lösen. Die denaturierten Zellen wurden in flüssigem Stickstoff gefroren und getaut, um sie vollständig aufzuschließen und anschließend abgeschabt. Die Suspension wurde für 6 min bei 700 x g zentrifugiert, um Zelltrümmer zu sedimentieren. Die ATP-Bestimmung erfolgte aus dem Überstand mit dem ATP-Kit SL von BioTherma. Die erhaltenen Proben wurden zunächst 1:250 in Tris/EDTA-Puffer verdünnt. 800 µl der verdünnten Probenlösungen wurden in je ein Luminometer-Röhrchen gegeben und mit 200 µl ATP-Reagenz, welches Luciferin und *Firefly*-Luciferase enthält, gemischt. Das Substrat Luciferin wird dabei unter Sauerstoff- und ATP-Verbrauch zu einer instabilen Dioxetan-Verbindung oxidiert, welche beim Zerfall Licht als Lumineszenz emittiert. Nach dem Mischen der Komponenten wurde die Lumineszenz gemessen. Der erhaltene Wert korreliert mit dem ATP-Gehalt der Probe. Danach erfolgte die Zugabe von 10 µl ATP-Standardlösung als interner Standard und die Lumineszenz wurde erneut gemessen. Die ATP-Konzentration der Probe wurde aus dem Verhältnis von Lumineszenz der Probe und der Differenz aus Standard und Probe berechnet. Für die Normierung der gemessenen ATP-Konzentrationen wurden parallel gleich behandelte Zellen für eine Proteinbestimmung lysiert. Die Zellen wurden dafür dreimal mit 0,5 ml HEPES-Puffer gewaschen und anschließend in 200 µl Solubilisierungspuffer (Tabelle 21) resuspendiert. Aus diesem Lysat wurden jeweils 50 µl für die Proteinbestimmung entnommen.

**Tabelle 21. Puffer für ATP-Bestimmung**

Puffer	Komponente	Konzentration
Tris/EDTA-Puffer (pH 7,4)	Tris	50 mM
	EDTA	4 mM
Solubilisierungspuffer	NaOH	100 mM
	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1,9 M
	SDS	1 %

#### 2.2.5.4 Zytokin-Bestimmung

Zellen wurden auf 30 mm-Zellkulturschalen ausgesät. 48 h nach Transfektion mit siRNA wurde das Medium abgesaugt und 600 µl frisches Medium zugegeben. Nach weiteren 24 h wurde das Medium abgenommen, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Messung bei -80 °C gelagert. Die Zellen wurden wie in Kapitel 2.2.5.3 beschrieben solubilisiert und der Protein-Gehalt zur Normalisierung bestimmt. Die Messung der Zytokine aus den Zellüberständen erfolgte mittels Multiplex-Methode mit dem „BD Cytometric Bead Array (CBA) Human Soluble Protein Master Buffer Kit“ für IL6, IL8 und MCP1 bzw. mit dem „BD Cytometric Bead Array (CBA) Human Enhanced Sensitivity Master Buffer Kit“ für IL1β und TNFα nach den Angaben des Herstellers (BD Biosciences) (Abbildung 9).



**Abbildung 9. Prinzip der Zytokin-Bestimmung mittels Multiplex-Methode.**

Zytokine der Probe binden an spezifische Bead- und PhE-gekoppelte Antikörper. Die Zytokin-Konzentration wird anhand der Intensität der PhE-Fluoreszenz der entsprechenden Bead-Population quantifiziert. (BD Biosciences, modifiziert).

Bei dieser Methode werden verschiedene Beads mit gekoppelten Antikörpern gegen die zu messenden Zytokine zu den Zellüberständen gegeben. Jeder Antikörper ist dabei an Beads mit spezifischer Größe und Fluoreszenzintensität gekoppelt, sodass die Signale später bei der Durchflusszytometrie voneinander unterschieden werden können. Außerdem erfolgt die Zugabe von Phycoerythrin (PhE)-gekoppelten Antikörpern gegen die zu messenden

Zytokine. Dabei bilden sich Sandwich-Komplexe aus Bead, Zytokin und Antikörper, die dann im Durchflusszytometer ausgewertet werden. Die Intensität der PhE-Fluoreszenz spezifisch für jede Bead-Population ist dem jeweiligen Zytokin-Gehalt proportional. Anhand von mitgeführten Standardreihen wurden die Zytokin-Konzentrationen berechnet und anschließend auf den Proteingehalt normiert.

## 2.2.6 Funktionelle Methoden

### 2.2.6.1 Proliferation (BrdU-Inkorporation)

Für die Analyse der Zellproliferation wurde der Kit *Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric)* von Roche verwendet. BrdU (Bromdesoxyuridin) ist ein Analogon von Desoxythymidin, das während der DNA-Synthese in die DNA der proliferierenden Zellen eingebaut wird. Die Menge des eingebauten BrdU liefert somit eine Aussage über die Anzahl der proliferierenden Zellen.

Zur Analyse wurden HUVEC zunächst auf 60 mm-Zellkulturschalen ausgesät und wie in Kapitel 2.2.2 beschrieben mit siRNA transfiziert. 72 h nach Transfektion wurden die Zellen abgelöst und auf 24-Well-Platten mit einer Zellzahl von 25.000 Zellen/Well ausgesät. 16 h später erfolgte ein Wechsel des Mediums zu serumarmen Medium. Nach weiteren 4 h wurden die Zellen mit 50 ng/ml VEGF stimuliert. Während der letzten 8 h der VEGF-Stimulationszeit wurde den Zellen 10  $\mu$ M BrdU zugesetzt. Die Inkubation wurde durch Entfernen des Mediums durch Ausklopfen der Zellkultur-Platte beendet. Anschließend erfolgten die Fixierung der Zellen nach Angaben des Kit-Herstellers und die Behandlung mit dem Antikörper gegen BrdU für 90 min. Die Zellen wurden dann gewaschen und mit der Substratlösung je nach Geschwindigkeit der Farbentwicklung für 5 bis 30 min inkubiert. Die Farbreaktion wurde durch Zugabe von 40  $\mu$ l 1 M  $H_2SO_4$  und 1 min Schütteln gestoppt. Aus jedem Well wurden 100  $\mu$ l entnommen und in eine 96-Well-Platte überführt. Die Tests wurden in Doppelbestimmung durchgeführt. Die Messung der Extinktion erfolgte bei 450 nm, die Referenzmessung bei 690 nm. Die erhaltenen Werte wurden zu jedem Zeitpunkt auf den Wert der unstimulierten Proben mit Kontroll-siRNA bezogen.

### 2.2.6.2 Zelltod (TUNEL-Färbung)

Die TUNEL (*TdT(terminal desoxynucleotidyl transferase)-mediated dUTP-biotin nick end labeling*)-Färbung ist eine Methode, um apoptotische Zellkerne anzufärben. Für diese Färbung wurde der *ApopTag® Plus Fluorescein In Situ Apoptosis Detection Kit S7111* von Chemicon verwendet. Die Durchführung erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers. Dazu wurden Zellen auf *Coverslips* ausgesät. Nach versuchsspezifischen Behandlungen wurden die Zellen mit HEPES/ $CaCl_2$ -Puffer gewaschen und mit 1 % Paraformaldehyd sowie anschließend mit eiskaltem Ethanol:Essigsäure (2:1) fixiert und permeabilisiert. Nach

Behandlung der Zellen mit Equilibrierungspuffer erfolgte die Inkubation mit dem Enzym terminale Desoxyribonukleotidyltransferase (TdT) für 1 h bei 37 °C in einer feuchten Kammer. Bei diesem Schritt werden Digoxigenin-markierte Nukleotide durch die TdT mit den freien 3'OH-Gruppen der fragmentierten DNA, die in Kernen apoptotischer Zellen entsteht, verknüpft. Anschließend wurden die Zellen mit 50 µl des Fluorescein-markierten Anti-Digoxigenin-Antikörpers für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach viermaligem Waschen mit PBS erfolgte eine Inkubation mit DAPI-Lösung (1 µg/ml) für 10 min. Anschließend wurden die *Coverslips* nochmals zweimal mit PBS gewaschen und auf einem Objektträger fixiert. Die Auswertung erfolgte am Fluoreszenz-Mikroskop. Es wurde das Verhältnis zwischen TUNEL-positiven Zellen und der Gesamtzahl der Zellen (DAPI) gebildet.

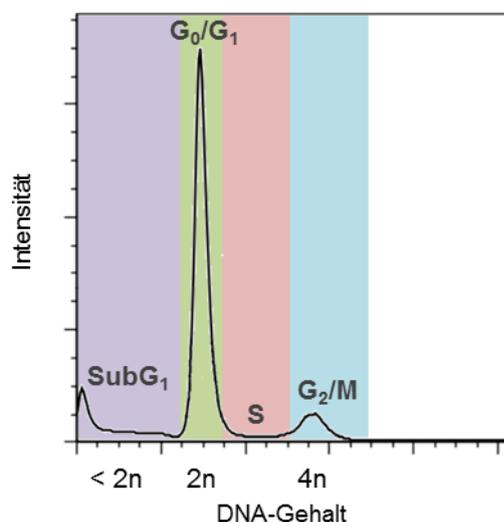
### 2.2.6.3 Zellzyklus-Analyse

Bei dieser Methode wird die DNA der Zellen mit Hilfe von Propidiumiodid angefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die Intensität der Färbung pro Zelle gibt Aufschluss über den DNA-Gehalt. Dadurch kann sowohl Proliferation als auch Zelltod gemessen werden.

HUVEC wurden auf 30 mm-Zellkulturschalen ausgesät, versuchsspezifisch behandelt und wie in Kapitel 2.2.1.2 beschrieben trypsinisiert. Alle Zellüberstände und Waschlösungen, die tote Zellen und Fragmente enthalten können, wurden ebenfalls gesammelt und mit den trypsinisierten Zellen vereint. Nach Zentrifugation (500 x g, 6 min) wurden die Zellen in 1 ml PBS resuspendiert und erneut zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde noch einmal wiederholt. Das Pellet wurde dann in 200 µl eiskaltem PBS resuspendiert und es wurden 2 ml eiskalter 70 %iger Ethanol tropfenweise unter ständigem Schütteln zugegeben, um die Zellen zu fixieren und zu permeabilisieren. Die Zellsuspension wurde dann bei leichtem Schütteln für mindestens 1 h bei 4 °C inkubiert. Danach erfolgten die Zentrifugation der Zellen wie oben beschrieben und die Abnahme des Überstandes. Die Zellen wurden dann zweimal mit 1 ml eiskaltem PBS mit 0,5 % Tween® 20 gewaschen. Um RNA zu entfernen, wurden die Zellen in 100 µl RNase A-Lösung (200 µg/ml in PBS) resuspendiert und für 15 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 100 µl Propidiumiodid-Lösung (150 µg/ml in PBS) zugegeben, gemischt und die Proben für 10 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Danach erfolgte die Messung im Durchflusszytometer.

Abhängig von der Zellzyklusphase, in der sich die Zelle gerade befindet, verändert sich der DNA-Gehalt (Abbildung 10). Die Abszisse gibt den DNA-Gehalt der Zellen an, während die Ordinate die Anzahl der Zellen mit dem entsprechenden DNA-Gehalt widerspiegelt. Der Hauptpeak im linken Teil des Histogramms stellt die ruhenden Zellen in der G<sub>0</sub>- und G<sub>1</sub>-Phase mit einem diploiden DNA-Gehalt von 2n dar. Links davon sind die Partikel, die weniger als 2n DNA haben, dargestellt. Dabei handelt es sich um tote Zellen und

Zellfragmente, die aus dem Zerfall toter Zellen resultieren (SubG<sub>1</sub>). Die Anzahl der gemessenen Partikel in der SubG<sub>1</sub>-Population wurde auf die Gesamtzahl der Partikel im Histogramm bezogen und ist nicht mit dem Anteil an toten Zellen gleichzusetzen. Die Quantifizierung wird dazu eingesetzt, die SubG<sub>1</sub>-Fraktion zwischen einzelnen Versuchsansätzen zu vergleichen. Rechts des G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Peaks sind Zellen, die gerade DNA synthetisieren (S-Phase) und demzufolge einen DNA-Gehalt zwischen 2n und 4n haben. Ein weiterer Peak enthält Zellen mit 4n DNA, die kurz vor der Zellteilung stehen (G<sub>2</sub>-Phase) oder sich gerade teilen (M-Phase). In dieser Arbeit wurden Zellen der S-, G<sub>2</sub>- und M-Phase zusammengefasst und als proliferierende Zellen dargestellt. Für die Darstellung der ruhenden Zellen (G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Phase) sowie der proliferierenden Zellen (S/G<sub>2</sub>/M-Phase) wurde die Anzahl der Zellen in der jeweiligen Phase auf die Gesamtzahl der lebenden Zellen bezogen.



**Abbildung 10. Zellzyklus-Analyse.**

Die Fläche unter den jeweiligen Abschnitten des Histogramms stellt den Anteil der Zellpopulation in den jeweiligen Phasen des Zellzyklus dar.

#### 2.2.6.4 *In vitro*-Angiogenesemessung durch Sphäroid-Assay

Der Sphäroid-Assay ist ein *in vitro*-Angiogenese-Assay, mit dem die Bildung kapillarähnlicher Strukturen aus Endothelzellen in einer Matrix untersucht wird.

##### Vorbereitungen

Autoklavierte Methylzellulose wurde in M199 (24 g/l) für 20 min bei 60 °C gerührt. Anschließend wurde die Lösung auf 12 g/l mit M199 verdünnt und eine weitere Stunde bei Raumtemperatur und anschließend über Nacht bei 4 °C gerührt. Die Lösung wurde dann für 2 h bei 4000 x g zentrifugiert und der Überstand in den Experimenten eingesetzt.

Für das Einbetten der Sphäroide in eine Fibrinmatrix wurde Fibrinogen in einer Konzentration von 5 mg/ml in HEPES/CaCl<sub>2</sub>-Puffer für etwa 4 h bei 37 °C frisch gelöst und anschließend auf eine Konzentration von 1,8 mg/ml mit HEPES/CaCl<sub>2</sub>-Puffer eingestellt. Zusätzlich wurde 200 U/ml Aprotinin zugesetzt, um das spätere Auflösen des Fibringels zu verhindern.

### Durchführung

Für diese Versuche wurden unbehandelte HUVEC oder HUVEC, die 72 h vor Versuchsbeginn mit siRNA transfiziert wurden, genutzt. Die Zellen wurden wie in Kapitel 2.2.1.2 beschrieben trypsinisiert und nach Zentrifugation in 5 ml M199 mit 10 % FKS resuspendiert. Danach erfolgten die Zellzählung in einer Neubauer-Zählkammer und die Verdünnung auf 37.500 Zellen/ml. Zur Zellsuspension wurde gelöste Methylzellulose (12 mg/ml) in einem Verhältnis von 1:5 zugegeben. Nach Mischung der Proben wurden jeweils 100 µl pro Well in einer 96-Well-Platte mit Rundboden und nicht-adhäsiver Oberfläche ausgesät und bis zum nächsten Tag bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Durch die Beschaffenheit der Wells bilden die Endothelzellen keine Zellschicht, sondern formen Sphäroide, deren Struktur durch die Methylzellulose stabilisiert wird. In jedem Well entsteht ein Sphäroid aus ca. 3000 Endothelzellen.

24 h nach Aussaat der Zellen wurden die gebildeten Sphäroide vorsichtig aus den 96-Well-Platten entnommen, in ein 50 ml-Röhrchen überführt und für 4 min bei 200 x g zentrifugiert. Nach vorsichtigem Absaugen des Überstandes wurden Sphäroide in 10 ml warmen Hapes/CaCl<sub>2</sub>-Puffer aufgenommen und erneut zentrifugiert. Anschließend wurden die Sphäroide in eine Fibrinmatrix eingebettet. Die Sphäroide wurden in der wie oben beschrieben hergestellten Fibrinogenlösung aufgenommen. 300 µl dieser Suspension wurden pro Well einer 24-Well-Platte zugesetzt, in dem durch das dort vorgelegte Thrombin (10 µl/Well, 20 U/ml) Fibrinogen in Fibrin umgewandelt wurde. Die Platte wurde gut gemischt und zur Polymerisierung für 20 min bei 37 °C inkubiert. Sobald das Gel fest war, wurden pro Well 350 µl M199 mit 2 % FKS und Glutamin zugegeben und für 20 bis 30 min im Brutschrank inkubiert. Nach 10 bis 15 min wurde das Medium noch einmal gewechselt, um das Thrombin wegzuwaschen. Anschließend wurde das Medium abgesaugt und 300 µl M199 mit 2 % FKS, Glutamin und dem jeweiligen Stimulus/Inhibitor zugegeben. In jedem Well befanden sich 5 bis 30 Sphäroide. Nach der Inkubation für 48 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> erfolgte die Fixierung der Sphäroide. Bei Sphäroid-Experimenten mit Bafilomycin A1 wurden die Sphäroide zur Vermeidung möglicher zytotoxischer Effekte bereits nach 24 h fixiert. Dazu wurde das Medium über dem Fibringel vorsichtig abgesaugt und 1 ml 4 % Paraformaldehyd pro Well zugegeben. Nach der Inkubation für 10 min auf Eis wurde das Paraformaldehyd abgesaugt. Die Wells wurden einmal mit 1 ml kaltem PBS gewaschen und dann mit 1 ml PBS versetzt. Anschließend wurden die Sphäroide an einem Mikroskop (AxioVert 200, Carl Zeiss, 5er Objektiv) mit einer angeschlossenen Digitalkamera fotografiert und mit einer Software von Jenoptik digitalisiert. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des Programms Cell<sup>^</sup>D, mit dem die Anzahl und die Länge der Aussprossungen der Sphäroide gemessen wurde.

## 2.2.6.5 Metabolismus und Autophagie

### 2.2.6.5.1 Fettsäure-Stoffwechsel

Als Maß für die Fettsäureoxidation wird die Oxidation von radioaktiv markierter Palmitinsäure gemessen. Bei der Oxidation der  $^{14}\text{C}$ -Palmitinsäure entstehen 7 unmarkierte und ein  $^{14}\text{C}$ -markiertes Acetyl-CoA, welche im Zitratzyklus zu  $\text{CO}_2$  metabolisiert werden. Das  $\text{CO}_2$ , welches zum Großteil im Medium gelöst ist, wird dann durch Zusatz von Perchlorsäure herausgelöst und in mit NaOH befeuchteten Filterpapieren gefangen, in denen es zu  $\text{NaHCO}_3$  reagiert. Die gemessene Radioaktivität in diesen Filterpapieren ist proportional zur Rate der Palmitat-Oxidation.

#### Komplexierung des Palmitats

Palmitat kommt im Körper nicht frei vor, sondern ist an Albumin gebunden, welches 6 Bindungsstellen für Palmitat aufweist. Um die geplanten Versuche zur Fettsäureoxidation physiologisch zu gestalten, wurde das experimentell eingesetzte Palmitat ebenfalls an Albumin komplexiert. Hierfür wurde das in Ethanol gelöste Palmitat, zunächst in eine wässrige Lösung überführt. Zu einer Mischung aus 105  $\mu\text{l}$  des markierten Palmitats (10,5  $\mu\text{Ci}$ ) und 15  $\mu\text{l}$  des unmarkierten Palmitats (60 mM) wurden unter leichtem Schütteln tropfenweise 120  $\mu\text{l}$  13,55 mM KOH zugegeben. Die erhaltene Lösung wurde im 45 °C-Wasserbad unter Stickstoff auf ein Endvolumen von 60 bis 80  $\mu\text{l}$  eingedampft und dann mit Wasser auf 100  $\mu\text{l}$  aufgefüllt. Diese Lösung wurde anschließend tropfenweise unter leichtem Schütteln zu 400  $\mu\text{l}$  M199 mit 2,5 % fettsäurefreiem BSA gegeben und bei 3000 x g für 10 min zentrifugiert. Diese Stammlösung enthielt 1800  $\mu\text{M}$  unmarkiertes Palmitat und 382  $\mu\text{M}$  bzw. 21  $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$   $^{14}\text{C}$ -markiertes Palmitat. Im Experiment wurde das komplexierte Palmitat in einer Verdünnung von 1:10 den Wells einer 24-Well-Platte zugegeben, was einer Endkonzentration von 2,1  $\mu\text{Ci}/\text{ml}$   $^{14}\text{C}$ -Palmitat entspricht.

#### Messung der Oxidation extrazellulärer Fettsäuren

Für die Messung wurden HUVEC in nicht benachbarten Wells einer 24-Well-Platte ausgesät, um später das Abdecken der Wells zu ermöglichen. Im Aussaatmedium waren zusätzlich 50  $\mu\text{M}$  L-Carnitin, das für den Fettsäuretransport in die Mitochondrien, dem Ort ihrer Oxidation, benötigt wird und 500 pM Biotin als Kofaktor der Acetyl-Coenzym A-Carboxylase (ACC), einem Schlüsselenzym des Fettsäurestoffwechsels, enthalten.

Die Zellen wurden zunächst für 5 h in 200  $\mu\text{l}$  M199 mit 0,25 % fettsäurefreiem BSA, 50  $\mu\text{M}$  L-Carnitin und 500 pM Biotin inkubiert. Anschließend wurden 20  $\mu\text{l}$  des komplexierten Palmitats (2,1  $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ , 38,2  $\mu\text{M}$   $^{14}\text{C}$ -Palmitat) in jedes Well zugegeben, die Wells mit Filterpapier bedeckt und die Abdeckung fixiert. Nach 2 h wurden die Filterpapiere mit 200  $\mu\text{l}$  NaOH (3 M) befeuchtet. Anschließend wurden 30  $\mu\text{l}$  70 %ige Perchlorsäure pro Well mit

einer Hamilton-Spritze zugegeben, um das gebildete CO<sub>2</sub> freizusetzen. Die Proben wurden für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert, um das CO<sub>2</sub> in den Filterpapieren aufzufangen. Diese wurden dann entnommen, getrocknet und in Vials überführt. Nach Zusatz von 2 ml Szintillationslösung wurde die Radioaktivität des aufgefangenen CO<sub>2</sub> mit Hilfe eines *liquid scintillation counter* (LSC) gemessen.

Parallel zum Versuch wurden Zellen in einer separaten 24-Well-Platte den gleichen Behandlungen unterworfen und wie in Kapitel 2.2.5.3 beschrieben mit Solubilisierungspuffer lysiert. Der Proteingehalt der Lysate wurde bestimmt, um die erhaltenen Werte der Fettsäureoxidation normieren zu können.

#### Messung der Oxidation intrazellulärer Fettsäuren

Zellen wurden wie oben beschrieben in Medium mit 50 µM L-Carnitin und 500 pM Biotin in 24-Well-Platten ausgesät. 48 h nach Aussaat wurde das Medium abgesaugt und durch 300 µl Wachstumsmedium mit nur 2 % FKS, 50 µM L-Carnitin, 500 pM Biotin und 100 µl/ml komplexiertem Palmitat (2,1 µCi/ml, 38,2 µM <sup>14</sup>C-Palmitat) ersetzt. Nach 24 h wurden die Zellen zweimal mit M199 gewaschen, um exogenes markiertes Palmitat zu entfernen und 200 µl M199/0,25 % fettsäurefreies BSA mit 50 µM L-Carnitin und 500 pM Biotin zugesetzt. Die Wells wurden mit Filterpapier abgedeckt und für 5 h im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Filterpapiere mit 200 µl NaOH (3 M) befeuchtet und die Zellen durch Zugabe von 30 µl 70 % Perchlorsäure denaturiert, um das gebildete CO<sub>2</sub> freizusetzen. Nach 1 h wurden die Filterpapiere entnommen und deren Radioaktivität mit Hilfe von 2 ml Szintillationslösung gemessen. Zur Normierung erfolgte eine Solubilisierung der Zellen mit nachfolgender Proteinbestimmung von gleich behandelten Zellen analog zu Kapitel 2.2.5.3.

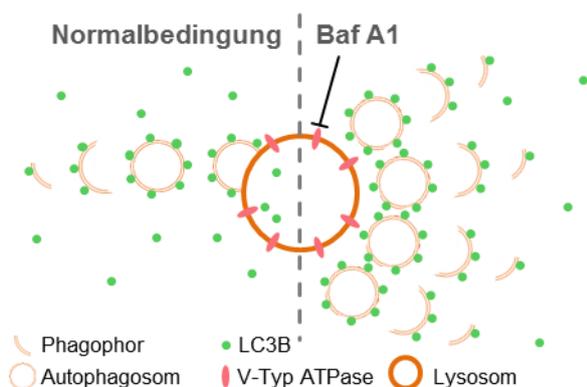
#### **2.2.6.5.2 Autophagie-Flux**

Autophagie-Aktivität kann anhand von Autophagie-Markern, wie konjugiertem LC3B-II oder der p62-Expression in Western-Blot-Analysen gemessen werden. Nach experimentellen Behandlungen wurden Zellen wie in Kapitel 2.2.4.1 lysiert und anschließend im Western-Blot untersucht.

Besonders für LC3B ist eine sorgfältige Interpretation der erhaltenen Daten wichtig. LC3B wird als proLC3B synthetisiert und danach gespalten, um LC3B-I zu bilden, welches eine Bindungsstelle für Phosphatidylethanolamin (PE) aufweist. Diese Spaltung geschieht unter basalen Bedingungen und ist nicht von einer Stimulierung der Autophagie abhängig. Kommt es zu einer Induktion der Autophagie durch einen Stimulus, so wird LC3B-I an PE gebunden und es entsteht die konjugierte Form des Proteins LC3B-II. Während der Autophagie wird das LC3B im Lumen der Autophagosomen abgebaut. Die Expression des konjugierten LC3B-II ist somit ein guter Marker, um Änderungen der Autophagie zu verfolgen. LC3B-I und

LC3B-II lassen sich im Western-Blot detektieren. Dabei bildet das unkonjugierte Protein die obere Bande (16 kDa), konjugiertes LC3B-II ist in der unteren Bande (14 kDa) sichtbar. Es ist bekannt, dass lipidierte Proteine durch ihre Hydrophobizität mehr SDS binden und dadurch während der SDS-PAGE eine höhere Mobilität aufweisen als die nicht-lipidierten Proteine, obwohl ihre Masse größer ist [104].

Die alleinige Betrachtung von Steady-State-Leveln an konjugiertem LC3B kann jedoch zu Fehlinterpretationen führen. Ein Anstieg von LC3B-II kann durch eine gesteigerte Konjugation, aber auch durch einen gehemmten Abbau zustande kommen. Ebenso kann eine Verminderung des Signals durch eine gehemmte Synthese oder einen verstärkten Abbau hervorgerufen werden. Es ist deshalb wichtig, den Autophagie-Flux nach dem Einsatz von lysosomalen Inhibitoren zu messen. In der vorliegenden Arbeit wurde Bafilomycin A1, welches die V-Typ-ATPasen an der Lysosomenmembran hemmt, eingesetzt. Dies geht mit einem Anstieg des lysosomalen pH-Wertes einher und hemmt die Aktivität lysosomaler Proteasen, wodurch es zu einer Akkumulation von LC3B-II kommt [105] (Abbildung 11). Der Vergleich zwischen Proben mit und ohne Bafilomycin A1-Behandlung erlaubt zuverlässige Rückschlüsse über den Autophagie-Flux in Zellen unter experimentellen Bedingungen.



**Abbildung 11. Wirkmechanismus von Bafilomycin A1.**

Durch Hemmung von V-Typ ATPasen steigert Bafilomycin A1 (Baf A1) den lysosomalen pH-Wert, wodurch der lysosomale Abbau und die Fusion der Autophagosomen mit den Lysosomen gehemmt wird, sodass es zur Akkumulation von Autophagosomen kommt.

Ein weiterer Zugang, den Autophagie-Flux zu untersuchen, ist die Analyse der p62-Expression. Dieses Protein ist an der Erkennung von Autophagie-Substraten beteiligt und wird spezifisch über den Autophagie-Weg abgebaut. Veränderungen des Fluxes gehen mit Veränderungen der p62-Expression einher. So führt ein gesteigerter Flux zu einem erhöhten Abbau und damit zu einem Rückgang des Signals von p62, während p62 unter Bedingungen, in denen Autophagie gehemmt ist, akkumuliert.

### 2.2.6.5.3 LC3B-Immunfluoreszenz

Mit Hilfe der LC3B-Immunfluoreszenz können Autophagosomen und Autolysosomen in der Zelle visualisiert werden. Im basalen Zustand ist das LC3B vorwiegend diffus in der Zelle verteilt. Unter Bedingungen, in denen Autophagie stimuliert ist, akkumuliert das LC3B an den

sich bildenden Phagophoren, Autophagosomen und Autolysosomen, welche dann als Punkte in der Zelle sichtbar werden. Die Anzahl der Punkte pro Zelle sowie die Anzahl der Zellen, die solche Punkte aufweisen, dienen zur Beurteilung der Autophagie.

Um LC3B anzufärben, wurden HUVEC auf *Coverslips* ausgesät und nach versuchsspezifischer Behandlung zweimal mit 500 µl eiskaltem PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen durch Zugabe von 500 µl eiskaltem Methanol für 10 min fixiert und permeabilisiert. Nach zweimaligem Waschen mit je 500 µl PBS wurden die Zellen für 30 min in 200 µl PBS mit 1 % BSA-C und 5 % Ziegen Serum blockiert. Anschließend wurden die *Coverslips* zweimal mit 500 µl PBS gewaschen und es erfolgte die Zugabe von 50 µl des LC3B-Antikörpers (1:200 in PBS mit 1 % BSA-C und 5 % Ziegen Serum) für 2 h in einer feuchten Kammer. Ungebundener Antikörper wurde durch zweimaliges Waschen mit 500 µl PBS entfernt. Danach wurden 50 µl des sekundären Antikörpers AlexaFluor 488 (1:500 in PBS mit 1 % BSA-C und 5 % Ziegen Serum) zugegeben und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen wurden anschließend dreimal mit 500 µl PBS gewaschen und für 10 min mit 50 µl DAPI-Lösung (1 µg/ml) gefärbt. Zuletzt wurden die *Coverslips* nochmals dreimal mit 500 µl PBS gewaschen und auf einem Objektträger fixiert. Die Auswertung erfolgte am Fluoreszenzmikroskop.

### **2.2.7 Statistik**

Ergebnisse sind als Mittelwerte aus mehreren Parallelversuchen + SEM dargestellt. Beim Vergleich von 2 Gruppen wurde ein T-Test durchgeführt. Die statistische Auswertung beim Vergleich von mehr als zwei Gruppen erfolgte mittels ANOVA mit PostHoc-Verfahren nach Holm-Sidak. Ein p-Wert kleiner als 0,05 wurde als statistisch signifikant angesehen und entsprechend gekennzeichnet.

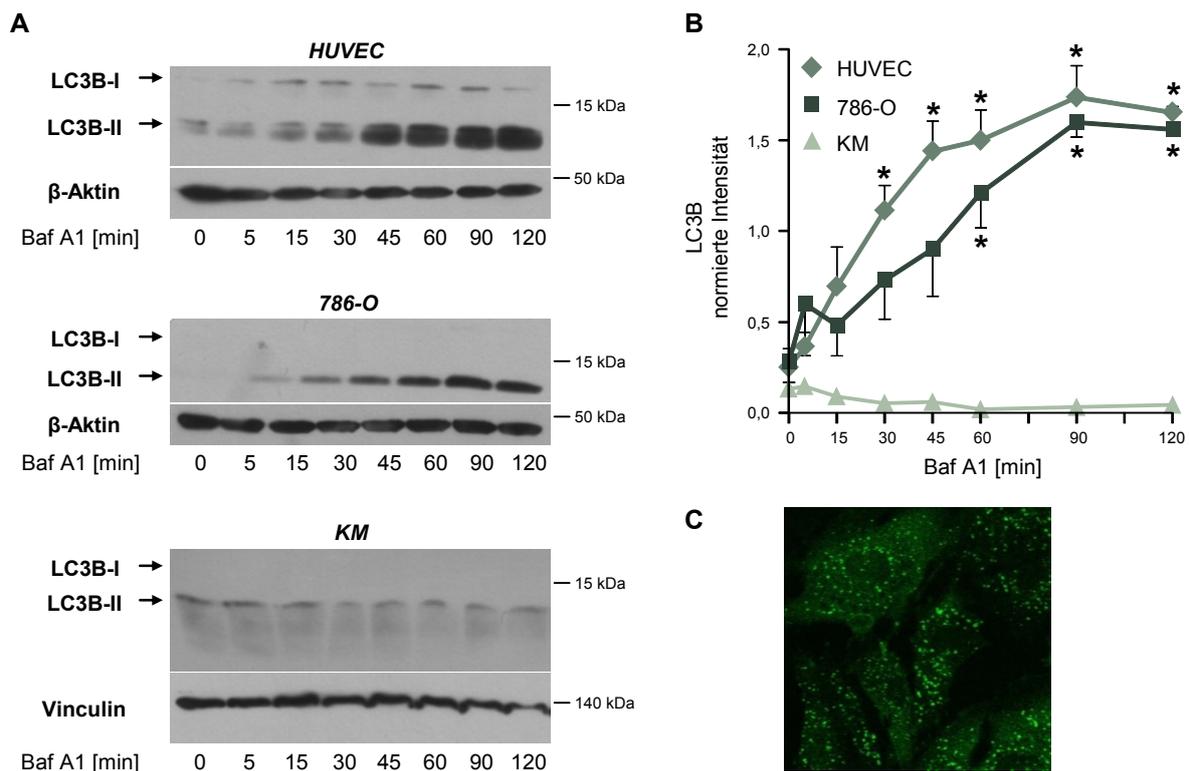
### 3 ERGEBNISSE

#### 3.1 Bedeutung der Autophagie in Endothelzellen unter basalen Bedingungen

Ziel der in diesem Kapitel beschriebenen Experimente war es, die Bedeutung der Autophagie in Endothelzellen unter Ruhebedingungen zu untersuchen. Dabei soll die basale Autophagie beschrieben werden, sowie effiziente Werkzeuge zur Beeinflussung dieses Prozesses identifiziert und der Einfluss der Autophagie-Hemmung auf basale endotheliale Funktionen überprüft werden.

##### 3.1.1 Basale Autophagie

Die erste Fragestellung befasste sich mit der Charakterisierung der Autophagie in Endothelzellen unter basalen Bedingungen. Als Parameter für basale Autophagie diente die Zeit bis zum Erreichen der maximalen Akkumulation von konjugiertem LC3B nach Zusatz von Bafilomycin A1, welches den lysosomalen Abbau hemmt und damit die Akkumulation ermöglicht (Abbildung 12A und B).



**Abbildung 12. HUVEC weisen eine hohe basale Autophagie auf.**

**A+B.** HUVEC, 786-O und Kardiomyozyten (KM) wurden zeitabhängig mit 50 nM Bafilomycin A1 (Baf A1) behandelt. Zellysate wurden mittels Western-Blot analysiert, mit Antikörpern gegen LC3B und β-Aktin bzw. Vinculin angefärbt und die Signale densitometrisch ausgewertet. Dargestellt sind ein repräsentativer Blot (**A**) und die Mittelwerte der Daten mit entsprechendem SEM (**B**). n=1 (KM), n=3 (786-O), n=5 (HUVEC). \* p < 0,05 gegen unstimulierte Kontrolle des gleichen Zelltyps. **C.** Unbehandelte HUVEC wurden mit einem Antikörper gegen LC3B gefärbt und am Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Gezeigt ist ein repräsentatives Bild.

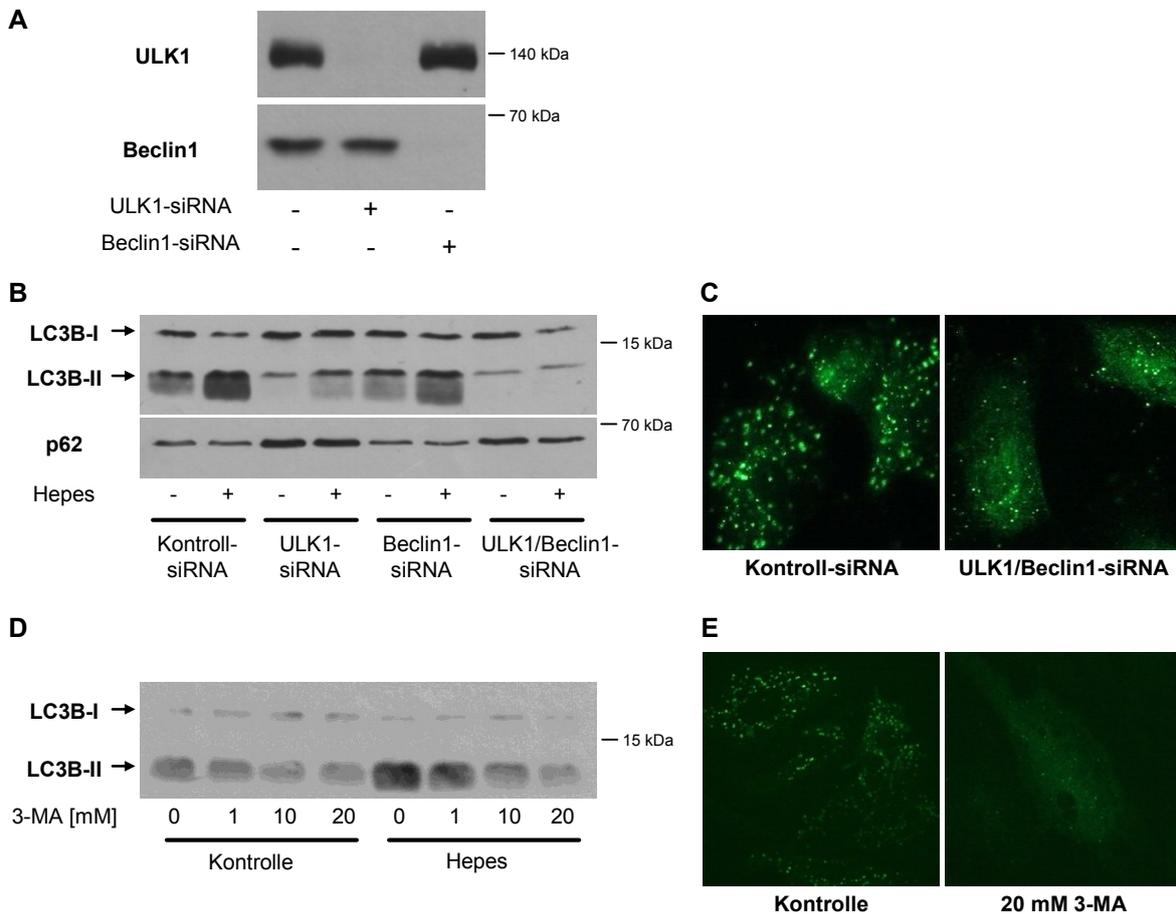
Zum Vergleich wurden die Nierenkarzinom-Zelllinie 786-O als Modell für Tumorzellen, von denen bekannt ist, dass sie eine hohe basale Autophagie aufweisen [106], und primäre Maus-Kardiomyozyten, für die ein sehr langsamer Autophagie-Flux beschrieben ist [107], untersucht. Die Daten zeigen, dass Endothelzellen eine ausgeprägte Autophagie im Ruhezustand aufweisen. In HUVEC war die schnellste Akkumulation von LC3B mit einer Sättigung nach 45 min zu beobachten, während maximale Werte in 786-O-Zellen erst nach 90 min erreicht wurden (Abbildung 12A und B). Dies spricht für einen hohen basalen Autophagie-Flux in Endothelzellen. In Kardiomyozyten, der Negativkontrolle, zeigte sich dagegen bis zu 2 h keine LC3B-Akkumulation. In Übereinstimmung mit den Western-Blot-Daten sind in Endothelzellen unter basalen Bedingungen viele LC3B-positive Puncta zu erkennen, wenn Zellen mittels Immunfluoreszenz analysiert werden (Abbildung 12C). Bei diesen Puncta handelt es sich um Phagophore und Autophagosomen, an denen LC3B akkumuliert. Das Auftreten dieser Strukturen spricht für eine hohe Autophagie-Aktivität.

### **3.1.2 Genetische und pharmakologische Hemmung der Autophagie**

Die basale Autophagie wird als Housekeeping-Mechanismus angesehen, der in verschiedenen Zelltypen eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der intrazellulären Homöostase spielt und eine Akkumulation von geschädigten Proteinen und Organellen verhindert. Zur Relevanz der basalen Autophagie in Endothelzellen liegen bislang jedoch kaum Daten vor. Um dies untersuchen zu können, wurde zunächst getestet, mit welchen experimentellen Maßnahmen Autophagie in Endothelzellen gehemmt werden kann. Dazu wurden die Autophagie-Initiatoren ULK1 und Beclin1 mit Hilfe von siRNA herunterreguliert (Abbildung 13A) oder die Aktivität von VPS34 durch Zusatz des PI3K-Inhibitors 3-Methyladenin (3-MA) in verschiedenen Konzentrationen inhibiert. Die Überprüfung beider Maßnahmen erfolgte nach Aktivierung der Autophagie durch HEPES/CaCl<sub>2</sub>/HSA-Puffer (Serum- und Aminosäure-Entzug, Hungerbedingungen) anhand der Messung von konjugiertem LC3B als Indikator der Autophagosomenbildung sowie anhand des Nachweises von p62, einem Protein, das an der Substraterkennung beteiligt ist und spezifisch über den Autophagieweg abgebaut wird. Abbildung 13B und 13D zeigen, dass es unter Hungerbedingungen wie erwartet zu einem deutlichen Anstieg der LC3B-Konjugation kommt. Wird ULK1 herunterreguliert, ist sowohl die basale als auch die Hunger-induzierte LC3B-Konjugation gehemmt. Auch Beclin1-siRNA führt zu einer geringen Reduktion beider Signale. Die gleichzeitige Herunterregulierung von ULK1 und Beclin1 hemmt die basale LC3B-Konjugation noch stärker und die Hunger-induzierte Autophagie komplett. Parallel dazu ist eine Akkumulation von p62 nach ULK1-siRNA und ULK1/Beclin1-siRNA zu beobachten (Abbildung 13B). Weiterhin zeigt die Immunfluoreszenz-Färbung von LC3B nach ULK1/Beclin1-siRNA im Vergleich zu Kontrollzellen eine deutliche Reduktion der LC3B-

positiven Puncta und eine mehr diffuse Verteilung von LC3B im Zytoplasma (Abbildung 13C). Auch die Behandlung mit 3-MA führt zu einer Verminderung der Autophagie. Abbildung 13D zeigt, dass die basale und die Hunger-induzierte LC3B-Konjugation konzentrationsabhängig durch 3-MA gehemmt werden. Darüber hinaus sind auch nach 3-MA weniger LC3B-positive Strukturen in der Immunfluoreszenz-Färbung zu sehen (Abbildung 13E). Bei 3-MA handelt es sich allerdings um einen generellen PI3K-Inhibitor [108], der auch Autophagie-unabhängige Effekte verursachen kann und deshalb in seiner Aussagekraft limitiert ist.

Die hier vorgestellten Daten zeigen, dass die stärkste Hemmung der Autophagie durch kombinierte Anwendung von ULK1- und Beclin1-siRNA zu erreichen ist, so dass dieser Zugang in den folgenden Experimenten zur Untersuchung der Bedeutung der Autophagie verwendet wurde.



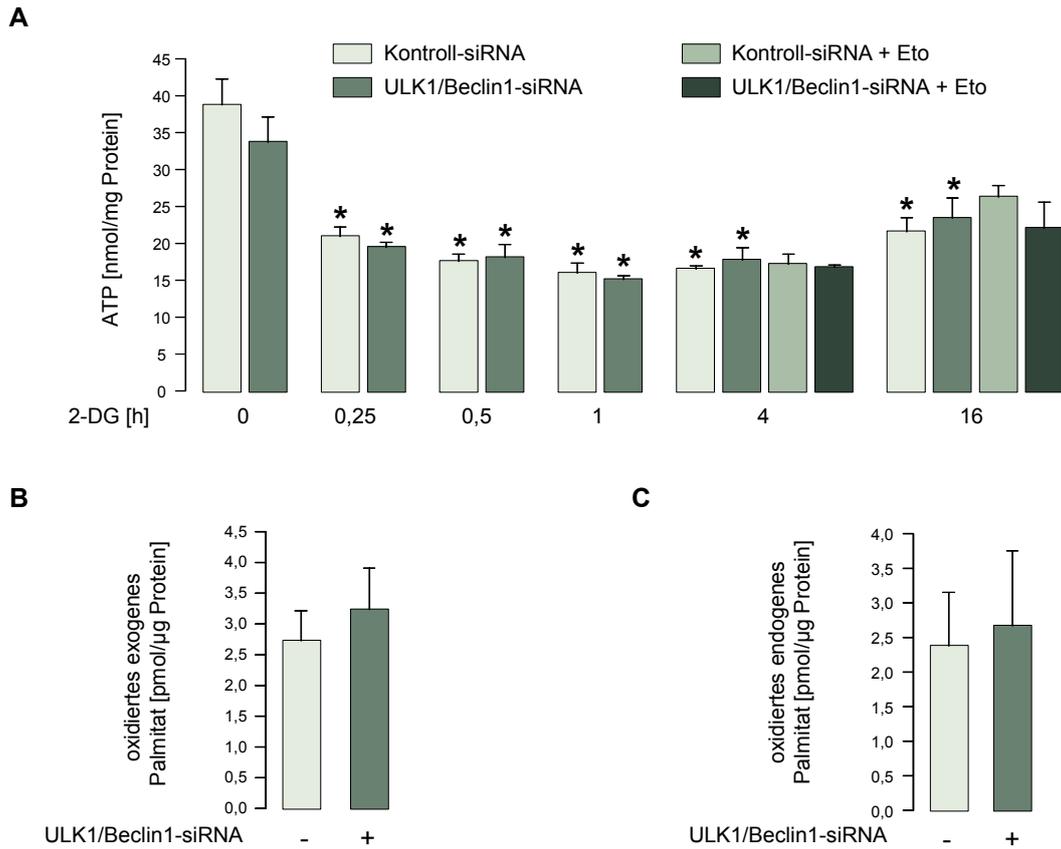
**Abbildung 13. Hemmung der Autophagie durch ULK1- und Beclin1-siRNA bzw. 3-MA.** HUVEC wurden mit Kontroll-siRNA bzw. ULK1- und/oder Beclin1-siRNA transfiziert (A-C) oder für 4 h mit den angegebenen Konzentrationen 3-Methyladenin (3-MA) behandelt (D+E). A. Zellysate wurden im Western-Blot mit spezifischen Antikörpern gegen ULK1 und Beclin1 angefärbt. B+D. Zellen wurden für 30 min mit Hepes/CaCl<sub>2</sub>/HSA-Puffer inkubiert, Zellysate hergestellt und LC3B und p62 mittels spezifischer Antikörper im Western-Blot nachgewiesen. Dargestellt ist jeweils ein repräsentativer Blot. n=2. C+E. Zellen wurden fixiert und mit einem Antikörper gegen LC3B angefärbt und am Fluoreszenzmikroskop analysiert. Dargestellt ist jeweils ein repräsentatives Bild. n=2.

### 3.1.3 Autophagie und intrazelluläre Energie-Homöostase

Nachdem Bedingungen definiert waren, unter denen Autophagie zuverlässig blockiert werden konnte, wurden die Auswirkungen dieser Hemmung auf Endothelzellen untersucht. Eine in der Literatur beschriebene Aufgabe der Autophagie ist die Erhaltung des intrazellulären Energiegleichgewichtes unter basalen Bedingungen und nach Einwirkung von metabolischem Stress. Um die Rolle der Autophagie für die Energiehomöostase in Endothelzellen zu untersuchen, wurden HUVEC mit und ohne Depletion von ULK1 und Beclin1 metabolischem Stress ausgesetzt und intrazelluläre ATP-Spiegel zwischen beiden Bedingungen verglichen. Metabolischer Stress wurde durch 2-DG induziert, einen kompetitiven Inhibitor der Hexokinase, der zu einer deutlichen Hemmung der für die Endothelzellen essentiellen Glykolyse führt.

Abbildung 14A zeigt, dass die Behandlung von Kontrollzellen mit 2-DG bereits nach 15 min zu einem ATP-Abfall führt, dieser nach einer Stunde ein Maximum erreicht und sich der zelluläre ATP-Gehalt danach wieder teilweise erholt. Zellen, die mit ULK1/Beclin1-siRNA behandelt wurden, zeigen den gleichen zeitlichen Verlauf der zellulären ATP-Veränderungen nach 2-DG-Zugabe wie Kontrollzellen. Dies spricht dafür, dass Autophagie in Endothelzellen keine Rolle bei der Wiederherstellung von intrazellulären ATP-Spiegeln nach metabolischem Stress spielt, obwohl sie unter diesen Bedingungen aktiviert ist (siehe Kapitel 3.3.1).

Eine Möglichkeit, einer ATP-Depletion durch Glykolyse-Hemmung entgegen zu wirken, ist eine Erhöhung der Energiegewinnung durch Fettsäureoxidation. ULK1/Beclin1-siRNA führt zu einem leichten, jedoch nicht signifikanten Anstieg der Fettsäureoxidation aus exogenen Quellen (Abbildung 14B), was ein Hinweis darauf sein könnte, dass prinzipiell ein Verlust der Autophagie-Leistung durch einen Anstieg der Fettsäureoxidation kompensiert werden kann, um basale ATP-Spiegel aufrecht zu erhalten. Allerdings ist keine Veränderung der Fettsäureoxidation aus intrazellulären Quellen zu beobachten (Abbildung 14C), was darauf hindeutet, dass Autophagie keine Fettsäuren zur Energiegewinnung bereitstellt. Insgesamt scheint eine Erhöhung der Fettsäureoxidation auch nicht an der Erholung der ATP-Spiegel unter 2-DG-Behandlung beteiligt zu sein. Eine Hemmung des Transports von Fettsäuren in die Mitochondrien, dem Ort ihrer Oxidation, durch Etomoxir hat keinen Einfluss auf die ATP-Veränderungen (Abbildung 14A), so dass hier vermutlich andere Energiequellen, wie zum Beispiel Glutamin, eine Rolle spielen.



**Abbildung 14. Autophagie hat keinen Einfluss auf basale und stress-induzierte Veränderungen der ATP-Spiegel.**

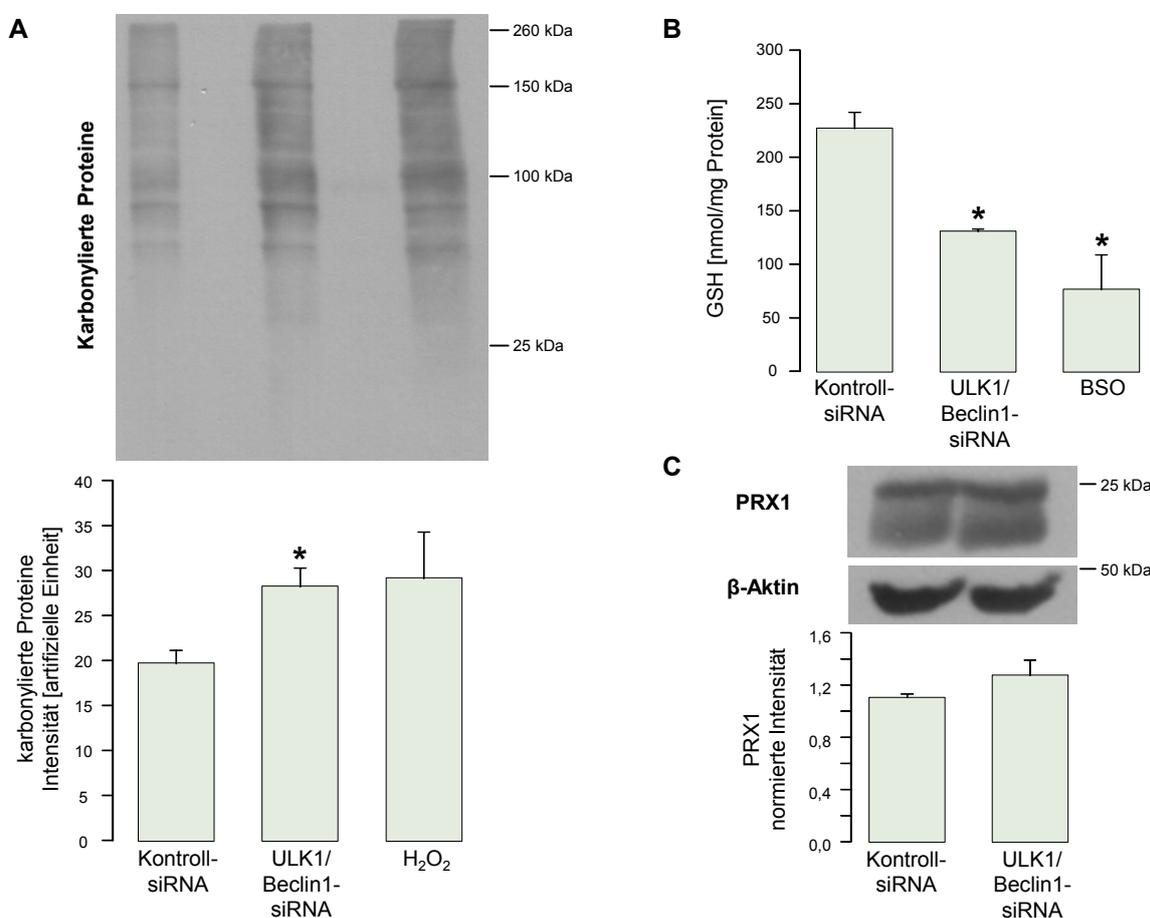
Zellen wurden mit Kontroll-siRNA bzw. ULK1- und Beclin1-siRNA transfiziert. **A.** Medium wurde erneuert und die Zellen wurden zeitabhängig mit 20 mM 2-Deoxyglukose (2-DG) und zusätzlich für die angegebenen Zeiten mit 100 µM Etomoxir (Eto) behandelt. Zellextrakte wurden hergestellt und intrazelluläre ATP-Spiegel gemessen. n=3, \* p<0,05 gegen unstimulierte Kontrolle der gleichen siRNA-Bedingung. **B.** Zellen wurden für 2 h mit <sup>14</sup>C-Palmitat inkubiert. Das während der Fettsäureoxidation gebildete <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> wurde auf Filterpapieren fixiert und die Radioaktivität gemessen. n=6. **C.** Zellen wurden 24 h mit <sup>14</sup>C-Palmitat inkubiert, um intrazelluläre Fettsäuren zu markieren. Überschüssiges <sup>14</sup>C-Palmitat wurde gewaschen. <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> wurde auf Filterpapieren fixiert und die Radioaktivität gemessen. n=4. Dargestellt sind die Mittelwerte der Daten mit entsprechendem SEM.

### 3.1.4 Einfluss von Autophagie auf Stressparameter

#### Oxidativer Stress

Als Nächstes wurde der Redoxzustand der Zellen nach Hemmung der Autophagie charakterisiert. Abbildung 15A zeigt, dass die Behandlung der Zellen mit ULK1/Beclin1-siRNA zu einem Anstieg der Proteinkarboxylierung führt. Dabei waren die Karboxylierungssignale fast genauso stark ausgeprägt wie nach Zusatz von 200 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, welches als Positivkontrolle diente. Diese Daten weisen auf einen deutlichen Anstieg von oxidativem Stress bei gehemmter Autophagie hin. Um dies zu untermauern, wurden GSH-Spiegel in den Zellen gemessen. GSH ist ein antioxidatives Tripeptid, das als Radikalfänger dient und nach Oxidation vom Monomer GSH in eine dimere Form Glutathiondisulfid (GSSG) übergeht. Abbildung 15B zeigt, dass es nach Hemmung der Autophagie zu einer

signifikanten Reduktion von intrazellulären GSH-Spiegeln kommt. Dies ist ein weiteres Anzeichen dafür, dass in diesen Zellen eine vermehrte ROS-Bildung auftritt. Ein gleichzeitiger Anstieg der oxidierten Form GSSG konnte nicht nachgewiesen werden. Die Konzentrationen von GSSG in Endothelzellen waren insgesamt zu niedrig und konnten somit nur unzuverlässig detektiert werden. Als Positivkontrolle in den Experimenten zur GSH-Messung diente Buthionin-Sulfoximin (BSO), welches die GSH-Synthese hemmt und zu einem deutlichen Abfall von GSH-Spiegeln in der Zelle führt. Die verminderten GSH-Spiegel in ULK1/Beclin1-siRNA-behandelten Zellen unterstreichen, dass eine Hemmung der Autophagie zu oxidativem Stress in der Zelle führt und lassen vermuten, dass umgekehrt Autophagie Endothelzellen vor oxidativen Schädigungen schützt.



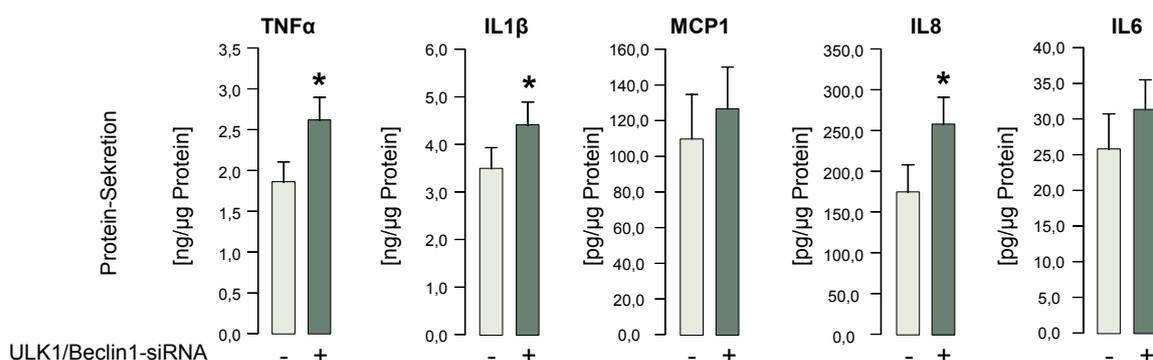
**Abbildung 15. Hemmung der Autophagie führt zu oxidativem Stress.**

Zellen wurden mit Kontroll-siRNA bzw. ULK1- und Beclin1-siRNA transfiziert. **A.** Die Positivkontrolle wurde für 3 h mit 200  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stimuliert. Karbonylierte Proteine im Zelllysate wurden mittels 2,4-Dinitrophenylhydrazin derivatisiert und mit einem spezifischen Antikörper gegen diese Derivate angefärbt. Dargestellt sind ein repräsentativer Blot und die Mittelwerte der densitometrischen Auswertung mit SEM. n=4. **B.** Die Positivkontrolle wurde für 12 h mit 100  $\mu$ M Buthionin-Sulfoximin (BSO) behandelt. Zellen wurden lysiert und GSH-Spiegel mittels 5-Thio-2-Nitrobenzoesäure-Bildung gemessen. Gezeigt sind die Mittelwerte der Daten mit SEM. n=3. (Bestimmung der GSH-Spiegel in Kooperation mit Prof. Dr. Lars-Oliver Klotz). **A+B.** \* p<0,05 gegen Kontroll-siRNA. **C.** Zellen wurden lysiert und die PRX1-Expression im Western-Blot nachgewiesen. Ein repräsentativer Blot und die Mittelwerte der Daten mit SEM sind dargestellt. n=3.

Autophagie scheint jedoch kaum das antioxidative System zu beeinflussen. Zumindest war die Expression von Peroxiredoxin1 (PRX1), einem wichtigen Protein der antioxidativen Verteidigung, durch ULK1/Beclin1-siRNA nicht verändert (Abbildung 15C). Weitere antioxidative Proteine müssen jedoch noch untersucht werden.

### Inflammatorischer Stress

Die Auswirkung der Hemmung der Autophagie auf inflammatorische Parameter der Endothelzellen wurde anhand der Zytokinbildung in unstimulierten Zellen mittels Multiplex-Analyse untersucht. Abbildung 16 zeigt eine signifikant erhöhte Sekretion von TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$  und IL8 in Zellen, in denen Autophagie durch Herunterregulierung von ULK1 und Beclin1 gehemmt war. Die Spiegel von MCP1 und IL6 im Medium waren ebenfalls leicht erhöht. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Hemmung der Autophagie die Entwicklung eines inflammatorischen Phänotyps in Endothelzellen initiiert.

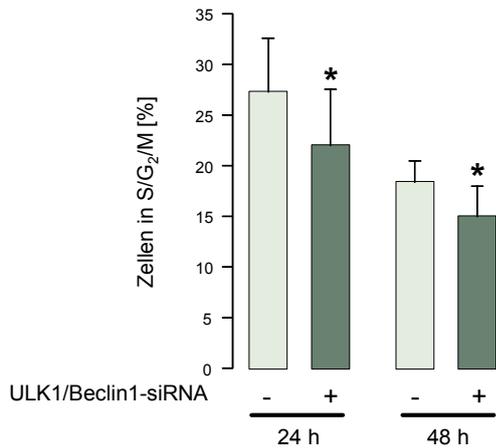


**Abbildung 16. Hemmung der Autophagie führt zu inflammatorischem Stress.**

Zellen wurden mit Kontroll-siRNA bzw. ULK1- und Beclin1-siRNA transfiziert. Medium wurde gewechselt und für 24 h inkubiert. Die in das Medium sezernierten Zytokine wurden mittels Multiplex-Methode im Durchflusszytometer quantifiziert (Multiplex-Messung durchgeführt von Marko Gröger). Zellen wurden lysiert und der Proteingehalt zur Normalisierung der Zytokindaten bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte der Daten mit SEM. n=5, \* p<0,05 gegen Kontroll-siRNA.

### **3.1.5 Bedeutung der Autophagie für endotheliale Proliferation**

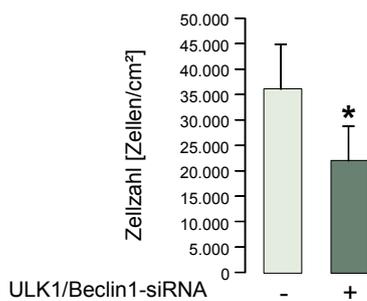
Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob der erhöhte oxidative und inflammatorische Stress in Autophagie-defizienten Endothelzellen Wachstum und Überleben der Zellen beeinflusst. Als Parameter für Proliferation diente die Zahl der Zellen, die sich in den S-, G<sub>2</sub>- und M-Phasen des Zellzyklus befanden bzw. die Gesamtzellzahl nach manueller Zählung der Zellen. Zellzyklusuntersuchungen zeigen, dass die Zahl der proliferierenden Zellen 24 und 48 h nach Transfektion mit ULK1/Beclin1-siRNA im Vergleich zur Kontrolle vermindert ist (Abbildung 17).



**Abbildung 17. Hemmung der Autophagie vermindert basale Proliferation.**

Zellen wurden mit Kontroll-siRNA bzw. ULK1- und Beclin1-siRNA transfiziert und für 24 h bzw. 48 h inkubiert. Danach wurden die Zellen abgelöst, fixiert und mit Propidiumiodid gefärbt. Proliferierende Zellen in S/G<sub>2</sub>/M-Phase wurden quantifiziert und der prozentuale Anteil der Zellen in S/G<sub>2</sub>/M-Phase auf die Gesamtzahl lebender Zellen bezogen. Dargestellt sind die Mittelwerte der Daten mit SEM. n=4. \* p<0,05 gegen Kontroll-siRNA. (Propidiumiodid-Färbung und Durchflusszytometrie durchgeführt von Nderim Kryeziu).

Dieser Effekt wird bestätigt, wenn man die Zellen 72 h nach Transfektion mit ULK1/Beclin1-siRNA ablöst und zählt. Abbildung 18 zeigt eine 44 %ige Reduktion der Zellzahl nach Hemmung der Autophagie.

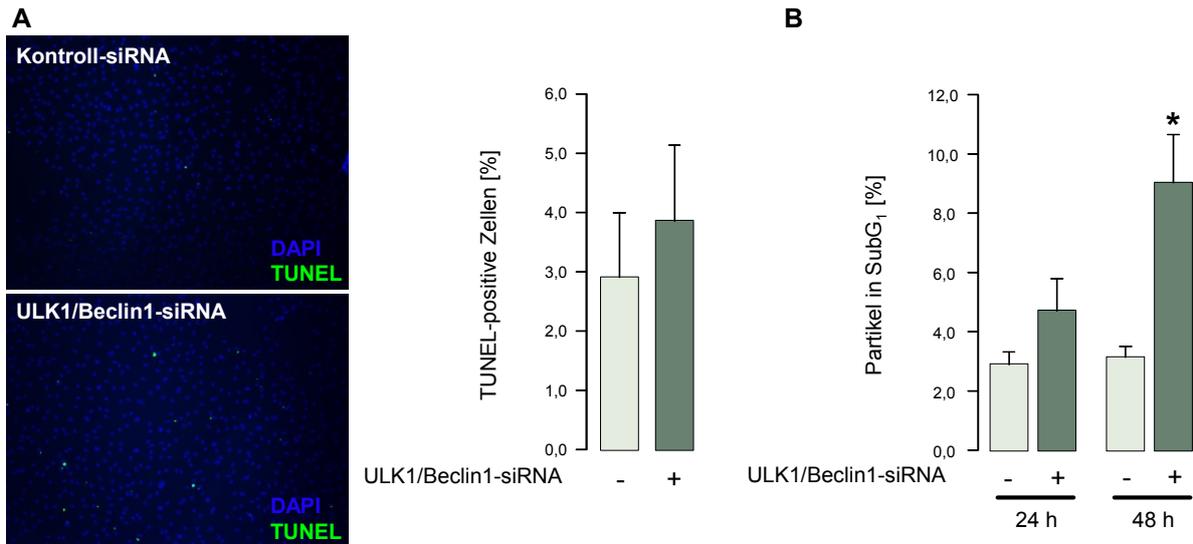


**Abbildung 18. Hemmung der Autophagie reduziert die Zellzahl.**

Zellen wurden mit Kontroll-siRNA bzw. ULK1- und Beclin1-siRNA transfiziert. Danach wurden die Zellen abgelöst und gezählt. Die erhaltenen Werte wurden auf die Größe des Zellkulturgefäßes normalisiert. Dargestellt sind die Mittelwerte der Daten mit SEM. n=7, \* p<0,05 gegen Kontroll-siRNA.

### 3.1.6 Einfluss der Autophagie auf das Überleben von Endothelzellen

Parallel wurde untersucht, ob und inwieweit die Erhöhung von oxidativem und inflammatorischem Stress nach Autophagie-Hemmung das Überleben von Endothelzellen beeinflusst. Der Zelltod wurde zunächst mittels TUNEL-Färbung analysiert, um apoptotische Zellen zu quantifizieren. In Abbildung 19A ist zu erkennen, dass nach Hemmung der Autophagie ein Trend zum Anstieg von apoptotischen Zellen zu beobachten ist. Mit dieser immunhistochemischen Methode werden jedoch nur die adhärenenten, nicht aber die bereits abgelösten apoptotischen Zellen analysiert. Deshalb wurde die Analyse der SubG<sub>1</sub>-Population in der Durchflusszytometrie als zweite Methode zum Nachweis des Zelltodes hinzugezogen. Damit können sowohl trypsinierte adhärenente Zellen als auch Zellen sowie Zellfragmente aus dem Überstand detektiert werden. Partikel, die in der SubG<sub>1</sub>-Population detektiert werden, haben weniger als 2n DNA-Gehalt und werden damit als tote Zellen oder Zellfragmente definiert. Abbildung 19B zeigt, dass die Anzahl der Partikel in der SubG<sub>1</sub>-Population bereits 24 h nach Transfektion mit ULK1- und Beclin1-siRNA leicht ansteigt. 48 h nach Transfektion gibt es einen deutlichen, signifikanten Anstieg.



**Abbildung 19. Hemmung der Autophagie führt zum Zelltod.**

Zellen wurden mit Kontroll-siRNA bzw. ULK1- und Beclin1-siRNA transfiziert. **A.** Apoptotische Zellen wurden mittels TUNEL-Färbung sichtbar gemacht und am Fluoreszenzmikroskop analysiert. Das Verhältnis aus TUNEL-positiven und Gesamtzellen (DAPI) wurde ausgewertet. Dargestellt sind ein repräsentatives Bild und die Mittelwerte der Daten mit entsprechendem SEM. n=2. **B.** Zellen wurden abgelöst, fixiert und mit Propidiumiodid gefärbt. Zellpartikel mit weniger als 2n DNA-Gehalt (SubG<sub>1</sub>) wurden mittels Durchflusszytometrie quantifiziert. Die Anzahl der Zellen und Zellfragmente in der SubG<sub>1</sub>-Population wurde auf die Gesamtzahl gemessener Partikel im Histogramm normiert. Dargestellt sind die Mittelwerte der normierten Daten mit SEM. n=4, \* p<0,05 gegen Kontroll-siRNA. (Propidiumiodid-Färbung und Durchflusszytometrie durchgeführt von Nderim Kryeziu).

Diese Daten demonstrieren, dass Hemmung der Autophagie Proliferation vermindert und Zelltod induziert. Möglicherweise ist dies auf erhöhten zellulären Stress und damit verbundene Schädigungen zurückzuführen.

Zusammenfassend konnte im ersten Kapitel des Ergebnisteils gezeigt werden, dass Endothelzellen über ein ausgeprägtes Maß an basaler Autophagie verfügen und dass dies für die zelluläre Homöostase und die Verhinderung oder Reduktion von intrazellulärem Stress und das Überleben der Zellen von großer Bedeutung ist. Bei der Aufrechterhaltung der Energiehomöostase in Endothelzellen scheint Autophagie nur eine untergeordnete Rolle zu spielen.

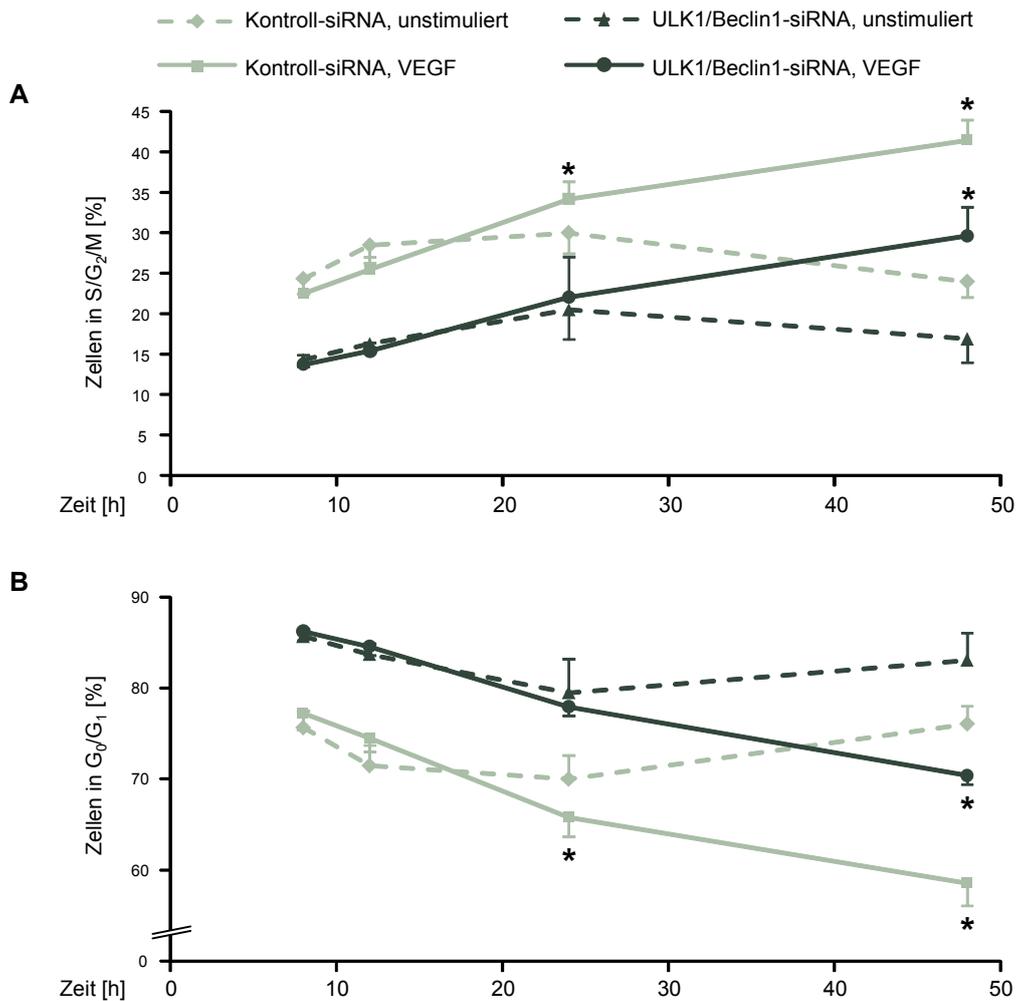
## 3.2 Bedeutung der Autophagie für VEGF-induzierte Angiogenese

Neben der Aufrechterhaltung der endothelialen und damit der vaskulären Homöostase unter basalen Bedingungen ist die Angiogenese eine wichtige und sehr komplexe Funktion von Endothelzellen, die durch Wachstumsfaktoren stimuliert wird. Der bedeutendste Wachstumsfaktor ist VEGF. Um Angiogenese zu gewährleisten, bedarf es einer gut abgestimmten Regulierung von VEGF-induzierten Signalwegen, die zelluläre Prozesse wie zum Beispiel Proliferation und das Überleben der Zellen stimulieren. In dem folgenden Kapitel wurde deshalb der Einfluss der Autophagie auf diese Signalwege und zellulären Vorgänge sowie deren Auswirkung auf den gesamten Prozess der Angiogenese charakterisiert.

### 3.2.1 Proliferation

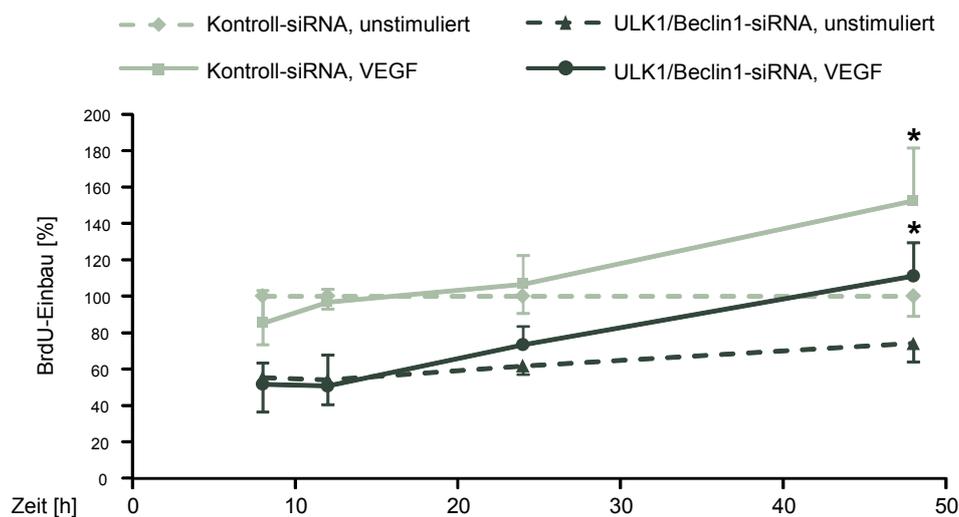
Zunächst wurde das Proliferationsverhalten in VEGF-stimulierten Endothelzellen nach Hemmung der Autophagie untersucht. Dazu wurden zwei verschiedene Assays eingesetzt: die Zellzyklusanalyse nach Propidiumiodid-Färbung der DNA und der BrdU-Assay. Im Gegensatz zu den in Abbildung 17 gezeigten Versuchen, wurden die hier vorgestellten Experimente in serumarmem Medium durchgeführt, um VEGF-Effekte besser darzustellen. Zusätzlich wurden die Zellen in diesen Versuchen insgesamt länger mit ULK1/Beclin1-siRNA inkubiert, um sie mit dem Zeitverlauf der Angiogenese-Versuche (Kapitel 3.2.4) vergleichbarer zu machen.

In der Zellzyklus-Analyse wurde der prozentuale Anteil der Zellen, die sich in der S-, G<sub>2</sub>- und M-Phase befinden, also erhöhten DNA-Gehalt aufweisen, als Parameter für proliferierende Zellen quantifiziert. Abbildung 20A zeigt, dass dieser Anteil in Kontrollzellen etwa 24 % beträgt und im Verlauf bis 24 h nach Aussaat leicht zu- und danach wieder abnimmt. Letzteres ist vermutlich auf die Verwendung von serumarmem Medium zurückzuführen. VEGF führt zu einem deutlichen Anstieg der Zellen in S-, G<sub>2</sub>- und M-Phase, der nach 48 h Stimulierung besonders ausgeprägt ist (Abbildung 20A). Nach Hemmung der Autophagie durch Einsatz von ULK1/Beclin1-siRNA ist der Anteil der Zellen in S-, G<sub>2</sub>- oder M-Phase unter basalen Bedingungen niedriger als in Autophagie-kompetenten Zellen (14,3 %), ähnlich wie in den Experimenten, die bereits in Kapitel 3.1.5 gezeigt wurden. VEGF führt zu einem Anstieg proliferierender Zellen, der prozentual mit dem VEGF-Effekt in Kontrollzellen vergleichbar ist, jedoch nicht das Niveau der Kontrollzellen erreicht. Betrachtet man die ruhenden Zellen in der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Phase, so ist eine gegensätzliche Wirkung von VEGF, d.h. eine Verminderung zu sehen. Das Ausmaß dieser Verminderung in Autophagie-defizienten Zellen entspricht dem in Kontrollzellen, findet jedoch auf einem verschobenen Niveau statt (Abbildung 20B).



**Abbildung 20. Hemmung der Autophagie beeinflusst vor allem die basale Proliferation.** Zellen wurden mit Kontroll-siRNA bzw. ULK1- und Beclin1-siRNA transfiziert. Nach 72 h wurden sie in neue Zellkulturgefäße ausgesät. Nach weiteren 16 h wurden Zellen für 4 h in serumarmen Medium inkubiert und anschließend für die angegebenen Zeiten mit 50 ng/ml VEGF stimuliert. Zellen wurden abgelöst, fixiert und mit Propidiumiodid gefärbt. Anhand der Intensität der Propidiumiodid-Färbung pro Zelle wurde der DNA-Gehalt bestimmt und auf die Zellzyklus-Phase geschlossen. **A.** Prozentualer Anteil der Zellen in S/G<sub>2</sub>/M-Phase bezogen auf die Gesamtzahl lebender Zellen. **B.** Prozentualer Anteil der Zellen in G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Phase bezogen auf die Gesamtzahl lebender Zellen. Gezeigt sind die Mittelwerte der normierten Daten mit entsprechendem SEM. n=4, \* p<0,05 gegen 8 h-Wert bei Vergleich der VEGF-stimulierten Werte (Differenz zu unstimulierten Werten) zwischen Kontroll- und ULK1/Beclin1-siRNA-Behandlung. (Propidiumiodid-Färbung und Durchflusszytometrie durchgeführt von Nderim Kryeziu).

Im BrdU-Assay ist ein Anstieg des BrdU-Einbaus in die DNA von Kontrollzellen nach 48 h VEGF-Stimulierung zu beobachten (Abbildung 21). Nach Hemmung der Autophagie durch ULK1/Beclin1-siRNA sinkt der basale BrdU-Einbau zu allen untersuchten Zeiten ab. Ähnlich wie bei der Zellzyklusanalyse ist auch hier erkennbar, dass VEGF den BrdU-Einbau trotz Hemmung der Autophagie stimuliert, jedoch alle Werte auf einem niedrigeren Niveau liegen als in den entsprechenden Kontrollzellen.

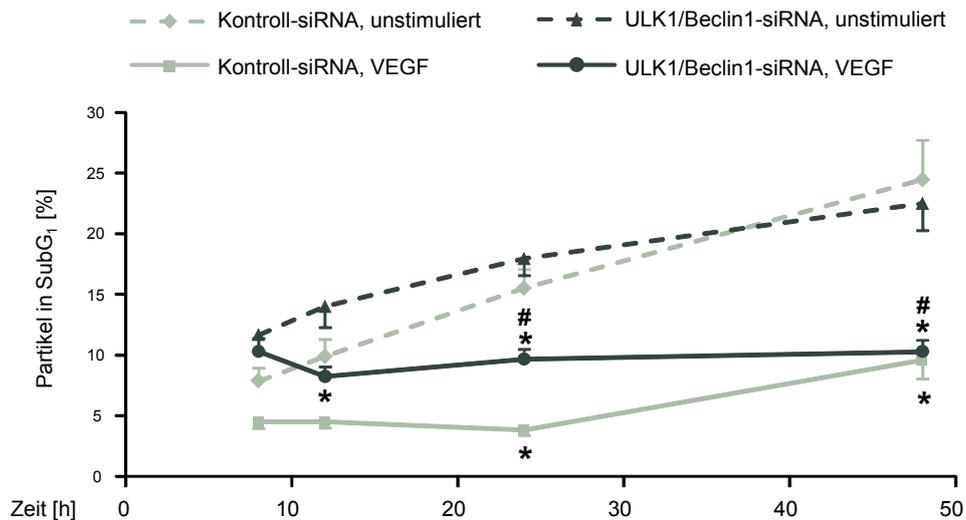


**Abbildung 21. ULK1/Beclin1-siRNA hat keinen Einfluss auf VEGF-induzierte BrdU-Inkorporation.**

Zellen wurden mit Kontroll-siRNA bzw. ULK1- und Beclin1-siRNA transfiziert. Nach 72 h wurden sie in neue Zellkulturgefäße ausgesät. Nach weiteren 16 h wurden Zellen für 4 h in serumarmen Medium inkubiert und anschließend für die angegebenen Zeiten mit 50 ng/ml VEGF stimuliert. 8 h vor Ablauf der VEGF-Stimulation wurde den Zellen 10  $\mu$ M BrdU zugesetzt. Anschließend wurde die Intensität des BrdU-Einbaus als Maß für Proliferation mit dem Kit *Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric)* gemessen. Die erhaltenen Werte wurden zu jedem Zeitpunkt auf den jeweiligen Wert der mit Kontroll-siRNA behandelten unstimulierten Proben bezogen. Gezeigt sind die Mittelwerte der normierten Daten mit entsprechendem SEM.  $n=3$ , \*  $p<0,05$  gegen 8 h-Wert bei Vergleich der VEGF-stimulierten Werte (Differenz zu unstimulierten Werten) zwischen Kontroll- und ULK1/Beclin1-siRNA-Behandlung.

### 3.2.2 Überleben

Die Quantifizierung apoptotischer Zellen erfolgte in Zellzyklusanalysen anhand des Anteils von Partikeln in der SubG<sub>1</sub>-Population. Auch diese Experimente wurden im serumarmen Medium durchgeführt. Abbildung 22 zeigt, dass der Anteil von toten Zellen und Zellfragmenten in unbehandelten Kontrollzellen im Beobachtungszeitraum ansteigt. Nach VEGF-Stimulierung ist der Anteil toter Zellen zu allen Zeitpunkten deutlich niedriger und ein zeitabhängiger Anstieg des Zelltodes kaum zu sehen. Die Behandlung der Zellen mit ULK1/Beclin1-siRNA führt zu einer leichten Erhöhung des Anteils von Zellen in der SubG<sub>1</sub>-Population im Vergleich zu Kontrollbedingungen nach 8, 12 und 24 h, jedoch nicht nach 48 h. Auch in Autophagie-defizienten Zellen fördert VEGF das Überleben der Zellen und verhindert den zeitabhängigen Anstieg des Zelltodes.

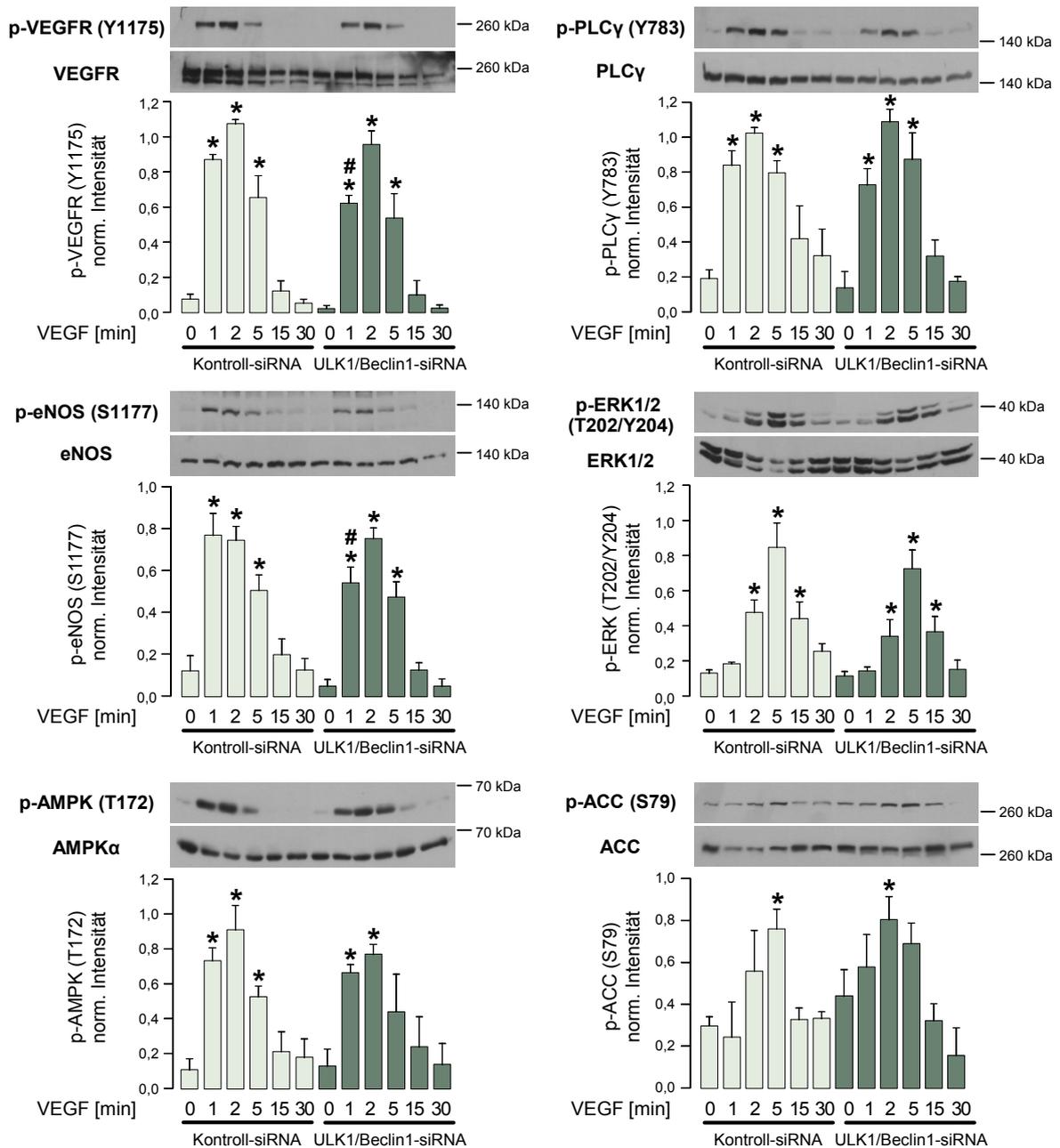


**Abbildung 22. Hemmung der Autophagie vermindert das Überleben.**

Zellen wurden mit Kontroll-siRNA bzw. ULK1- und Beclin1-siRNA transfiziert. Nach 72 h wurden die Zellen in neue Zellkulturgefäße ausgesät. Nach weiteren 16 h wurden Zellen für 4 h in serumarmen Medium inkubiert und anschließend für die angegebenen Zeiten mit 50 ng/ml VEGF stimuliert. Danach wurden sie abgelöst, fixiert und mit Propidiumiodid gefärbt. Zellpartikel mit weniger als 2n DNA-Gehalt (SubG<sub>1</sub>) wurden mittels Durchflusszytometrie quantifiziert. Die Anzahl der Zellen und Zellfragmente in der SubG<sub>1</sub>-Population wurde auf die Gesamtzahl gemessener Partikel im Histogramm normiert. Dargestellt sind die Mittelwerte der normierten Daten mit SEM. n=6, \* p<0,05 gegen 8 h-Wert bei Vergleich der VEGF-stimulierten Werte (Differenz zu unstimulierten Werten) zwischen Kontroll- und ULK1/Beclin1-siRNA-Behandlung; # p<0,05 gegen Kontroll-siRNA-behandelte Probe bei Vergleich der VEGF-stimulierten Werte zum jeweiligen Zeitpunkt. (Propidiumiodid-Färbung und Durchflusszytometrie durchgeführt von Nderim Kryeziu).

**3.2.3 VEGF-Signalwege**

VEGF induziert Angiogenese über verschiedene Signalwege. Um herauszufinden, ob diese Signalwege durch Autophagie beeinflusst werden, wurde die Phosphorylierung verschiedener Proteine nach VEGF-Stimulierung in Kontrollzellen und in mit ULK1- und Beclin1-siRNA behandelten Zellen verglichen (Abbildung 23). Die Untersuchung der Phosphorylierung des VEGFR2 sollte Auskunft darüber geben, ob schon am Beginn der Signalkaskade Veränderungen auftreten. Weiterhin wurden ERK1/2- und AMPK/ACC-Signalwege untersucht, durch die es zu Veränderungen von Genexpression, Proliferation und Metabolismus kommen könnte. Darüber hinaus wurden PLCγ und eNOS analysiert, die Permeabilität und Migration regulieren. In Abbildung 23 ist zu sehen, dass ULK1/Beclin1-siRNA die VEGF-induzierte Phosphorylierung der untersuchten Signalproteine kaum verändert, wobei VEGFR2- und eNOS-Phosphorylierung leicht verzögert auftreten.



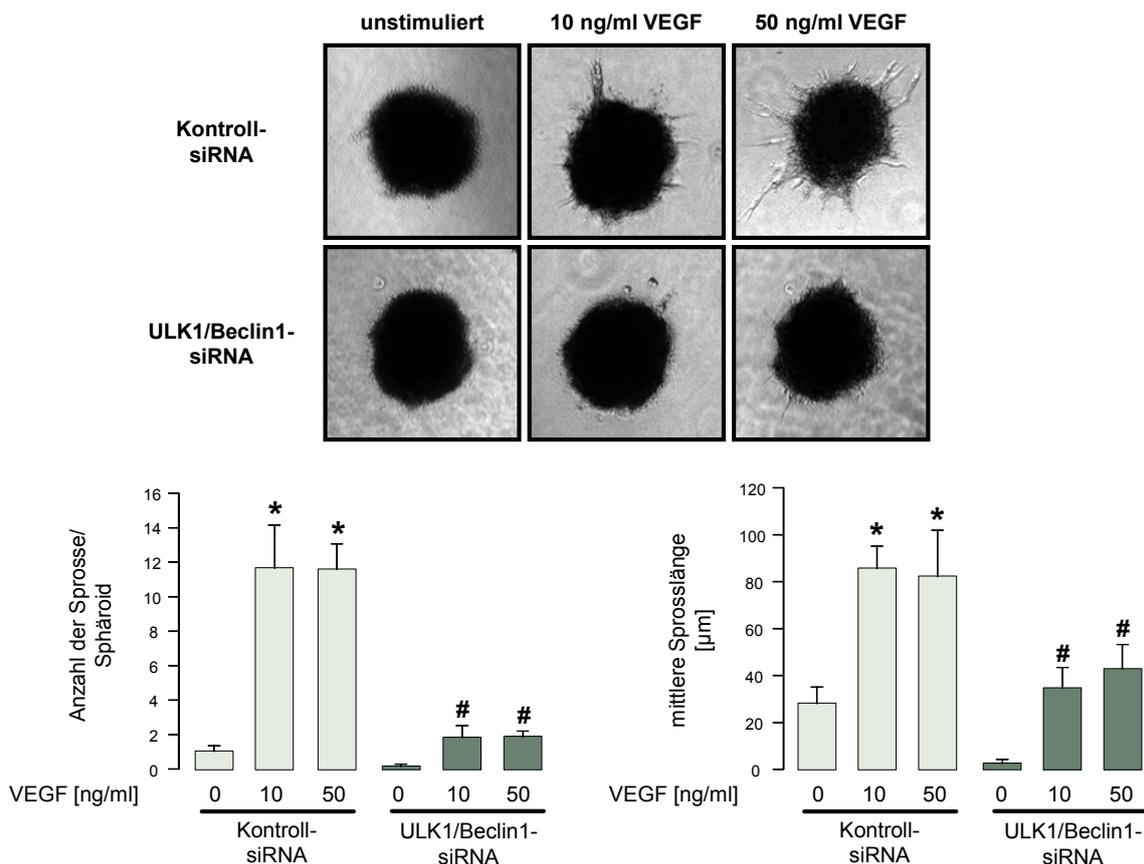
**Abbildung 23. ULK1/Beclin1-siRNA verändert VEGF-Signalwege kaum.**

HUVEC wurden mit Kontroll-siRNA bzw. ULK1- und Beclin1-siRNA transfiziert und für die angegebenen Zeiten mit 50 ng/ml VEGF stimuliert. Zelllysate wurde in Western-Blot-Analysen mit spezifischen Antikörpern gegen die dargestellten Signalproteine untersucht und die Proteinbanden densitometrisch ausgewertet. Gezeigt sind jeweils ein repräsentativer Blot und die Mittelwerte der Daten mit SEM. n=3, \* p<0,05 gegen unstimulierte Kontrolle der gleichen siRNA-Behandlung, # p<0,05 gegen zeitgleich stimulierte Kontroll-siRNA-behandelte Probe.

Zusammenfassend lässt sich aus diesen Daten schlussfolgern, dass eine Hemmung der Autophagie die VEGF-induzierte Proliferation und den VEGF-Effekt auf das Überleben der Zellen nicht beeinflusst. Die Daten bestätigen, dass in Autophagie-defizienten Zellen bereits unter basalen Bedingungen Proliferation und Überleben gestört sind. In Übereinstimmung damit sind die VEGF-induzierten Signalwege, die diese Zellfunktionen regulieren durch Hemmung der Autophagie nicht beeinflusst.

### 3.2.4 Angiogenese in Autophagie-defizienten Zellen

Im nächsten Schritt wurden die Auswirkungen der gehemmten Autophagie auf komplexe Endothelzellfunktionen mit Hilfe des Sphäroid-Assays untersucht. Dabei handelt es sich um einen *in vitro*-Angiogenese-Assay, bei dem das Aussprossen von kapillarähnlichen Strukturen aus einem Endothelzell-Sphäroid quantifiziert wird und als Maß für Angiogenese dient. Der Zusatz von VEGF zu Sphäroiden, die aus Kontroll-siRNA-vorbehandelten Endothelzellen generiert wurden, führt zu einer deutlichen und konzentrationsabhängigen Aussprossung (Abbildung 24). Dies zeigt sich in einem Anstieg der Anzahl sowie der Länge der Aussprossungen. Dagegen ist die VEGF-induzierte Antwort in Autophagie-defizienten Zellen reduziert, wobei eine signifikante Hemmung der Anzahl der Sprosse sowie der Sprosslänge zu erkennen ist. Das bedeutet, dass VEGF in Autophagie-defizienten Zellen kaum noch einen angiogenen Effekt aufweist, obwohl der stimulierende Effekt auf dessen Signalwege sowie Proliferation und Überleben noch gegeben sind.

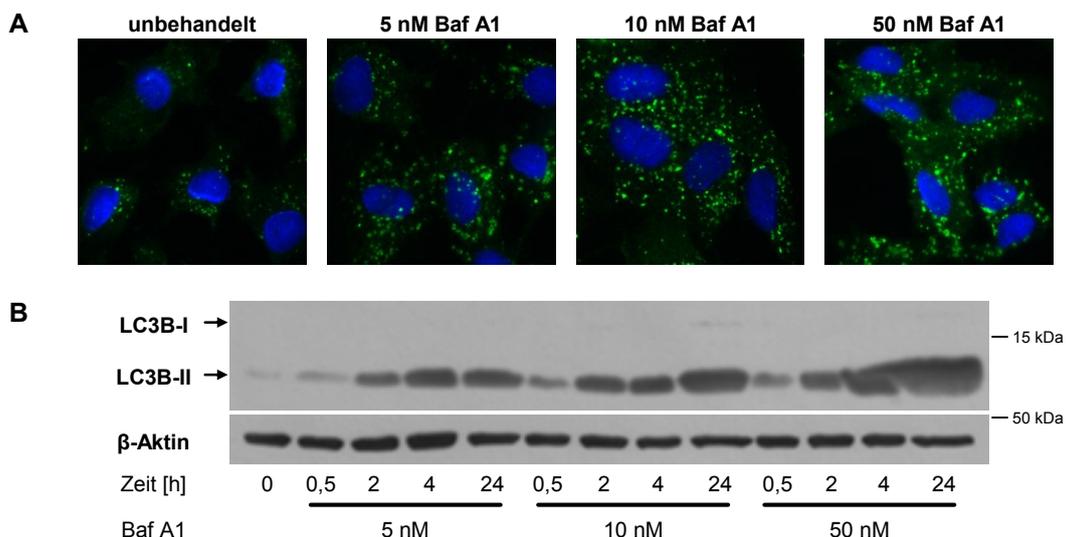


**Abbildung 24. ULK1/Beclin1-siRNA hemmt VEGF-induzierte *in vitro*-Angiogenese.**

Zellen wurden mit Kontroll-siRNA bzw. ULK1- und Beclin1-siRNA transfiziert. Sphäroide wurden generiert, eingebettet und für 48 h mit 10 ng/ml bzw. 50 ng/ml VEGF stimuliert. Anschließend wurden die Sphäroide fixiert und die Anzahl und Länge der Aussprossungen ausgewertet. Dargestellt sind die Mittelwerte der Daten mit entsprechendem SEM. n=5, \* p<0,05 gegen unstimulierte Kontrolle, # p<0,05 gegen gleich stimulierte Kontroll-siRNA-behandelte Probe.

### 3.2.5 Angiogenese nach pharmakologischer Hemmung der Autophagie

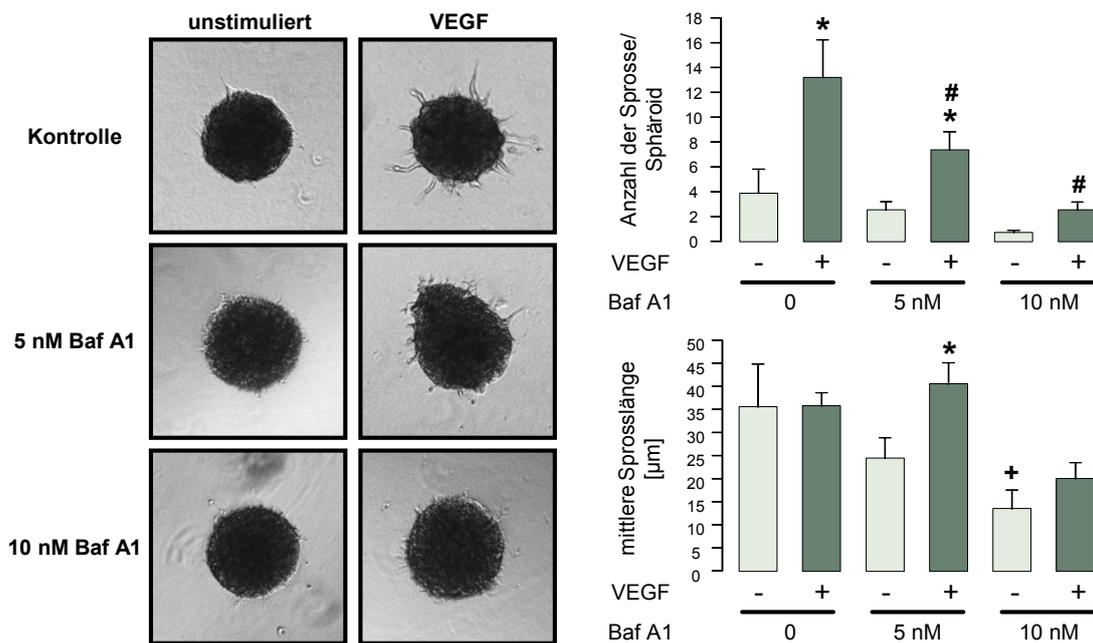
Nachdem durch den Einsatz von ULK1/Beclin1-siRNA zur Hemmung der Autophagie prinzipiell ein Einfluss von Autophagie auf angiogene Prozesse gezeigt werden konnte, sollte dieses Ergebnis durch einen zweiten methodischen Zugang bestätigt werden. Dabei wurde Bafilomycin A1, ein lysosomaler Inhibitor, eingesetzt, obwohl dies ein weniger spezifisches Werkzeug zur Hemmung der Autophagie ist als die erwähnten siRNAs. Der Vorteil von Bafilomycin A1 liegt darin, dass es akut eingesetzt werden kann und so ermöglicht, dass sich die Zellen im Gegensatz zur ULK1/Beclin1-siRNA-Behandlung zum Zeitpunkt der Angiogenese-Stimulation in einem guten Ausgangszustand befinden. Dadurch lässt sich die Rolle der Autophagie bei der Angiogenese zuverlässiger untersuchen. Da in den geplanten Experimenten 24 h-Inkubationen notwendig waren, wurden die Zellen mit niedrigeren Bafilomycin A1-Konzentrationen (5 und 10 nM) inkubiert als in den Experimenten zur Flux-Messung, um mögliche zytotoxische Effekte zu reduzieren. Zudem wurden deshalb auch die Aussprossungen bereits 24 h nach Stimulierung quantifiziert im Gegensatz zu den Sphäroid-Analysen nach 48 h bei den zuvor gezeigten Experimenten. Wie in Abbildung 25 zu sehen ist, führt Bafilomycin A1 unter den gewählten Bedingungen zu einer Hemmung der Autophagie. Alle eingesetzten Bafilomycin A1-Konzentrationen führen zu einer zuverlässigen Akkumulation von LC3B-positiven Puncta, was auf den verminderten Abbau von autophagosomalen Strukturen schließen lässt (Abbildung 25A). Auch in Western-Blot-Analysen ist eine Akkumulation von konjugiertem LC3B zu erkennen (Abbildung 25B).



**Abbildung 25. Niedrige Bafilomycin A1-Konzentrationen hemmen Autophagie.**

Zellen wurden für 24 h (**A**) oder für die angegebenen Zeiten (**B**) mit 5 nM, 10 nM oder 50 nM Bafilomycin A1 (Baf A1) behandelt. **A.** Zellen wurden fixiert und mit einem Antikörper gegen LC3B sowie mit DAPI angefärbt und am Fluoreszenzmikroskop analysiert. Dargestellt ist jeweils ein repräsentatives Bild. n=2. **B.** Zellysate wurden hergestellt und im Western-Blot mit Antikörpern gegen LC3B und β-Aktin angefärbt. Dargestellt ist ein repräsentativer Blot. n=3.

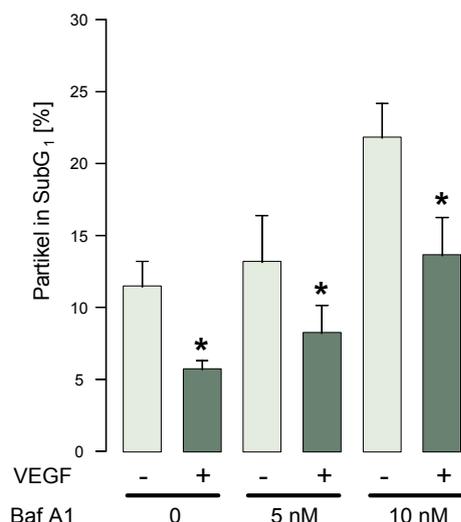
Abbildung 26 zeigt, dass VEGF zu einem Anstieg der Anzahl der Aussprossungen führt und dieser durch Vorinkubation mit Bafilomycin A1 signifikant gehemmt wird. Die Hemmung ist auch bei Einsatz von 5 nM Bafilomycin A1 deutlich zu sehen. Nach 24 h ist die mittlere Sprosslänge durch VEGF in Kontrollzellen noch nicht beeinflusst. Bafilomycin A1 hemmt die basale Länge der Sprosse konzentrationsabhängig. Die Sprosslänge in Gegenwart von VEGF ist durch 10 nM Bafilomycin A1 ebenfalls vermindert. Bei Zusatz von 5 nM Bafilomycin A1 ist dagegen keine Hemmwirkung in VEGF-behandelten Proben zu sehen. Möglicherweise wirken VEGF-induzierte Signalprozesse dem Bafilomycin A1-Effekt entgegen.



**Abbildung 26. Bafilomycin A1 hemmt VEGF-stimulierte *in vitro*-Angiogenese.**

Sphäroide wurden generiert, eingebettet, für 30 min mit 5 nM bzw. 10 nM Bafilomycin A1 (Baf A1) vorinkubiert und anschließend mit 50 ng/ml VEGF stimuliert. Nach 24 h wurden die Sphäroide fixiert und die Anzahl und Länge der Aussprossungen ausgewertet. Dargestellt sind ein repräsentatives Bild sowie die Mittelwerte der Daten mit entsprechendem SEM. n=5, \* p<0,05 gegen unstimulierte Kontrolle der gleichen Baf A1-Behandlung, # p<0,05 gegen VEGF-stimulierte Probe ohne Baf A1, + p<0,05 gegen unstimulierte Kontrolle ohne Baf A1.

Parallel zu den Angiogenese-Experimenten wurde die Überlebensfähigkeit der Zellen gemessen. Wie in Abbildung 27 dargestellt, führen auch niedrige Bafilomycin A1-Konzentrationen (10 nM) bei langer Inkubationszeit zu einem leichten Anstieg des Zelltodes. Nach 5 nM Bafilomycin A1 ist jedoch kaum ein Anstieg der Anzahl von toten Zellen und Zellfragmenten zu erkennen. Auch der überlebenssteigernde Effekt von VEGF wird hier nicht beeinflusst. Die verminderte Angiogenese-Kapazität nach Bafilomycin A1-induzierter Hemmung der Autophagie kann daher nur begrenzt durch eine verminderte Überlebensfähigkeit der Zellen erklärt werden.



**Abbildung 27. Bafilomycin A1 induziert nur wenig Zelltod.**

Zellen wurden für 2 h in serumarmen Medium inkubiert, mit 5 nM bzw. 10 nM Bafilomycin A1 (Baf A1) für 30 min vorinkubiert und anschließend für 24 h mit 50 ng/ml VEGF stimuliert. Danach wurden sie abgelöst, fixiert und mit Propidiumiodid gefärbt. Zellpartikel mit weniger als 2n DNA-Gehalt (SubG<sub>1</sub>) wurden mittels Durchflusszytometrie quantifiziert. Die Anzahl der Zellen und Zellfragmente in der SubG<sub>1</sub>-Population wurde auf die Gesamtzahl gemessener Partikel im Histogramm normiert. Dargestellt sind die Mittelwerte der normierten Daten mit SEM. n=5, \* p<0,05 gegen unstimulierte Kontrolle der gleichen Baf A1-Behandlung. (Propidiumiodid-Färbung und Durchflusszytometrie durchgeführt von Nderim Kryeziu).

Die Ergebnisse dieses Kapitels zeigen, dass VEGF-induzierte Zellantworten wie Signalkaskaden, Proliferation und Überleben in Autophagie-defizienten Zellen erhalten sind, obwohl Proliferation und Überleben basal gehemmt sind. Dagegen ist die VEGF-stimulierte Angiogenese deutlich vermindert. Letzteres tritt auch auf, wenn Autophagie durch Bafilomycin A1-Zusatz akut inhibiert ist. Dabei ist eine deutliche Hemmung der Sprossbildung zu sehen, auch wenn das Überleben der Zellen kaum eingeschränkt ist. Diese Daten deuten darauf hin, dass Autophagie nicht nur über Stressreduktion, sondern auch über spezifische Mechanismen in die Regulierung der Angiogenese eingreift.

### 3.3 AMPK aktiviert Autophagie in Endothelzellen

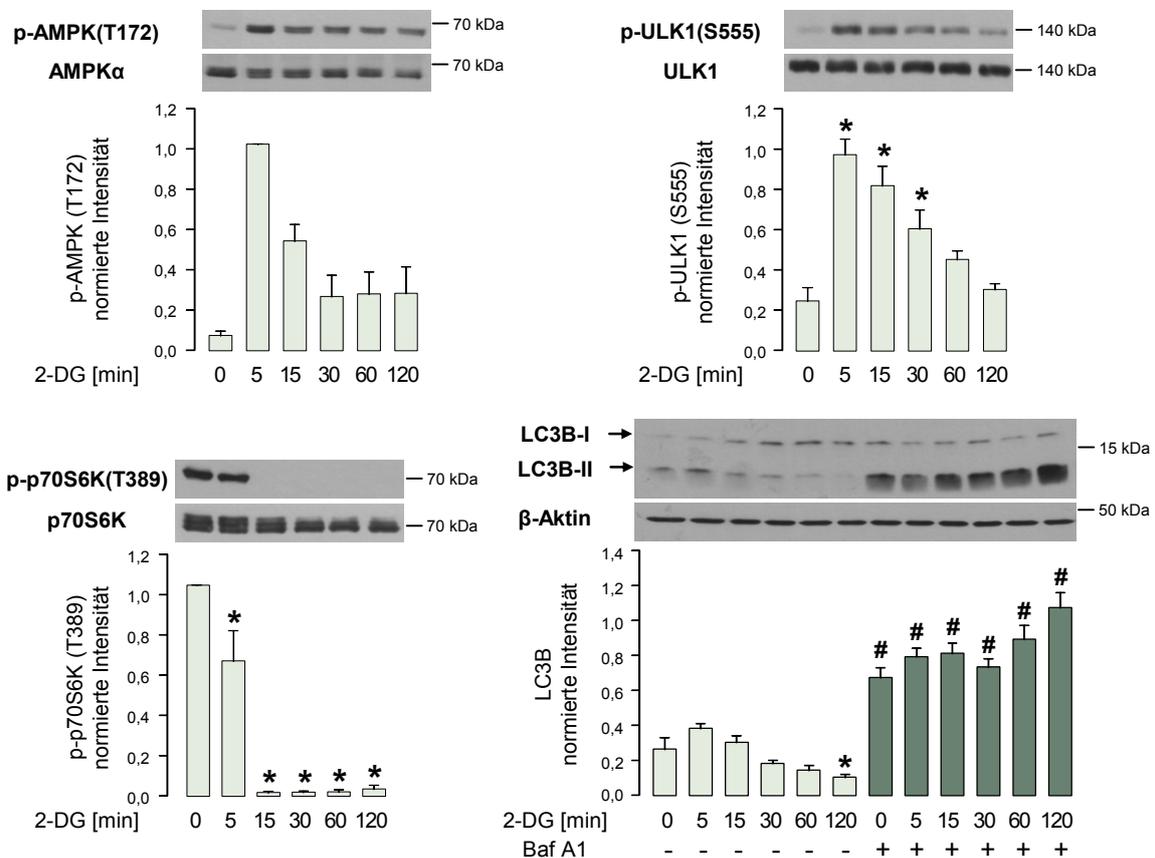
Ähnlich wie Autophagie wird auch AMPK durch verschiedene Stressoren aktiviert und erfüllt eine Zellschutzfunktion. In den folgenden Abschnitten sollte nun untersucht werden, ob und wie AMPK auch Autophagie in Endothelzellen beeinflussen kann und welche Auswirkungen dies für die Endothelzellfunktion hat. Obwohl in verschiedenen Zelltypen eine Aktivierung der Autophagie durch AMPK gezeigt wurde, gibt es für Endothelzellen kaum Daten dazu.

#### 3.3.1 Metabolischer Stress, AMPK und Autophagie

Die AMPK ist als Energiesensor der Zelle bekannt und wird durch Energiemangel aktiviert. Energiemangel führt auch zur Aktivierung der Autophagie. In den folgenden Versuchen sollte daher ein Zusammenhang zwischen AMPK-Aktivierung und Autophagie nach Auslösen von metabolischem Stress durch 2-DG untersucht werden.

Die zeitabhängige Stimulierung von Endothelzellen mit 2-DG führt zu einer schnellen und anhaltenden AMPK-Phosphorylierung am Aminosäurerest T172 (Abbildung 28) und damit zur Aktivierung des Enzyms. Parallel dazu ist eine Stimulierung der Phosphorylierung von ULK1 am Serinrest 555 zu beobachten. Diese führt zur Aktivierung von ULK1 und ermöglicht

die ULK1-abhängige Initiierung der Autophagie. 2-DG verursacht außerdem eine Hemmung der *p70 ribosomal protein S6 kinase* (p70S6K)-Phosphorylierung, was auf eine Inhibierung der mTOR-Aktivität schließen lässt. Die Hemmung von mTOR verhindert die mTOR-vermittelte inhibierende Phosphorylierung von ULK1 (nicht untersucht) und ist möglicherweise wichtig, um eine vollständige Initiierung der Autophagie zu gewährleisten. Betrachtet man den Autophagie-Flux nach Zusatz von 2-DG anhand der LC3B-Konjugation, so ist ein leichter, transienter Anstieg von LC3B-II nach 5 min Stimulationszeit zu erkennen. Nach 30 min 2-DG-Behandlung sind die LC3B-II-Spiegel wieder deutlich reduziert und sinken sogar unter das Basalniveau ab (Abbildung 28). Dieser Abfall wird durch Zusatz von Bafilomycin A1 verhindert, was darauf hinweist, dass LC3B aufgrund des hohen Autophagie-Fluxes nach 2-DG schnell verbraucht wird.

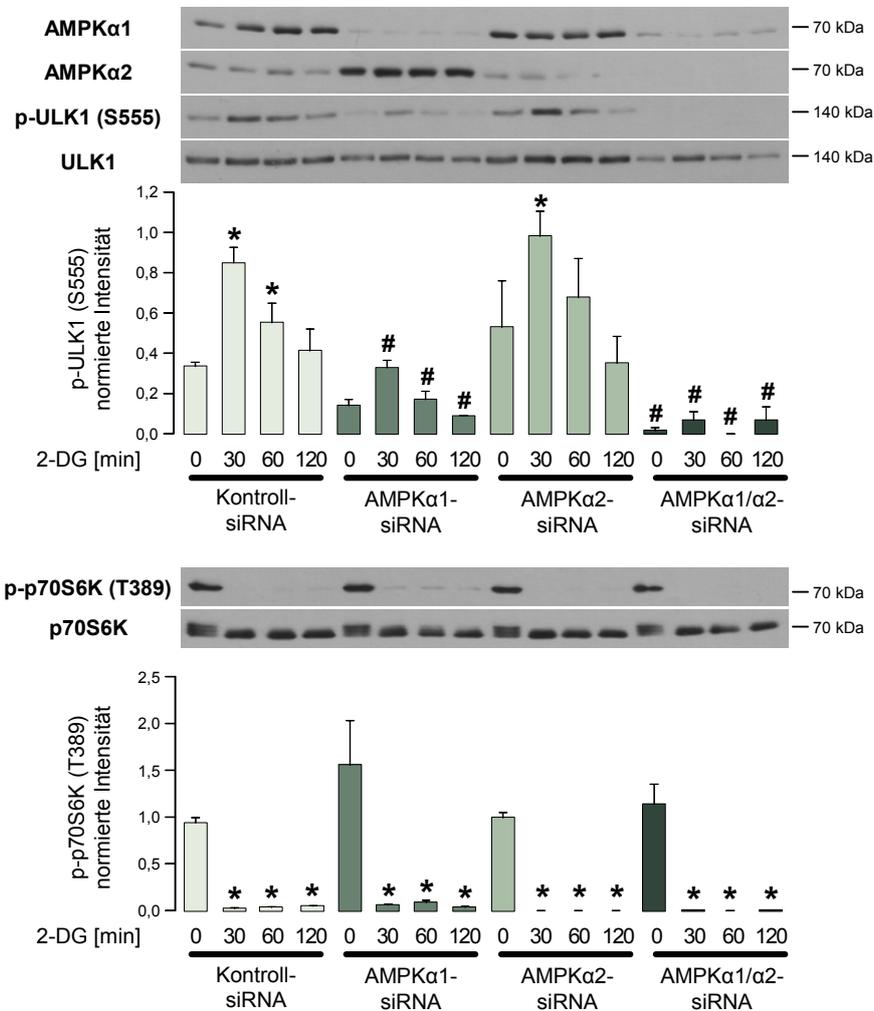


**Abbildung 28. Metabolischer Stress induziert Autophagie in HUVEC.**

HUVEC wurden für 30 min mit 50 nM Bafilomycin A1 (Baf A1) vorbehandelt (für LC3B-Analyse) und anschließend mit 20 mM 2-Deoxyglukose (2-DG) stimuliert und lysiert. Zelllysate wurden nach SDS-PAGE im Western-Blot mit spezifischen Antikörpern gegen die dargestellten Proteine angefärbt und die Signale densitometrisch ausgewertet. Gezeigt sind ein repräsentativer Blot und die Mittelwerte der Daten mit entsprechendem SEM. n=4 (n=2 für p-AMPK (T172)), \* p<0,05 gegen unstimulierte Kontrolle, # p<0,05 gegen zeitgleich stimulierte Probe ohne Baf A1.

Abbildung 29 zeigt, dass die 2-DG-stimulierte ULK1-Phosphorylierung durch AMPKα1 vermittelt wird. Nach siRNA-vermittelter Herunterregulierung von AMPKα1 oder kombinierter

Herunterregulierung von AMPK $\alpha$ 1 und AMPK $\alpha$ 2 ist sie signifikant vermindert, während AMPK $\alpha$ 2-siRNA allein keinen Effekt hat. Dagegen ist die 2-DG-induzierte Hemmung der p70S6K-Phosphorylierung nicht AMPK-abhängig, da sie durch Herunterregulierung der AMPK-Isoformen nicht verändert wird.



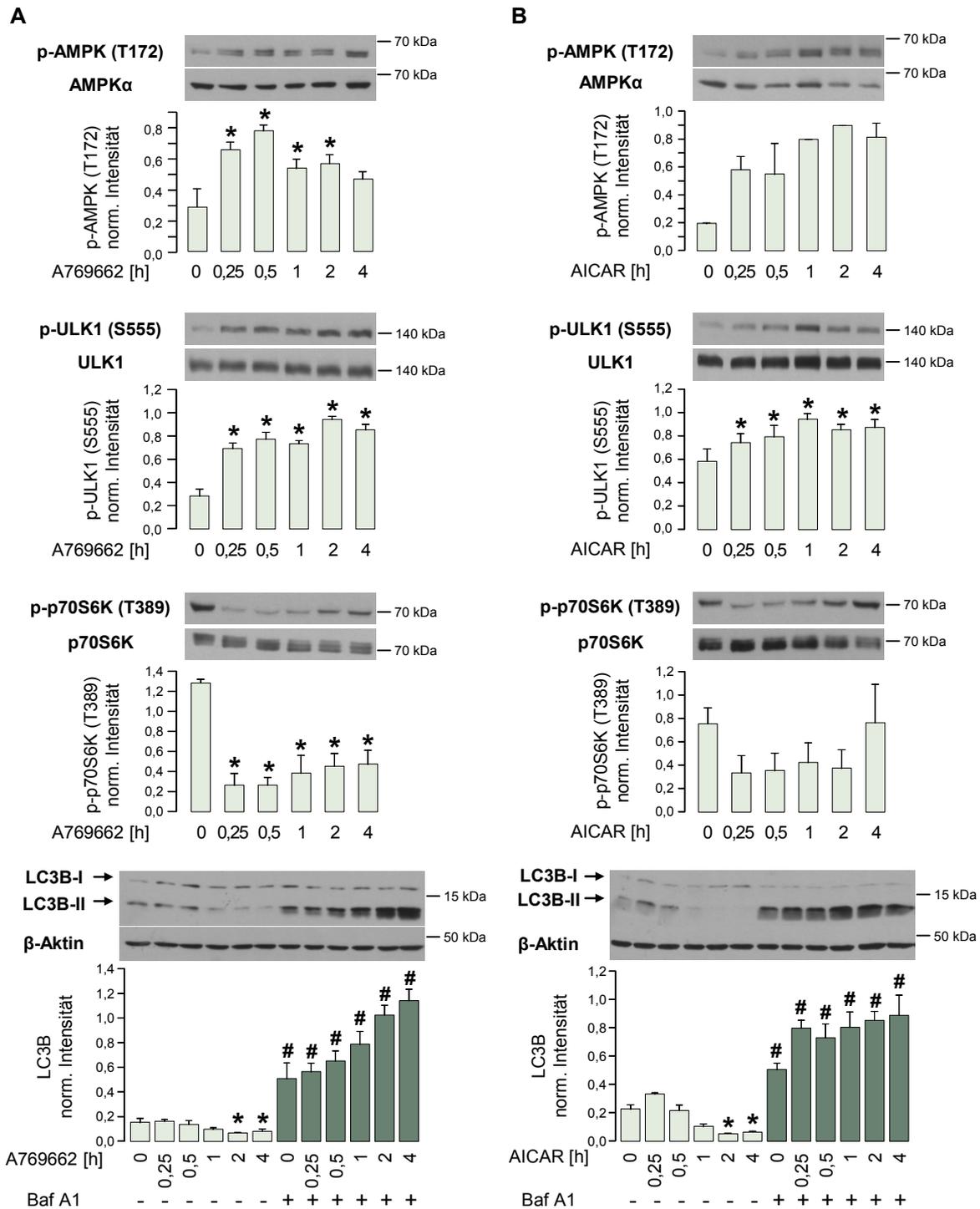
**Abbildung 29. 2-DG stimuliert Autophagie AMPK $\alpha$ 1-abhängig.**

Zellen wurden mit Kontroll-siRNA bzw. AMPK $\alpha$ 1- und/oder AMPK $\alpha$ 2-siRNA transfiziert, für die angegebenen Zeiten mit 20 mM 2-Deoxyglukose (2-DG) stimuliert und lysiert. Zelllysate wurden nach SDS-PAGE im Western-Blot gegen die dargestellten Proteine angefärbt und die Proteinbanden densitometrisch ausgewertet. Dargestellt sind repräsentative Blots und die Mittelwerte der Daten mit SEM. n=3, \* p<0,05 gegen unstimulierte Kontrolle der gleichen siRNA-Behandlung, # p<0,05 gegen zeitgleich stimulierte Kontroll-siRNA-behandelte Probe.

### 3.3.2 Pharmakologische AMPK-Aktivierung und Autophagie

Die mit 2-DG erhobenen Daten legen einen Zusammenhang zwischen AMPK-Aktivierung und Autophagie-Stimulierung nahe. Um diesen Zusammenhang zu untermauern, wurden die unter 3.3.1 beschriebenen Experimente mit zwei spezifischen Aktivatoren der AMPK, A769662 und AICAR wiederholt. Diese Aktivatoren induzieren die AMPK-Stimulierung durch Verhinderung der Dephosphorylierung von T172 bzw. wirken allosterisch.

Die durch die Aktivatoren induzierte AMPK-Phosphorylierung ist in Abbildung 30 zu sehen.

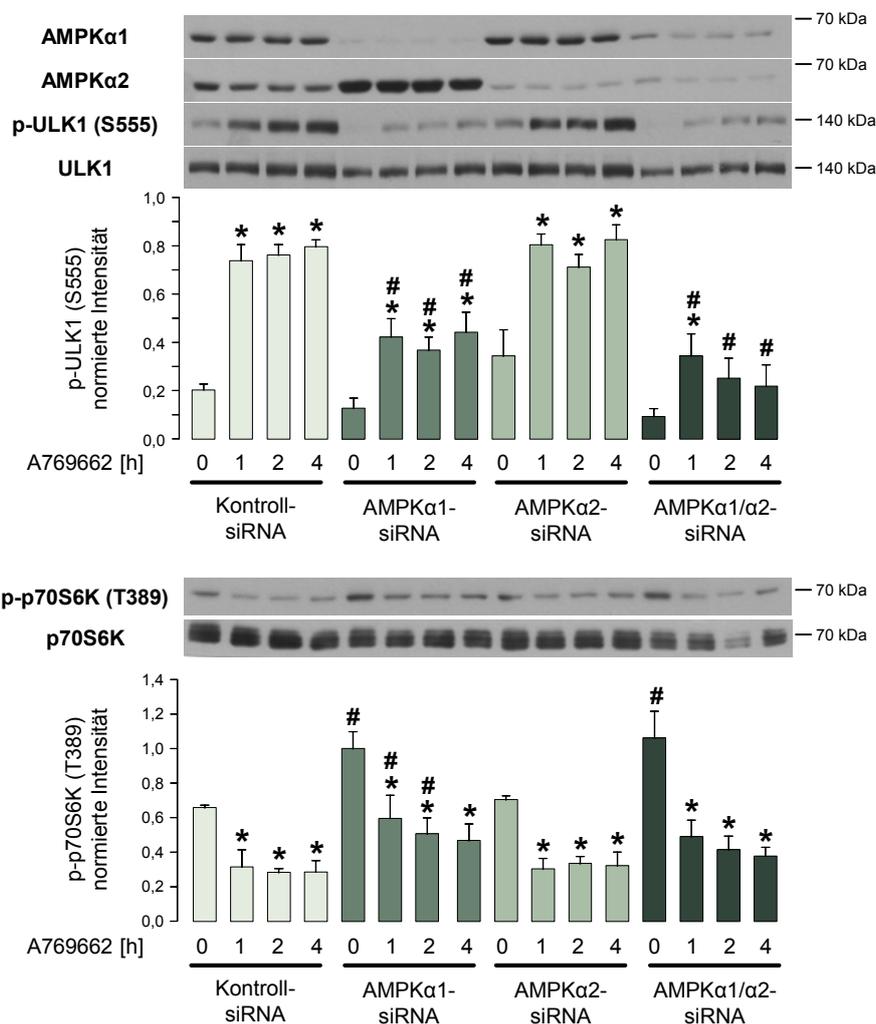


**Abbildung 30. AMPK stimuliert Autophagie.**

Zellen wurden für 30 min mit Bafilomycin A1 (Baf A1) vorinkubiert (für LC3B-Analyse) und anschließend mit 200  $\mu$ M A769662 (**A**) oder 2 mM AICAR (**B**) stimuliert und lysiert. Zelllysate wurden in Western-Blot-Analysen mit spezifischen Antikörpern gegen die dargestellten Proteine untersucht und die Proteinbanden densitometrisch ausgewertet. Gezeigt sind ein repräsentativer Blot und die Mittelwerte der Daten mit entsprechendem SEM. **A.** n=4, **B.** n=5 (n=2 für p-AMPK (T172)), \* p<0,05 gegen unstimulierte Kontrolle, # p<0,05 gegen zeitgleich stimulierte Probe ohne Baf A1.

Ähnlich wie 2-DG führen auch A769662 und AICAR zu einem Anstieg der ULK1-Phosphorylierung am Serinrest 555 und einer gleichzeitigen Hemmung der p70S6K-Phosphorylierung als Indikator einer verminderten mTOR-Aktivität. Diese beiden Parameter, ebenso wie der Zeitverlauf der LC3B-Konjugation in An- und Abwesenheit von Bafilomycin A1 weisen auf eine Aktivierung der Autophagie hin (Abbildung 30).

Abbildung 31 zeigt, dass die A769662-induzierte ULK1-Phosphorylierung AMPK $\alpha$ 1-abhängig ist. Die Herunterregulierung der AMPK $\alpha$ 1 oder beider Isoformen  $\alpha$ 1 und  $\alpha$ 2 führt zu einem signifikanten Rückgang der A769662-stimulierten ULK1-Phosphorylierung. Dagegen hat die Herunterregulierung der AMPK $\alpha$ 2 keinen Effekt.



**Abbildung 31. A769662-induzierte Autophagie ist AMPK $\alpha$ 1-abhängig.**

Zellen wurden mit Kontroll-siRNA bzw. AMPK $\alpha$ 1 und/oder AMPK $\alpha$ 2-siRNA transfiziert, anschließend für die angegebenen Zeiten mit 200  $\mu$ M A769662 stimuliert und lysiert. Zelllysate wurden in Western-Blot-Analysen mit spezifischen Antikörpern gegen die dargestellten Proteine untersucht und die Signale densitometrisch ausgewertet. Gezeigt sind ein repräsentativer Blot und die Mittelwerte der Daten mit entsprechendem SEM. n=4, \* p<0,05 gegen unstimulierte Kontrolle der gleichen siRNA-Behandlung, # p<0,05 gegen zeitgleich stimulierte Kontroll-siRNA-behandelte Probe.

Die basale Phosphorylierung der p70S6K ist in Abwesenheit von AMPK $\alpha$ 1 und AMPK $\alpha$ 1/ $\alpha$ 2 signifikant erhöht (Abbildung 31). Auch die A769662-vermittelte Hemmung der p70S6K-Phosphorylierung wird durch die Herunterregulierung von AMPK $\alpha$ 1 leicht vermindert, bleibt jedoch in Abwesenheit von AMPK $\alpha$ 2 oder beiden Isoformen nahezu bestehen.

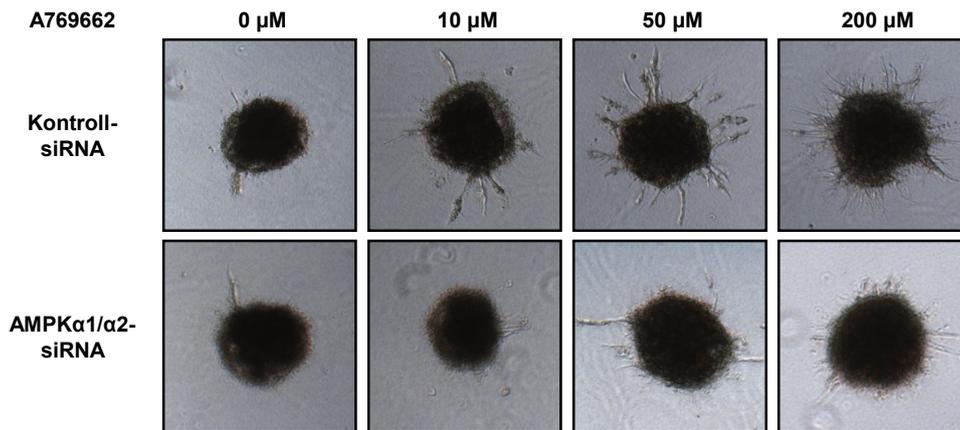
Zusammenfassend konnte anhand der drei in diesem Kapitel eingesetzten methodischen Zugänge festgestellt werden, dass AMPK-Aktivierung die Stimulierung der Autophagie in Endothelzellen initiiert. Die Vermittlung von Autophagie kann damit zu den protektiven Funktionen der AMPK in Endothelzellen gezählt werden.

### **3.4 AMPK-stimulierte Angiogenese und Autophagie**

Nachdem gezeigt werden konnte, dass AMPK Autophagie in Endothelzellen aktivieren kann, soll nun die Bedeutung der AMPK/Autophagie-Achse für die Funktion von Endothelzellen geprüft werden. Von besonderem Interesse ist dabei die Untersuchung der Angiogenese, da in einer früheren Arbeit der Gruppe bereits gezeigt wurde, dass AMPK $\alpha$ 1 für die VEGF-induzierte Angiogenese essentiell ist [21]. Welcher Signalweg oder Mechanismus dem zugrunde liegt, und ob Autophagie bei diesem Prozess beteiligt ist, ist jedoch unklar und soll hier weiter aufgeklärt werden. Um den Zusammenhang in einem einfachen Modellsystem untersuchen zu können, wurde zunächst überprüft, ob eine spezifische Aktivierung von AMPK durch A769662 in der Lage ist, Angiogenese zu induzieren und ob Autophagie dabei eine Rolle spielt.

#### **3.4.1 Stimulierung der Angiogenese durch AMPK-Aktivator**

Der Einfluss des spezifischen AMPK-Aktivators A769662 auf die Angiogenese wurde in dem Sphäroid-Assay getestet. Abbildung 32 (oberer Teil) zeigt, dass A769662 konzentrationsabhängig zu einer starken Aussprossung aus Sphäroiden führt. Dieser Effekt war nach Herunterregulation der Isoformen der katalytischen AMPK-Untereinheit  $\alpha$ 1 und  $\alpha$ 2 mittels siRNA fast vollständig gehemmt (Abbildung 32, unterer Teil). Die geringe verbleibende Sprossbildung kann durch Restaktivitäten von AMPK $\alpha$ 1/ $\alpha$ 2 erklärt werden. Geringe AMPK-unabhängige Effekte von A769662 sind aufgrund des Wirkungsmechanismus der Substanz als spezifischer AMPK-Aktivator dagegen eher unwahrscheinlich. In den nachfolgenden Angiogenese-Experimenten wurden 50  $\mu$ M A769662 eingesetzt, da die Aussprossungen bei 200  $\mu$ M so stark sind, dass sie nur unzuverlässig quantifizieren werden konnten.

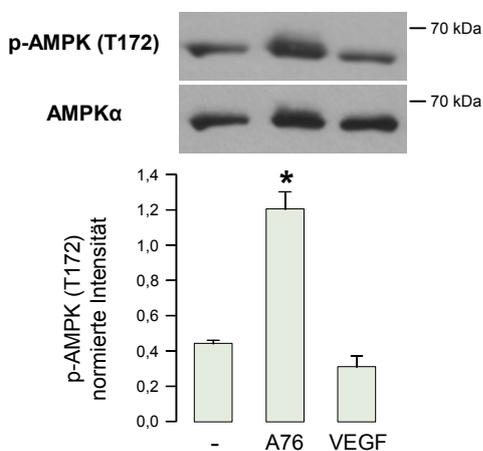


**Abbildung 32. A769662-induzierte Angiogenese ist AMPK-abhängig.**

Zellen wurden mit Kontroll-siRNA bzw. AMPK $\alpha$ 1- und AMPK $\alpha$ 2-siRNA transfiziert. Sphäroide wurden generiert, für 48 h mit den angegebenen A769662-Konzentrationen inkubiert und fixiert. Dargestellt sind repräsentative Bilder. n=4.

### 3.4.2 AMPK-Aktivierung durch VEGF und A769662

Abbildung 32 zeigt, dass Endothelzellen nach A769662-Behandlung deutlich mehr Aussprossungen bilden als nach VEGF-Stimulation (Vergleich Abbildung 24). Darüber hinaus unterscheiden sich die durch A769662 induzierten Sprosse hinsichtlich ihrer Morphologie deutlich von den VEGF-stimulierten Sprossen, was ein Hinweis auf unterschiedliche Signalmuster nach A769662 und VEGF sein kann. Diese Vermutung wurde anhand einer Langzeitstimulation von HUVEC mit beiden Stimuli überprüft. In Abbildung 33 ist zu sehen, dass 48 h nach VEGF-Stimulation keine verstärkte AMPK-Phosphorylierung an T172 im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle auftritt. AMPK ist demnach zu diesem Zeitpunkt nicht mehr aktiv. Dagegen ist ein deutliches Phosphorylierungssignal durch A769662 zu sehen. Dies spricht für eine langanhaltende AMPK-Aktivierung durch A769662, die nicht gegenreguliert zu sein scheint und die starke, unkontrollierte Bildung kapillarähnlicher Strukturen erklären kann.

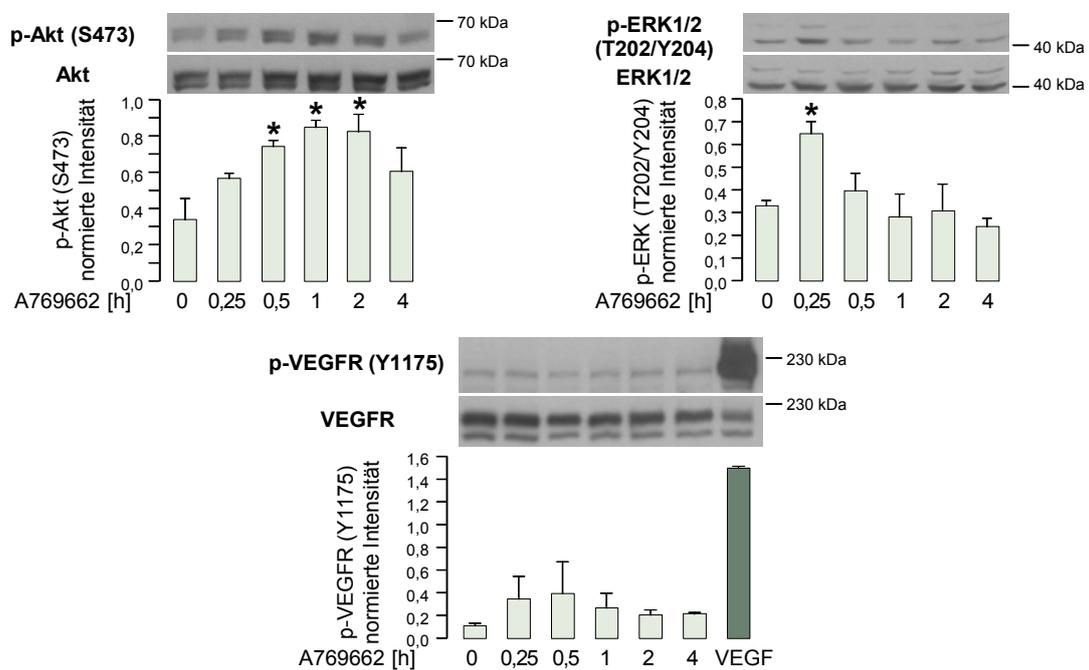


**Abbildung 33. A769662 aktiviert AMPK langanhaltend.**

Zellen wurden für 48 h mit 200  $\mu$ M A769662 (A76) oder 50 ng/ml VEGF stimuliert und lysiert. Zelllysate wurden in Western-Blot-Analysen mit spezifischen Antikörpern gegen p-AMPK (T172) und AMPK $\alpha$  untersucht und die Signale densitometrisch ausgewertet. Dargestellt sind ein repräsentativer Blot und die Mittelwerte der Daten mit entsprechendem SEM. n=3, \* p<0,05 gegen unstimulierte Kontrolle.

### 3.4.3 AMPK und angiogene Signalwege

Nachdem gezeigt wurde, dass A769662 Angiogenese stimuliert, sollte nun untersucht werden, welche angiogenen Signalwege dafür verantwortlich sind. Insbesondere wurde eine mögliche Rolle der Kinasen Akt und ERK1/2, die angiogene Prozesse wie Überleben, Migration, Permeabilität und Proliferation regulieren, überprüft. Wie in Abbildung 34 dargestellt, führt A769662 zu einer zeitabhängigen Phosphorylierung von Akt und ERK1/2 und damit zur Aktivierung der jeweiligen Kinasen. Akt und ERK1/2 sind Signalproteine, die auch durch den wichtigen angiogenen Stimulus VEGF aktiviert werden. Eine Transaktivierung des VEGFR2 durch A769662 scheint jedoch nicht vorzuliegen, da im Gegensatz zur Stimulierung mit VEGF keine Phosphorylierung des Rezeptors zu sehen war.

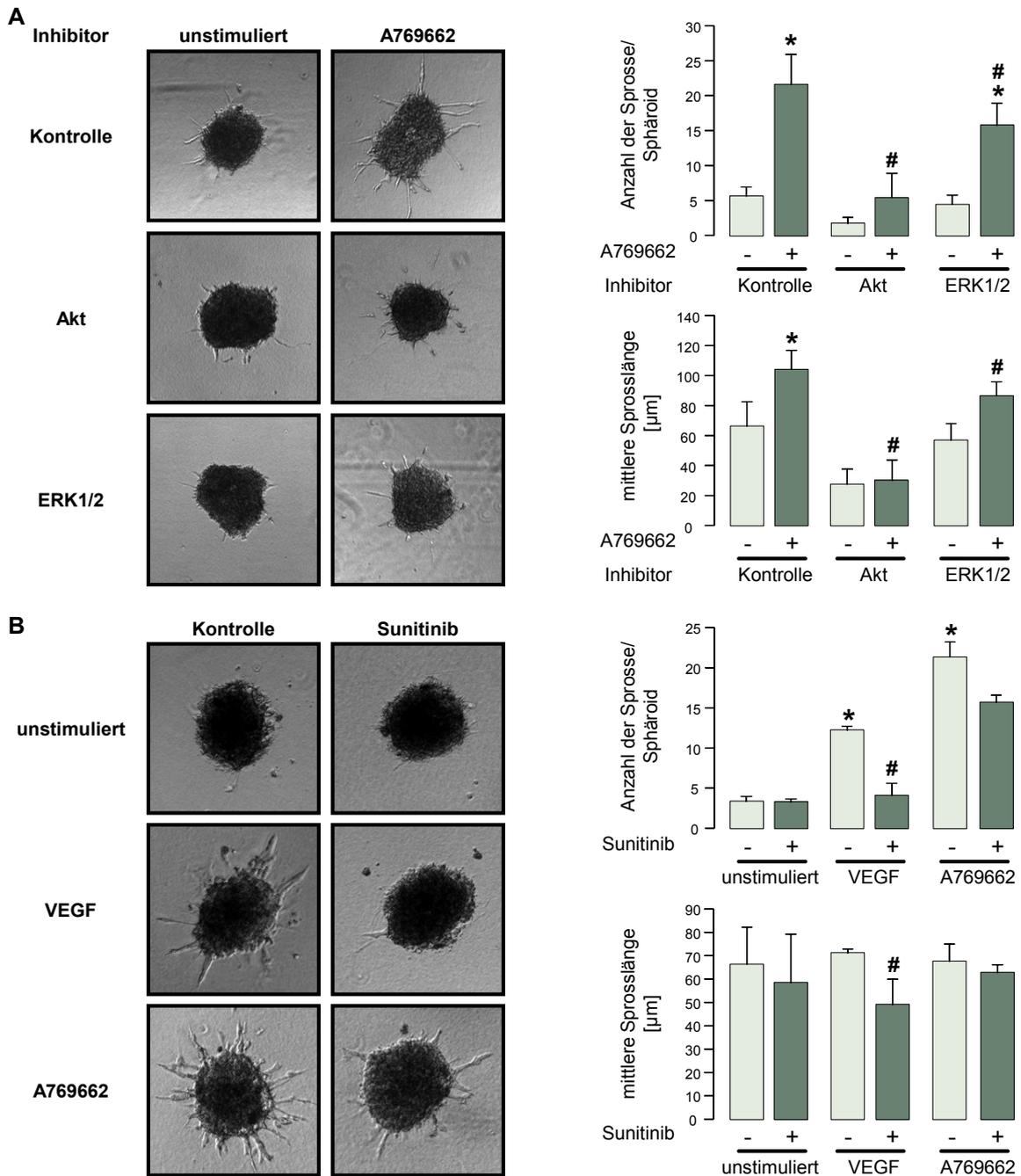


**Abbildung 34. A769662 stimuliert angiogene Signalwege.**

Zellen wurden für die angegebenen Zeiten mit 200  $\mu$ M A769662 bzw. für 5 min mit 50 ng/ml VEGF stimuliert und lysiert. Die Zelllysate wurden in Western-Blot-Analysen mit spezifischen Antikörpern gegen die dargestellten Proteine untersucht und die erhaltenen Signale densitometrisch ausgewertet. Gezeigt sind ein repräsentativer Blot und die Mittelwerte der Daten mit entsprechendem SEM. n=3 (n=2 für p-VEGFR2 (Y1175)). \*  $p < 0,05$  gegen unstimulierte Kontrolle.

Die angiogene Wirkung von A769662 ist vor allem auf die Aktivierung von Akt zurückzuführen. Die Vorbehandlung der Endothelzellen mit einem spezifischen Inhibitor (Akt-Inhibitor VIII) führt zu einer signifikanten Verminderung der A769662-stimulierten Aussprossung, was sowohl in der Anzahl als auch der mittleren Länge der kapillarähnlichen Strukturen zum Ausdruck kommt (Abbildung 35A). Auch die Hemmung von ERK1/2 durch PD98059, einen MAPK/ERK1/2-Kinase (MEK)-Inhibitor vermindert die A769662-stimulierte Angiogenese, wobei der Effekt im Vergleich zum Akt-Inhibitor deutlich geringer ausfällt, aber dennoch signifikant ist. Sunitinib, ein Inhibitor des VEGFR2, hat dagegen keinen Einfluss auf

die A769662-induzierte Angiogenese, hemmt aber die VEGF-induzierte Sprossbildung deutlich (Abbildung 35B). Damit kann eine Beteiligung des VEGFR2 an den von A769662-initiierten angiogenen Signalwegen ausgeschlossen werden.

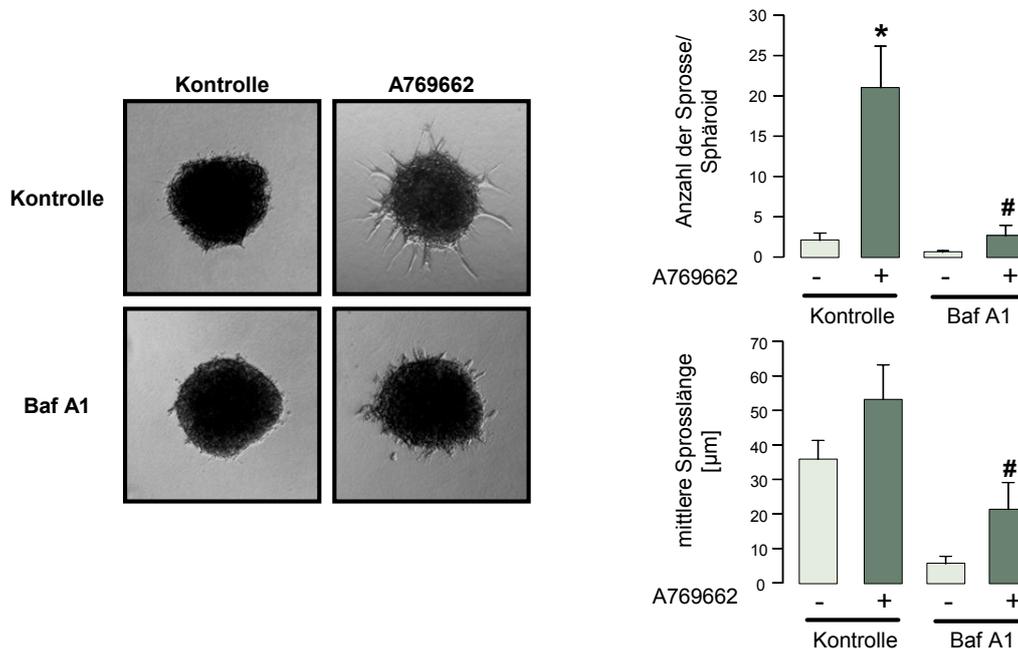


**Abbildung 35. Akt und ERK1/2 vermitteln A769662-induzierte Angiogenese.**

Sphäroide wurden generiert, eingebettet und für 30 min mit 10  $\mu$ M Akt-Inhibitor VIII oder 20  $\mu$ M PD98059 (ERK1/2-Inhibitor) **(A)** bzw. 10 nM Sunitinib (VEGFR-Inhibitor) **(B)** vorinkubiert. Anschließend erfolgte die Stimulierung mit 50  $\mu$ M A769662 oder 50 ng/ml VEGF. Nach 48 h wurden die Sphäroide fixiert und die Anzahl und Länge der Aussprossungen ausgewertet. Dargestellt sind ein repräsentatives Bild sowie die Mittelwerte der Daten mit entsprechendem SEM. n=4 **(A)**, n=3 **(B)**, \* p<0,05 gegen unstimulierte Kontrolle der gleichen Inhibitor-Behandlung, # p<0,05 gegen stimulierte Probe ohne Inhibitor.

### 3.4.4 AMPK-induzierte Angiogenese und Autophagie

Im Modell der A769662-stimulierten Angiogenese sollte nun untersucht werden, welche Bedeutung die durch A769662 stimulierte Autophagie für angiogene Prozesse hat. Dazu wurde Autophagie mittels Bafilomycin A1-Behandlung gehemmt und die A769662-stimulierte Angiogenese in diesen Zellen mit Kontrollzellen verglichen. Der Vorteil der Bafilomycin A1-Behandlung ist, dass sie kurz vor der Stimulierung mit VEGF eingesetzt wird und dadurch keine Vorschädigungen der Zellen wie nach Herunterregulierung von Autophagieproteinen mittels siRNA auftreten. Wie in Kapitel 3.2.5 beschrieben, wurden niedrige Bafilomycin A1-Konzentrationen (10 nM) eingesetzt, um zytotoxische Effekte zu vermeiden. Zudem erfolgte die Bewertung der Sphäroide 24 h nach A769662-Stimulierung. A769662 führt bei intakter Autophagie zu einem Anstieg der Aussprossung aus Sphäroiden. Dabei ist, wie bereits in Abbildung 35 gezeigt, vor allem die Anzahl der kapillarähnlichen Strukturen und weniger deren Länge verändert (Abbildung 36). Nach Hemmung der Autophagie durch Bafilomycin A1 ist eine signifikante Hemmung der Anzahl der Sprosse erkennbar. Die Länge der Aussprossungen ist durch Bafilomycin A1 ebenfalls vermindert. Die Aktivierung der Autophagie durch A769662 ist demnach wichtig, um die Angiogenese zu gewährleisten.



**Abbildung 36. Bafilomycin A1 hemmt A769662-induzierte *in vitro*-Angiogenese.**

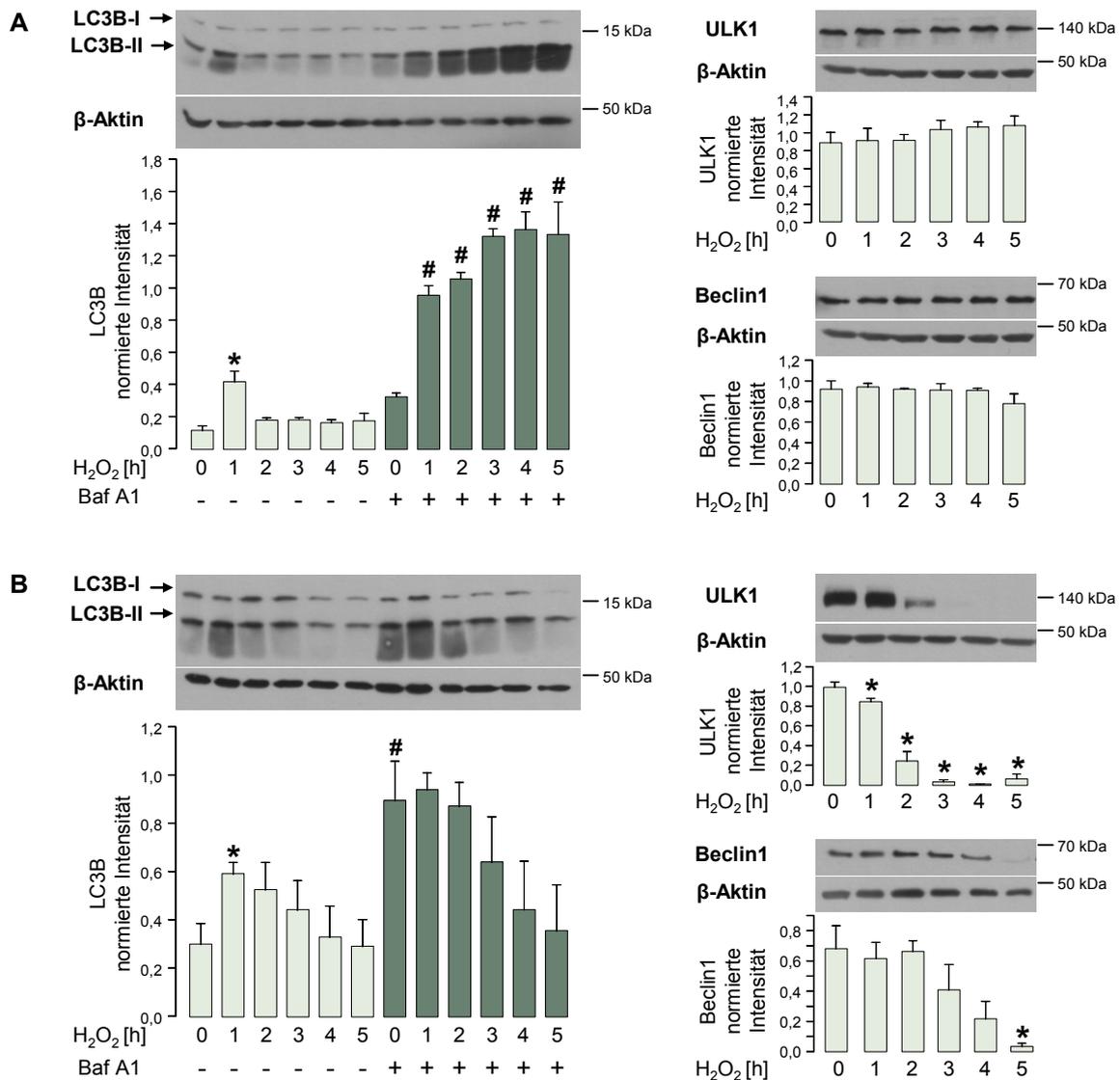
Sphäroide wurden generiert, eingebettet, für 30 min mit 10 nM Bafilomycin A1 (Baf A1) vorinkubiert und anschließend mit 50 µM A769662 stimuliert. Nach 24 h wurden die Sphäroide fixiert und die Anzahl und Länge der Aussprossungen ausgewertet. Dargestellt sind ein repräsentatives Bild sowie die Mittelwerte der Daten mit entsprechendem SEM. n=3, \* p<0,05 gegen unstimulierte Kontrolle, # p<0,05 gegen A769662-stimulierte Probe ohne Baf A1.

### **3.5 Regulierung der endothelialen Autophagie durch oxidativen Stress**

In den vorangegangenen Abschnitten konnte die Bedeutung der basalen Autophagie und die Rolle der AMPK-stimulierten Autophagie für Endothelzellen charakterisiert werden. Endothelzellen sind durch den direkten Kontakt zum Blut verschiedenen Stressoren ausgesetzt. Im folgenden Abschnitt sollte nun untersucht werden, wie sich oxidativer Stress auf Autophagie in Endothelzellen auswirkt. Dies ist von pathophysiologischer Relevanz, da Zellen des Gefäßsystems wie Leukozyten oder glatte Muskelzellen, aber auch Endothelzellen selbst, ROS bilden und dadurch oxidativer Stress entstehen kann. Des Weiteren wurde untersucht, wie Hypoxie die Autophagie in Endothelzellen beeinflusst, da es nach vaskulären Komplikationen, wie zum Beispiel einem Gefäßverschluss, zu einer unzureichenden Sauerstoffversorgung der Endothelzellen und des umliegenden Gewebes kommen kann.

#### **3.5.1 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierte Autophagie**

Die zeitabhängige Behandlung von HUVEC mit 100 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> führte zu einem transienten Anstieg der LC3B-Konjugation nach 1 h (Abbildung 37A), was auf eine Aktivierung der Autophagie schließen lässt. Nach Zusatz von Bafilomycin A1 verläuft die LC3B-Konjugation nicht mehr transient, sondern steigt stetig an. Dies weist auf einen erhöhten Autophagie-Flux hin. Werden Endothelzellen durch Zusatz von 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sehr hohem oxidativen Stress ausgesetzt, so verläuft die LC3B-Konjugation selbst unter Zusatz von Bafilomycin A1 transient (Abbildung 37B). Dies bedeutet, dass nach initialer Stimulierung der Autophagie durch 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eine Hemmung des Prozesses einsetzt. Wie in Abbildung 37B zu sehen, liegt dies vermutlich am Abbau der wichtigen Autophagieproteine ULK1 und Beclin1 unter diesen Bedingungen. Im Gegensatz dazu bleibt die Expression dieser beiden Proteine nach Einsatz von 100 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> unverändert (Abbildung 37A). Die Auswirkungen von oxidativem Stress auf die endotheliale Autophagie sind demzufolge dosisabhängig. Während geringer oxidativer Stress Autophagie stimuliert und dadurch eventuelle Schädigungen ausgleicht, kommt es nach anhaltendem hohen oxidativen Stress zum Abbau von Autophagie-Proteinen und zum Rückgang des Fluxes. Die Zellen können den hohen oxidativen Stress nicht mehr kompensieren und schalten vermutlich von Autophagie auf Apoptose um. Der Zelltod unter diesen Bedingungen wurde jedoch nicht untersucht.

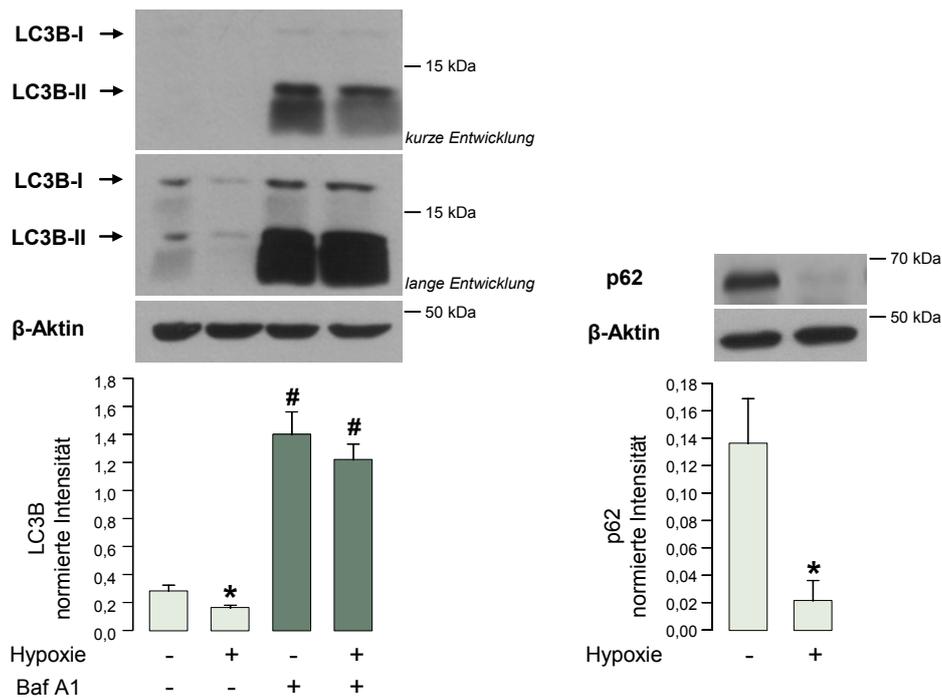


**Abbildung 37. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> beeinflusst Autophagie konzentrationsabhängig.**

Zellen wurden für 30 min mit 50 nM Bafilomycin A1 (Baf A1) vorinkubiert (für LC3B-Analysen) und für die angegebenen Zeiten mit 100 µM (A) oder 1 mM (B) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stimuliert. Zelllysate wurden im Western-Blot mit Antikörpern gegen die dargestellten Proteine angefärbt und densitometrisch ausgewertet. Dargestellt sind ein repräsentativer Blot und die Mittelwerte der Daten mit entsprechendem SEM. n=3 (A), n=4 (B), \* p<0,05 gegen unbehandelte Kontrolle, # p<0,05 gegen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-behandelte Probe ohne Baf A1.

### 3.5.2 Hypoxie-induzierte Autophagie

Zur Untersuchung des Einflusses von Hypoxie auf die endotheliale Autophagie wurden HUVEC für 24 h bei 1 % O<sub>2</sub> inkubiert. Unter diesen Bedingungen ist ein Abfall von LC3B-II im Vergleich zu Zellen, die unter normoxischen Bedingungen (20 % O<sub>2</sub>) inkubiert wurden, zu beobachten. Die Vorbehandlung mit Bafilomycin A1 führt zu einem Anstieg beider Signale (Abbildung 38). Auch die p62-Expression als zweiter Marker des Autophagie-Fluxes ist durch Hypoxie deutlich verringert, was für eine Aktivierung der Autophagie unter diesen Bedingungen spricht.



**Abbildung 38. Hypoxie stimuliert Autophagie.**

HUVEC wurden für 30 min mit 50 nM Bafilomycin A1 (Baf A1) vorinkubiert und anschließend für 24 h in Normoxie oder Hypoxie inkubiert. Zelllysate wurden in Western-Blot-Analysen mit Antikörpern gegen LC3B, p62 und β-Aktin angefärbt und densitometrisch ausgewertet. Für die Auswertung der Bafilomycin A1-behandelten Proben wurden die Blots mit kürzeren Entwicklungszeiten herangezogen. Dargestellt sind ein repräsentativer Blot und die Mittelwerte der Daten mit entsprechendem SEM. n=5, \* p<0,05 gegen Normoxie-Kontrolle, # p<0,05 gegen gleich behandelte Probe ohne Baf A1.

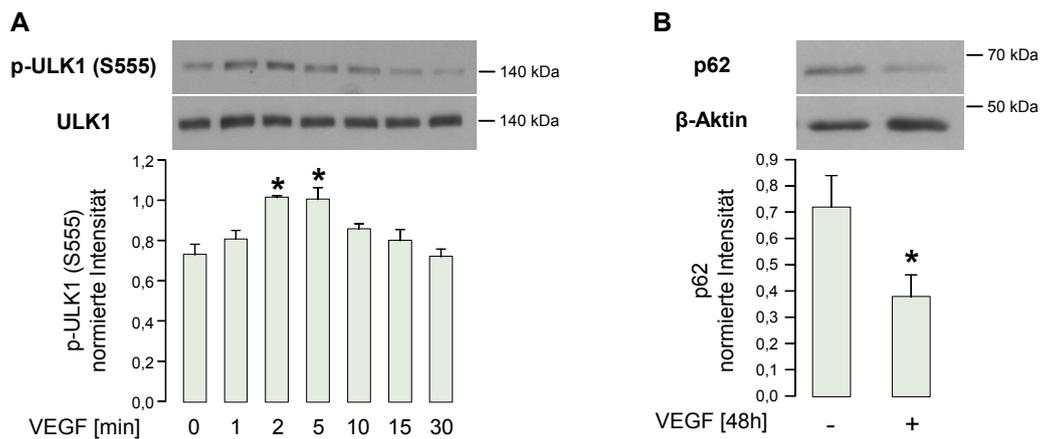
Dieses Kapitel zeigt, dass oxidativer Stress in der Lage ist, Autophagie zu stimulieren, vermutlich um eine Akkumulation Stress-bedingter Zellschädigungen zu reduzieren. In Abhängigkeit vom Ausmaß kann oxidativer Stress aber auch zur Hemmung der Autophagie und zum Zelltod führen. Auch unter hypoxischen Bedingungen kann Autophagie zum Schutz der Endothelzellen beitragen.

### 3.6 Regulierung der endothelialen Autophagie durch VEGF

#### 3.6.1 VEGF-induzierte Autophagie

Endotheliale Funktionen und Angiogenese werden durch vaskuläre Mediatoren und Wachstumsfaktoren reguliert. Bisher ist nicht bekannt, inwieweit diese Faktoren endotheliale Autophagie beeinflussen und somit zum Schutz der Endothelzellen und zur Aufrechterhaltung ihrer Funktion beitragen. Hier sollte deshalb untersucht werden, ob Autophagie durch Wachstumsfaktoren beeinflusst werden kann und dadurch eventuell optimale Bedingungen für Proliferation und Angiogenese geschaffen werden. Insbesondere wurden Effekte von VEGF auf die endotheliale Autophagie untersucht, da dieser Faktor als wichtiger angiogener Wachstumsfaktor unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen angesehen wird.

Endothelzellen wurden mit VEGF stimuliert und die ULK1-Phosphorylierung und p62-Expression als Autophagiemarker analysiert. Wie in Abbildung 39 zu sehen ist, induziert VEGF eine zeitabhängige Phosphorylierung und damit die Aktivierung von ULK1, was auf eine Initiierung der Autophagie durch VEGF schließen lässt. Zusätzlich ist ein deutlicher Abfall des p62-Signals nach 48 h VEGF-Stimulierung zu sehen. Da p62 spezifisch durch Autophagie abgebaut wird, spricht dieser Befund für eine langanhaltende Aktivierung der Autophagie durch VEGF.



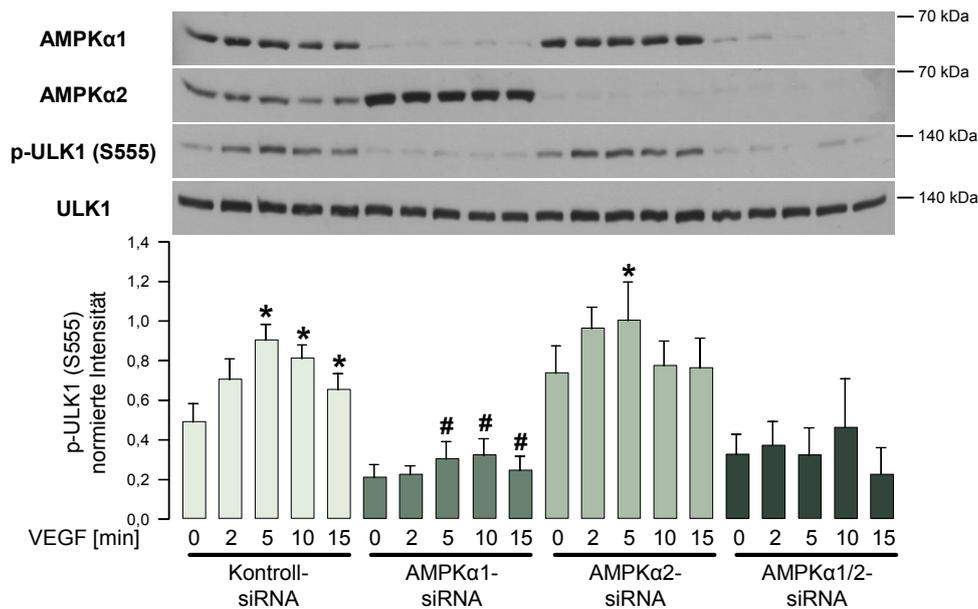
**Abbildung 39. VEGF stimuliert Autophagie in Endothelzellen.**

HUVEC wurden für die angegebenen Zeiten mit 50 ng/ml VEGF stimuliert. Zellysate wurden in Western-Blot-Analysen mit Antikörpern gegen p-ULK1 (S555), ULK1, p62 und  $\beta$ -Aktin untersucht und die Signale densitometrisch ausgewertet. Dargestellt sind ein repräsentativer Blot und die Mittelwerte der Daten mit SEM. n=3 (A), n=6 (B). \* p<0,05 gegen unstimulierte Kontrolle.

### 3.6.2 Beteiligung der AMPK an VEGF-induzierter Autophagie

Nachdem gezeigt werden konnte, dass Autophagie durch VEGF stimuliert werden kann, sollte nun die Frage geklärt werden, ob dies durch AMPK vermittelt wird. In früheren Arbeiten war bereits beobachtet worden, dass VEGF AMPK aktiviert und dass dieser Prozess für den Ablauf der Angiogenese essentiell ist [21]. Ein Zusammenhang zwischen AMPK-Aktivierung und Stimulierung der Autophagie konnte bereits in Kapitel 3.3 für 2-DG und A769662 gezeigt werden.

Um zu überprüfen, ob die VEGF-induzierte Autophagie durch AMPK vermittelt wird, wurden die beiden Isoformen der katalytischen Untereinheit der AMPK  $\alpha$ 1 und  $\alpha$ 2 allein oder kombiniert mittels siRNA herunterreguliert. Abbildung 40 zeigt, dass AMPK $\alpha$ 1-siRNA die VEGF-induzierte ULK1-Phosphorylierung signifikant hemmt und unterstreicht damit die Bedeutung der AMPK $\alpha$ 1 für die Stimulierung der Autophagie durch VEGF. Die Herunterregulierung beider AMPK-Isoformen  $\alpha$ 1 und  $\alpha$ 2 führt ebenfalls zu einer deutlichen Reduktion der VEGF-Antwort. Im Gegensatz dazu hat AMPK $\alpha$ 2-siRNA keinen Einfluss auf die VEGF-vermittelte ULK1-Phosphorylierung, was für einen Isoform-spezifischen Effekt spricht.



**Abbildung 40. VEGF-stimulierte Autophagie ist AMPKα1-vermittelt.**

HUVEC wurden mit Kontroll-siRNA bzw. AMPKα1- und/oder AMPKα2-siRNA transfiziert und für die angegebenen Zeiten mit 50 ng/ml VEGF stimuliert. Zelllysate wurden in Western-Blot-Analysen mit Antikörpern gegen p-ULK1 (S555), ULK1, AMPKα1 und AMPKα2 angefärbt und densitometrisch ausgewertet. Dargestellt sind ein repräsentativer Blot und die Mittelwerte der Daten mit SEM. n=5, \* p<0,05 gegen unstimulierte Kontrolle der gleichen siRNA-Behandlung, # p <0,05 gegen zeitgleich stimulierte Kontroll-siRNA-behandelte Probe.

Diese Daten beschreiben einen bisher nicht bekannten VEGF/AMPK/Autophagie-Signalweg, der die angiogene Wirkung von VEGF unterstützt. Sie charakterisieren damit einen Mechanismus, der die essentielle Bedeutung der AMPK für die VEGF-induzierte Angiogenese, die in früheren Arbeiten der Arbeitsgruppe publiziert wurde, erklären kann.

## 4 DISKUSSION

### 4.1 Beeinflussung der Autophagie in Endothelzellen

Die vorgelegte Arbeit hatte das Ziel, die Regulierung und Funktion der Autophagie in humanen Endothelzellen zu charakterisieren. Ein wichtiger methodischer Zugang war dabei die Herunterregulierung der beiden Autophagie-Initiatoren ULK1 und Beclin1 mittels siRNA. Die Herunterregulierung von jeweils einem der beiden Proteine führte bereits zu einer Hemmung der basalen und Hunger-induzierten Autophagie, wobei der Effekt von ULK1-siRNA deutlich stärker ausgeprägt war und Beclin1-siRNA nur einen schwachen Hemmeffekt zeigte. Der kombinierte Einsatz von ULK1- und Beclin1-siRNA bewirkte eine nahezu komplette Hemmung der Autophagie, wie anhand von LC3B- und p62-Analysen gezeigt wurde.

Beclin1 gehört zu den essentiellen Regulatoren der Autophagie. Der systemische *Knockout* von Beclin1 in Mäusen führt zu früher embryonaler Letalität [109], was dafür spricht, dass Beclin1-abhängige Autophagie für die embryonale Entwicklung von großer Bedeutung ist. Die *in vitro*-Beobachtungen zum Beclin1-*Knockdown* sind widersprüchlich und scheinen von Zellkultur- und Stimulationsbedingungen abzuhängen. Für HUVEC wurde bereits beschrieben, dass, ähnlich wie in der vorliegenden Arbeit, eine Herunterregulierung von Beclin1 kaum einen Effekt auf Autophagiemarker hat [110]. Andererseits konnte gezeigt werden, dass Autophagie in Endothelzellen ebenfalls über Veränderungen der Beclin1-Expression reguliert werden kann, wie im Falle der Stimulierung mit VEGF-A, Decorin [111] oder Endostatin [112] beobachtet wurde. Die alleinige Herunterregulierung von ULK1 führt in Übereinstimmung mit Literaturdaten [70, 113] zu einer starken Hemmung der Autophagie, allerdings wurden auch ULK1-unabhängige Effekte beschrieben [114, 115]. Welche Mechanismen dabei eine Rolle spielen und ob dies auch für Endothelzellen zutrifft, ist jedoch unklar. Die vorliegenden Daten zeigen aber, dass die gleichzeitige Herunterregulierung von ULK1 und Beclin1 zu einer zuverlässigen Hemmung der basalen und Hunger-induzierten Autophagie führt, die den alleinigen Effekt einer ULK1-Depletion übersteigt.

Neben ULK1 ist auch für die Isoform ULK2 eine Rolle bei der Regulierung der Autophagie beschrieben [116]. Es wird diskutiert, dass ULK2 nicht essentiell ist, um Autophagie zu induzieren, aber dass ULK2 einen Verlust von ULK1 kompensieren kann. Beide Kinasen zeigen redundante, aber auch nicht-redundante Funktionen. Diese Aussage wird dadurch unterstützt, dass ULK1<sup>-/-</sup>- bzw. ULK2<sup>-/-</sup>-Mäuse lebensfähig sind. Während ULK1<sup>-/-</sup>-Mäuse nur einen leichten Phänotyp in der Mitochondrienhomöostase aufweisen [117], zeigen ULK2<sup>-/-</sup>-Mäuse dagegen keinen Autophagie-relevanten Phänotyp [114]. Der *Knockout* beider Proteine gleichzeitig ist jedoch neonatal letal [118]. Über die Expression von ULK2 in Endothelzellen ist nichts bekannt. Da jedoch die Herunterregulation von ULK1 zu einer sehr starken Hemmung der Autophagie führt, scheint die Bedeutung von ULK2 in Endothelzellen eher gering zu sein.

## **4.2 Autophagie ist für den Erhalt der Endothelzellfunktion wichtig**

### **4.2.1 Endothelzellen verfügen über eine aktive basale Autophagie**

Die Daten der vorliegenden Arbeit zeigen, dass Autophagie eine entscheidende Rolle bei der Aufrechterhaltung der intrazellulären Homöostase in Endothelzellen spielt. Wie in Kapitel 3.1.1 beschrieben, zeigen HUVEC eine hohe Autophagie-Aktivität unter nährstoffreichen Bedingungen. Letztere wurde im Vergleich mit Nierenkarzinomzellen 786-O und primären Maus-Kardiomyozyten charakterisiert, wobei die Akkumulation von konjugiertem LC3B nach Bafilomycin A1-Behandlung als Maß für die Stärke des Autophagie-Fluxes diente. Diese Methode gibt jedoch keinen Aufschluss darüber, ob es sich um nicht-selektive oder selektive Formen der Autophagie, wie z. B. Mitophagie handelt. Von Tumorzellen ist bekannt, dass ihr Überleben stark von Autophagie abhängt. Sie weisen einen hohen Autophagie-Flux auf, um die durch schnelles Wachstum bedingten erhöhten metabolischen Anforderungen erfüllen zu können und Stress durch Chemotherapeutika zu minimieren [106]. Die Experimente der vorliegenden Arbeit zeigen, dass der Autophagie-Flux in Endothelzellen sogar stärker ausgeprägt war als in 786-O-Nierenkarzinomzellen. Die ebenfalls in den Experimenten eingesetzten Kardiomyozyten dienten hier als Negativkontrolle, da bekannt ist, dass sie einen sehr geringen Autophagie-Flux unter basalen Bedingungen aufweisen [107]. Tatsächlich führt Bafilomycin A1-Behandlung hier zu keiner Akkumulation von LC3B-II.

Basale Autophagie wird als homöostatischer Prozess angesehen, der das Überleben von Zellen sichert und Zellfunktionen aufrechterhält, indem fehlerhafte Proteine und Organellen abgebaut und recycelt werden, wie es unter anderem in Neuronen [119, 120] und Hepatozyten [121] beschrieben ist. Mizushima *et al.* konnten zeigen, dass das Ausmaß basaler Autophagie zelltypabhängig ist [107]. Die Daten der vorliegenden Arbeit zeigen, dass Endothelzellen zu den Zellen mit hoher basaler Autophagie zählen, was mit ihrer Lokalisation und ihrer besonderen Belastung durch mechanische, oxidative und inflammatorische Stressfaktoren zusammenhängen könnte. Endothelzellen gehören zu den langsam proliferierenden Zellen und teilen sich *in vivo* nur etwa einmal alle 6 Monate [122]. Ohne den Prozess der Autophagie würden Schäden stärker als in schnell proliferierenden Zellen akkumulieren. In Übereinstimmung mit den vorliegenden Daten wird berichtet, dass die basale Autophagie für die zelluläre Homöostase im Gefäßsystem von großer Bedeutung ist [123], obwohl es in diesem Zusammenhang kaum Daten zu Endothelzellen gibt. In atherosklerotischen Läsionen sowie in ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen, die als Modell für Atherogenese dienen, kommt es zu einer Verminderung der Autophagie-Aktivität, was die wichtige Rolle der basalen Autophagie im vaskulären System unterstreicht.

#### 4.2.2 Autophagie hat wenig Bedeutung für die Energiehomöostase in Endothelzellen

Die hier vorliegenden Daten lassen vermuten, dass der Beitrag der Autophagie zum Energiegleichgewicht in Endothelzellen gering ist. Die Hemmung der Autophagie bewirkt weder eine deutliche Veränderung der basalen ATP-Spiegel noch eine Aktivierung des Energiesensors AMPK (Abbildung 23). Ebenso wenig ist die Oxidation intrazellulärer Fettsäuren durch Hemmung der Autophagie beeinflusst, was dafür spricht, dass Autophagie keine Fettsäuren als Substrate liefert. In Autophagie-defizienten Zellen kommt es jedoch zu einem leichten Anstieg der Fettsäureoxidation aus extrazellulären Quellen, was bedeuten könnte, dass eine eventuell auftretende Verminderung basaler ATP-Spiegel durch andere Energie-generierende Wege kompensiert wird. Autophagie scheint auch nach Einwirkung von metabolischem Stress nicht an der Wiederherstellung des Energiegleichgewichtes beteiligt zu sein, obwohl sie unter diesen Bedingungen aktiviert wird. Dies zeigen die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente mit Einsatz des Glykolyse-Inhibitors 2-DG. Der ausgeprägte glykolytische Metabolismus der Endothelzellen [124] macht sie anfällig gegenüber 2-DG und führt zu einem starken Abfall von intrazellulären ATP-Spiegeln. Der Abfall ist jedoch nicht komplett, was ein Hinweis darauf ist, dass auch andere Stoffwechselwege zur Energiegewinnung aktiv sind [3]. Letztere tragen vermutlich auch zur teilweisen Wiederherstellung der ATP-Spiegel nach einem Zeitraum von 16 h bei. Eine Hemmung der Autophagie durch ULK1/Beclin1-siRNA führt weder zu einem stärkeren Abfall noch zu einer Beeinträchtigung der Wiederherstellung der ATP-Spiegel. Nach diesen Daten scheint Autophagie als Energiequelle in Endothelzellen, zumindest unter den hier untersuchten Bedingungen, nur eine untergeordnete Rolle zu spielen. Endothelzellen verfügen über eine Vielzahl anderer Stoffwechselwege, die unter Stressbedingungen hochreguliert werden können [3]. Daten aus der Arbeitsgruppe zeigen, dass die Oxidation von Fettsäuren durch 2-DG stimuliert wird [125, 126]. Allerdings scheint auch die Fettsäureoxidation nicht für die Wiederherstellung der ATP-Spiegel bei blockierter Glykolyse verantwortlich zu sein, da eine Erholung auch dann erfolgt, wenn der Fettsäuretransport in die Mitochondrien durch Etomoxir blockiert und damit die Fettsäureoxidation inhibiert wird. Es ist möglich, dass die Endothelzellen nach Hemmung der Glykolyse ihren Stoffwechsel auf Glukoseoxidation umstellen [127] oder ihre Energie aus Glutamin gewinnen, welches in den Trikarbonsäurezyklus eingespeist werden kann [128]. Diese Wege der Energiegewinnung sind zwar durch die damit verbundene ROS-Produktion weniger schonend für die Zelle als die Glykolyse, jedoch notwendig, um den Energiemangel zu überwinden. Eine Abhängigkeit der intrazellulären Energiehomöostase von der Autophagie wurde dagegen unter anderem für T-Zellen [129], Trophoblasten [130] und hämatopoetische Zellen des Knochenmarks [131] beschrieben. Die Hauptfunktionen der Autophagie können jedoch abhängig von Zelltyp und Metabolismus variieren.

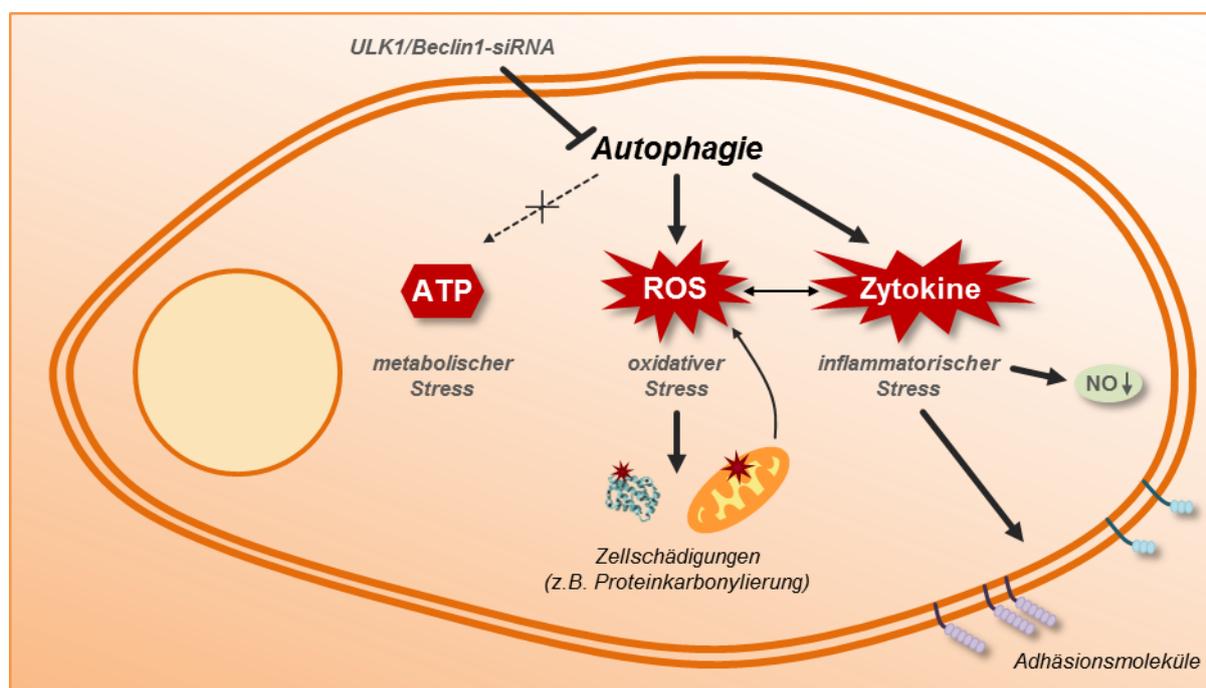
### 4.2.3 Autophagie ist ein wichtiger Mechanismus zur Stressprotektion

Literaturdaten lassen vermuten, dass Endothelzellen eine hohe Rate an Mitophagie haben, um die Anzahl der Mitochondrien gering zu halten. Tatsächlich machen Mitochondrien nur 5 % des Endothelzellvolumens aus [132]. Dagegen weisen zum Beispiel Hepatozyten eine Mitochondrienmasse von 28 % auf. Durch eine geringe Anzahl von Mitochondrien wird vermutlich ein niedriger Sauerstoffverbrauch sichergestellt und ermöglicht, dass ein hoher Anteil des aufgenommenen Sauerstoffs in das umliegende Gewebe diffundiert [3]. Gleichzeitig wird eine übermäßige ROS-Produktion in der Atmungskette verhindert [133]. Um trotzdem ausreichend Energie produzieren zu können, haben Endothelzellen einen hohen aeroben glykolytischen Metabolismus. Diese Literaturdaten lassen vermuten, dass eine Hemmung der Mitophagie eine verstärkte ROS-Produktion in Endothelzellen bewirken kann. Tatsächlich führt die Hemmung der Autophagie durch ULK1/Beclin1-siRNA in den hier gezeigten Experimenten zu Proteinkarboxylierung und GSH-Verbrauch, was auf einen Anstieg der ROS-Produktion schließen lässt und damit diese Vermutung unterstützt. Die Quelle des oxidativen Stresses wurde in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht untersucht. ROS könnten durch defekte Mitochondrien entstehen, die durch Hemmung der Mitophagie, welche ebenfalls durch ULK1 reguliert wird [134], akkumulieren. Durch eine Hemmung der Mitophagie und der damit verbundenen Erhöhung der Mitochondrienanzahl kann es zudem zu einem Anstieg des oxidativen Metabolismus kommen, wie zum Beispiel der Glukose- oder Fettsäureoxidation. In Übereinstimmung damit war ein moderater Anstieg der Fettsäureoxidation nach ULK1/Beclin1-siRNA zu beobachten, was darauf hinweist, dass der vorwiegend nicht-oxidative Metabolismus der Endothelzellen möglicherweise in Richtung oxidativer Zustand verschoben wurde. Autophagie könnte den Redoxzustand der Zelle auch durch Beeinflussung des antioxidativen Systems kontrollieren. Die Expression von Peroxiredoxin1, einem wichtigen Enzym zur ROS-Abwehr in Endothelzellen [135], wird durch ULK1/Beclin1-siRNA jedoch nicht verändert. Diese Beobachtung schließt eine Regulierung anderer antioxidativer Proteine jedoch nicht aus. Für eine konkretere Aussage über das antioxidative System sind daher weitere Untersuchungen notwendig.

Zusätzlich zu oxidativem Stress konnte in Endothelzellen mit gehemmter Autophagie erhöhter inflammatorischer Stress beobachtet werden. In Experimenten, in denen die basale Zytokin-Bildung zwischen Kontrollzellen und ULK1/Beclin1-siRNA-behandelten Zellen verglichen wurde, war eine erhöhte Sekretion der proinflammatorischen Zytokine TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$ , MCP1, IL8 und IL6 nach Autophagie-Hemmung zu sehen. In Übereinstimmung damit zeigen auch Literaturdaten, dass Autophagie die Bildung und Sekretion proinflammatorischer Zytokine in verschiedenen Zellen hemmt [123, 136-138]. So konnten Wechselwirkungen zwischen Autophagie und dem Inflammasom, das für die Prozessierung von IL1 $\beta$  wichtig ist, beschrieben werden [139]. Dies könnte im Zusammenhang mit dem nach Autophagie-

Hemmung beobachteten Anstieg von ROS stehen, da ROS zu einer Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms und damit zu einer gesteigerten IL1 $\beta$ -Produktion und -Sekretion führen können [140]. Der größte Anstieg war in der vorliegenden Arbeit jedoch bei TNF $\alpha$  zu sehen. TNF $\alpha$  ist eines der wichtigsten Zytokine, das Endothelzellfunktionen beeinflusst. Es führt zum Anstieg von ROS, zur Senkung der NO-Bioverfügbarkeit und zur Expression von Adhäsionsmolekülen und induziert damit einen inflammatorischen Phänotyp, der mit einer Endotheldysfunktion einhergeht [141]. Die Regulation der TNF $\alpha$ -Sekretion durch Autophagie ist bisher kaum untersucht, nur aus Immunzellen gibt es Hinweise auf eine allerdings unterstützende Rolle der Autophagie in diesem Prozess [142].

Zusammenfassend zeigen die diskutierten Daten, dass Endothelzellen durch eine hohe basale Autophagie-Aktivität gekennzeichnet sind und dass die Autophagie zur Aufrechterhaltung der Homöostase in Endothelzellen unter Ruhebedingungen von großer Bedeutung ist. Autophagie scheint in Endothelzellen kaum eine Rolle bei der Regulierung des Energiegleichgewichtes zu spielen. Jedoch führt der Verlust der Autophagie-Leistung zu einem Anstieg von oxidativem und inflammatorischem Stress, was die Ausbildung einer Endotheldysfunktion begünstigen kann (Abbildung 41).



**Abbildung 41. Funktion der basalen Autophagie in Endothelzellen.**

Hemmung der Autophagie durch ULK1/Beclin1-siRNA führt zu einem Anstieg von oxidativen Zellschädigungen wie Proteinkarboxylierung und einer erhöhten Sekretion von Zytokinen, was zur Ausprägung eines inflammatorischen Phänotypes mit einer erhöhten Expression von Adhäsionsmolekülen und einer verminderten NO-Bioverfügbarkeit führen kann. Erhöhte ROS- und Zytokin-Spiegel können sich zudem gegenseitig beeinflussen. Demnach schützt Autophagie Endothelzellen unter basalen Bedingungen vor oxidativem und inflammatorischem Stress und einer damit verbundenen Akkumulation von Zellschädigungen und -veränderungen. Dagegen hat die Hemmung dieses Prozesses keinen Einfluss auf intrazelluläre ATP-Spiegel und Energiehomöostase.

NO: Stickstoffmonoxid, ROS: reaktive Sauerstoffspezies

#### **4.2.4 Autophagie sichert Wachstum und Überleben der Endothelzellen**

Die Daten dieser Arbeit zeigen, dass die Hemmung der Autophagie in Endothelzellen nicht nur zu erhöhtem oxidativen und inflammatorischen Stress führt, sondern auch mit einer Beeinträchtigung von Endothelzellfunktionen einhergeht (Abbildung 42A). Eine Hemmung der Autophagie durch ULK1/Beclin1-siRNA führt sowohl zu einem Anstieg des Zelltodes als auch zu einem Verlust der Kapazität zur Proliferation. In Übereinstimmung damit zeigen Weikel *et al.*, dass eine gestörte Autophagie in humanen Aorten-Endothelzellen mit einem Anstieg apoptotischer Zellen assoziiert ist [143]. Weiterhin verstärkt eine Hemmung der endothelialen Autophagie die proapoptotischen Eigenschaften von Chemotherapeutika [112, 144, 145]. All diese Daten unterstreichen die Rolle der Autophagie als einen Überlebensmechanismus für Endothelzellen. Daneben sind auch Auswirkungen einer gehemmten Autophagie auf die Proliferation der Endothelzellen zu beobachten.

Die Zellzyklusuntersuchungen zeigen eine Verminderung der Zahl proliferierender Zellen 24 und 48 h nach Transfektion mit ULK1/Beclin1-siRNA. In Übereinstimmung damit war die Zellzahl bei manueller Auszählung nach 72 h deutlich reduziert, wobei hier ein kombinierter Effekt aus Hemmung von Proliferation und Überleben beurteilt wird, da nur adhärente lebende Zellen bei der Zellzählung erfasst wurden. Die Tatsache, dass Hemmung von Proliferation und Überleben nach Herunterregulierung von ULK1/Beclin1 zeitabhängig zunimmt, legt nahe, dass es nach Inhibierung der Autophagie zu einer schrittweisen Akkumulation von Zellschädigungen kommt, die die Zellfunktion beeinträchtigen.

#### **4.2.5 Autophagie reguliert die VEGF-induzierte Angiogenese**

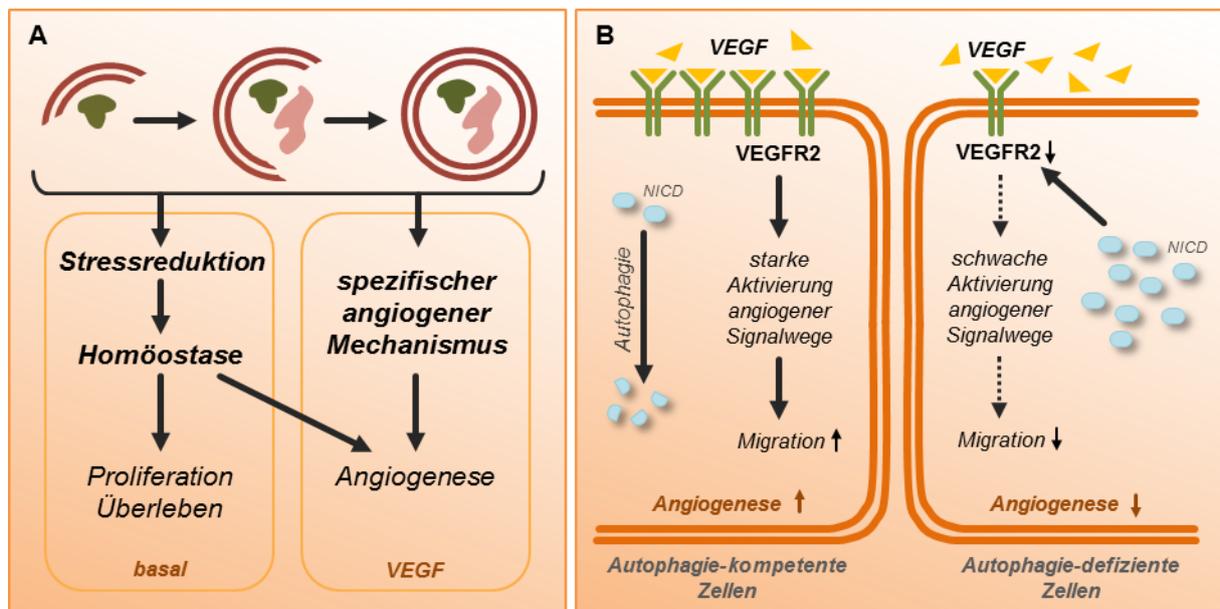
Die hier gezeigten Daten demonstrieren, dass die Hemmung der Autophagie auch eine weitere bedeutende Endothelzellfunktion beeinflusst, die VEGF-induzierte Angiogenese (Abbildung 42A). VEGF stellt den wichtigsten angiogenen Wachstumsfaktor dar und stimuliert die Aussprossungen von kapillarähnlichen Strukturen im Sphäroid-Assay. Nach Hemmung der Autophagie durch ULK1/Beclin1-siRNA ist VEGF jedoch kaum noch in der Lage, die Kapillarbildung zu induzieren. Diese Einschränkung beruht jedoch nicht auf einer Beeinflussung der VEGF-induzierten Signalwege in Autophagie-defizienten Zellen. Die vorliegenden Daten zeigen, dass weder die VEGFR2-Phosphorylierung noch die VEGF-induzierten Phosphorylierungen der untersuchten Signalproteine (PLC $\gamma$ , eNOS, ERK1/2, AMPK und ACC) nach Herunterregulierung von ULK1/Beclin1 wesentlich verändert sind. Auch die für die Angiogenese essentiellen Zellfunktionen, die durch die genannten Signalwege induziert werden, wie Proliferation (ERK1/2-vermittelt) und Überleben der Zellen (Akt-vermittelt), bleiben durch VEGF stimulierbar, obwohl die jeweiligen basalen Werte aus Autophagie-defizienten Zellen im Vergleich zu intakten Kontrollzellen deutlich verringert sind. Die VEGF-induzierten Antworten finden in Autophagie-defizienten Zellen sozusagen auf

einem niedrigeren Niveau statt, wobei die jeweiligen prozentualen Anstiege von Proliferation und Überleben nach VEGF-Behandlung mit denen in Autophagie-kompetenten Zellen durchaus vergleichbar sind. Die Beeinträchtigung von basaler Proliferation und Überleben ist, wie oben diskutiert, vermutlich auf den schlechten Grundzustand der Autophagie-defizienten Zellen zurückzuführen. Der überlebenssteigernde Effekt von VEGF bleibt allerdings erhalten und wird daher vermutlich nicht durch Autophagie vermittelt. Er beruht vermutlich auf der Aktivierung des Akt-Signalweges, der für das Überleben von Endothelzellen wichtig ist [146]. Eine Hemmung der VEGF-induzierten Angiogenese durch Hemmung der Autophagie wurde bereits in bovinen Aorten-Endothelzellen beobachtet, obwohl dabei keine Angaben zur Überlebensfähigkeit der Zellen gemacht wurden [147].

Um die proangiogene Funktion der Autophagie in Zellen zu untersuchen, ohne dass diese zu Beginn des Experiments bereits durch erhöhten zellulären Stress gekennzeichnet sind, wurden Experimente mit dem Autophagie-Inhibitor Bafilomycin A1 durchgeführt. Dabei wurde eine Bafilomycin A1-Konzentration gewählt, die Autophagie signifikant hemmt, im gewählten Zeitraum aber nur geringe zytotoxische Wirkungen aufweist. Auch die Hemmung der Autophagie durch Bafilomycin A1-Zusatz verminderte die Angiogenese im Sphäroid-Assay nach VEGF-Zusatz signifikant. Dies kann jedoch nur zu einem geringen Teil auf erhöhten zellulären Stress zurückgeführt werden, da es unter diesen Bedingungen kaum zu einem Anstieg des Zelltodes kommt. Diese Daten sprechen für eine spezifische Beeinflussung der Angiogenese durch Autophagie. Vorstellbar wäre zum Beispiel, dass Autophagie zum Abbau von Signalmolekülen beiträgt, die die Angiogenese inhibieren. Ein möglicher Mechanismus könnte die Interaktion mit dem Notch-Signalweg sein (Abbildung 42B). Dieser Signalweg ist unter normalen Bedingungen für die Hemmung der Migration in den *stalk*-Zellen verantwortlich und wird nach Aktivierung der *tip*-Zellen durch VEGF induziert. Eine Aktivierung des Notch-Rezeptors führt zur Abspaltung seiner intrazellulären Domäne (*notch intracellular domain*, NICD). Diese agiert als Transkriptionsfaktor, der durch Herunterregulierung des VEGFR2 eine Hemmung der Migration der betroffenen Zellen bewirkt und dadurch antiangiogene Eigenschaften aufweist [148]. Kürzlich wurde berichtet, dass NICD durch Autophagie abgebaut werden kann [149]. Nach Hemmung der Autophagie könnte es daher zu einer Akkumulation von NICD kommen, wodurch VEGF nicht mehr in der Lage wäre, die Aktivierung und Migration von Zellen zu bewirken und Angiogenese zu induzieren.

Zusammenfassend konnte durch die in Kapitel 4.2. diskutierten Daten gezeigt werden, dass Endothelzellen einen ausgeprägten Autophagie-Flux unter basalen Bedingungen aufweisen. Dies ist wichtig, um die zelluläre Homöostase aufrecht zu erhalten und einem Anstieg von oxidativem und inflammatorischem Stress entgegen zu wirken. Dadurch können Endothelzellfunktionen, wie das Überleben der Zellen sowie Proliferation und Angiogenese

gewährleistet werden. Eine Hemmung der Autophagie führt zu zellulärem Stress und Einschränkung der Funktion. Autophagie scheint zudem auch spezifische Effekte auf die Regulation der Angiogenese zu haben, da eine Hemmung der Angiogenese *in vitro* auch dann beobachtet wird, wenn Autophagie gehemmt ist, ohne dass das Überleben der Zellen wesentlich beeinträchtigt wird. Diese Schlussfolgerungen sind in Abbildung 42 zusammengefasst.



**Abbildung 42. Bedeutung der Autophagie für die Endothelzellfunktion.**

**A.** Über die Reduktion von intrazellulärem Stress gewährleistet Autophagie die Aufrechterhaltung der intrazellulären Homöostase. Dies ist wichtig, um Proliferation und das Überleben der Zellen unter basalen Bedingungen sicherzustellen, aber auch um VEGF-stimulierte Angiogenese zu gewährleisten. Zudem scheint Autophagie über einen oder mehrere spezifische Mechanismen Angiogenese spezifisch zu beeinflussen. **B.** Hypothese zur spezifischen, proangiogenen Wirkung von Autophagie. Unter normalen Bedingungen (links) führt VEGF über Stimulation von angiogenen Signalwegen zur Aktivierung der Migration als einen initialen Schritt für die Induktion der Angiogenese. In diesen Zellen wird durch autophagosomalen Abbau die Konzentration des antiangiogenen NICD gering gehalten. Bei Hemmung der Autophagie (rechts) kommt es zur Akkumulation des NICD, welches die Expression des VEGFR2 heruntermuliert und dadurch die Effekte von VEGF, wie Aktivierung von angiogenen Signalwegen, Migration und Angiogenese unterdrückt.

NICD: notch intracellular domain, VEGF: vascular endothelial growth factor, VEGFR2: VEGF-Rezeptor 2

Das Verständnis über die Aufrechterhaltung der Endothelzell-Homöostase und -Funktion ist von großem medizinischem Interesse, da eine Endotheldysfunktion das Risiko von kardiovaskulären Ereignissen stark erhöht. Zudem ist Angiogenese ein Prozess, der sowohl unter pathophysiologischen als auch unter pharmakologischen Gesichtspunkten von großer Bedeutung ist.

### 4.3 AMPK aktiviert endotheliale Autophagie

Autophagie gehört zu den adaptiven Stressantworten und muss an einen erhöhten Bedarf angepasst werden. Dies kann über verschiedene Signalwege erfolgen. Eine Kinase, die durch verschiedene Stressoren wie Energiemangel oder ROS aktiviert werden kann und zur Erhöhung der Autophagie beiträgt, ist AMPK. Die vorliegenden Daten zeigen, dass die AMPK-Aktivatoren 2-DG, A769662 und AICAR zu einer Aktivierung der Autophagie in Endothelzellen führen. Dies wurde anhand der Phosphorylierung des Autophagie-Initiators ULK1, der Verminderung der mTOR-Aktivität und der LC3B-Konjugation nachgewiesen.

A769662 und AICAR aktivieren AMPK direkt, während 2-DG auf einem indirekten Weg zur AMPK-Aktivierung führt, da durch Hemmung der Glykolyse zelluläre ATP-Spiegel gesenkt werden und AMP ansteigt [21]. Weiterhin wurde eine ROS-abhängige AMPK-Aktivierung nach 2-DG beobachtet [55].

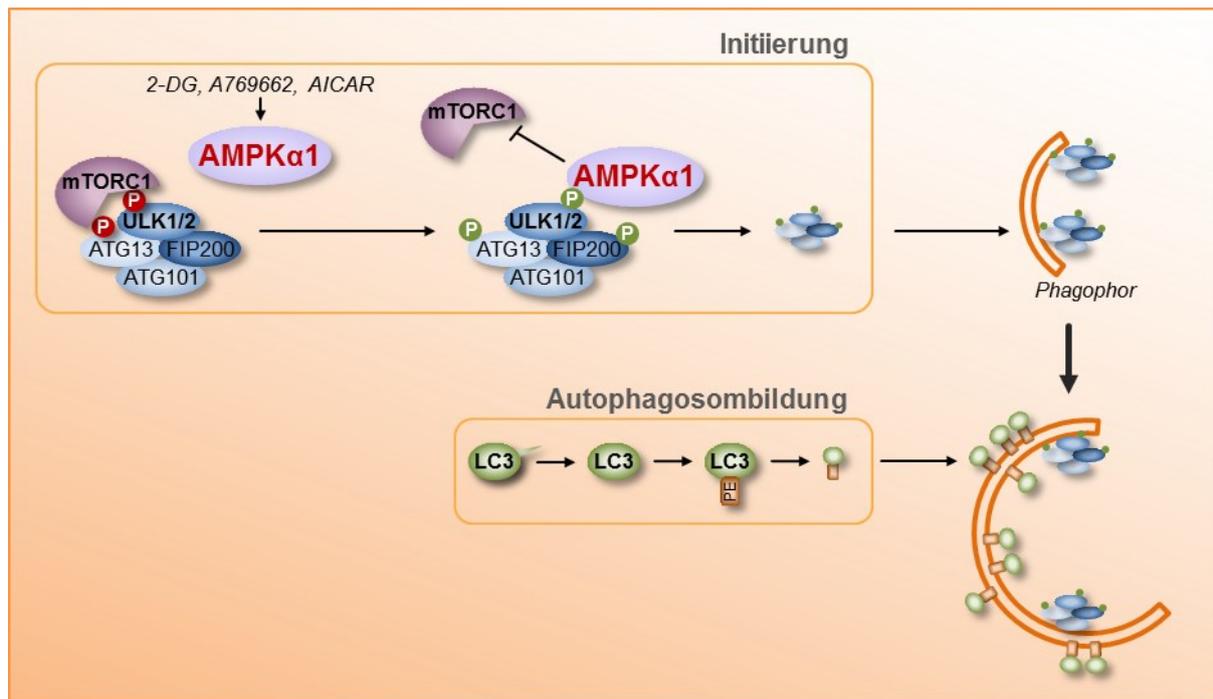
Die Daten der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die eingesetzten AMPK-Aktivatoren eine Phosphorylierung von ULK1 an S555 bewirken (Abbildung 43). Dieser Rest wird spezifisch durch AMPK phosphoryliert und spielt eine entscheidende Rolle für die Funktion von ULK1 bei der Initiierung der Autophagie [150]. Eine Herunterregulierung der katalytischen AMPK-Untereinheiten  $\alpha 1$  und  $\alpha 2$  bestätigt, dass die 2-DG-, A769662- und AICAR-induzierte ULK1-Phosphorylierung durch AMPK $\alpha 1$  vermittelt wird (Daten für AICAR nicht gezeigt). AMPK $\alpha 2$  ist hingegen nicht für die ULK1-Phosphorylierung in Endothelzellen verantwortlich. Die Regulierung und Phosphorylierung von ULK1 an verschiedenen Resten durch AMPK konnte bereits in mehreren Zelltypen gezeigt werden [150-153]. In Endothelzellen gibt es bislang 2 Arbeiten, die eine ULK1-Phosphorylierung an S555 nach AMPK-Stimulierung demonstrieren [143, 154]. Über die spezifische Beteiligung verschiedener AMPK-Isoformen an der ULK1-Phosphorylierung ist hingegen kaum etwas bekannt. Zwar konnte gezeigt werden, dass AMPK $\alpha 1$  ULK1 in Erythrozyten phosphoryliert [155], während dies in Skelettmuskelzellen durch AMPK $\alpha 2$  vermittelt wird [156], jedoch fehlt in beiden Studien der Vergleich zur jeweils anderen Isoform. Die Expression und Funktion der AMPK-Isoformen können zelltypabhängig variieren [19, 45]. Der fehlende Einfluss der AMPK $\alpha 2$ -Isoform auf den Prozess der Autophagie, der in der vorliegenden Arbeit beobachtet wurde, hängt eventuell damit zusammen, dass sich ein großer Teil von AMPK $\alpha 2$  im Nukleus befindet [17], während AMPK $\alpha 1$  sowie die Substrate ULK1 und mTOR im Zytoplasma bzw. an der Lysosomenmembran lokalisiert sind [17, 70, 157].

Parallel zu einer Aktivierung von ULK1 führt die AMPK-Aktivierung durch 2-DG, A769662 und AICAR in der vorliegenden Arbeit zu einer Hemmung der p70S6K-Phosphorylierung. Dies ist ein Indikator für eine reduzierte mTOR-Aktivität. mTOR ist ein wichtiger Regulator der Autophagie in Endothelzellen und anderen Zelltypen. AMPK, mTOR und ULK1 werden als ‚Triade‘ bezeichnet, die gegenseitig in komplexer Wechselwirkung zueinander stehen

[158]. Unter basalen Bedingungen hemmt mTOR die Aktivität des ULK-Komplexes durch inhibitorische Phosphorylierungen von ULK1/2 und ATG13, einem Regulator von ULK1/2 [69]. Die Inhibierung von mTOR nach AMPK-Stimulierung und die damit verbundene Aufhebung der ULK1-Hemmung werden neben der AMPK-vermittelten ULK1-Phosphorylierung als ein weiterer Mechanismus gesehen, um eine volle Aktivierung des ULK-Komplexes zu erreichen und Autophagie zu initiieren (Abbildung 43). mTOR-Hemmung durch AMPK und dadurch initiierte Aktivierung der Autophagie wurde in Endothelzellen bereits beobachtet [55, 136, 159-161], wobei die genauen molekularen Zusammenhänge jedoch nicht untersucht wurden. Eine Vielzahl von Studien in anderen Zelltypen zeigt jedoch, dass AMPK mTOR auf verschiedene Weisen inhibieren kann. AMPK führt zum einen zu einer Phosphorylierung und damit Aktivierung von TSC2 [36], einem negativen Regulator von mTOR. Des Weiteren wurde gezeigt, dass AMPK den mTOR-Komplextspartner Raptor phosphoryliert und inhibiert [37] oder zu einer direkten Phosphorylierung von mTOR führt [162].

Obwohl in der vorliegenden Arbeit eine mTOR-Hemmung nach AMPK-Aktivierung nachweisbar war, konnte die AMPK-Abhängigkeit dieses Prozesses nicht eindeutig gezeigt werden. Die Herunterregulierung von AMPK $\alpha$ 1 und/oder AMPK $\alpha$ 2 hatte keine Auswirkung auf die Hemmung der p70S6K-Phosphorylierung nach 2-DG und nur einen kleinen Effekt nach A769662-Stimulation. Andererseits war die basale Phosphorylierung der p70S6K durch Fehlen von AMPK $\alpha$ 1 und AMPK $\alpha$ 1/ $\alpha$ 2 erhöht, was für eine negative Regulierung der mTOR-Aktivität durch AMPK spricht. Diese Ergebnisse bedürfen weiterer Klärung. Die fehlende AMPK-Abhängigkeit der mTOR-Hemmung nach 2-DG-Behandlung könnte mit einem veränderten Energie- und Aminosäurestatus der Zelle zusammenhängen. Durch 2-DG wird die Glykolyse als Hauptenergiequelle unterdrückt, so dass der Energiestoffwechsel auch aus dem Aminosäurestoffwechsel, zum Beispiel über Glutamin oder Glukoneogenese gespeist werden muss. In der Folge könnte es zu einer Verringerung der Aminosäurespiegel und einer dadurch bedingten mTOR-Hemmung kommen. Ähnliche Prozesse wurden in AMPK $\alpha$ 1/ $\alpha$ 2<sup>-/-</sup>-*mouse embryonic fibroblasts* (MEF's) beschrieben [163].

Neben der Initiierung der Autophagie durch Aktivierung von ULK1 konnte auch die Bildung von Autophagosomen nach Einwirkung von AMPK-Aktivatoren nachgewiesen werden. Dazu wurde die Konjugation von LC3B, einem Markerprotein von Autophagosomen, untersucht. 2-DG, A769662 und AICAR induzierten einen moderaten Anstieg der LC3B-Konjugation nach kurzen Stimulationszeiten. Danach war ein Absinken der LC3B-Konjugation unter das Basalniveau zu sehen. Dies konnte auf einen gesteigerten Verbrauch zurückgeführt werden, da es durch den lysosomalen Inhibitor Bafilomycin A1 verhindert wurde.



**Abbildung 43. AMPK-regulierte Autophagie.**

AMPK-Aktivierung durch 2-Deoxyglukose (2-DG), A769662 oder AICAR führt zu einer AMPKα1-vermittelten Phosphorylierung von ULK1 an S555, woraufhin der ULK1/2-Komplex aktiviert wird. Gleichzeitig kommt es zu einer Hemmung von mTOR, was die volle Aktivierung des ULK1/2-Komplexes unterstützt. Die Stimulierung des ULK1/2-Komplexes führt zur Initiierung der Autophagie in deren weiteren Verlauf es zur Konjugation von LC3B kommt, um die Membran des sich bildenden Autophagosoms zu verlängern. Das gezeigte Schema ist nicht in allen Teilen mit Daten belegt.

2-DG: 2-Deoxyglukose, ATG13/101: *autophagy-related protein 13/101*, FIP200: *200 kDa focal adhesion kinase family-interacting protein*, LC3B: *microtubule-associated protein light chain 3B*, mTOR: *mechanistic target of rapamycin*, P: Phosphorylierung (rot – inhibierend, grün – aktivierend), ULK1/2: *uncoordinated 51-like kinase 1/2*

Die hier gezeigten Daten lassen eine AMPK-vermittelte Aktivierung der Autophagie vermuten (Abbildung 43), obwohl noch einige Fragen offen bleiben. Die AMPKα1-Isoform nimmt hierbei eine dominante Rolle ein, was deren Bedeutung für den Schutz vor Stress in Endothelzellen unterstreicht. Möglicherweise ist AMPKα1 in die Regulierung der Mitochondrien-Homöostase einbezogen, um die Bildung von ROS zu minimieren. In Übereinstimmung damit wurde gezeigt, dass Mitophagie durch den AMPK/ULK1-Signalweg aktiviert wird [150] und alte und dysfunktionale Mitochondrien abgebaut werden. Gleichzeitig wird die Bildung neuer Mitochondrien durch den AMPK/PGC1α-Signalweg induziert [35]. Auch bei oxLDL-induzierten Schädigungen nimmt der AMPK/Autophagie-Signalweg eine schützende Rolle ein [164]. Die AMPKα2, die vor allem den Energiemetabolismus zu regulieren scheint, spielt bei der Regulierung der Autophagie keine Rolle. In Übereinstimmung damit ist die Autophagie auch kaum an der Regulierung der Energiehomöostase in Endothelzellen beteiligt.

#### 4.4 Mechanismen der AMPK-stimulierten Angiogenese

Die Daten der vorliegenden Arbeit zeigen, dass A769662 als Aktivator der AMPK zu starken Aussprossungen von Sphäroiden führt und damit als angiogener Faktor zu betrachten ist. Diese Experimente wurden als Modell genutzt, um die Bedeutung der AMPK-aktivierten Autophagie für die Angiogenese zu untersuchen. Sie zeigen, dass hier tatsächlich ein Zusammenhang zwischen AMPK-abhängiger Autophagie und Angiogenese besteht.

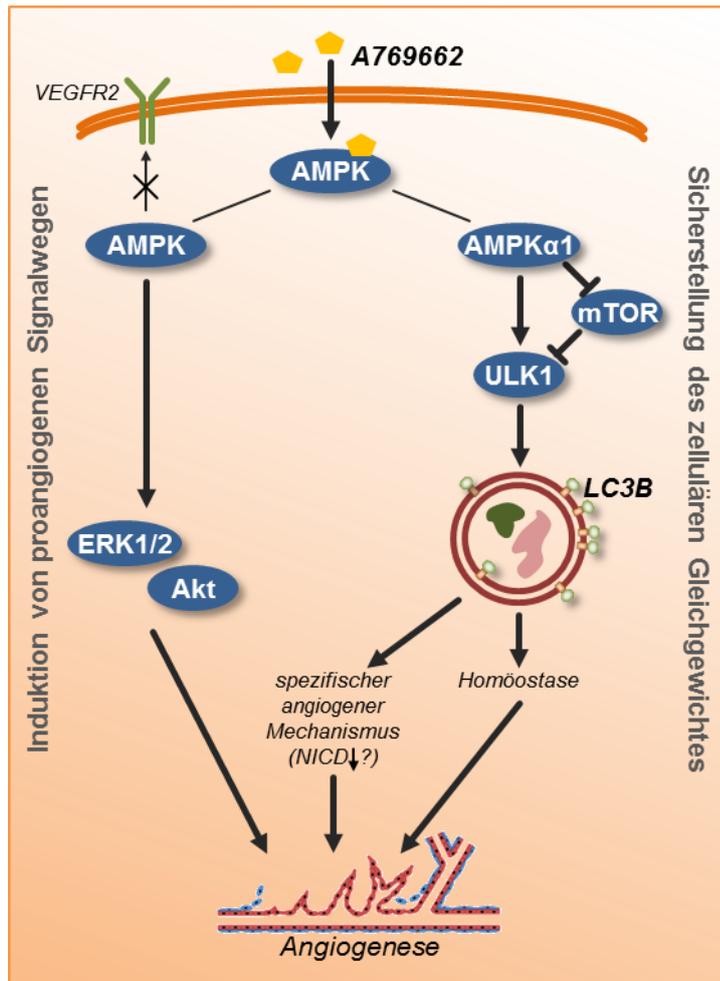
Die starke angiogene Wirkung von A769662 war ein eher unerwartetes Ergebnis, das bisher nicht mit Literaturdaten zu belegen ist. Die durch A769662 induzierten Aussprossungen waren durch spezifische morphologische Charakteristika gekennzeichnet (Vergleich Abbildung 24 (VEGF) und Abbildung 32 (A769662)). Während VEGF eine geringere Anzahl an gut ausgebildeten kräftigen Aussprossungen induzierte, bewirkte A769662 die Bildung sehr vieler Sprosse mit einer Haar-ähnlichen Morphologie. Dies ist vermutlich auf unterschiedliche angiogene Signalwege zurückzuführen, wobei vor allem das unterschiedliche Aktivierungsmuster der AMPK nach beiden Agonisten eine Rolle spielen könnte. VEGF führt über den VEGFR/PLC $\gamma$ /CaMKK $\beta$ -Signalweg zu einer transienten Aktivierung der AMPK, die nach etwa 30 min wieder das Basalniveau erreicht [21]. Diese Aktivierung hatte sich als essentiell für angiogene Prozesse erwiesen [21]. 48 h nach VEGF-Stimulierung, also zu einem Zeitpunkt, zu dem das Aussprossen der Sphäroide beurteilt wurde, war keine AMPK-Phosphorylierung mehr zu erkennen. Dagegen führte A769662 zu einer langanhaltenden AMPK-Phosphorylierung bis zu 48 h. Offensichtlich unterliegt die pharmakologische Aktivierung der AMPK durch A769662 keinen ausreichenden Kontrollmechanismen. Für die Angiogenese und die Ausbildung funktionsfähiger Kapillaren ist jedoch eine feine Kontrolle der Signalwege notwendig, um die verschiedenen Prozesse wie Auswahl der *tip*-Zellen durch den Notch-Signalweg, Proliferation und Migration gut koordinieren zu können. Bei einer unkontrollierten AMPK-Aktivierung durch A769662 ist dies vermutlich nicht gewährleistet.

Neben der Aktivierung von AMPK führte A769662 zur Phosphorylierung von Akt und ERK1/2 (Abbildung 44). Die Aktivierung beider Kinasen war für die angiogene Wirkung von A769662 essentiell, da eine Hemmung beider Wege das Aussprossen von Sphäroiden verhinderte. Da in früheren Untersuchungen VEGF eine Stimulation von AMPK bewirkte, die Aktivierung von Signalproteinen wie Akt aber unabhängig von AMPK erfolgte [21], sollte hier die Möglichkeit geprüft werden, dass die angiogene Wirkung von A769662 durch Transaktivierung des VEGFR2 hervorgerufen wird. Denkbar wäre zum Beispiel, dass AMPK-Aktivierung zu einer verstärkten Bildung von VEGF in Endothelzellen führt. Ouchi *et al.* konnten zeigen, dass eine AMPK-Stimulierung die VEGF-mRNA stabilisiert und damit VEGF-Expression in Skelettmuskelzellen fördert [165]. A769662 führte in den hier gezeigten Experimenten jedoch weder zu einer Phosphorylierung des VEGFR2 noch beeinflusste die Hemmung des VEGFR

durch Sunitinib die A769662-vermittelten Effekte auf die Angiogenese. Die Stimulierung der VEGF-Expression durch AMPK verläuft daher eventuell zelltypabhängig. Genauso kann auch der Effekt von A769662 auf Signalproteine je nach Zelltyp variieren. In Mausneuronen wurde für A769662 zum Beispiel eine negative Regulierung von Akt und ERK1/2 gezeigt [166]. Bemerkenswert ist, dass A769662 in unseren Experimenten nicht in der Lage war, Proliferation zu stimulieren (Daten nicht gezeigt), obwohl ERK1/2 als Mediator mitogener Signalwege aktiviert wurde. Dies könnte eventuell die spezifische Morphologie der Aussprossungen nach Einwirkung von A769662 erklären und vermuten lassen, dass A769662 vor allem migratorische Prozesse beeinflusst. Dass eine reine AMPK-Stimulierung in Abwesenheit von VEGF nicht in der Lage ist, Proliferation zu stimulieren, wurde bereits beschrieben [167]. Des Weiteren wurden aber auch negative Einflüsse von AMPK auf den Zellzyklus und die Proliferation in HUVEC beobachtet [168]. Interessanterweise war für AICAR, einen anderen AMPK-Aktivator, keine Beeinflussung von Akt und ERK1/2 nachweisbar [167], was eventuell auf Isoform-spezifische Effekte schließen lässt, die hier aber nicht weiter untersucht wurden.

Die hier erhobenen Daten zeigen, dass die Initiierung der Autophagie durch A769662 für dessen angiogene Wirkung essentiell ist (Abbildung 44). Eine akute Hemmung der Autophagie durch Zusatz von Bafilomycin A1 unterdrückt die Stimulierung der Angiogenese durch A769662 und spricht für die Notwendigkeit der Autophagie-Aktivierung während der Angiogenese. Bei Inhibierung der Autophagie ist vor allem die Anzahl der Aussprossungen stark reduziert, was dafür spricht, dass ein früher Schritt der Angiogenese, zum Beispiel die Aktivierung und Migration von *tip*-Zellen, beeinflusst wird. Dies lässt auf eine mögliche Beteiligung des Notch-Signalweges wie in Kapitel 4.2.5 beschrieben, schließen. Kann die Sprossbildung dennoch induziert werden, sind die Sprosse nur wenig kürzer als in Autophagie-kompetenten Zellen, was darauf hinweist, dass die Reifung der Sprosse nur wenig von Autophagie abhängig zu sein scheint. Im Gegensatz zur Verwendung von ULK1/Beclin1-siRNA wird durch den Zusatz von Bafilomycin A1 verhindert, dass sich die Zellen zum Zeitpunkt der Stimulation bereits in einem schlechteren Ausgangszustand befinden, der selbst die Angiogenese beeinträchtigen kann. Die akute Hemmung der Autophagie erlaubt eine zuverlässigere Aussage über den Einfluss dieses Prozesses auf die Angiogenese. Spezifische Inhibitoren der Autophagie, wie zum Beispiel ein ULK-Inhibitor, sind noch nicht verfügbar.

Zusammenfassend konnte in diesem Kapitel demonstriert werden, dass die pharmakologische Aktivierung der AMPK durch A769662 Angiogenese induziert und dabei sowohl die Aktivierung proangiogener Signalproteine wie Akt und ERK1/2 als auf der AMPK $\alpha$ 1/Autophagie-Weg von Bedeutung sind.



**Abbildung 44. A769662-regulierte Angiogenese.**

A769662 aktiviert AMPK, was zur Stimulierung von Akt und ERK1/2 führt und Angiogenese induziert. Gleichzeitig wird die zelluläre Homöostase durch Aktivierung der Autophagie sichergestellt.

Akt: Proteinkinase B, ERK1/2: *extracellular signal-regulated kinase 1/2*, LC3B: *microtubule-associated protein light chain 3B*, mTOR: *mechanistic target of rapamycin*, NICD: *notch intracellular domain*, ULK1: *uncoordinated 51-like kinase 1*

#### 4.5 Stress-induzierte Autophagie

Die Daten der vorgelegten Arbeit zeigen, dass Autophagie wichtig ist, um das zelluläre Gleichgewicht in Endothelzellen unter basalen Bedingungen aufrechtzuerhalten. Darüber hinaus wurde nachgewiesen, dass AMPK als einer der zellulären Stresssensoren, in der Lage ist, die Autophagie zu stimulieren. Dies legt nahe, dass Autophagie als adaptive Stressantwort Endothelzellen auch vor unterschiedlichen schädigenden Einflüssen schützt. Endothelzellen sind unter physiologischen Bedingungen durch den Kontakt zum Blut ständig verschiedenen Stressoren ausgesetzt. Dazu zählt vor allem mechanischer Scherstress. Nach pathophysiologischen Ereignissen, wie zum Beispiel einer Gefäßverengung oder einem Verschluss kommt es zudem zum Mangel an Sauerstoff und Nährstoffen. Dabei ist es wichtig, die Zellfunktion bestmöglich zu erhalten, um Schädigungen des umliegenden Gewebes zu reduzieren. Die Daten dieser Arbeit zeigen, dass ein Energiemangel, hervorgerufen durch Behandlung der Zellen mit 2-DG, zu einer Stimulierung der Autophagie führt. Letzteres diente jedoch nicht der Wiederherstellung des Energiegleichgewichtes, sondern vermutlich vielmehr der Verhinderung von Zellschädigungen. Nährstoffmangel (Serum- und Aminosäureentzug) sowie hypoxische Bedingungen (1 % O<sub>2</sub>) induzieren

ebenfalls Autophagie in Endothelzellen. Die Konsequenzen dieser Aktivierung sind noch nicht vollständig untersucht. Nach Literaturdaten soll Autophagie bei Hypoxie das Wachstum und Überleben von Endothelzellen bis zu einem gewissen Zeitraum sichern [169]. Es ist denkbar, dass die Aktivierung der Autophagie wichtig ist, um Mitochondrien abzubauen und so zum einen die ROS-Produktion zu limitieren [170] und zum anderen Substrate und Bausteine zu gewinnen, die das Überleben fördern.

Besonders unter inflammatorischen Bedingungen wirkt auf Endothelzellen ein hoher oxidativer Stress ein, der durch die verstärkte ROS-Produktion von Leukozyten hervorgerufen wird. Wie die Daten der vorliegenden Arbeit zeigen, beeinflusst oxidativer Stress Autophagie. Dazu wurde die Behandlung von HUVEC mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  als Modell gewählt. Die Beeinflussung der endothelialen Autophagie zeigte dabei einen hormetischen Verlauf. Während bei einer relativ niedrigen  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration von  $100 \mu\text{M}$  Autophagie aktiviert wird, um die Zelle zu schützen, führt hoher Stress durch  $1 \text{ mM}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  nach kurzer transientser Stimulierung der Autophagie zu einem Abbau von Autophagieproteinen (LC3B, ULK1, Beclin1) und damit zu einer Senkung des Autophagie-Fluxes. Obwohl es viele Arbeiten gibt, die eine Induktion der Autophagie durch  $\text{H}_2\text{O}_2$  und andere Sauerstoffspezies zeigen, sind die zugrundeliegenden Mechanismen noch unzureichend untersucht. Erste Studien zeigen, dass ROS zum einen zu einer Aktivierung von AMPK führen können und auf diese Weise Autophagie aktivieren [55], zum anderen aber auch spezifisch mit dem Autophagieprotein ATG4 reagieren können [171]. Das Einwirken von  $\text{H}_2\text{O}_2$  führt zu einer Oxidation von ATG4, woraufhin GATE16, ein LC3-Homolog, am Ort der Autophagosomenbildung nicht mehr delipidiert werden kann und Autophagie somit verstärkt wird. Während die genannten Mechanismen eine Aktivierung der Autophagie durch ROS erklären können, führen hohe ROS-Spiegel zu Hemmung der Autophagie und Zelltod. Die in den hier gezeigten Experimenten verwendete hohe  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration von  $1 \text{ mM}$  wird mit der Induktion von Zelltod assoziiert [172]. Es ist schwer abzuschätzen, welche  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration bei Zusatz von  $1 \text{ mM}$  tatsächlich auf die Zellen einwirkt, da ein Teil bereits im Medium deaktiviert wird. Im Gefäßsystem können lokale  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentrationen von bis zu  $300 \mu\text{M}$  erreicht werden [173]. Bei anhaltendem Einwirken von hohen ROS-Konzentrationen von mehr als  $2 \text{ h}$  versagen die Schutzmechanismen der Zelle, sodass Apoptose induziert wird. Die Wechselwirkungen zwischen Autophagie und Apoptose sind sehr komplex, sie können gegeneinander, aber auch miteinander wirken [174]. Es ist denkbar, dass bei Aktivierung von Apoptose Autophagie unterdrückt wird, um einen kontrollierten Zelltod zu gewährleisten und umliegende Zellen zu schützen. Der Zelltod wurde in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht untersucht.

#### 4.6 VEGF-stimuliert AMPK-abhängig Autophagie und Angiogenese

Neben verschiedenen Stressoren sind Endothelzellen auch vaskulären Mediatoren und Wachstumsfaktoren ausgesetzt, die die Funktion der Zellen den jeweiligen Bedürfnissen anpassen. Die Daten der vorliegenden Arbeit zeigen, dass VEGF als der wichtigste Wachstumsfaktor für Endothelzellen zu einer Aktivierung der Autophagie führt. Da Autophagie für eine funktionsfähige Angiogenese essentiell ist, kann die Stimulierung dieses Weges zu den proangiogenen Wirkungsmechanismen von VEGF gezählt werden.

VEGF scheint Autophagie moderat, aber langanhaltend zu stimulieren. VEGF induziert eine gemäßigte, aber signifikante ULK1-Phosphorylierung und führt zu einem deutlichen Abfall der p62-Expression nach 48 h. Letzteres zeigt eine Stimulierung der Autophagie über einen längeren Zeitraum an, da eine gleichzeitige Unterdrückung der p62-Transkription eher unwahrscheinlich ist. Die Expression von p62 wird durch den Transkriptionsfaktor *nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2* (Nrf2) reguliert [175], der durch VEGF stimuliert und nicht inhibiert wird [176]. Da VEGF AMPK aktivieren kann und in der vorliegenden Arbeit AMPK-Aktivatoren Autophagie induzierten (Kapitel 3.3), wurde nun die Frage gestellt, ob VEGF über den AMPK-Signalweg zur Stimulierung der Autophagie führt. Die vorliegenden Daten zeigen, dass die VEGF-induzierte ULK1-Phosphorylierung AMPK $\alpha$ 1-abhängig verläuft, während AMPK $\alpha$ 2 nicht involviert ist. Damit wurde der VEGF/AMPK $\alpha$ 1/ULK1-Signalweg als neuer proangiogener Signalweg identifiziert, der über die Auslösung von Autophagie Angiogenese fördert und feinreguliert. Diese Daten erklären, zumindest zum Teil, die essentielle Rolle der AMPK $\alpha$ 1-Isoform bei der Vermittlung der VEGF-induzierten Angiogenese, die in früheren Arbeiten der Gruppe beschrieben wurde [21].

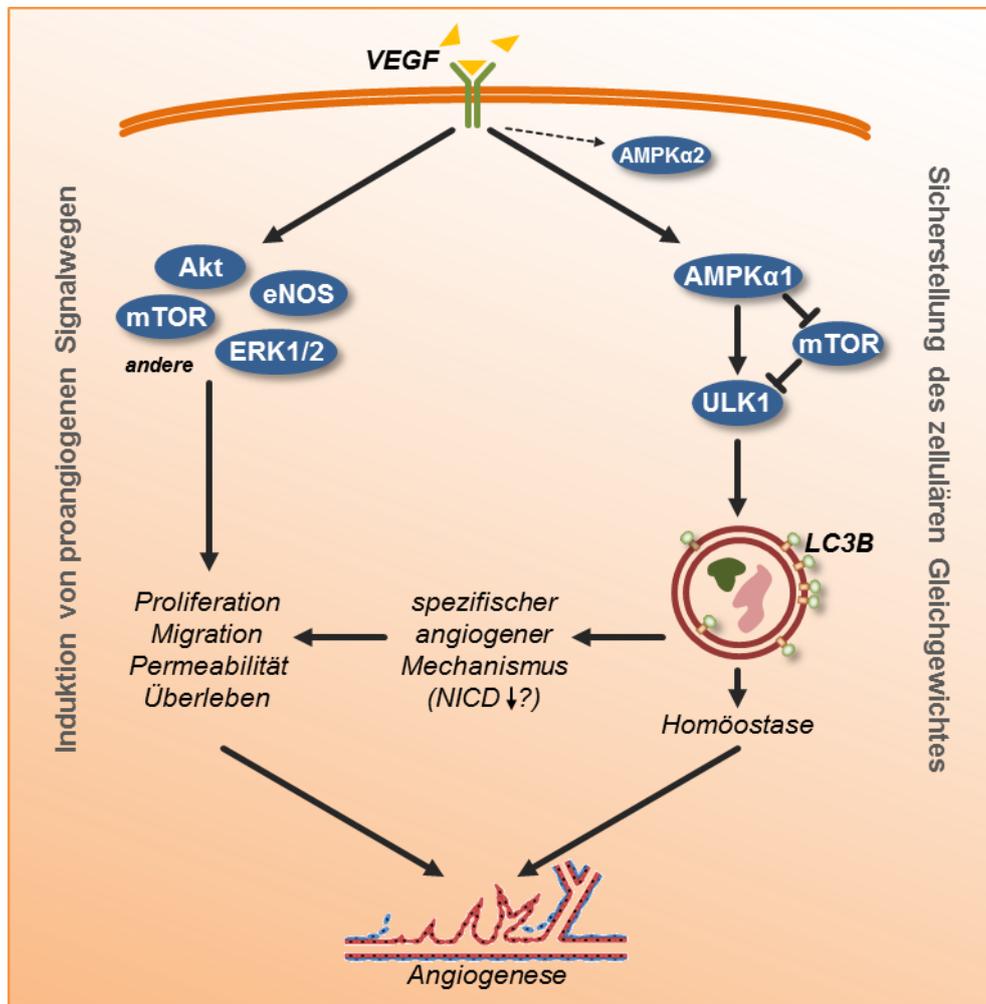
Die meisten Studien, die sich mit der Regulierung der Autophagie durch Wachstumsfaktoren befassen, beschreiben einen negativen Einfluss von Wachstumsfaktoren wie *epidermal growth factor* (EGF) oder *transforming growth factor  $\beta$*  (TGF $\beta$ ) auf die Autophagie-Aktivität, wurden jedoch nicht in Endothelzellen durchgeführt [177-179]. Für VEGF und *basic fibroblast growth factor* (bFGF) konnte gezeigt werden, dass sie den Autophagie-Flux nach Behandlung von Epithelzellen mit Extrakt von Zigarettenrauch verstärken, allein Autophagie jedoch nicht beeinflussen [180]. Der Einfluss eines Stimulus kann zwischen verschiedenen Zelltypen variieren. So aktiviert TGF $\beta$  Autophagie in Tumorzellen [181], unterdrückt sie aber in Fibroblasten [182]. Eine Wachstumsfaktor-vermittelte Hemmung der Autophagie scheint besonders bei der Zellteilung wichtig zu sein, damit genügend Organellen und Makromoleküle für die Tochterzellen verbleiben [180]. Da Wachstumsfaktoren die Nährstoffaufnahme stimulieren, besteht zudem kein Grund, intrazelluläre Ressourcen durch Autophagie zu nutzen [183].

Wachstumsfaktoren stimulieren den PI3K/Akt-Signalweg, der durch Aktivierung von mTOR zur Unterdrückung der Autophagie führt. Auch VEGF aktiviert mTOR in Endothelzellen,

was für Proliferation und Wachstum wichtig ist. Parallel dazu stimuliert VEGF in Endothelzellen aber auch AMPK über den VEGFR/PLC $\gamma$ /CaMKK $\beta$ -Signalweg [21]. Dieser Weg ist auf die wenigen Zelltypen beschränkt, die CaMKK $\beta$  als Calcium-abhängige AMPK-Kinase exprimieren, darunter Endothelzellen [184]. VEGF stimuliert in diesen Zellen somit gleichzeitig Autophagie-aktivierende (AMPK/ULK1) und Autophagie-hemmende (PI3K/Akt/mTOR) Signalwege. Der Netto-Effekt ist eine vermutlich präzise regulierte Aktivierung der Autophagie, die an die wachstumsfördernden Signalwege angepasst ist. VEGF initiiert damit eine Feinregulierung angiogener Signalwege, mit der Schutz, Überleben und Wachstum aufeinander abgestimmt werden. Da nur funktionell intakte Endothelzellen die Bildung funktionsfähiger neuer Blutgefäße gewährleisten können, ist die Aufrechterhaltung der endothelialen Homöostase vermutlich von besonderer Bedeutung für Angiogenese (Abbildung 45). VEGF könnte auch Formen der selektiven Autophagie, zum Beispiel Mitophagie, induzieren, um Stressfaktoren wie ROS-Bildung während der Angiogenese gering zu halten. Zudem ist es möglich, dass spezifische antiangiogene Mechanismen über Autophagie reguliert und an proangiogene Prozesse angepasst werden, was in weiterführenden Untersuchungen geklärt werden muss. Denkbar wäre, dass die Stimulierung der Autophagie den Abbau von NICD beeinflusst, was die Aktivierung und Migration von *tip*-Zellen durch VEGF begünstigen würde (Abbildung 45). Die Regulierung der Energiehomöostase durch Autophagie unter angiogenen Bedingungen ist unwahrscheinlich, da selbst nach starkem metabolischem Stress durch 2-DG keine Regulierung der ATP-Spiegel durch Autophagie zu sehen war. Auch AMPK scheint den Energiemetabolismus in Endothelzellen nur wenig zu beeinflussen [126], obwohl sie in anderen Zelltypen als Energiesensor und -regulator angesehen wird [185].

Die hier vorliegenden Daten ergänzen frühere Untersuchungen der Gruppe, in denen die essentielle Rolle der AMPK $\alpha$ 1 bei der Vermittlung der VEGF-stimulierten Angiogenese beschrieben wurde [21] und lassen den AMPK $\alpha$ 1/Autophagie-Weg als einen der zugrundeliegenden proangiogenen Signalwege vermuten. Zusammen zeigen diese Daten, dass (i) VEGF AMPK, Autophagie und Angiogenese stimuliert, (ii) VEGF-induzierte Autophagie und Angiogenese AMPK $\alpha$ 1-abhängig verlaufen und (iii) Autophagie für den Ablauf der Angiogenese essentiell ist (Abbildung 45). Dabei lassen die Experimente zur relativ selektiven Hemmung der Autophagie durch Bafilomycin A1-Zusatz, die eine deutliche Hemmung der Angiogenese bei gering erhöhtem Zelltod demonstrieren, sogar auf eine spezifische angiogene Funktion der Autophagie schließen. Besonders hervorzuheben ist die Rolle der AMPK $\alpha$ 1-Isoform als die Isoform, die VEGF-Effekte vermittelt, während AMPK $\alpha$ 2 nicht beteiligt ist. Die Isoform-spezifische Rolle der AMPK in diesem Prozess wird dadurch gestützt, dass der Knockout von AMPK $\alpha$ 1 in Mäusen anders als der von AMPK $\alpha$ 2 einen Defekt in der VEGF-stimulierten *in vivo* Angiogenese bewirkt [21, 43]. Die hier vorgelegten

Daten tragen zu einem besseren Verständnis der Regulierung der Angiogenese bei. Dies kann langfristig dazu führen, Therapieansätze zur Beeinflussung der Angiogenese, wie zum Beispiel proangiogene Therapien zur Verbesserung der Vaskularisierung oder die antiangiogene Tumorthherapie, zu verbessern und neue Strategien zu entwickeln.



**Abbildung 45. Beteiligung des AMPK/Autophagie-Signalweges an der VEGF-induzierten Angiogenese.**

VEGF aktiviert angiogene Signalproteine, u. a. Akt, mTOR, ERK1/2 und eNOS und stimuliert dadurch Angiogenese. Durch die parallele Aktivierung des AMPKα1/ULK1/Autophagie-Signalweges wird die zelluläre Homöostase aufrechterhalten, um Angiogenese zu gewährleisten. Darüber hinaus scheint Autophagie über spezifische Mechanismen in die Regulierung der Angiogenese einzugreifen.

Akt: Proteinkinase B, eNOS: endotheliale NO-Synthase, ERK1/2: *extracellular signal-regulated kinase 1/2*, LC3B: *microtubule-associated protein light chain 3B*, mTOR: *mechanistic target of rapamycin*, NICD: *notch intracellular domain*, ULK1: *uncoordinated 51-like kinase 1*, VEGF: *vascular endothelial growth factor*

## 5 SCHLUSSFOLGERUNG

Die vorgelegte Arbeit befasste sich mit der Bedeutung und der Regulierung der Autophagie in Endothelzellen, worüber bisher nur wenige Studien existieren. Die generelle Homöostase-Funktion der Autophagie konnte in Endothelzellen bestätigt und näher charakterisiert werden. Eine neue Erkenntnis ist, dass Endothelzellen unter basalen Bedingungen einen hohen Autophagie-Flux aufweisen, welcher oxidativem und inflammatorischem Stress entgegenwirkt und damit Proliferation und Überleben sicherstellt, ohne den Energiestoffwechsel der Zellen wesentlich zu beeinflussen. Ein weiteres wichtiges Ergebnis ist, dass Autophagie durch VEGF, einen essentiellen angiogenen Wachstumsfaktor, stimuliert wird. Die Stimulation der Autophagie durch VEGF wird spezifisch durch die Isoform AMPK $\alpha$ 1 vermittelt. Diese wird, wie in früheren Arbeiten gezeigt, durch VEGF aktiviert und ist für die VEGF-induzierte Angiogenese essentiell [21]. Die hier vorgestellten Daten charakterisieren die VEGF/AMPK $\alpha$ 1/Autophagie-Achse als einen bisher nicht bekannten proangiogenen Signalweg, der Einblicke in die Feinregulierung der VEGF-induzierten Angiogenese gibt. Schließlich zeigen die Daten dieser Arbeit auch, dass Autophagie für eine funktionierende VEGF-induzierte Angiogenese von Bedeutung ist. Autophagie dient zum einen der Aufrechterhaltung der intrazellulären Homöostase während der Angiogenese, scheint diesen Prozess aber auch durch einen oder mehrere spezifische Mechanismen zu regulieren. In Zukunft bedarf es weiterer Untersuchungen, um diese spezifischen Mechanismen zu identifizieren. Die hier vorgestellten Daten können als Ansatzpunkte dienen, präventive oder therapeutische Strategien zu entwickeln, um Endotheldysfunktion zu verhindern und pro- und antiangiogene Therapieansätze zu verbessern.

## 6 LITERATURVERZEICHNIS

1. Statistisches-Bundesamt:  
<https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/HaeufigsteTodesursachen.html>. 2013.
2. De Bock K, Georgiadou M, Schoors S, Kuchnio A, Wong BW, Cantelmo AR, Quaegebeur A, Ghesquiere B, Cauwenberghs S, Eelen G, et al: Role of PFKFB3-driven glycolysis in vessel sprouting. *Cell* 2013, 154:651-663.
3. De Bock K, Georgiadou M, Carmeliet P: Role of endothelial cell metabolism in vessel sprouting. *Cell Metab* 2013, 18:634-647.
4. Hsieh HJ, Liu CA, Huang B, Tseng AH, Wang DL: Shear-induced endothelial mechanotransduction: the interplay between reactive oxygen species (ROS) and nitric oxide (NO) and the pathophysiological implications. *J Biomed Sci* 2014, 21:3.
5. Boueiz A, Hassoun PM: Regulation of endothelial barrier function by reactive oxygen and nitrogen species. *Microvasc Res* 2009, 77:26-34.
6. Song P, Zou MH: Redox regulation of endothelial cell fate. *Cell Mol Life Sci* 2014, 71:3219-3239.
7. Costa C, Soares R, Schmitt F: Angiogenesis: now and then. *APMIS* 2004, 112:402-412.
8. Olsson AK, Dimberg A, Kreuger J, Claesson-Welsh L: VEGF receptor signalling - in control of vascular function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006, 7:359-371.
9. Stapleton D, Mitchelhill KI, Gao G, Widmer J, Michell BJ, Teh T, House CM, Fernandez CS, Cox T, Witters LA, Kemp BE: Mammalian AMP-activated protein kinase subfamily. *J Biol Chem* 1996, 271:611-614.
10. Davies SP, Hawley SA, Woods A, Carling D, Haystead TA, Hardie DG: Purification of the AMP-activated protein kinase on ATP-gamma-sepharose and analysis of its subunit structure. *Eur J Biochem* 1994, 223:351-357.
11. Hawley SA, Davison M, Woods A, Davies SP, Beri RK, Carling D, Hardie DG: Characterization of the AMP-activated protein kinase kinase from rat liver and identification of threonine 172 as the major site at which it phosphorylates AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem* 1996, 271:27879-27887.
12. Hardie DG: AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007, 8:774-785.
13. Scott JW, Ross FA, Liu JK, Hardie DG: Regulation of AMP-activated protein kinase by a pseudosubstrate sequence on the gamma subunit. *EMBO J* 2007, 26:806-815.
14. Suter M, Riek U, Tuerk R, Schlattner U, Wallimann T, Neumann D: Dissecting the role of 5'-AMP for allosteric stimulation, activation, and deactivation of AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem* 2006, 281:32207-32216.
15. Scott JW, Hawley SA, Green KA, Anis M, Stewart G, Scullion GA, Norman DG, Hardie DG: CBS domains form energy-sensing modules whose binding of adenosine ligands is disrupted by disease mutations. *J Clin Invest* 2004, 113:274-284.
16. Sanders MJ, Grondin PO, Hegarty BD, Snowden MA, Carling D: Investigating the mechanism for AMP activation of the AMP-activated protein kinase cascade. *Biochem J* 2007, 403:139-148.
17. Salt I, Celler JW, Hawley SA, Prescott A, Woods A, Carling D, Hardie DG: AMP-activated protein kinase: greater AMP dependence, and preferential nuclear localization, of complexes containing the alpha2 isoform. *Biochem J* 1998, 334 ( Pt 1):177-187.
18. Sakamoto K, Zarrinpashneh E, Budas GR, Pouleur AC, Dutta A, Prescott AR, Vanoverschelde JL, Ashworth A, Jovanovic A, Alessi DR, Bertrand L: Deficiency of LKB1 in heart prevents ischemia-mediated activation of AMPKalpha2 but not AMPKalpha1. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2006, 290:E780-788.
19. Fisslthaler B, Fleming I: Activation and signaling by the AMP-activated protein kinase in endothelial cells. *Circ Res* 2009, 105:114-127.

20. Stahmann N, Woods A, Carling D, Heller R: Thrombin activates AMP-activated protein kinase in endothelial cells via a pathway involving Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase beta. *Mol Cell Biol* 2006, 26:5933-5945.
21. Stahmann N, Woods A, Spengler K, Heslegrave A, Bauer R, Krause S, Viollet B, Carling D, Heller R: Activation of AMP-activated protein kinase by vascular endothelial growth factor mediates endothelial angiogenesis independently of nitric-oxide synthase. *J Biol Chem* 2010, 285:10638-10652.
22. Vidal CJ: *Post-Translational Modifications in Health and Disease*. 1 edn: Springer-Verlag New York; 2011.
23. Corton JM, Gillespie JG, Hawley SA, Hardie DG: 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside. A specific method for activating AMP-activated protein kinase in intact cells? *Eur J Biochem* 1995, 229:558-565.
24. Sanders MJ, Ali ZS, Hegarty BD, Heath R, Snowden MA, Carling D: 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, 282:32539-32548.
25. Goransson O, McBride A, Hawley SA, Ross FA, Shpiro N, Foretz M, Viollet B, Hardie DG, Sakamoto K: Mechanism of action of A-769662, a valuable tool for activation of AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem* 2007, 282:32549-32560.
26. Cura AJ, Carruthers A: AMP kinase regulation of sugar transport in brain capillary endothelial cells during acute metabolic stress. *Am J Physiol Cell Physiol* 2012, 303:C806-814.
27. Kurth-Kraczek EJ, Hirshman MF, Goodyear LJ, Winder WW: 5' AMP-activated protein kinase activation causes GLUT4 translocation in skeletal muscle. *Diabetes* 1999, 48:1667-1671.
28. Stoppani J, Hildebrandt AL, Sakamoto K, Cameron-Smith D, Goodyear LJ, Neuffer PD: AMP-activated protein kinase activates transcription of the UCP3 and HKII genes in rat skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002, 283:E1239-1248.
29. Marsin AS, Bertrand L, Rider MH, Deprez J, Beauloye C, Vincent MF, Van den Berghe G, Carling D, Hue L: Phosphorylation and activation of heart PFK-2 by AMPK has a role in the stimulation of glycolysis during ischaemia. *Curr Biol* 2000, 10:1247-1255.
30. Lochhead PA, Salt IP, Walker KS, Hardie DG, Sutherland C: 5-aminoimidazole-4-carboxamide riboside mimics the effects of insulin on the expression of the 2 key gluconeogenic genes PEPCK and glucose-6-phosphatase. *Diabetes* 2000, 49:896-903.
31. Carling D, Hardie DG: The substrate and sequence specificity of the AMP-activated protein kinase. Phosphorylation of glycogen synthase and phosphorylase kinase. *Biochim Biophys Acta* 1989, 1012:81-86.
32. Watt MJ, Holmes AG, Pinnamaneni SK, Garnham AP, Steinberg GR, Kemp BE, Febbraio MA: Regulation of HSL serine phosphorylation in skeletal muscle and adipose tissue. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2006, 290:E500-508.
33. Hardie DG, Pan DA: Regulation of fatty acid synthesis and oxidation by the AMP-activated protein kinase. *Biochem Soc Trans* 2002, 30:1064-1070.
34. Clarke PR, Hardie DG: Regulation of HMG-CoA reductase: identification of the site phosphorylated by the AMP-activated protein kinase in vitro and in intact rat liver. *EMBO J* 1990, 9:2439-2446.
35. Canto C, Gerhart-Hines Z, Feige JN, Lagouge M, Noriega L, Milne JC, Elliott PJ, Puigserver P, Auwerx J: AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD<sup>+</sup> metabolism and SIRT1 activity. *Nature* 2009, 458:1056-1060.
36. Inoki K, Zhu T, Guan KL: TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell* 2003, 115:577-590.
37. Gwinn DM, Shackelford DB, Egan DF, Mihaylova MM, Mery A, Vasquez DS, Turk BE, Shaw RJ: AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Mol Cell* 2008, 30:214-226.
38. Horman S, Browne G, Krause U, Patel J, Vertommen D, Bertrand L, Lavoinne A, Hue L, Proud C, Rider M: Activation of AMP-activated protein kinase leads to the phosphorylation of elongation factor 2 and an inhibition of protein synthesis. *Curr Biol* 2002, 12:1419-1423.

39. Kola B: Role of AMP-activated protein kinase in the control of appetite. *J Neuroendocrinol* 2008, 20:942-951.
40. Russell RR, 3rd, Bergeron R, Shulman GI, Young LH: Translocation of myocardial GLUT-4 and increased glucose uptake through activation of AMPK by AICAR. *Am J Physiol* 1999, 277:H643-649.
41. Abbud W, Habinowski S, Zhang JZ, Kendrew J, Elkairi FS, Kemp BE, Witters LA, Ismail-Beigi F: Stimulation of AMP-activated protein kinase (AMPK) is associated with enhancement of Glut1-mediated glucose transport. *Arch Biochem Biophys* 2000, 380:347-352.
42. Ojuka EO, Nolte LA, Holloszy JO: Increased expression of GLUT-4 and hexokinase in rat epitrochlearis muscles exposed to AICAR in vitro. *J Appl Physiol (1985)* 2000, 88:1072-1075.
43. Viollet B, Andreelli F, Jorgensen SB, Perrin C, Flamez D, Mu J, Wojtaszewski JF, Schuit FC, Birnbaum M, Richter E, et al: Physiological role of AMP-activated protein kinase (AMPK): insights from knockout mouse models. *Biochem Soc Trans* 2003, 31:216-219.
44. Wojtaszewski JF, Birk JB, Frosig C, Holten M, Pilegaard H, Dela F: 5'AMP activated protein kinase expression in human skeletal muscle: effects of strength training and type 2 diabetes. *J Physiol* 2005, 564:563-573.
45. Li J, Coven DL, Miller EJ, Hu X, Young ME, Carling D, Sinusas AJ, Young LH: Activation of AMPK alpha- and gamma-isoform complexes in the intact ischemic rat heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006, 291:H1927-1934.
46. Ouchi N, Kobayashi H, Kihara S, Kumada M, Sato K, Inoue T, Funahashi T, Walsh K: Adiponectin stimulates angiogenesis by promoting cross-talk between AMP-activated protein kinase and Akt signaling in endothelial cells. *J Biol Chem* 2004, 279:1304-1309.
47. Webler AC, Michaelis UR, Popp R, Barbosa-Sicard E, Murugan A, Falck JR, Fisslthaler B, Fleming I: Epoxyeicosatrienoic acids are part of the VEGF-activated signaling cascade leading to angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol* 2008, 295:C1292-1301.
48. Lee KY, Choi HC: Acetylcholine-induced AMP-activated protein kinase activation attenuates vasoconstriction through an LKB1-dependent mechanism in rat aorta. *Vascul Pharmacol* 2013, 59:96-102.
49. Potente M, Dimmeler S: Emerging roles of SIRT1 in vascular endothelial homeostasis. *Cell Cycle* 2008, 7:2117-2122.
50. Liu C, Liang B, Wang Q, Wu J, Zou MH: Activation of AMP-activated protein kinase alpha1 alleviates endothelial cell apoptosis by increasing the expression of anti-apoptotic proteins Bcl-2 and survivin. *J Biol Chem* 2010, 285:15346-15355.
51. Dong Y, Zhang M, Liang B, Xie Z, Zhao Z, Asfa S, Choi HC, Zou MH: Reduction of AMP-activated protein kinase alpha2 increases endoplasmic reticulum stress and atherosclerosis in vivo. *Circulation* 2010, 121:792-803.
52. Ceolotto G, Gallo A, Papparella I, Franco L, Murphy E, Iori E, Pagnin E, Fadini GP, Albiero M, Semplicini A, Avogaro A: Rosiglitazone reduces glucose-induced oxidative stress mediated by NAD(P)H oxidase via AMPK-dependent mechanism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007, 27:2627-2633.
53. Zippel N, Malik RA, Fromel T, Popp R, Bess E, Strilic B, Wettschureck N, Fleming I, Fisslthaler B: Transforming growth factor-beta-activated kinase 1 regulates angiogenesis via AMP-activated protein kinase-alpha1 and redox balance in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2013, 33:2792-2799.
54. Li XN, Song J, Zhang L, LeMaire SA, Hou X, Zhang C, Coselli JS, Chen L, Wang XL, Zhang Y, Shen YH: Activation of the AMPK-FOXO3 pathway reduces fatty acid-induced increase in intracellular reactive oxygen species by upregulating thioredoxin. *Diabetes* 2009, 58:2246-2257.
55. Wang Q, Liang B, Shirwany NA, Zou MH: 2-Deoxy-D-glucose treatment of endothelial cells induces autophagy by reactive oxygen species-mediated activation of the AMP-activated protein kinase. *PLoS One* 2011, 6:e17234.
56. Goyal A, Neill T, Owens RT, Schaefer L, Iozzo RV: Reprint of: Decorin activates AMPK, an energy sensor kinase, to induce autophagy in endothelial cells. *Matrix Biol* 2014, 35:42-50.

57. Dagher Z, Ruderman N, Tornheim K, Ido Y: The effect of AMP-activated protein kinase and its activator AICAR on the metabolism of human umbilical vein endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1999, 265:112-115.
58. Boya P, Reggiori F, Codogno P: Emerging regulation and functions of autophagy. *Nat Cell Biol* 2013, 15:713-720.
59. Hayashi-Nishino M, Fujita N, Noda T, Yamaguchi A, Yoshimori T, Yamamoto A: A subdomain of the endoplasmic reticulum forms a cradle for autophagosome formation. *Nat Cell Biol* 2009, 11:1433-1437.
60. Yla-Anttila P, Vihinen H, Jokitalo E, Eskelinen EL: 3D tomography reveals connections between the phagophore and endoplasmic reticulum. *Autophagy* 2009, 5:1180-1185.
61. Geng J, Nair U, Yasumura-Yorimitsu K, Klionsky DJ: Post-Golgi Sec proteins are required for autophagy in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 2010, 21:2257-2269.
62. van der Vaart A, Griffith J, Reggiori F: Exit from the Golgi is required for the expansion of the autophagosomal phagophore in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 2010, 21:2270-2284.
63. Hailey DW, Rambold AS, Satpute-Krishnan P, Mitra K, Sougrat R, Kim PK, Lippincott-Schwartz J: Mitochondria supply membranes for autophagosome biogenesis during starvation. *Cell* 2010, 141:656-667.
64. Ravikumar B, Moreau K, Jahreiss L, Puri C, Rubinsztein DC: Plasma membrane contributes to the formation of pre-autophagosomal structures. *Nat Cell Biol* 2010, 12:747-757.
65. Gordon PB, Seglen PO: Prelysosomal convergence of autophagic and endocytic pathways. *Biochem Biophys Res Commun* 1988, 151:40-47.
66. Rabinowitz JD, White E: Autophagy and metabolism. *Science* 2010, 330:1344-1348.
67. Mercer CA, Kaliappan A, Dennis PB: A novel, human Atg13 binding protein, Atg101, interacts with ULK1 and is essential for macroautophagy. *Autophagy* 2009, 5:649-662.
68. Hosokawa N, Hara T, Kaizuka T, Kishi C, Takamura A, Miura Y, Iemura S, Natsume T, Takehana K, Yamada N, et al: Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1-Atg13-FIP200 complex required for autophagy. *Mol Biol Cell* 2009, 20:1981-1991.
69. Jung CH, Jun CB, Ro SH, Kim YM, Otto NM, Cao J, Kundu M, Kim DH: ULK-Atg13-FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery. *Mol Biol Cell* 2009, 20:1992-2003.
70. Chan EY, Kir S, Tooze SA: siRNA screening of the kinome identifies ULK1 as a multidomain modulator of autophagy. *J Biol Chem* 2007, 282:25464-25474.
71. Itakura E, Mizushima N: Characterization of autophagosome formation site by a hierarchical analysis of mammalian Atg proteins. *Autophagy* 2010, 6:764-776.
72. Russell RC, Tian Y, Yuan H, Park HW, Chang YY, Kim J, Kim H, Neufeld TP, Dillin A, Guan KL: ULK1 induces autophagy by phosphorylating Beclin-1 and activating VPS34 lipid kinase. *Nat Cell Biol* 2013, 15:741-750.
73. Di Bartolomeo S, Corazzari M, Nazio F, Oliverio S, Lisi G, Antonioli M, Pagliarini V, Matteoni S, Fuoco C, Giunta L, et al: The dynamic interaction of AMBRA1 with the dynein motor complex regulates mammalian autophagy. *J Cell Biol* 2010, 191:155-168.
74. Kihara A, Kabeya Y, Ohsumi Y, Yoshimori T: Beclin-phosphatidylinositol 3-kinase complex functions at the trans-Golgi network. *EMBO Rep* 2001, 2:330-335.
75. Abrahamsen H, Stenmark H, Platta HW: Ubiquitination and phosphorylation of Beclin 1 and its binding partners: Tuning class III phosphatidylinositol 3-kinase activity and tumor suppression. *FEBS Lett* 2012, 586:1584-1591.
76. Itakura E, Kishi C, Inoue K, Mizushima N: Beclin 1 forms two distinct phosphatidylinositol 3-kinase complexes with mammalian Atg14 and UVRAG. *Mol Biol Cell* 2008, 19:5360-5372.
77. Zhong Y, Wang QJ, Li X, Yan Y, Backer JM, Chait BT, Heintz N, Yue Z: Distinct regulation of autophagic activity by Atg14L and Rubicon associated with Beclin 1-phosphatidylinositol-3-kinase complex. *Nat Cell Biol* 2009, 11:468-476.

78. Liang C, Feng P, Ku B, Dotan I, Canaani D, Oh BH, Jung JU: Autophagic and tumour suppressor activity of a novel Beclin1-binding protein UVRAG. *Nat Cell Biol* 2006, 8:688-699.
79. Liang C, Lee JS, Inn KS, Gack MU, Li Q, Roberts EA, Vergne I, Deretic V, Feng P, Akazawa C, Jung JU: Beclin1-binding UVRAG targets the class C Vps complex to coordinate autophagosome maturation and endocytic trafficking. *Nat Cell Biol* 2008, 10:776-787.
80. Noble CG, Dong JM, Manser E, Song H: Bcl-xL and UVRAG cause a monomer-dimer switch in Beclin1. *J Biol Chem* 2008, 283:26274-26282.
81. Matsunaga K, Saitoh T, Tabata K, Omori H, Satoh T, Kurotori N, Maejima I, Shirahama-Noda K, Ichimura T, Isobe T, et al: Two Beclin 1-binding proteins, Atg14L and Rubicon, reciprocally regulate autophagy at different stages. *Nat Cell Biol* 2009, 11:385-396.
82. Fu LL, Cheng Y, Liu B: Beclin-1: autophagic regulator and therapeutic target in cancer. *Int J Biochem Cell Biol* 2013, 45:921-924.
83. Reggiori F, Tucker KA, Stromhaug PE, Klionsky DJ: The Atg1-Atg13 complex regulates Atg9 and Atg23 retrieval transport from the pre-autophagosomal structure. *Dev Cell* 2004, 6:79-90.
84. Young AR, Chan EY, Hu XW, Kochl R, Crawshaw SG, High S, Hailey DW, Lippincott-Schwartz J, Tooze SA: Starvation and ULK1-dependent cycling of mammalian Atg9 between the TGN and endosomes. *J Cell Sci* 2006, 119:3888-3900.
85. Dooley HC, Razi M, Polson HE, Girardin SE, Wilson MI, Tooze SA: WIPI2 links LC3 conjugation with PI3P, autophagosome formation, and pathogen clearance by recruiting Atg12-5-16L1. *Mol Cell* 2014, 55:238-252.
86. Polson HE, de Lartigue J, Rigden DJ, Reedijk M, Urbe S, Clague MJ, Tooze SA: Mammalian Atg18 (WIPI2) localizes to omegasome-anchored phagophores and positively regulates LC3 lipidation. *Autophagy* 2010, 6:506-522.
87. Mizushima N, Sugita H, Yoshimori T, Ohsumi Y: A new protein conjugation system in human. The counterpart of the yeast Apg12p conjugation system essential for autophagy. *J Biol Chem* 1998, 273:33889-33892.
88. Mizushima N, Kuma A, Kobayashi Y, Yamamoto A, Matsubae M, Takao T, Natsume T, Ohsumi Y, Yoshimori T: Mouse Apg16L, a novel WD-repeat protein, targets to the autophagic isolation membrane with the Apg12-Apg5 conjugate. *J Cell Sci* 2003, 116:1679-1688.
89. Tanida I, Tanida-Miyake E, Komatsu M, Ueno T, Kominami E: Human Apg3p/Aut1p homologue is an authentic E2 enzyme for multiple substrates, GATE-16, GABARAP, and MAP-LC3, and facilitates the conjugation of hApg12p to hApg5p. *J Biol Chem* 2002, 277:13739-13744.
90. Hanada T, Noda NN, Satomi Y, Ichimura Y, Fujioka Y, Takao T, Inagaki F, Ohsumi Y: The Atg12-Atg5 conjugate has a novel E3-like activity for protein lipidation in autophagy. *J Biol Chem* 2007, 282:37298-37302.
91. Slobodkin MR, Elazar Z: The Atg8 family: multifunctional ubiquitin-like key regulators of autophagy. *Essays Biochem* 2013, 55:51-64.
92. Tanida I: Autophagy basics. *Microbiol Immunol* 2011, 55:1-11.
93. Wenzel T, Baumeister W: Conformational constraints in protein degradation by the 20S proteasome. *Nat Struct Biol* 1995, 2:199-204.
94. Onodera J, Ohsumi Y: Autophagy is required for maintenance of amino acid levels and protein synthesis under nitrogen starvation. *J Biol Chem* 2005, 280:31582-31586.
95. Maiuri MC, Zalckvar E, Kimchi A, Kroemer G: Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007, 8:741-752.
96. Kroemer G, Levine B: Autophagic cell death: the story of a misnomer. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008, 9:1004-1010.
97. Dagda RK, Cherra SJ, 3rd, Kulich SM, Tandon A, Park D, Chu CT: Loss of PINK1 function promotes mitophagy through effects on oxidative stress and mitochondrial fission. *J Biol Chem* 2009, 284:13843-13855.
98. Pickford F, Maslah E, Britschgi M, Lucin K, Narasimhan R, Jaeger PA, Small S, Spencer B, Rockenstein E, Levine B, Wyss-Coray T: The autophagy-related protein beclin 1 shows reduced

- expression in early Alzheimer disease and regulates amyloid beta accumulation in mice. *J Clin Invest* 2008, 118:2190-2199.
99. Hamano T, Gendron TF, Causevic E, Yen SH, Lin WL, Isidoro C, Deture M, Ko LW: Autophagic-lysosomal perturbation enhances tau aggregation in transfectants with induced wild-type tau expression. *Eur J Neurosci* 2008, 27:1119-1130.
  100. Webb JL, Ravikumar B, Atkins J, Skepper JN, Rubinsztein DC: Alpha-Synuclein is degraded by both autophagy and the proteasome. *J Biol Chem* 2003, 278:25009-25013.
  101. Ravikumar B, Duden R, Rubinsztein DC: Aggregate-prone proteins with polyglutamine and polyalanine expansions are degraded by autophagy. *Hum Mol Genet* 2002, 11:1107-1117.
  102. Huang J, Klionsky DJ: Autophagy and human disease. *Cell Cycle* 2007, 6:1837-1849.
  103. Mathew R, Karantza-Wadsworth V, White E: Role of autophagy in cancer. *Nat Rev Cancer* 2007, 7:961-967.
  104. Taylor MP, Kirkegaard K: Modification of cellular autophagy protein LC3 by poliovirus. *J Virol* 2007, 81:12543-12553.
  105. Klionsky DJ, Elazar Z, Seglen PO, Rubinsztein DC: Does bafilomycin A1 block the fusion of autophagosomes with lysosomes? *Autophagy* 2008, 4:849-850.
  106. Yang ZJ, Chee CE, Huang S, Sinicrope FA: The role of autophagy in cancer: therapeutic implications. *Mol Cancer Ther* 2011, 10:1533-1541.
  107. Mizushima N, Yamamoto A, Matsui M, Yoshimori T, Ohsumi Y: In vivo analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker. *Mol Biol Cell* 2004, 15:1101-1111.
  108. Wu YT, Tan HL, Shui G, Bauvy C, Huang Q, Wenk MR, Ong CN, Codogno P, Shen HM: Dual role of 3-methyladenine in modulation of autophagy via different temporal patterns of inhibition on class I and III phosphoinositide 3-kinase. *J Biol Chem* 2010, 285:10850-10861.
  109. Yue Z, Jin S, Yang C, Levine AJ, Heintz N: Beclin 1, an autophagy gene essential for early embryonic development, is a haploinsufficient tumor suppressor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, 100:15077-15082.
  110. Torisu T, Torisu K, Lee IH, Liu J, Malide D, Combs CA, Wu XS, Rovira, II, Fergusson MM, Weigert R, et al: Autophagy regulates endothelial cell processing, maturation and secretion of von Willebrand factor. *Nat Med* 2013, 19:1281-1287.
  111. Buraschi S, Neill T, Goyal A, Poluzzi C, Smythies J, Owens RT, Schaefer L, Torres A, Iozzo RV: Decorin causes autophagy in endothelial cells via Peg3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013, 110:E2582-2591.
  112. Nguyen TM, Subramanian IV, Xiao X, Ghosh G, Nguyen P, Kelekar A, Ramakrishnan S: Endostatin induces autophagy in endothelial cells by modulating Beclin 1 and beta-catenin levels. *J Cell Mol Med* 2009, 13:3687-3698.
  113. Ganley IG, Lam du H, Wang J, Ding X, Chen S, Jiang X: ULK1.ATG13.FIP200 complex mediates mTOR signaling and is essential for autophagy. *J Biol Chem* 2009, 284:12297-12305.
  114. Cheong H, Lindsten T, Wu J, Lu C, Thompson CB: Ammonia-induced autophagy is independent of ULK1/ULK2 kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011, 108:11121-11126.
  115. Alers S, Loffler AS, Paasch F, Dieterle AM, Keppeler H, Lauber K, Campbell DG, Fehrenbacher B, Schaller M, Wesselborg S, Stork B: Atg13 and FIP200 act independently of Ulk1 and Ulk2 in autophagy induction. *Autophagy* 2011, 7:1423-1433.
  116. Lee EJ, Tournier C: The requirement of uncoordinated 51-like kinase 1 (ULK1) and ULK2 in the regulation of autophagy. *Autophagy* 2011, 7:689-695.
  117. Kundu M, Lindsten T, Yang CY, Wu J, Zhao F, Zhang J, Selak MA, Ney PA, Thompson CB: Ulk1 plays a critical role in the autophagic clearance of mitochondria and ribosomes during reticulocyte maturation. *Blood* 2008, 112:1493-1502.
  118. Alers S, Loffler AS, Wesselborg S, Stork B: The incredible ULKs. *Cell Commun Signal* 2012, 10:7.

119. Hara T, Nakamura K, Matsui M, Yamamoto A, Nakahara Y, Suzuki-Migishima R, Yokoyama M, Mishima K, Saito I, Okano H, Mizushima N: Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature* 2006, 441:885-889.
120. Komatsu M, Waguri S, Chiba T, Murata S, Iwata J, Tanida I, Ueno T, Koike M, Uchiyama Y, Kominami E, Tanaka K: Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature* 2006, 441:880-884.
121. Komatsu M, Waguri S, Ueno T, Iwata J, Murata S, Tanida I, Ezaki J, Mizushima N, Ohsumi Y, Uchiyama Y, et al: Impairment of starvation-induced and constitutive autophagy in Atg7-deficient mice. *J Cell Biol* 2005, 169:425-434.
122. Ramakrishnan S, Nguyen TM, Subramanian IV, Kelekar A: Autophagy and angiogenesis inhibition. *Autophagy* 2007, 3:512-515.
123. Razani B, Feng C, Coleman T, Emanuel R, Wen H, Hwang S, Ting JP, Virgin HW, Kastan MB, Semenkovich CF: Autophagy links inflammasomes to atherosclerotic progression. *Cell Metab* 2012, 15:534-544.
124. Peters K, Kamp G, Berz A, Unger RE, Barth S, Salamon A, Rychly J, Kirkpatrick CJ: Changes in human endothelial cell energy metabolic capacities during in vitro cultivation. The role of "aerobic glycolysis" and proliferation. *Cell Physiol Biochem* 2009, 24:483-492.
125. Lindenmüller S: Die Charakterisierung von Acetyl-CoA-Carboxylase Isoformen in Endothelzellen. *Diplomarbeit*. Universitätsklinikum Jena, Institut für Molekulare Zellbiologie; 2011.
126. Weigel D: Fatty acid metabolism and AMPK in endothelial cells. *Masterarbeit*. Universitätsklinikum Jena, Institut für Molekulare Zellbiologie; 2011.
127. Dranka BP, Hill BG, Darley-Usmar VM: Mitochondrial reserve capacity in endothelial cells: The impact of nitric oxide and reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med* 2010, 48:905-914.
128. Hinshaw DB, Burger JM: Protective effect of glutamine on endothelial cell ATP in oxidant injury. *J Surg Res* 1990, 49:222-227.
129. Hubbard VM, Valdor R, Patel B, Singh R, Cuervo AM, Macian F: Macroautophagy regulates energy metabolism during effector T cell activation. *J Immunol* 2010, 185:7349-7357.
130. Yamanaka-Tatematsu M, Nakashima A, Fujita N, Shima T, Yoshimori T, Saito S: Autophagy induced by HIF1 $\alpha$  overexpression supports trophoblast invasion by supplying cellular energy. *PLoS One* 2013, 8:e76605.
131. Lum JJ, Bauer DE, Kong M, Harris MH, Li C, Lindsten T, Thompson CB: Growth factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis. *Cell* 2005, 120:237-248.
132. Dromparis P, Michelakis ED: Mitochondria in vascular health and disease. *Annu Rev Physiol* 2013, 75:95-126.
133. Duan J, Yu Y, Yu Y, Li Y, Huang P, Zhou X, Peng S, Sun Z: Silica nanoparticles enhance autophagic activity, disturb endothelial cell homeostasis and impair angiogenesis. *Part Fibre Toxicol* 2014, 11:50.
134. Wu W, Tian W, Hu Z, Chen G, Huang L, Li W, Zhang X, Xue P, Zhou C, Liu L, et al: ULK1 translocates to mitochondria and phosphorylates FUNDC1 to regulate mitophagy. *EMBO Rep* 2014, 15:566-575.
135. Kisucka J, Chauhan AK, Patten IS, Yesilaltay A, Neumann C, Van Etten RA, Krieger M, Wagner DD: Peroxiredoxin1 prevents excessive endothelial activation and early atherosclerosis. *Circ Res* 2008, 103:598-605.
136. Zhou HF, Yan H, Hu Y, Springer LE, Yang X, Wickline SA, Pan D, Lanza GM, Pham CT: Fumagillin prodrug nanotherapy suppresses macrophage inflammatory response via endothelial nitric oxide. *ACS Nano* 2014, 8:7305-7317.
137. LaRocca TJ, Henson GD, Thorburn A, Sindler AL, Pierce GL, Seals DR: Translational evidence that impaired autophagy contributes to arterial ageing. *J Physiol* 2012, 590:3305-3316.
138. Bharath LP, Mueller R, Li Y, Ruan T, Kunz D, Goodrich R, Mills T, Deeter L, Sargsyan A, Anandh Babu PV, et al: Impairment of autophagy in endothelial cells prevents shear-stress-induced increases in nitric oxide bioavailability. *Can J Physiol Pharmacol* 2014, 92:605-612.

139. Shi CS, Shenderov K, Huang NN, Kabat J, Abu-Asab M, Fitzgerald KA, Sher A, Kehrl JH: Activation of autophagy by inflammatory signals limits IL-1beta production by targeting ubiquitinated inflammasomes for destruction. *Nat Immunol* 2012, 13:255-263.
140. Lupfer C, Thomas PG, Anand PK, Vogel P, Milasta S, Martinez J, Huang G, Green M, Kundu M, Chi H, et al: Receptor interacting protein kinase 2-mediated mitophagy regulates inflammasome activation during virus infection. *Nat Immunol* 2013, 14:480-488.
141. Madge LA, Pober JS: TNF signaling in vascular endothelial cells. *Exp Mol Pathol* 2001, 70:317-325.
142. Harris J: Autophagy and cytokines. *Cytokine* 2011, 56:140-144.
143. Weikel KA, Cacicedo JM, Ruderman NB, Ido Y: Glucose and palmitate uncouple AMPK from autophagy in human aortic endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2015, 308:C249-263.
144. Nguyen TM, Subramanian IV, Kelekar A, Ramakrishnan S: Kringle 5 of human plasminogen, an angiogenesis inhibitor, induces both autophagy and apoptotic death in endothelial cells. *Blood* 2007, 109:4793-4802.
145. Wang F, Dong X, Xiu P, Zhong J, Wei H, Xu Z, Li T, Liu F, Sun X, Li J: T7 peptide inhibits angiogenesis via downregulation of angiopoietin-2 and autophagy. *Oncol Rep* 2015, 33:675-684.
146. Gerber HP, McMurtrey A, Kowalski J, Yan M, Keyt BA, Dixit V, Ferrara N: Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. *J Biol Chem* 1998, 273:30336-30343.
147. Du J, Teng RJ, Guan T, Eis A, Kaul S, Konduri GG, Shi Y: Role of autophagy in angiogenesis in aortic endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2012, 302:C383-391.
148. Liu Z, Fan F, Wang A, Zheng S, Lu Y: Dll4-Notch signaling in regulation of tumor angiogenesis. *J Cancer Res Clin Oncol* 2014, 140:525-536.
149. Jia Z, Wang J, Wang W, Tian Y, XiangWei W, Chen P, Ma K, Zhou C: Autophagy eliminates cytoplasmic beta-catenin and NICD to promote the cardiac differentiation of P19CL6 cells. *Cell Signal* 2014, 26:2299-2305.
150. Egan DF, Shackelford DB, Mihaylova MM, Gelino S, Kohnz RA, Mair W, Vasquez DS, Joshi A, Gwinn DM, Taylor R, et al: Phosphorylation of ULK1 (hATG1) by AMP-activated protein kinase connects energy sensing to mitophagy. *Science* 2011, 331:456-461.
151. Lee JW, Park S, Takahashi Y, Wang HG: The association of AMPK with ULK1 regulates autophagy. *PLoS One* 2010, 5:e15394.
152. Kim J, Kundu M, Viollet B, Guan KL: AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol* 2011, 13:132-141.
153. Shang L, Chen S, Du F, Li S, Zhao L, Wang X: Nutrient starvation elicits an acute autophagic response mediated by Ulk1 dephosphorylation and its subsequent dissociation from AMPK. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011, 108:4788-4793.
154. Kim HS, Montana V, Jang HJ, Parpura V, Kim JA: Epigallocatechin gallate (EGCG) stimulates autophagy in vascular endothelial cells: a potential role for reducing lipid accumulation. *J Biol Chem* 2013, 288:22693-22705.
155. Zhu H, Foretz M, Xie Z, Zhang M, Zhu Z, Xing J, Leclerc J, Gaudry M, Viollet B, Zou MH: PRKAA1/AMPKalpha1 is required for autophagy-dependent mitochondrial clearance during erythrocyte maturation. *Autophagy* 2014, 10:1522-1534.
156. Ost M, Werner F, Dokas J, Klaus S, Voigt A: Activation of AMPKalpha2 is not crucial for mitochondrial uncoupling-induced metabolic effects but required to maintain skeletal muscle integrity. *PLoS One* 2014, 9:e94689.
157. Sancak Y, Bar-Peled L, Zoncu R, Markhard AL, Nada S, Sabatini DM: Ragulator-Rag complex targets mTORC1 to the lysosomal surface and is necessary for its activation by amino acids. *Cell* 2010, 141:290-303.
158. Dunlop EA, Tee AR: The kinase triad, AMPK, mTORC1 and ULK1, maintains energy and nutrient homeostasis. *Biochem Soc Trans* 2013, 41:939-943.

159. Zhang L, Cui L, Zhou G, Jing H, Guo Y, Sun W: Pterostilbene, a natural small-molecular compound, promotes cytoprotective macroautophagy in vascular endothelial cells. *J Nutr Biochem* 2013, 24:903-911.
160. Zhang L, Jing H, Cui L, Li H, Zhou B, Zhou G, Dai F: 3,4-Dimethoxystilbene, a resveratrol derivative with anti-angiogenic effect, induces both macroautophagy and apoptosis in endothelial cells. *J Cell Biochem* 2013, 114:697-707.
161. Zhang L, Dai F, Cui L, Jing H, Fan P, Tan X, Guo Y, Zhou G: Novel role for TRPC4 in regulation of macroautophagy by a small molecule in vascular endothelial cells. *Biochim Biophys Acta* 2015, 1853:377-387.
162. Cheng SW, Fryer LG, Carling D, Shepherd PR: Thr2446 is a novel mammalian target of rapamycin (mTOR) phosphorylation site regulated by nutrient status. *J Biol Chem* 2004, 279:15719-15722.
163. Williams T, Forsberg LJ, Viollet B, Brenman JE: Basal autophagy induction without AMP-activated protein kinase under low glucose conditions. *Autophagy* 2009, 5:1155-1165.
164. Guo H, Chen Y, Liao L, Wu W: Resveratrol protects HUVECs from oxidized-LDL induced oxidative damage by autophagy upregulation via the AMPK/SIRT1 pathway. *Cardiovasc Drugs Ther* 2013, 27:189-198.
165. Ouchi N, Shibata R, Walsh K: AMP-activated protein kinase signaling stimulates VEGF expression and angiogenesis in skeletal muscle. *Circ Res* 2005, 96:838-846.
166. Melemedjian OK, Asiedu MN, Tillu DV, Sanoja R, Yan J, Lark A, Khoutorsky A, Johnson J, Peebles KA, Lepow T, et al: Targeting adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) in preclinical models reveals a potential mechanism for the treatment of neuropathic pain. *Mol Pain* 2011, 7:70.
167. Reihill JA, Ewart MA, Salt IP: The role of AMP-activated protein kinase in the functional effects of vascular endothelial growth factor-A and -B in human aortic endothelial cells. *Vasc Cell* 2011, 3:9.
168. Peyton KJ, Liu XM, Yu Y, Yates B, Durante W: Activation of AMP-activated protein kinase inhibits the proliferation of human endothelial cells. *J Pharmacol Exp Ther* 2012, 342:827-834.
169. Chen G, Zhang W, Li YP, Ren JG, Xu N, Liu H, Wang FQ, Sun ZJ, Jia J, Zhao YF: Hypoxia-induced autophagy in endothelial cells: a double-edged sword in the progression of infantile haemangioma? *Cardiovasc Res* 2013, 98:437-448.
170. Zhang H, Bosch-Marce M, Shimoda LA, Tan YS, Baek JH, Wesley JB, Gonzalez FJ, Semenza GL: Mitochondrial autophagy is an HIF-1-dependent adaptive metabolic response to hypoxia. *J Biol Chem* 2008, 283:10892-10903.
171. Scherz-Shouval R, Shvets E, Fass E, Shorer H, Gil L, Elazar Z: Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4. *EMBO J* 2007, 26:1749-1760.
172. Chen S, Tang Y, Qian Y, Chen R, Zhang L, Wo L, Chai H: Allicin prevents H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced apoptosis of HUVECs by inhibiting an oxidative stress pathway. *BMC Complement Altern Med* 2014, 14:321.
173. Csato V, Peto A, Koller A, Edes I, Toth A, Papp Z: Hydrogen peroxide elicits constriction of skeletal muscle arterioles by activating the arachidonic acid pathway. *PLoS One* 2014, 9:e103858.
174. Marino G, Niso-Santano M, Baehrecke EH, Kroemer G: Self-consumption: the interplay of autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014, 15:81-94.
175. Jain A, Lamark T, Sjøttem E, Larsen KB, Awuh JA, Overvatn A, McMahon M, Hayes JD, Johansen T: p62/SQSTM1 is a target gene for transcription factor NRF2 and creates a positive feedback loop by inducing antioxidant response element-driven gene transcription. *J Biol Chem* 2010, 285:22576-22591.
176. Kweider N, Fragoulis A, Rosen C, Pecks U, Rath W, Pufe T, Wruck CJ: Interplay between vascular endothelial growth factor (VEGF) and nuclear factor erythroid 2-related factor-2 (Nrf2): implications for preeclampsia. *J Biol Chem* 2011, 286:42863-42872.

177. Sobolewska A, Gajewska M, Zarzynska J, Gajkowska B, Motyl T: IGF-I, EGF, and sex steroids regulate autophagy in bovine mammary epithelial cells via the mTOR pathway. *Eur J Cell Biol* 2009, 88:117-130.
178. Li Y, Zhang L, Li K, Li J, Xiang R, Zhang J, Li H, Xu Y, Wei Y, Gao J, et al: ZNF32 inhibits autophagy through the mTOR pathway and protects MCF-7 cells from stimulus-induced cell death. *Sci Rep* 2015, 5:9288.
179. Fu MY, He YJ, Lv X, Liu ZH, Shen Y, Ye GR, Deng YM, Shu JC: Transforming growth factorbeta1 reduces apoptosis via autophagy activation in hepatic stellate cells. *Mol Med Rep* 2014, 10:1282-1288.
180. Chu YK, Lee SC, Byeon SH: VEGF rescues cigarette smoking-induced human RPE cell death by increasing autophagic flux: implications of the role of autophagy in advanced age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2013, 54:7329-7337.
181. Suzuki HI, Kiyono K, Miyazono K: Regulation of autophagy by transforming growth factor-beta (TGF-beta) signaling. *Autophagy* 2010, 6:645-647.
182. Patel AS, Lin L, Geyer A, Haspel JA, An CH, Cao J, Rosas IO, Morse D: Autophagy in idiopathic pulmonary fibrosis. *PLoS One* 2012, 7:e41394.
183. Li TY, Lin SY, Lin SC: Mechanism and physiological significance of growth factor-related autophagy. *Physiology (Bethesda)* 2013, 28:423-431.
184. Racioppi L, Means AR: Calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 2: roles in signaling and pathophysiology. *J Biol Chem* 2012, 287:31658-31665.
185. Hardie DG, Scott JW, Pan DA, Hudson ER: Management of cellular energy by the AMP-activated protein kinase system. *FEBS Lett* 2003, 546:113-120.

## 7 ANHANG

### 7.1 Abkürzungsverzeichnis

<b>2-DG</b> .....	2-Deoxyglukose	<b>FOXO1</b> .....	<i>forkhead box protein O1</i>
<b>3-MA</b> .....	3-Methyladenin	<b>G6P</b> .....	Glukose-6-Phosphatase
<b>ACC1/2</b> .....	Acetyl-Coenzym A-Carboxylase	<b>GABARAP</b> .....	<i>gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein</i>
<b>AICAR</b> .....	5-Aminoimidazol-4-Carboxamid-Ribonukleotid	<b>GATE16</b> .....	<i>golgi-associated ATPase enhancer of 16 kDa</i>
<b>AIS</b> .....	autoinhibitorische Sequenz	<b>GBD</b> .....	Glykogenbindedomäne
<b>AMP</b> .....	Adenosinmonophosphat	<b>GLUT1/4</b> .....	Glukosetransporter 1/4
<b>Akt</b> .....	Proteinkinase B (PKB)	<b>GS</b> .....	Glykogensynthase
<b>AMBRA1</b> .....	<i>activating molecule in Beclin1-regulated autophagy</i>	<b>GSH</b> .....	Glutathion
<b>AMPK</b> .....	5'AMP-aktivierte Proteinkinase	<b>GSSG</b> .....	Glutathiondisulfid
<b>APP</b> .....	<i>amyloid precursor protein</i>	<b>HEXKII</b> .....	Hexokinase II
<b>ATG</b> .....	<i>autophagy-related</i>	<b>HMGR</b> .....	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym A-Reduktase
<b>ATG14L</b> .....	<i>ATG14-like</i>	<b>HSA</b> .....	humanes Serumalbumin
<b>ATP</b> .....	Adenosintriphosphat	<b>HSL</b> .....	hormonsensitive Lipase
<b>Bcl2</b> .....	<i>B-cell lymphoma 2</i>	<b>HUVEC</b> .....	<i>human umbilical vein endothelial cells</i>
<b>Beclin1</b> .....	<i>Bcl2-interacting protein 1</i>	<b>IL1<math>\beta</math>/6/8</b> .....	Interleukin 1 $\beta$ /6/8
<b>BrdU</b> .....	Bromdesoxyuridin	<b>KM</b> .....	Kardiomyozyten
<b>BSA</b> .....	bovines Serumalbumin	<b>LC3B</b> .....	<i>microtubule-associated protein light chain 3B</i>
<b>bFGF</b> .....	<i>basic fibroblast growth factor</i>	<b>LKB1</b> .....	<i>liver kinase B1</i>
<b>BSO</b> .....	Buthionin-Sulfoximin	<b>MAPK</b> .....	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
<b>CaMKK<math>\beta</math></b> .....	Calcium/Calmodulin-abhängige Proteinkinase-Kinase $\beta$	<b>MCP1</b> .....	<i>monocyte chemotactic protein 1</i>
<b>CBS</b> .....	Cystathionin- $\beta$ -Synthase-Motiv	<b>MEF</b> .....	<i>mouse embryonic fibroblast</i>
<b>CMA</b> .....	<i>chaperone-mediated autophagy</i>	<b>MEK</b> .....	MAPK/ERK1/2-Kinase
<b>CTD</b> .....	C-terminale Domäne	<b>MLCK</b> .....	<i>myosin light chain kinase</i>
<b>CYP2C</b> .....	Cytochrom P450 2C	<b>mTOR</b> .....	<i>mechanistic target of rapamycin</i>
<b>DAG</b> .....	Diacylglycerol	<b>mTORC1</b> .....	mTOR-Komplex1
<b>DLL4</b> .....	<i>Delta-like ligand 4</i>	<b>NADPH</b> .....	Nicotinamadenin dinukleotid-phosphat
<b>eEF2</b> .....	eukaryotischer Translations-Elongationsfaktor 2	<b>NICD</b> .....	<i>notch intracellular domain</i>
<b>EGF</b> .....	<i>epidermal growth factor</i>	<b>NF<math>\kappa</math>B</b> .....	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
<b>eNOS</b> .....	endotheliale NO-Synthase	<b>Nrf2</b> .....	<i>nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2</i>
<b>ERK1/2</b> .....	<i>extracellular signal-regulated kinase 1/2</i>	<b>NOX</b> .....	NADPH-Oxidase
<b>FAK</b> .....	<i>focal adhesion kinase</i>	<b>NTD</b> .....	N-terminale Domäne
<b>FIP200</b> .....	<i>200 kDa focal adhesion kinase family-interacting protein</i>		
<b>FKS</b> .....	fötales Kälberserum		

<b>p</b> .....phospho	<b>S</b> ..... Serin
<b>p70S6K</b> ..... <i>p70 ribosomal protein S6 kinase</i>	<b>SERCA</b> ..... <i>sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase</i>
<b>PE</b> .....Phosphatidylethanolamin	<b>SIRT1</b> ..... Sirtuin1
<b>PEPCK</b> .....Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase	<b>SOD</b> ..... Superoxiddismutase
<b>PFK2</b> .....6-Phosphofrukto-2-Kinase	<b>Src</b> ..... <i>sarcom-family kinase</i>
<b>PGC1<math>\alpha</math></b> ..... <i>peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1<math>\alpha</math></i>	<b>T</b> ..... Threonin
<b>PI(3)P</b> .....Phosphatidylinositol-3-Phosphat	<b>TGF<math>\beta</math></b> ..... <i>transforming growth factor <math>\beta</math></i>
<b>PI3K</b> .....Phosphoinositid-3-Kinase	<b>TNF<math>\alpha</math></b> ..... Tumornekrosefaktor $\alpha$
<b>PKC</b> .....Proteinkinase C	<b>TRX</b> ..... Thioredoxin
<b>PLC<math>\beta/\gamma</math></b> .....Phospholipase C $\beta/\gamma$	<b>TSC2</b> ..... <i>tuberous sclerosis complex 2</i>
<b>PP2C<math>\alpha</math></b> .....Proteinphosphatase 2C $\alpha$	<b>ULK1/2</b> ..... <i>uncoordinated 51-like kinase 1/2</i>
<b>PRX1</b> .....Peroxiredoxin 1	<b>UVRAG</b> ..... <i>UV-irradiation resistance-associated gene</i>
<b>Rac</b> ..... <i>ras-related C3 botulinum toxin substrate</i>	<b>VEGF</b> ..... <i>vascular endothelial growth factor</i>
<b>Raf</b> ..... <i>rapidly accelerated fibrosarcoma</i>	<b>VEGFR1/2/3</b> .... VEGF-Rezeptor 1/2/3
<b>ROS</b> .....reaktive Sauerstoffspezies	<b>VPS34</b> ..... <i>vacuolar protein sorting 34</i>
<b>Rubicon</b> ..... <i>RUN domain Beclin1-interacting and cysteine-rich-containing protein</i>	<b>WIPI</b> ..... <i>WD-repeat protein interacting with phosphoinositides</i>
	<b>Y</b> ..... Tyrosin

## 7.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.	VEGF-Signalwege. ....	3
Abbildung 2.	Aufbau der AMPK. ....	5
Abbildung 3.	Regulierung der AMPK. ....	6
Abbildung 4.	Regulierung des Metabolismus durch AMPK. ....	7
Abbildung 5.	Funktion der AMPK in Endothelzellen. ....	10
Abbildung 6.	Übersicht über den Ablauf der Autophagie (vereinfacht). ....	12
Abbildung 7.	Zelluläre Funktionen der Autophagie. ....	15
Abbildung 8.	Prinzip der GSH-Messung. ....	32
Abbildung 9.	Prinzip der Zytokin-Bestimmung mittels Multiplex-Methode. ....	34
Abbildung 10.	Zellzyklus-Analyse. ....	37
Abbildung 11.	Wirkmechanismus von Bafilomycin A1. ....	41
Abbildung 12.	HUVEC weisen eine hohe basale Autophagie auf. ....	43
Abbildung 13.	Hemmung der Autophagie durch ULK1- und Beclin1-siRNA bzw. 3-MA. ....	45
Abbildung 14.	Autophagie hat keinen Einfluss auf basale und stress-induzierte Veränderungen der ATP-Spiegel. ....	47
Abbildung 15.	Hemmung der Autophagie führt zu oxidativem Stress. ....	48
Abbildung 16.	Hemmung der Autophagie führt zu inflammatorischem Stress. ....	49
Abbildung 17.	Hemmung der Autophagie vermindert basale Proliferation. ....	50
Abbildung 18.	Hemmung der Autophagie reduziert die Zellzahl. ....	50
Abbildung 19.	Hemmung der Autophagie führt zum Zelltod. ....	51
Abbildung 20.	Hemmung der Autophagie beeinflusst vor allem die basale Proliferation. ....	53
Abbildung 21.	ULK1/Beclin1-siRNA hat keinen Einfluss auf VEGF-induzierte BrdU-Inkorporation. ....	54
Abbildung 22.	Hemmung der Autophagie vermindert das Überleben. ....	55
Abbildung 23.	ULK1/Beclin1-siRNA verändert VEGF-Signalwege kaum. ....	56
Abbildung 24.	ULK1/Beclin1-siRNA hemmt VEGF-induzierte <i>in vitro</i> -Angiogenese. ....	57
Abbildung 25.	Niedrige Bafilomycin A1-Konzentrationen hemmen Autophagie. ....	58
Abbildung 26.	Bafilomycin A1 hemmt VEGF-stimulierte <i>in vitro</i> -Angiogenese. ....	59
Abbildung 27.	Bafilomycin A1 induziert nur wenig Zelltod. ....	60
Abbildung 28.	Metabolischer Stress induziert Autophagie in HUVEC. ....	61
Abbildung 29.	2-DG stimuliert Autophagie AMPK $\alpha$ 1-abhängig. ....	62
Abbildung 30.	AMPK stimuliert Autophagie. ....	63
Abbildung 31.	A769662-induzierte Autophagie ist AMPK $\alpha$ 1-abhängig. ....	64
Abbildung 32.	A769662-induzierte Angiogenese ist AMPK-abhängig. ....	66
Abbildung 33.	A769662 aktiviert AMPK langanhaltend. ....	66
Abbildung 34.	A769662 stimuliert angiogene Signalwege. ....	67
Abbildung 35.	Akt und ERK1/2 vermitteln A769662-induzierte Angiogenese. ....	68
Abbildung 36.	Bafilomycin A1 hemmt A769662-induzierte <i>in vitro</i> -Angiogenese. ....	69
Abbildung 37.	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> beeinflusst Autophagie konzentrationsabhängig. ....	71
Abbildung 38.	Hypoxie stimuliert Autophagie. ....	72
Abbildung 39.	VEGF stimuliert Autophagie in Endothelzellen. ....	73
Abbildung 40.	VEGF-stimulierte Autophagie ist AMPK $\alpha$ 1-vermittelt. ....	74
Abbildung 41.	Funktion der basalen Autophagie in Endothelzellen. ....	79
Abbildung 42.	Bedeutung der Autophagie für die Endothelzellfunktion. ....	82
Abbildung 43.	AMPK-regulierte Autophagie. ....	85
Abbildung 44.	A769662-regulierte Angiogenese. ....	88
Abbildung 45.	Beteiligung des AMPK/Autophagie-Signalweges an der VEGF-induzierten Angiogenese. ....	92

### 7.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.	Zellkultur- und Transfektionsreagenzien .....	18
Tabelle 2.	Reagenzien für Zellyse und Proteinanalytik.....	18
Tabelle 3.	Reagenzien zur Analyse von Stressparametern .....	20
Tabelle 4.	Reagenzien für funktionelle Versuche.....	20
Tabelle 5.	Inhibitoren und Stimulanzen.....	21
Tabelle 6.	Antikörper für Western-Blot.....	21
Tabelle 7.	Antikörper für Immunfluoreszenz .....	22
Tabelle 8.	Antikörper für Multiplex-Zytokinmessung .....	23
Tabelle 9.	siRNA .....	23
Tabelle 10.	Materialien .....	23
Tabelle 11.	Geräte.....	24
Tabelle 12.	Zusammensetzung der Lösungen und Medien zur Präparation und Kultivierung von Endothelzellen .....	25
Tabelle 13.	Zellzahlen .....	26
Tabelle 14.	Hepes/CaCl <sub>2</sub> /HSA-Puffer .....	27
Tabelle 15.	Puffer für Zellyse .....	28
Tabelle 16.	Zusammensetzung der Polyacrylamid-Gele.....	29
Tabelle 17.	Puffer für Elektrophorese .....	30
Tabelle 18.	Puffer für Western-Blot.....	30
Tabelle 19.	Strippingpuffer .....	31
Tabelle 20.	Reaktionspuffer für GSH-Bestimmung .....	32
Tabelle 21.	Puffer für ATP-Bestimmung .....	34

## 7.4 Veröffentlichungen der Ergebnisse dieser Arbeit

### Publikation in Tagungsbänden

Lindenmüller S, **Spengler K**, Weigel D, Heller R: Metabolic stress and energy metabolism in endothelial cells. 27. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Arterioskleroseforschung 2013, *Perfusion* 2013 (2).

**Spengler K**, Lindenmüller S, Kryeziu N, Heller R: Regulation of endothelial cell function by the AMPK/autophagy axis. 28. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Arterioskleroseforschung 2014, *Perfusion* 2014 (1).

**Spengler K**, Kryeziu N, Lindenmüller S, Meçe O, Weiland A, Klotz LO, Heller R: Angiogenesis is dependent on endothelial autophagy – the role of AMPK. 29. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Arterioskleroseforschung 2015, *Perfusion* 2015 (1).

### Vorstellung der Daten bei Konferenzen

**Spengler K**, Lindenmüller S, Heller R: Regulation of autophagy by AMPK in endothelial cells. Dose-Response 2013: Implications for Toxicology, Medicine, and Risk Assessment, Amherst (USA) [Poster]

**Spengler K**, Lindenmüller S, Weigel D, Heller R: Adaptation mechanisms to metabolic stress in endothelial cells. Stress and Ageing – from Molecular Biology to Clinical Perspectives, 2013, Halle (Saale) [Vortrag + Poster]

**Spengler K**, Lindenmüller S, Kryeziu N, Heller R: Regulation of endothelial cell function by the AMPK/autophagy axis. Stress and Ageing – Chancen und Risiken, 2014, Halle (Saale) [Poster]

**Spengler K**, Kryeziu N, Lindenmüller S, Meçe O, Weiland A, Klotz LO, Heller R: Angiogenesis is dependent on endothelial autophagy – the role of AMPK. 7th Postgraduate Symposium on Cancer Research, 2015, Dornburg [Poster]

## 7.5 Danksagung

Ich möchte mich bei Prof. Dr. Regine Heller für dieses interessante Thema und die Möglichkeit, dieses in ihrer Arbeitsgruppe zu bearbeiten, bedanken. Darüber hinaus danke ich ihr vielmals für die kompetente wissenschaftliche und persönliche Unterstützung während dieser Zeit und die zahlreichen Diskussionen, Ratschläge und Hilfestellungen bei Problemen.

Weiterhin danke ich der gesamten Arbeitsgruppe, den Mitarbeitern des Institutes für Molekulare Zellbiologie sowie den Mitgliedern des RTG1715 für die freundliche Atmosphäre. Mein besonderer Dank gilt Silke Lindenmüller und Anne Knierim, die mir während der Promotionszeit nicht nur mit wissenschaftlichem Rat und experimentellen Hilfestellungen zur Seite standen, sondern mir auch in persönlichen Belangen immer geholfen haben.

Ich bedanke mich auch herzlich bei Elke Teuscher für ihre Geduld, ihre Arbeit in der Zellkultur und die Ermöglichung der Experimente sowie für die tatkräftige Hilfe.

Weiterhin gilt mein herzlicher Dank Prof. Dr. Lars-Oliver Klotz und Dr. Alexander Mosig für die freundliche Kooperation sowie Nderim Kryeziu, Odeta Meçe, Ann-Katrin Clauder und Marko Gröger für die experimentelle Unterstützung und Diskussion.

Daneben danke ich nochmals Anne Knierim und Dr. Bernadin Ndongson Dongmo für die Bereitstellung der Vergleichszellen.

Schließlich möchte ich mich bei meinem Lebensgefährten René Dorn und meiner Familie bedanken, die mich während der Promotionszeit in vielerlei Hinsicht unterstützt haben und mir zur Seite standen.

## **7.6 Ehrenwörtliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der biologisch-pharmazeutischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena bekannt ist,

ich die Dissertation selbstständig angefertigt habe, keine Textabschnitte eines Dritten ohne Kennzeichnung übernommen habe und alle von mir genutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes unterstützt haben: Prof. Dr. Regine Heller (Betreuer), Nderim Kryeziu (Auswertung von Zellzyklusanalysen),

die Hilfe eines Promotionsberaters von mir nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die in Zusammenhang mit dem Inhalt der vorliegenden Dissertation stehen,

ich diese Dissertation nicht bereits zuvor als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe,

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, 04.08.16