

**Der Einfluss des
5' AMP-aktivierten Proteinkinase (AMPK)-Signalwegs
auf Alterung und Seneszenz
vaskulärer Endothelzellen**

Dissertation

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

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von M. Sc. Claudia Ender
geboren am 17.07.1993 in Bad Salzungen

Gutachter:

1. **Prof. Dr. Regine Heller**
CMB - Zentrum für Molekulare Biomedizin
Institut für Molekulare Zellbiologie
Universitätsklinikum Jena
2. **Prof. Dr. Otmar Huber**
Institut für Biochemie II
Universitätsklinikum Jena
3. **Prof. Dr. Andreas Simm**
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Universitätsklinik und Poliklinik für Herzchirurgie
Ernst-Grube Str. 40, 06120 Halle (Saale)

Tag der öffentlichen Verteidigung: 05.04.2022

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	V
Zusammenfassung	VII
Summary	IX
1. Einleitung.....	1
1.1 Endothel	1
1.2 AMPK.....	2
1.2.1 Aufbau	2
1.2.2 Regulation.....	3
1.2.3 Funktion	5
1.2.4 AMPK-Knockout-Mäuse.....	6
1.3 Protektive Funktionen der AMPK bei Alterungsprozessen	6
1.3.1 Stimulierung der Autophagie.....	7
1.3.2 Hemmung von oxidativem und inflammatorischem Stress	8
1.3.3 Energiehomöostase	9
1.4 Veränderung der AMPK bei Alterungsprozessen.....	10
1.5 Alterung und Seneszenz.....	11
1.6 Ursachen von Seneszenz	12
1.6.1 Replikative Seneszenz.....	13
1.6.2 Stress-induzierte Seneszenz	13
1.7 Zielstellung	15
2. Material und Methoden	16
2.1 Material.....	16
2.1.1 Zellen	16
2.1.2 Chemikalien und Reagenzien	16
2.1.3 Inhibitoren und Stimulantien.....	18
2.1.4 Antikörper.....	19
2.1.5 Small interfering RNA (siRNA).....	22
2.1.6 Primer	22
2.1.7 Kits.....	23
2.1.8 Materialien	23

2.1.9	Geräte	24
2.1.10	Mäuse	25
2.2	Methoden <i>in vitro</i>	26
2.2.1	Zellkultur von HUVEC	26
2.2.1.1	Präparation von HUVEC.....	26
2.2.1.2	Passagieren, Einfrieren und Auftauen von HUVEC.....	27
2.2.1.3	Aussaat von HUVEC	28
2.2.1.4	Transfektion mit siRNA.....	28
2.2.2	Zellkultur von MLEC.....	29
2.2.2.1	Präparation von MLEC	29
2.2.2.2	Aussaat von MLEC.....	31
2.2.3	Stimulationsbedingungen.....	31
2.2.4	Proteinanalytik	32
2.2.4.1	Zelllyse	32
2.2.4.2	Proteinbestimmung nach Lowry	33
2.2.4.3	SDS-PAGE.....	34
2.2.4.4	Western Blot.....	35
2.2.4.5	Immundetektion von Proteinen.....	35
2.2.4.6	Strippen von Membranen	36
2.2.4.7	Densitometrische Auswertung der Western Blots	36
2.2.5	Färbungen.....	37
2.2.5.1	Seneszenz-assoziierte β -Galaktosidase (SA- β -Gal)-Färbung	37
2.2.5.2	Immunfluoreszenzfärbungen.....	38
2.2.5.3	Bildauswertung der Immunfluoreszenzfärbung	39
2.2.5.4	Zellzyklus-Färbung	39
2.2.5.5	Nachweis von CD31 mittels Durchflusszytometrie	42
2.2.5.6	Messung der Lysosomenaktivität	42
2.2.5.7	Messung der AMPK-Aktivität.....	43
2.2.5.8	Messung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS).....	44
2.2.6	RNA-Isolation und RNA-Sequenzierung	45
2.3	Methoden <i>in vivo</i> – Tierversuche	45
2.3.1	Genotypisierung von Mäusen	45
2.3.1.1	DNA-Isolation aus Mausschwanzbiopsien.....	45
2.3.1.2	Genotypisierungs-Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	46

2.3.1.3	Agarose-Gelelektrophorese.....	47
2.3.2	Retrospektive Überlebensstudie	47
2.3.3	Gewichtsmessung, Blutanalyse und Organentnahme	47
2.3.4	Histologie	48
2.3.4.1	Einbetten von Organen in Paraffin und Herstellen von Paraffin- schnitten	48
2.3.4.2	Entparaffinieren und Rehydrieren von Gewebeschnitten	48
2.3.4.3	Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung.....	48
2.3.5	SA- β -Gal-Färbung der Aorta	49
2.3.6	Einbettung der Aorta und Herstellung von Kryoschnitten.....	49
2.3.7	RNA-Isolation, cDNA-Synthese und PCR.....	50
2.4	Statistik	50
3.	Ergebnisse.....	51
3.1.	AMPK in seneszenten und chronologisch gealterten Endothelzellen..	51
3.1.1	Charakterisierung replikativ seneszenten Endothelzellen.....	51
3.1.2	Expression und Aktivität der AMPK in replikativ seneszenten Zellen....	53
3.1.3	Aktivierbarkeit der AMPK in replikativ seneszenten Zellen durch physiologische Stimuli.....	55
3.1.4	Aktivierbarkeit der AMPK nach stress-induzierter Seneszenz	60
3.1.5	Charakterisierung von chronologisch gealterten Endothelzellen aus Mäusen.....	61
3.1.6	Expression und Aktivität der AMPK in chronologisch gealterten Endothelzellen	62
3.1.7	Aktivierbarkeit der AMPK in chronologisch gealterten Endothelzellen durch physiologische Stimuli.....	64
3.2	Seneszenz und zelluläre Alterung nach <i>Knockdown</i> der AMPK.....	70
3.2.1	Einfluss der AMPK α -siRNA auf Marker der zellulären Seneszenz	70
3.2.2	Einfluss der AMPK α -siRNA auf die Funktion der Lysosomen.....	73
3.2.3	Einfluss der AMPK α -siRNA auf zelluläre ROS und DNA-Schädigung ..	74
3.2.4	Einfluss der AMPK α -siRNA auf die Endothelzellproliferation.....	76
3.2.5	Einfluss der AMPK α -siRNA auf die Transkripte von Proliferation- und Seneszenz-regulierenden Genen	78
3.3	Charakterisierung der AMPK α1-/- und AMPKα2-/- Mäuse.....	80
3.3.1	Beurteilung der Lebensspanne der AMPK α 1-/- und AMPK α 2-/- Mäuse.....	80

3.3.2	Beurteilung der Organe von AMPK α 1 ^{-/-} Mäusen.....	80
3.3.3	Veränderungen des Blutbildes in AMPK α 1 ^{-/-} Mäusen	86
3.3.4	Veränderungen der Aorta von AMPK α 1 ^{-/-} Mäusen.....	87
3.4	Hypoxie und Seneszenz von Endothelzellen	90
4.	Diskussion.....	93
4.1	Zelluläre Modelle für Seneszenz und Alterung	93
4.2	Regulation der AMPK in seneszenten und gealterten Zellen	94
4.3	Die Herunterregulierung der AMPK α 1 durch siRNA führt zu Seneszenz	97
4.4	Der <i>Knockout</i> von AMPK α 1 weist auf einen Alterungsphänotyp in Mäusen hin.....	101
4.5	Hypoxie als pro-Seneszenzfaktor	105
5.	Schlussfolgerung und Ausblick	107
6.	Literaturverzeichnis	108
6.	Anhang.....	122
6.1	Abbildungsverzeichnis	122
6.2	Tabellenverzeichnis	124
6.3	Veröffentlichungen der Ergebnisse dieser Arbeit	125
6.4	Danksagung.....	126
6.5	Ehrenwörtliche Erklärung.....	127

Abkürzungsverzeichnis

2-DG	2-Deoxyglukose	FKS	fötales Kälberserum
ACC	Acetyl-Coenzym A-Carboxylase	FoxO	<i>forkhead box protein O</i>
Akt	Proteinkinase B	G	<i>Gauge</i>
AMP	Adenosinmonophosphat	GSH	Glutathion
AMPK	5' AMP-aktivierte Proteinkinase	H2AFV	<i>H2A.Z variant histone 2</i>
ANOVA	analysis of variance	HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
APS	Ammoniumpersulfat	HCT	Hämatokrit
ATM	<i>Ataxia telangiectasia mutated</i>	HE	Hämatoxylin-Eosin
ATP	Adenosintriphosphat	HGB	Hämoglobin
ATR	<i>Ataxia telangiectasia and Rad3 related</i>	HMGA1/2	<i>high mobility group AT-hook 1/2</i>
BSA	bovines Serumalbumin	HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
CaMKK2	Calcium/Calmodulin-abhängige Proteinkinase-Kinase 2	HSA	humanes Serumalbumin
CDK	<i>cyclin dependent kinase</i>	HUVEC	<i>human umbilical vein endothelial cells</i>
CD31	<i>cluster of differentiation 31</i>	ID1	<i>inhibitor of DNA binding 1</i>
CDK2	<i>cyclin dependent kinase 2</i>	IGFBP7	<i>insulin like growth factor binding protein 7</i>
CO	Kohlenstoffmonoxid	IgG	Immunglobulin
CREB	<i>cAMP response element binding protein</i>	IKK	<i>inhibitor of NF-κB kinase</i>
CRTC-1	<i>cyclic AMP-regulated transcriptional co-activator-1</i>	iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
DCF	2',7'-Dichlorfluorescein	IP3	Inositoltriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat	Jun	<i>Jun Proto-Oncogene</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid	Keap1	<i>Kelch-like ECH-associated protein 1</i>
DTT	DL-Dithiotreitol	LDL	Lipoproteine niedriger Dichte
ECL	<i>enhanced chemo-luminescence</i>	LKB1	<i>liver kinase B1</i>
E2F	<i>E2 transcription factor</i>	LMNB1	Lamin B1
eEF2	Translations-Elongationsfaktor 2	M	Molar
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase	mA	Milliampere
ERF	<i>ETS2 repressor factor</i>	MAP4K4	<i>mitogen-activated protein kinase kinase kinase 4</i>
ETS2	<i>ETS proto-oncogene 2</i>	MCV	<i>mean corpuscular volume</i>
ERK	<i>extracellular signal regulated Kinases</i>	MEK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kinasen

mg	Milligramm	Ras	<i>rat sarcoma</i>
min	Minute	Rb	Retinoblastom-Protein
ml	Milliliter	RBBP7	<i>RB binding protein 7</i>
MLEC	<i>murine lung endothelial cells</i>	RBC	<i>red blood cell count</i>
mm	Millimeter	ROS	reaktive Sauerstoffspezies
mM	Millimolar	rpm	<i>rounds per minute</i>
mTOR	<i>mechanistic target of rapamycin</i>	RPS27A	<i>ribosomal protein S27a</i>
NADPH	Nicotinamidadenin- nukleotidphosphat	RPS6KA2	<i>ribosomal protein S6 kinase A2</i>
NFκB1	<i>nuclear factor kappa B subunit 1</i>	S	Serin
NF-κB	<i>nuclear factor 'kappa lightchain-enhancer' of activated B-cells</i>	SA-β-Gal	Seneszenz-assoziierte-β- Galaktosidase
ng	Nanogramm	SDS	Sodiumdodecylsulfat
NO	Stickstoffmonoxid	siRNA	small interfering RNA
Nrf2	<i>nuclear factor-erythroid 2 related factor 2</i>	SIRT1	Sirtuin 1
p	phospho	T	Threonin
p16	CDK-Inhibitor 2A	TFDP1	<i>Transcription Factor Dp-1</i>
p21	CDK-Inhibitor 1	TNIK	<i>TRAF2 and NCK inter- acting kinase</i>
p53	<i>tumor protein p53</i>	TSC2	<i>tuberous sclerosis complex 2</i>
PAGE	Polyacrylamid- Gelelektrophorese	U	<i>Units</i>
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>	UBE2	<i>ubiquitin conjugating enzyme E2</i>
PCR	Polymerase Kettenreaktion	UCP-2	<i>uncoupling protein 2</i>
PFKFB3	Phosphofruktokinase-2/ Fructose-2,6-bisphosphatase	ULK1	<i>uncoordinated 51-like kinase 1</i>
PGC-1α	<i>proliferator-activated receptor gamma coactivator 1α</i>	VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
PIC	<i>protease inhibitor cocktail</i>	VEGFR2	VEGF-Rezeptor 2
PIKKs	<i>phosphatidylinositol 3 kinase-related kinases</i>	x g	mal Erdschwere- beschleunigung
PKA	Proteinkinase A	γH2AX	phosphoryliertes H2AX am Serinrest 139
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid	°C	Grad Celsius
PP	Proteinphosphatase	μg	Mikrogramm
PP2Cα	Proteinphosphatase 2Cα	μl	Mikroliter
PVDF	Polyvinylidendifluorid	μM	Mikromolar

Zusammenfassung

Der Alterungsprozess eines Organismus steht in engem Zusammenhang mit Veränderungen des Gefäßsystems, welche zu altersassoziierten kardiovaskulären Erkrankungen führen können. Vaskuläre Alterung wird wesentlich durch dysfunktionale Endothelzellen bestimmt, welche normalerweise die vaskuläre Homöostase aufrechterhalten. Zu den Signalproteinen, die der Entwicklung einer endothelialen Dysfunktion entgegenwirken können, gehört die 5` AMP-aktivierte Proteinkinase (AMPK). Die AMPK ist ein bedeutender Regulator von zellulärem Energiestoffwechsel und Homöostase und hat entzündungshemmende und antioxidative Funktionen. Die vorliegende Studie befasst sich mit der Rolle der AMPK im vaskulären Alterungsprozess. Zwei Aspekte stehen hierbei im Vordergrund: (1) die Frage, ob Seneszenz und Alterung Veränderungen des AMPK-Signalwegs induziert und (2) die Frage, ob die AMPK den Alterungsprozess in Endothelzellen und der Gefäßwand beeinflussen kann.

Um diese Fragen zu klären, wurden junge und replikativ senescente humane Endothelzellen aus der Nabelschnurvene (HUVEC) und Lungenendothelzellen aus jungen und alten Mäusen (MLEC) verglichen sowie der Einfluss einer verminderten oder fehlenden AMPK-Expression auf Alterung und Seneszenz untersucht. Hierzu wurden katalytische Untereinheiten der AMPK (AMPK α 1 und α 2) in HUVEC mit siRNA herunterreguliert sowie *in vivo*-Studien an AMPK α 1-*Knockout*-Mäusen durchgeführt. Der AMPK-Signalweg wurde unter basalen Bedingungen und nach Stimulierung mit einem physiologischen (*vascular endothelial growth factor* (VEGF)) oder einem metabolischen AMPK-Aktivator (2-Deoxyglukose (2-DG)) in Western Blot-Analysen untersucht. Die Charakterisierung der Seneszenz erfolgte mit Hilfe von Seneszenz-assoziiertes- β -Galaktosidase (SA- β -Gal)-Färbung, Seneszenzmarkern (p53, p21 und p16), Untersuchungen der Zellproliferation und Messung von DNA-Schadensmarkern.

Anhand der SA- β -Gal-Färbung wurden 80 % der Zellen im Modell der replikativen Seneszenz und 5 % der chronologisch gealterten Zellen als seneszent eingestuft. Die AMPK-Expression war in beiden Modellen im Vergleich zu jungen Zellen erhöht, was der Aufrechterhaltung der basalen Enzymaktivität zu dienen schien (HUVEC) oder sogar zu einer Erhöhung der Aktivität führte (MLEC). In seneszenten HUVEC war die VEGF-induzierte AMPK-Aktivierung erhöht und die Aktivierung der AMPK durch 2-DG vermindert. Die Verstärkung der VEGF-induzierten Aktivierung ging mit einer erhöhten

Expression des VEGF-Rezeptors 2 (VEGFR2) und der Calcium/Calmodulin-abhängigen Proteinkinase-Kinase 2 (CaMKK2) einher. In chronologisch gealterten MLEC war die VEGF-induzierte AMPK-Aktivierung vermindert, wobei durch die erhöhte Expression der AMPK die Phosphorylierung ihrer Substrate nicht verändert war, während die Enzymaktivierung nach 2-DG beschleunigt verlief.

Ein wichtiges Ergebnis der vorliegenden Arbeit ist, dass die Herunterregulierung der AMPK α 1-Expression mittels spezifischer siRNA einen Seneszenz-Phänotyp induzierte. Dieser zeichnete sich durch den Anstieg von Seneszenzmarkern im Western Blot (p21, p53), in der Immunfluoreszenz (p21) und in histochemischen Untersuchungen (SA- β -Gal) aus und wurde durch Veränderungen wie DNA-Schäden, die Verminderung der Zellproliferation und den Nachweis einer Endotheldysfunktion (Anstieg der induzierbaren und Abfall der endothelialen NO-Synthase) weiter bekräftigt. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass es in AMPK α 1-defizienten Zellen zu einem Anstieg reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) kommt, was eine Erklärung für das Auftreten von DNA-Schäden und Wachstumsstopp darstellen könnte. Aus diesen Daten kann umgekehrt geschlossen werden, dass AMPK α 1 vor Seneszenz schützt. Um die *in vivo*-Relevanz dieser Daten zu überprüfen, wurden verschiedene Experimente an AMPK α 1-/- Mäusen durchgeführt. Diese Mäuse waren durch eine verkürzte Lebensspanne charakterisiert. Sie zeigten pathologische Veränderungen in der Leber, hatten eine vergrößerte Milz mit Anzeichen von gesteigerter Hämatopoese und Erythrozytenabbau und wiesen eine Anämie auf. All diese Veränderungen nahmen mit dem Alter deutlich zu. Verschiedenen Daten deuten auf die Entwicklung von vorzeitiger Seneszenz in AMPK α 1-/- Mäusen hin. Dazu gehörten die β -Gal-positive Aorta und ein Anstieg der p21-Genexpression in Leber und Milz. Insgesamt lassen die beschriebenen Veränderungen einen Alterungsphänotyp der AMPK α 1-/- Mäuse vermuten, der in weiteren Studien näher untersucht und durch weitere Seneszenzmarker bekräftigt werden muss.

Die Daten dieser Arbeit erlauben ein besseres Verständnis der Bedeutung des AMPK-Signalwegs für die zelluläre Alterung und lassen annehmen, dass eine Aktivierung der AMPK α 1 dem Auftreten einer endothelialen Dysfunktion im Rahmen zellulärer Alterung entgegenwirken kann. Dies sollte in zukünftigen präventiven Strategien berücksichtigt werden.

Summary

The ageing process of an organism is closely related to changes in the vascular system, which can lead to age-associated cardiovascular diseases. Vascular ageing is substantially determined by dysfunctional endothelial cells, which normally maintain vascular homeostasis. One of the signal proteins that can counteract the development of endothelial dysfunction is the 5' AMP-activated protein kinase (AMPK). The AMPK is an important regulator of cellular energy metabolism and homeostasis and has anti-inflammatory as well as antioxidant functions. The present study addresses the role of AMPK in the vascular aging process with focusing on two aspects: (1) the question of whether senescence and ageing induce changes in the AMPK signaling pathway and (2) the question of whether AMPK can influence the ageing process in endothelial cells and the vasculature.

To clarify these questions, young and replicative senescent human endothelial cells from the umbilical cord vein (HUVEC) and lung endothelial cells from young and old mice (MLEC) were compared, and the influence of reduced or absent AMPK expression on ageing and senescence was investigated. For this purpose, catalytic subunits of AMPK (AMPK α 1 and α 2) were downregulated with siRNA in HUVEC and *in vivo* studies in AMPK α 1-knockout-mice were carried out. The AMPK signaling pathway was investigated under basal conditions and after stimulation with a physiological (vascular endothelial growth factor (VEGF)) or a metabolic AMPK activator (2-deoxyglucose (2-DG)) in western blot analyses. Senescence was characterized using senescence-associated β -galactosidase (SA- β -Gal) staining, senescence markers (p53, p21 and p16), cell proliferation studies and measurement of DNA damage markers.

Based on the SA- β -Gal staining, 80 % of the cells in the replicative senescence model and 5 % of chronologically aged cells were classified as senescent. The AMPK expression was increased in both models compared to young cells, which seemed to help maintaining basal AMPK activity (HUVEC) or was associated with an enhanced enzyme activity (MLEC). In senescent HUVEC, the VEGF-induced AMPK activation was increased and the activation of the AMPK by 2-DG was decreased. The rise in VEGF-induced activation was accompanied by a stronger expression of the VEGF receptor 2 (VEGFR2) and the calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 2 (CaMKK2). In chronologically aged MLEC, VEGF-induced AMPK activation was

reduced, but due to increased expression of AMPK, the phosphorylation of its substrates was maintained. In these cells, AMPK activation after 2-DG was accelerated.

An important result of this study is that the downregulation of AMPK α 1 expression with specific siRNA induced a senescence phenotype. This was characterized by the increase in senescence markers in western blot analysis (p21, p53), in immunofluorescence (p21) and in histochemical staining (SA- β -Gal) and was further confirmed by parameters such as DNA damage, reduction in cell proliferation and detection of an endothelial dysfunction (increase in inducible and decrease in endothelial NO synthase). Furthermore, an increase in reactive oxygen species (ROS) was shown in AMPK α 1-deficient cells, which could explain the occurrence of DNA damage and growth arrest. Conversely, these data suggest that AMPK α 1 protects against senescence. To check the *in vivo* relevance of these data, various experiments were carried out on AMPK α 1^{-/-} mice. These mice were characterized by a shortened life span. They showed pathological changes in the liver, had an enlarged spleen with signs of increased hematopoiesis and erythrocyte breakdown, and exhibited anemia. All these changes increased significantly with age. Various data suggest the development of premature senescence in AMPK α 1^{-/-} mice. These included the β -gal-positive aorta and an increase in p21 gene expression in the liver and spleen. Overall, the described changes suggest an ageing phenotype of the AMPK α 1^{-/-} mice, which requires further studies to confirm senescence by additional markers.

The data of this study allow a better understanding of the AMPK signaling pathway and its role in cellular aging and suggest that the activation of AMPK α 1 may counteract the development of endothelial dysfunction in the context of cellular aging. This should be considered in future preventive strategies.

1. Einleitung

1.1 Endothel

Das Endothel kleidet als einzellige Schicht das Lumen von Lymph- und Blutgefäßen aus. Endothelzellen stehen somit in direktem Kontakt zum Blut und spielen eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der vaskulären Homöostase. Die Funktionen der Endothelzellen sind heterogen und vom Gefäßgebiet sowie von der Größe der Gefäße abhängig [1]. In Kapillaren, den kleinsten Blutgefäßen, regulieren sie als semipermeable Zellschicht den Stoffaustausch zwischen Blut und darunter liegendem Gewebe und versorgen die Organe mit Sauerstoff und Nährstoffen. Die Endothelzellen in großen Blutgefäßen, wie beispielsweise Arterien, bilden hingegen eine starke Barriere aus, um die Blutverteilung im Körper zu ermöglichen und zu regulieren [2]. Zudem sind Endothelzellen an vielen anderen physiologischen Prozessen beteiligt, wie der Regulierung des Vasotonus und der Koagulation [3]. Des Weiteren spielen sie die entscheidende Rolle bei der Bildung neuer Blutgefäße in der Embryonalentwicklung, bei Wachstums- und Wundheilungsprozessen, sowie beim Tumorwachstum [4].

Ein dysfunktionales Endothel und damit der Verlust der homöostatischen und Barrierefunktion der Endothelzellen kann zu Gefäßerkrankungen wie der Atherosklerose führen [5]. Endotheliale Dysfunktion ist durch erhöhte Expression von Adhäsionsmolekülen, gesteigerte Synthese von pro-inflammatorischen und pro-thrombotischen Faktoren sowie durch erhöhten oxidativen Stress, beispielsweise durch NADPH-Oxidasen nach oszillatorischem Scherstress, gekennzeichnet [6, 7]. Ein Anstieg an reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), hemmt die Expression und Funktion der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase eNOS [8], die für die Produktion von vasoprotektivem Stickstoffmonoxid (NO) verantwortlich ist. Durch die Reaktion von Superoxidanion mit NO kommt es zudem zur NO-Inaktivierung und zur Bildung von Peroxinitrit (ONOO^-), welches Proteine und Lipide oxidiert und zur Störung wichtiger vaskulärer Signalwege führt [9]. Diese Veränderungen initiieren und fördern die Entstehung atherosklerotischer Läsionen [10]. Dies wird durch die Einwanderung von Monozyten in die Gefäßwand, die dort zu Makrophagen differenzieren und durch die Aufnahme von oxidierten Lipoproteinen niedriger Dichte (LDL) zu Schaumzellen werden, verstärkt [11].

Um oxidativem Stress und endothelialer Dysfunktion entgegenzuwirken, gibt es antioxidative Schutzmechanismen. Wichtige antioxidative Enzyme sind Superoxiddismutasen, Katalase, Glutathionperoxidase und Thioredoxinperoxidase [12]. Der Transkriptionsfaktor *nuclear factor-erythroid 2 related factor 2* (Nrf2) spielt eine wichtige Rolle bei der Expressionsregulierung antioxidativer Proteine [13].

1.2 AMPK

1.2.1 Aufbau

Die 5' AMP-aktivierte Proteinkinase (AMPK) ist eine Serin/Threonin-Proteinkinase und ein wichtiger metabolischer Regulator. Sie ist ein Heterotrimer, bestehend aus einer katalytischen α -Untereinheit und zwei regulatorischen β und γ -Untereinheiten [14]. Die verschiedenen Untereinheiten der AMPK werden in unterschiedlichen Zellen und Geweben differentiell exprimiert [15]. In Säugetieren existieren zwei Isoformen der α -Untereinheit ($\alpha 1$, $\alpha 2$), zwei Isoformen der β -Untereinheit ($\beta 1-2$) und drei Isoformen der γ -Untereinheit ($\gamma 1-3$), die von verschiedenen Genen kodiert werden [16, 17]. Dadurch ist die Bildung von 12 verschiedenen heterotrimeren AMPK-Komplexen möglich [17]. Die α -Untereinheit besitzt eine Kinasedomäne und eine autoinhibitorische Sequenz [18]. Ihre C-terminale Region dient der Bindung an die β -Untereinheit [19]. Die β -Untereinheit wiederum verfügt in ihrer C-terminalen Domäne über Bindungsstellen für die α - und die γ -Untereinheit und ist daher für die Bildung des trimeren AMPK-Komplexes verantwortlich [16]. Des Weiteren besitzt die β -Untereinheit eine Glykogen-Bindedomäne, die es der Kinase ermöglicht, als Glykogen-Sensor zu fungieren [20]. Die γ -Untereinheit der AMPK besitzt Bateman-Domänen, die AMP und ATP binden können [18] und die AMPK zu einem sehr sensiblen Sensor des zellulären Energiestatus machen. Dabei ist die Bindungsaffinität von AMP 5-fach höher als die von ATP [21].

Die AMPK wird ubiquitär exprimiert, das Vorkommen der Isoformen variiert jedoch je nach Zell- und Gewebetyp. So wird die $\alpha 2$ -Isoform hauptsächlich in Kardiomyozyten exprimiert [22], wohingegen die $\alpha 1$ -Isoform im Fettgewebe und Skelettmuskeln überwiegt [23]. In Endothelzellen dominiert die $\alpha 1$ -Isoform, jedoch kann das Verhältnis zwischen den beiden Isoformen in kultivierten Endothelzellen je nach Spender stark variieren [23].

1.2.2 Regulation

Die AMPK reagiert auf Änderungen des AMP:ATP-Verhältnisses. Eine Inhibierung der ATP-Produktion, sowie eine Erhöhung des ATP-Verbrauchs führen zum Anstieg des AMP:ATP-Verhältnisses, zur Bindung von AMP an die γ -Untereinheit und damit zur Aktivierung der AMPK [18]. Steigt ATP wieder an, wirkt dies der beschriebenen Aktivierung entgegen [21].

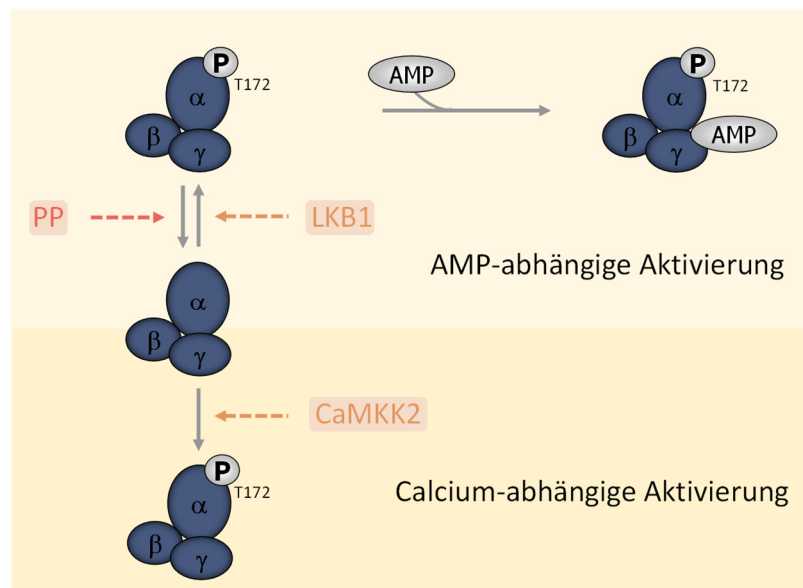


Abbildung 1: AMPK-Aktivierung durch AMP-Bindung und Phosphorylierung. Die AMPK ist ein heterotrimeres Enzym, bestehend aus einer katalytischen α -Untereinheit und zwei regulatorischen β und γ - Untereinheiten. AMP-abhängige Aktivierung: Basal wird die AMPK durch LKB1 phosphoryliert und zeitgleich durch Proteinphosphatasen dephosphoryliert. Bei Energiemangel bindet AMP an die γ -Untereinheit und führt zur allosterischen Aktivierung der AMPK. Zusätzlich bewirkt AMP eine Konformationsänderung der AMPK, was die Zugänglichkeit für Phosphatasen erschwert und somit zur vollständigen Aktivierung der AMPK führt. Calcium-abhängige Aktivierung: Calcium-Anstieg führt zur Aktivierung der CaMKK2, welche die AMPK an T172 phosphoryliert und aktiviert. (verändert nach [24]). AMP: Adenosinmonophosphat, CaMKK2: Calcium/Calmodulin-abhängige Proteinkinase-Kinase 2, LKB1: *liver kinase B1*, PP: Proteinphosphatase.

Die Aktivierung der AMPK durch AMP erfolgt zum einen allosterisch durch eine Konformationsänderung und zum anderen durch eine Begünstigung der Phosphorylierung der AMPK in der Kinasedomäne am Threoninrest 172 (T172) [24, 25]. Während die allosterische Aktivierung die AMPK-Aktivität um das Zehnfache erhöht, kommt es durch die Phosphorylierung zu einer weiteren hundertfachen Aktivitätssteigerung [26]. Die Phosphorylierung von T172 ist daher essenziell für die

volle Enzymaktivität [25]. Für die Phosphorylierung sind zwei vorgeschaltete Kinasen verantwortlich, die *liver kinase B1* (LKB1) und die Calcium/Calmodulin-abhängige Proteinkinase Kinase 2 (CaMKK2). LKB1 sorgt für eine kontinuierliche T172-Phosphorylierung der AMPK unter basalen Bedingungen [27]. Proteinphosphatasen, wie beispielsweise die Proteinphosphatase 2C α (PP2C α), führen jedoch zeitgleich zu einer Dephosphorylierung des Enzyms [24]. Nach Bindung von AMP wird die AMPK zu einem schlechteren Substrat für Phosphatasen, so dass die Phosphorylierung überwiegt und zu einer Aktivierung der AMPK führt [24, 28] (Abbildung 1).

Die CaMKK2 aktiviert die AMPK über einen AMP-unabhängigen Signalweg [29]. Ein intrazellulärer Anstieg von Calcium nach Aktivierung bestimmter Rezeptoren führt zur Stimulierung der CaMKK2, die dann nachfolgend eine Phosphorylierung der AMPK am T172 vermittelt [30]. Eine Calcium-abhängige AMPK-Aktivierung wird beispielsweise durch die Bindung des Wachstumsfaktors *vascular endothelial growth factor* (VEGF) an den VEGF-Rezeptor2 (VEGFR2) ausgelöst [31]. Dies führt zur Aktivierung der Phospholipase C γ und damit zur Spaltung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat in Inositoltriphosphat (IP3) und Diacylglycerol. IP3 induziert dann eine Freisetzung von Calcium aus dem endoplasmatischen Retikulum [32], wodurch die Calcium/Calmodulin-abhängigen Aktivierung der CaMKK2 erfolgen kann [29] (Abbildung 1).

Eine Aktivierung der AMPK ist sowohl indirekt als auch direkt durch chemische/pharmakologische Aktivatoren möglich. Direkte AMPK-Aktivatoren binden und aktivieren die Kinase durch Konformationsänderung [33]. Indirekte AMPK-Aktivatoren sorgen für einen Anstieg von AMP oder Ca²⁺, ohne direkte Interaktion mit der AMPK [33]. Ein Beispiel hierfür ist Metformin, welches durch die Inhibierung des Komplexes 1 der mitochondrialen Atmungskette einen Anstieg im AMP:ATP-Verhältnis verursacht [34]. AICAR, ein weiterer AMPK-Aktivator, ist ein Adenosin-Analog, welches in seiner phosphorylierten Form wie AMP an die AMPK binden und diese aktivieren kann [35]. Anders als AICAR, das neben AMPK auch andere AMP-abhängige Enzyme aktivieren kann, ist A-769662 ein Beispiel für einen spezifischen AMPK-Aktivator. A-769662 führt zur allosterischen Aktivierung der AMPK, welches eine Phosphorylierung der AMPK β 1-Untereinheit am S108 erfordert [33].

1.2.3 Funktion

Die AMPK ist ein wichtiger Nährstoff- und Energiesensor. Nach ihrer Aktivierung bei Energiemangel stimuliert sie die Energieproduktion aus Glukose und Fettsäuren und hemmt den Energieverbrauch durch Herunterregulierung von ATP-abhängigen Stoffwechselwegen [36] (Abbildung 2).

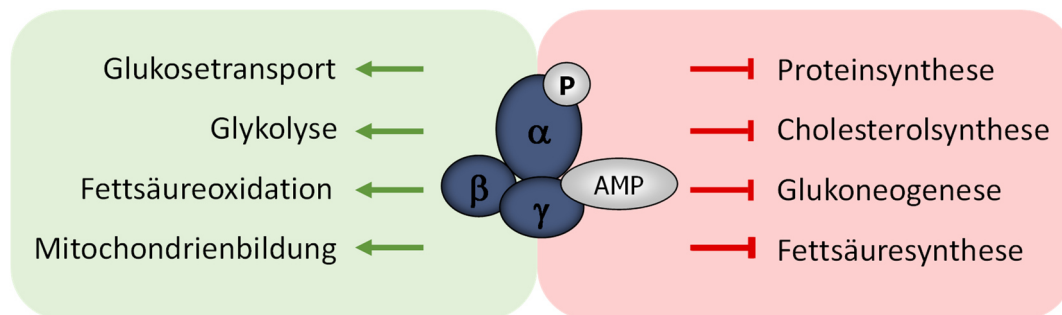


Abbildung 2: Stoffwechselregulierung durch AMPK. Die AMPK stimuliert ATP-generierende Stoffwechselwege (grün) und führt zur Hemmung ATP-verbrauchender Stoffwechselwege (rot). (nach [36]).

So ist die AMPK ein wichtiger Regulator des Fettsäurestoffwechsels, wobei die Phosphorylierung der Acetyl-CoA-Carboxylase (ACC) eine wichtige Rolle spielt. In Säugetieren werden 2 Isoformen der ACC exprimiert, ACC1 und ACC2, die beide durch AMPK gehemmt werden [37]. Dabei führt die Phosphorylierung der ACC2 zu einer Aktivierung der Fettsäureoxidation [38], wohingegen die Phosphorylierung der ACC1 eine Inhibierung der Fettsäuresynthese bewirkt [37]. Des Weiteren kann die AMPK die Cholesterolsynthese durch Phosphorylierung der 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A (HMG-CoA) Reduktase hemmen [39]. Auch die Proteinsynthese wird durch AMPK beeinflusst. Phosphorylierung von *tuberous sclerosis complex 2* (TSC2) führt zur Inhibierung von *mechanistic target of rapamycin* (mTOR) und damit zur Herunterregulierung der Translation [40, 41]. Zusätzlich kann die AMPK diesen Prozess durch Aktivierung der Translations-Elongationsfaktor 2 (eEF2)-Kinase und die darauffolgenden Hemmung von eEF2 inhibieren [42].

AMPK spielt auch eine wichtige Rolle im Glukosestoffwechsel. Damit Glukose zur ATP-Gewinnung bereitstehen kann, kann AMPK deren Aufnahme in die Zelle vermitteln. Durch Phosphorylierung der Proteine TXNIP und TBC1D1 kommt es zur erhöhten Bereitstellung der Glukosetransporter Glut1 [43] und Glut4 [44]. In einigen Zelltypen führt AMPK zu einer gesteigerten Glykolyse durch Phosphorylierung der

Phosphofruktokinase-2/Fruktose-2,6-bisphosphatase (PFKFB3) [45]. Die aktivierte PFKFB3 bewirkt einen Anstieg an Fruktose-2,6-bisphosphat, welches zur Aktivierung der Phosphofruktokinase, einem Schlüsselenzym der Glykolyse, führt [45]. Die Aktivierung der AMPK führt durch die Erhöhung intrazellulärer NAD⁺ Level außerdem zu einer Aktivierung der NAD⁺-abhängigen Deacetylase Sirtuin 1 (SIRT1) [46]. SIRT1 aktiviert daraufhin verschiedene Zielproteine, wie *proliferator-activated receptor gamma coactivator 1α* (PGC-1α), *forkhead box protein O1* (FoxO1) and FoxO3 [46]. PGC-1α ist ein Masteregulator der Mitochondrienbildung und induziert somit ATP-Gewinnung [47, 48]. Weitere Funktionen der AMPK werden in Kapitel 1.3 im Zusammenhang mit Alterung erläutert.

1.2.4 AMPK-Knockout-Mäuse

Zur genaueren Untersuchung der physiologischen Funktionen der verschiedenen AMPK-Isoformen wurden AMPK-Knockout-Mäuse entwickelt. Der *Knockout* beider katalytischer Isoformen der AMPK (AMPKα1 und AMPKα2) ist letal [49]. Der Einzel-*Knockout* von AMPKα1 oder AMPKα2 weist auf die unterschiedlichen Rollen der beiden Isoformen im Energiestoffwechsel hin. Die AMPKα2 scheint eine entscheidende Rolle bei der Glukosehomöostase zu spielen, da AMPKα2^{-/-} Mäuse eine Glukoseintoleranz und eine verringerte Insulinsensitivität aufweisen. Im Gegensatz dazu, weisen AMPKα1^{-/-} Mäuse keinen metabolischen Phänotyp auf [50]. Die Unterdrückung der AMPK kann *in vivo* auch durch die Überexprimierung einer mutierten α-Untereinheit mit fehlender Kinaseaktivität erfolgen [49]. Zur Untersuchung der Folgen chronischer AMPK-Aktivierung wurden Mausmodelle erstellt, welche eine dauerhaft aktive Form der AMPK überexprimieren [49].

1.3 Protektive Funktionen der AMPK bei Alterungsprozessen

Alterung und Seneszenz können zu endothelialer Dysfunktion beitragen, welche die Entstehung von kardiovaskulären Krankheiten begünstigt [6, 51]. Während oxidativer oder metabolischer Stress Endotheldysfunktion fördern, wirken einige antioxidative und antiinflammatorische Signalwege der Entstehung einer endothelialen Dysfunktion entgegen [52, 53]. Hier spielt der AMPK-Signalweg eine wichtige Rolle. Die AMPK wirkt anti-inflammatorisch und antioxidativ [54] und trägt zur Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase bei [55]. Dabei beeinflusst die AMPK mehrere Prozesse, die

zur Langlebigkeit beitragen können [47]. Sie führt zum Beispiel zur Stimulierung der Autophagie, zur Verminderung von oxidativem und inflammatorischem Stress sowie zur Aufrechterhaltung der Energie-Homöostase [47]. Diese und weitere AMPK-abhängige Signalwege und die Folgen der verminderten AMPK-Aktivierung im Alter sind in Abbildung 3 dargestellt und werden im Anschluss näher beschrieben.

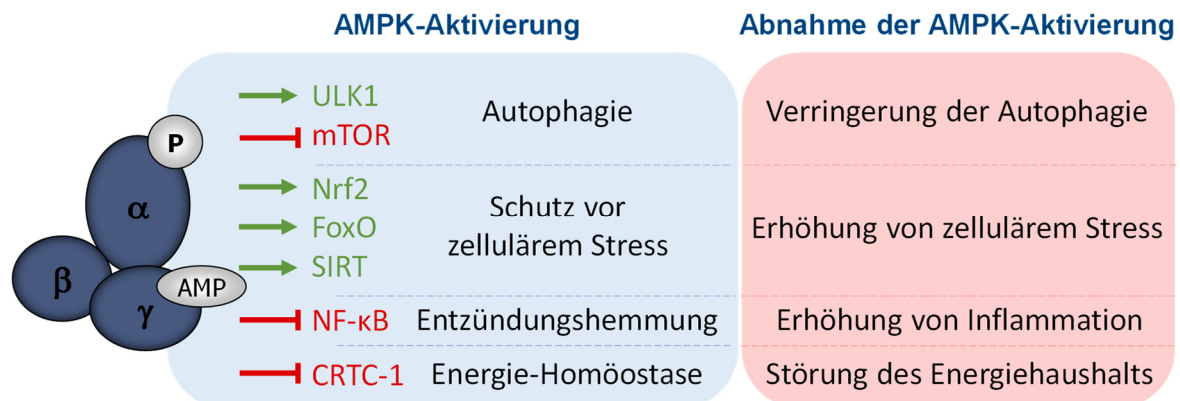


Abbildung 3: AMPK-abhängige Signalwege und die Folgen der verminderten AMPK-Aktivierung im Alter. AMPK führt zur Aktivierung nachgeschalteter Signalwege durch ULK1, Nrf2, FoxO und SIRT1. AMPK führt zur Inhibierung von mTOR, NF-κB und CRTC-1. Die Abnahme der AMPK-Aktivierung mit zunehmendem Alter kann zur Verringerung der Autophagie und zur Erhöhung von zellulärem Stress, sowie zu einer Erhöhung der Inflammation und einer Störung des Energiehaushaltes führen (nach [47]). CRTC-1: *cyclic AMP-regulated transcriptional co-activator-1*, FoxO: *forkhead box protein O*, mTOR: *mammalian target of rapamycin*, NF-κB: *nuclear factor 'kappa-lightchain-enhancer' of activated B-cells*, Nrf2: *nuclear factor-erythroid 2-related factor 2*, SIRT1: *sirtuin 1*, ULK1: *uncoordinated 51-like kinase 1*.

1.3.1 Stimulierung der Autophagie

Im Alterungsprozess von Zellen und Geweben kommt es zur Beeinträchtigung der Autophagie, eines lysosomalen Abbau- und Wiederverwertungsprozesses, und somit zur Anhäufung von Abfallprodukten sowie zur Störung der zellulären Homöostase [56]. Kang et al. konnten zeigen, dass ein direkter Zusammenhang zwischen Lebensdauer und der Regulierung der Autophagie in *C. elegans* besteht [57]. Des Weiteren kann eine Abnahme der Autophagie in humanen Fibroblasten zu zellulärer Seneszenz führen [58]. Die AMPK kann Autophagie aktivieren, indem sie ein Autophagie-Schlüsselprotein, die *uncoordinated 51-like kinase 1* (ULK1) an den Serinresten S317 und S777 phosphoryliert und gleichzeitig den mTOR-Komplex hemmt, welcher seinerseits Autophagie durch eine Phosphorylierung von ULK1 am S757 inhibiert [59].

AMPK reduziert die Aktivität des mTOR-Komplexes, durch Phosphorylierung des mTOR-Bindungspartners Raptor [40] und durch Phosphorylierung von TSC2, einem mTOR-Regulator [41].

1.3.2 Hemmung von oxidativem und inflammatorischem Stress

Neben der Beeinträchtigung der Autophagie kommt es im Verlauf der Zell- und Gewebeeralterung vermehrt zu oxidativem Stress. Bereits Denham Harman, der 1956 seine Theorie des Alterns durch freie Radikale vorstellte, sah oxidativen Stress als einen wichtigen Mechanismus des Alterns an [60]. Die AMPK kann oxidativem Stress auf unterschiedliche Arten entgegenwirken. Ein zugrundeliegender Mechanismus ist die Phosphorylierung und Aktivierung des Transkriptionsfaktors FoxO3 durch AMPK [61], wodurch Proteine exprimiert werden, die dem Schutz vor oxidativem Stress dienen. Dazu gehören das *uncoupling protein 2* (UCP-2) und die Thioredoxinreduktase, welche die Cysteinoxidation zellulärer Proteine verhindert [47, 54, 61]. Xie et al. konnten zeigen, dass die Aktivierung der AMPK in Endothelzellen durch hohe Glukosespiegel die UCP-2 Expression steigert, und nachfolgend die mitochondriale Superoxidproduktion hemmt [62]. Zur Resistenz gegen oxidativen Stress und Verlängerung der Lebensspanne kommt es auch in *C. elegans*, wenn DAF-16, das Ortholog der FOXO-Familie, durch AMPK phosphoryliert und aktiviert wird [63].

Ein zweiter antioxidativer Schutzmechanismus der AMPK ist die Aktivierung des Nrf2-Signalwegs [47, 64]. Nrf2 ist ein Transkriptionsfaktor, der unter anderem die Synthese und Aufrechterhaltung von Glutathion (GSH) sowie die Expression von Thioredoxin reguliert [65]. Liu et al. konnten zeigen, dass AMPK über den Nrf2-Signalweg zur erhöhten Expression von Hämoxxygenase 1 in Endothelzellen führt [66]. Die Hämoxxygenase 1 wirkt zytoprotektiv, indem sie das Oxidans Häm in antioxidative Gallenfarbstoffe und Kohlenstoffmonoxid (CO) umwandelt. Außerdem steigert sie die Expression von Ferritin, welches freierwerdende Eisenionen bindet [66, 67]. Nrf2 spielt auch eine schützende Rolle bei entzündlichen Erkrankungen [68]. Ein Nrf2-Mangel im Alter kann chronische Entzündungsreaktionen fördern, welche ein typisches Merkmal verschiedener altersassoziiierter metabolischer Erkrankungen sind, wie beispielsweise Atherosklerose und Typ2 Diabetes [47, 69].

Chronische Entzündungen werden durch die Expression inflammatorischer Gene gefördert, was unter anderem durch den Transkriptionsfaktor *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells* (NF- κ B) koordiniert wird [69]. Ein gesteigerter NF- κ B-Signalweg im Alter kann beispielsweise der Nrf2-Aktivierung entgegenwirken [47]. Als ein zugrundeliegender Mechanismus wurde eine Interaktion der p65 Untereinheit des NF- κ B Transkriptionsfaktors mit *Kelch-like ECH-associated protein 1* (Keap1), einem Inhibitor von Nrf2, beschrieben, welche zu einer gesteigerten Ubiquitinierung von Nrf2 und einem damit verbundenen proteosomalem Abbau führt [70]. Die AMPK kann einer chronischen Entzündungsreaktion entgegenwirken, indem sie den NF- κ B-Signalweg inhibiert [71]. Hier spielt beispielsweise der AMPK-SIRT-NF- κ B Signalweg eine Rolle. SIRT1, welches durch eine AMPK-abhängige Steigerung der NAD⁺-Synthese aktiviert wird, bewirkt eine Deacetylierung der p65-Untereinheit von NF- κ B und nachfolgend eine verminderte Aktivierung der Transkription [72]. PGC-1 α , ein wichtiges Zielprotein der AMPK, kann ebenfalls mit der p65-Untereinheit von NF- κ B interagieren [73]. Kim et al. konnten zeigen, dass eine Überexpression von PGC-1 α die NF- κ B-vermittelte Entzündungsantwort in glatten Muskel- und Endothelzellen der Aorta herunterreguliert [74]. Des Weiteren kann NF- κ B durch den AMPK-FoxO3-Signalweg inhibiert werden [47]. FoxO3 reguliert die Transkription von Genen der I κ B-Familie, welche die Aktivierung und Translokation von NF- κ B in den Zellkern verhindern [75]. *Inhibitor of NF- κ B kinase* (IKK) α und IKK β , vorgeschaltete Kinasen von NF- κ B, können umgekehrt FoxO3 inhibieren, was zu dessen Ubiquitinierung und proteosomalem Abbau führt [76].

1.3.3 Energiehomöostase

Im Alter kann es zur Störung des Energiestoffwechsels kommen. Zum Beispiel stehen altersbedingte Krankheiten, wie Fettstoffwechselstörungen oder Störungen der Glukosehomöostase mit der Deregulation des *CREB-regulated transcription coactivator* (CRTC)-1-Signalwegs in Verbindung [77]. CRTCs sind Koaktivatoren des Transkriptionsfaktors *cAMP response element-binding protein* (CREB). Die AMPK kann diesen Signalweg, durch eine Phosphorylierung von CRTC-1 und eine nachfolgende Hemmung der Translokation in den Zellkern, inhibieren [78].

Eine wichtige Rolle spielt AMPK auch bei der Vermittlung der Lebensverlängerung durch kalorische Restriktion. Dabei handelt es sich um eine Verringerung der

Nahrungsaufnahme, ohne dass eine Unterernährung hervorgerufen wird [79]. Eine damit einhergehende Verlängerung der Lebensspanne wurde in verschiedenen Organismen beispielsweise bei Würmern, Fliegen, Nagetieren und Rhesusaffen demonstriert [79]. In einigen Ratten- und Mausstämmen führte eine 20-50% reduzierte Kalorienaufnahme zu einer Lebensverlängerung von bis zu 50% [80]. In Nagetieren und Rhesusaffen konnte gezeigt werden, dass kalorische Restriktion auch zu einer Reduktion altersbedingter Krankheiten führt [79, 81]. Da durch kalorische Restriktion das AMP:ATP-Verhältnis ansteigt, wird eine Aktivierung des AMPK-Signalwegs ausgelöst, welcher dann an der Vermittlung der lebensverlängernden Wirkung von kalorischer Restriktion beteiligt ist. Dies wurde in Nagetieren beschrieben [82-84]. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Überexpression und Aktivierung der AMPK die Lebensdauer von *C. elegans* [85, 86] und *D. melanogaster* [87] verlängern kann.

Aufgrund erhöhter zellulärer NAD⁺-Konzentrationen, die bei kalorischer Restriktion auftreten, kommt es zu einer Aktivierung des SIRT1-Signalwegs, der vermutlich ebenfalls zur erhöhten Lebensdauer beiträgt [47, 88]. Interessanterweise zeigen transgene Mäuse, die SIRT1 überexprimieren, einige Eigenschaften, die denen von Mäusen mit kalorienreduzierter Ernährung ähneln. Diese Mäuse sind magerer und metabolisch aktiver als ihre Wurfgeschwister und zeigen verminderte Cholesterin-, Insulin- und Glukosespiegel im Blut [89]. Ma et al. konnten zeigen, dass kalorische Restriktion in Mäusen über längere Zeit zur Aktivierung des SIRT1-AMPK-PGC-1 α -Signalwegs im Myokardium führt und somit zum kardiovaskulären Schutz beitragen kann [90]. Des Weiteren konnten Kume et al. zeigen, dass kalorische Restriktion zur Aktivierung des SIRT1-FoxO3-Signalwegs in Nieren von alten Mäusen führt und Hypoxie-assoziierte Nierenschäden abschwächt [91].

1.4 Veränderung der AMPK bei Alterungsprozessen

Alterung von Zellen und Geweben scheint mit Veränderungen der AMPK-Aktivierung verbunden zu sein. Verschiedene Studien zeigen, dass die Aktivierbarkeit des AMPK-Signalwegs mit zunehmendem Alter abnimmt, was zu zellulärem Stress, Stoffwechselstörungen und entzündlichen Erkrankungen führen kann [47]. Ein zugrundeliegender Mechanismus könnte eine vermehrte Dephosphorylierung der AMPK durch Steigerung der Aktivität oder Expression von Proteinphosphatasen sein [92]. Die Hochregulierung der PP2C ist beispielsweise für verminderte AMPK-

Aktivität in adipösen Ratten verantwortlich [93]. Der AMPK-Signalweg kann auch durch bestimmte Nährstoffe, Hormone und Zytokine herunterreguliert werden [47, 92]. Des Weiteren kann es durch vorgeschaltete Signalwege, wie Insulin-Proteinkinase B (Akt), cAMP-Proteinkinase A (PKA) oder Ras-MEK-ERK zu einer inhibitorischen Phosphorylierung von Serin und Threonin-Resten in der β/γ -Interaktionsdomäne der AMPK α -Untereinheit kommen [94]. Reznick et al. konnten eine verminderte AMPK-Aktivierbarkeit in alten Ratten zeigen, die vermutlich im Zusammenhang mit mitochondrialer Fehlfunktion und Fehlregulation des Lipidstoffwechsels im Alter steht [95]. In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass eine beeinträchtigte AMPK-Aktivität in alten Ratten zu einer Störung der Insulin-vermittelten Glukoseaufnahme in den Skelettmuskel führt [96].

1.5 Alterung und Seneszenz

Der Alterungsprozess ist durch eine fortschreitende Anhäufung schädlicher Veränderungen in Zellen und Geweben gekennzeichnet, welche das Risiko für Krankheit und Tod erhöhen [97]. Zu den zellulären und molekularen Mechanismen der Alterung gehören genomische Instabilität, Verlust der Proteostase und zelluläre Seneszenz [98].

Zelluläre Seneszenz ist durch einen irreversiblen Wachstumsarrest und den Erwerb bestimmter phänotypischer Veränderungen, zum Beispiel einer erhöhten sekretorischen Aktivität, gekennzeichnet [99]. Seneszenten Zellen in Kultur sind oft groß, granulär, und besitzen viele Vakuolen [100]. Des Weiteren weisen seneszenten Zellen einen erhöhten Lysosomengehalt auf [101]. Auf Grund der dadurch gesteigerten Expression des lysosomalen Enzyms β -Galaktosidase, kann die Aktivität der seneszenz-assoziierten (SA)- β -Galaktosidase auch bei einem suboptimalen pH-Wert von 6,0 nachgewiesen werden [101]. Die darauf basierende β -Galaktosidase-Färbung stellt daher einen wichtigen Marker seneszenten Zellen dar. Basis dieser Färbung ist die Spaltung des Substrats X-Gal durch die SA- β -Galaktosidase und die Entstehung einer unlöslichen Verbindung, welche für die charakteristische blaue Färbung seneszenten Zellen sorgt [102]. Seneszenz ist ein Hauptkennzeichen des Alterungsprozesses, spielt aber auch eine wichtige Rolle in der Embryonalentwicklung sowie bei der Regeneration [99].

Der Alterungsprozess eines Organismus steht in engem Zusammenhang mit Veränderungen des vaskulären Systems, die zu alterungsbedingten kardiovaskulären und zerebrovaskulären Erkrankungen führen. Vaskuläre Alterung wird durch dysfunktionale und seneszente Endothelzellen gefördert [103]. Letztere induzieren auf Grund ihrer veränderten Eigenschaften strukturelle und funktionelle Gefäßveränderungen, welche Entzündungsreaktionen, Thrombose und Atherosklerose verstärken [103]. Eine verringerte Aktivität der eNOS in seneszenten Endothelzellen führt beispielsweise zu einer verminderten Produktion von NO [104], wodurch Gefäßtonus, Gefäßintegrität und Angiogenese beeinträchtigt werden [103].

Zur Untersuchung der Endothelzellalterung können verschiedene Zellkulturmodelle angewandt werden, in denen replikative Seneszenz oder Stress-induzierte Seneszenz induziert werden (siehe Kapitel 1.6).

1.6 Ursachen von Seneszenz

Verschiedene Faktoren können zur Entstehung von Seneszenz führen und/oder diese weiter vorantreiben. Wichtige Faktoren sind oxidativer, metabolischer, genotoxischer und onkogener Stress (Abbildung 4) [105]. Aufgrund verschiedener Ursachen werden 2 Arten von Seneszenz unterschieden, die im Folgenden näher beschrieben werden.

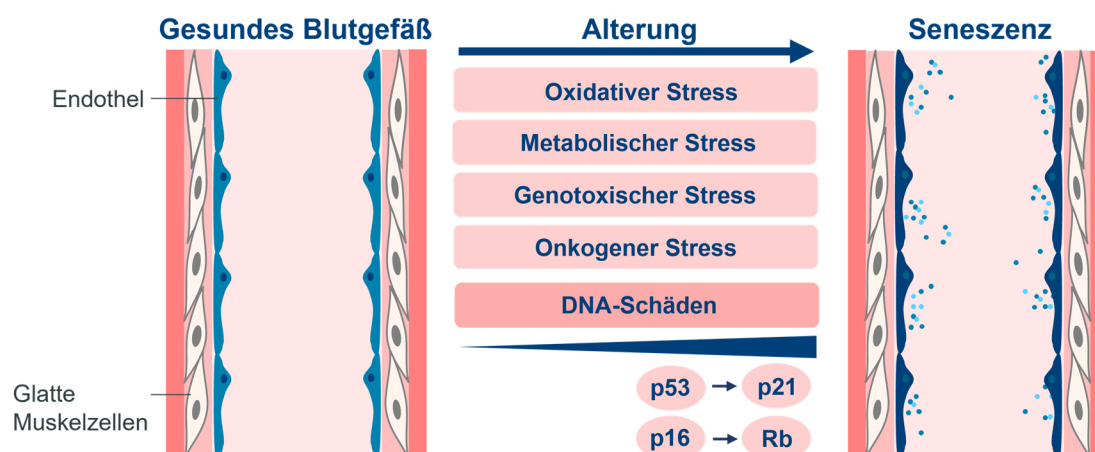


Abbildung 4: Ursachen vaskulärer Seneszenz. Zellulärer Stress und DNA-Schäden nehmen mit dem Alter zu. Eine daraus folgende Aktivierung des p53-p21-Signalwegs und/oder des p16-Rb-Signalwegs führt zu Zellzyklusarrest und Seneszenz (nach [105]). Dunkelblaue Endothelzellen: seneszente Endothelzellen, Punkte: seneszenz-assoziiertes sekretorischer Phänotyp, p16: *cyclin dependent kinase inhibitor 2A*, p21: *cyclin-dependent kinase inhibitor 1*, p53: *tumor protein p53*, Rb: Retinoblastom-Protein.

1.6.1 Replikative Seneszenz

Replikative Seneszenz beschreibt, dass Zellen nach einer bestimmten Anzahl an Zellteilungen ihr Replikationslimit erreichen [106]. Im Jahr 1990 konnte durch Harley et al. gezeigt werden, dass replikative Seneszenz auf einer Verkürzung von sogenannten Telomeren, protektiven repetitiven DNA-Strukturen am Ende von Chromosomen, beruht [107]. Eine Verkürzung tritt bei jeder Zellteilung auf, bis ein kritisches Minimum der Telomerlänge erreicht ist und weitere Zellteilungen nicht mehr möglich sind. Prinzipiell kann das Enzym Telomerase die Verkürzung zwar ausgleichen, dieses Enzym ist jedoch hauptsächlich in schnell proliferierenden Zellen, wie Keimbahnzellen, Stammzellen und Tumorzellen aktiv. Somatischen Zellen erreichen dagegen nach ca. 50-70 Zellteilungen ihr Proliferationslimit und werden seneszent [108]. Die Verkürzung der Telomere ruft eine DNA-Schadensantwort hervor [109]. Die DNA-Schadensantwort kann zum Zellzyklusarrest führen, so dass Reparaturvorgänge oder Seneszenz eingeleitet werden. Initial werden dabei Proteinkinasen der Phosphatidylinositol-3-OH-Kinase-ähnlichen Familie (PIKKs) rekrutiert [110]. Hierzu zählen die Kinasen *Ataxia telangiectasia mutated* (ATM) und *Ataxia telangiectasia and Rad3 related* (ATR) [110]. ATM und ATR phosphorylieren nach DNA-Doppelstrangbrüchen das Histon H2AX am S139 (γ H2AX) [111]. Dies führt zur Rekrutierung verschiedener Proteine, die der DNA-Reparatur dienen [112]. Weiterhin vermitteln ATM und ATR eine Stabilisierung von *tumor protein p53* (p53) und die p53-abhängige Transkription des Proteins CDK-Inhibitor 1 (p21), eines Inhibitors cyclin-abhängiger Kinasen, welcher den Eintritt der Zellen in die G1/S-Phase des Zellzyklus verhindert [113, 114] (Abbildung 4). Telomerverkürzung und DNA-Schäden führen außerdem zur Aktivierung des CDK-Inhibitor 2A (p16)- Retinoblastom-Protein (Rb)-Signalwegs, der ebenfalls den Übergang in die S-Phase des Zellzyklus verhindert. Während der p53-p21-Signalweg Seneszenz initiiert, scheint p16 vor allem für deren Aufrechterhaltung von Bedeutung zu sein [113, 115, 116]. Beausejour et al. konnten zeigen, dass p16 die irreversible Phase der Seneszenz kennzeichnet [117]. Alle drei Proteine, p53, p21 und p16, werden als Marker für die zelluläre Seneszenz betrachtet.

1.6.2 Stress-induzierte Seneszenz

Viele Stressoren können Seneszenz auslösen, noch bevor das Proliferationslimit der Zellen erreicht ist. Diese vorzeitige Stress-induzierte Seneszenz kann beispielsweise

durch oxidativen oder glykotoxischen Stress oder durch UVA- und UVB-Strahlung ausgelöst werden [118]. Dabei kommt es zur direkten Schädigung von Makromolekülen, insbesondere der DNA. Es wurde beispielsweise beobachtet, dass oxidativer Stress sowohl in kultivierten Zellen als auch *in vivo*, bei Tieren oder bei Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen, zu Seneszenz führte [119]. Suo et al. konnten zeigen, dass Behandlung von Endothelzellen mit H₂O₂ zelluläre Seneszenz bewirkte. Behandlung der Zellen mit Schwefelwasserstoff, welches antioxidative Funktionen besitzt, konnte die H₂O₂-induzierte Seneszenz durch Aktivierung von SIRT1 verhindern [120]. In einer weiteren Studie wurde gezeigt, dass Endothelzellen, die aus Gewebeproben von chronischen Rauchern mit Atherosklerose isoliert wurden, Stress-induzierte Seneszenz aufwiesen. Die Seneszenz stand in direktem Zusammenhang mit oxidativen Schäden und war unabhängig von der Telomerlänge [121]. Pham et al. berichteten, dass auch metabolischer Stress Seneszenz induzieren kann. Hohe Glukosekonzentrationen im Kulturmedium initiierten Seneszenz in Stammzellen aus menschlichem Fettgewebe [122]. Außerdem führten intermittierende Veränderungen der Glukosekonzentrationen im Kulturmedium zur Seneszenz von humanen Endothelzellen [123].

Stress-induzierte Seneszenz wird, wie replikative Seneszenz, durch Aktivierung des p53-p21- und/oder des p16-Rb-Signalwegs vermittelt, da es bei beiden Arten der Seneszenz zu einer DNA-Schadensantwort kommt [113]. Chen et al. konnten zeigen, dass sowohl der p53-p21-Signalweg als auch der p16-Rb-Signalweg eine Rolle bei der Entwicklung einer vorzeitigen Seneszenz durch glykotoxischen Stress in Endothelzellen spielt [124]. Des Weiteren konnten Coleman et al. zeigen, dass vorzeitige Seneszenz in Endothelzellen, ausgelöst durch oxidativen Stress, durch die Aktivierung des p16-Rb-Signalwegs induziert wird. Die Regulation des p16-Rb-Signalwegs erfolgte durch das SENEX Gen, welches durch die H₂O₂-Behandlung hochreguliert wurde [125]. Interessanterweise zeigten die seneszenten Endothelzellen einen anti-inflammatorischen Phänotyp, was auf eine Schutzfunktion der Stress-induzierten Seneszenz hinweist [125].

1.7 Zielstellung

Altern ist durch endotheliale Dysfunktion gekennzeichnet, welche kardiovaskuläre Krankheiten initiiert oder zu deren Entwicklung beiträgt. Die AMPK spielt eine wichtige Rolle in Endothelzellen und besitzt verschiedene protektive Funktionen, die dem Alterungsprozess entgegenwirken können. Die Rolle des AMPK-Signalwegs im vaskulären Alterungsprozess ist noch nicht geklärt und steht daher im Fokus der vorgelegten Arbeit. Ziele dieser Arbeit sind:

- 1) die Charakterisierung des AMPK-Signalwegs in gealterten und seneszenten Zellen und
- 2) die Untersuchung des Einflusses von AMPK-Herunterregulierung und AMPK-*Knockout* auf Parameter von Alterung und Seneszenz *in vitro* und *in vivo*.

Die in dieser Arbeit erhobenen Daten sollen dazu beitragen, die Rolle der AMPK als eine mögliche Zielstruktur für neue Therapien altersbedingter kardiovaskulärer Erkrankungen zu charakterisieren.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zellen

In der vorliegenden Arbeit wurden humane Zellen aus der Nabelschnurvene (*human umbilical vein endothelial cells*, HUVEC) und murine Endothelzellen aus Lungengewebe (*murine lung endothelial cells*, MLEC) verwendet.

2.1.2 Chemikalien und Reagenzien

Die verwendeten Chemikalien und Reagenzien sind den nachfolgenden Tabellen 1-2 zu entnehmen.

Tabelle 1: Chemikalien und Reagenzien

Substanz	Hersteller
Acrylamid 4K-Lösung 30% Mix 29:1	AppliChem GmbH, Darmstadt
AF647-Azidreagenz	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Agarose	Bio & SELL GmbH, Feucht/Nürnberg
Ammoniumpersulfat (APS)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Aurion BSA-C	AURION Immuno Gold Reagents & Accessories, Wageningen, Niederlande
Bovines Serumalbumin Fraktion V (BSA)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Calciumchlorid (CaCl ₂)	AppliChem GmbH, Darmstadt
CM-H2DCFDA	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
(4',6-Diamidin-2-Phenylindol) DAPI	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Dimethylformamid (DMF)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
DL-Dithiotreitol (DTT)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Donkey-Serum	Merck Millipore GmbH, Darmstadt
DreamTaq Green PCR Master Mix (2x)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Amersham ECL™ Western Blotting Detection Reagents	GE Healthcare UK Limited, Buckinghamshire, UK
Eosin Y Lösung, alkoholisch	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ethanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

Material und Methoden

Ethylenglycol bis(2-aminoethylether) - N,N,N,N,- tetraacetat (EGTA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
5-Ethynyl-2'-deoxyuridin (EdU)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Fluoromount-G®	Southern Biotech, Birmingham, AL, USA
Formamid	AppliChem GmbH, Darmstadt
Gene Ruler™ DNA Ladder Mix	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main
Glutaraldehyd	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Goat-Serum (Normal)	Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark
Hämatoxylin – Lösung nach Mayer	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-(ethansulfonsäure)-Natriumsalz (HEPES)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Isopentan	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Isopropanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Kaliumchlorid (KCl)	VEB Jenapharm-Laborchemie, Apolda
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Riedel-De Haen AG, Hannover
Kaliumhexacyanidoferrat(III) (K ₃ [Fe(CN) ₆])	Riedel-De Haen AG, Hannover
Kaliumhexacyanidoferrat(II)-Trihydrat (K ₄ [Fe(CN) ₆]x 3H ₂ O)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Kodak GBX developer and replenisher	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Kodak GBX fixer and replenisher	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Kupfer(II)-sulfat (CuSO ₄)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Magermilchpulver	AppliChem GmbH, Darmstadt
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
2-Mercaptoethanol (2-ME)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Methanol	AppliChem GmbH, Darmstadt
MitoSOX™	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Natrium-Ascorbat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Natriumazid (NaN ₃)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Natriumchlorid (NaCl)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Natriumfluorid (NaF)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat (Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Natriumhydroxid (NaOH)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Natriumphosphat (Na ₃ PO ₄)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Neg-50™ Gefrierschnittmedium	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Neo-Mount®	Merck Millipore GmbH, Darmstadt
Paraffin	Merck KGaA, Darmstadt
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Proteinase K	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Red Safe™	iNtRON Biotechnology, Korea

Salzsäure, rauchend (HCl)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder (10-260 kDa)	Fermentas life science, Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
N,N,N,N-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	AppliChem GmbH, Darmstadt
TE-Puffer, endotoxinfrei	QIAGEN GmbH, Hilden
Tri-Natriumcitrat Dihydrat Fluka	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Triton®X-100	Ferak Berlin GmbH, Berlin
Tween®20	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Xylol	VWR International GmbH, Darmstadt
Zitronensäure (C ₆ H ₈ O ₇ ·x H ₂ O)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

Tabelle 2: Zellkultur- und Transfektionsreagenzien

Substanz	Hersteller
Ciprofloxacin Kabi	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg v.d.H.
endothelial mitogen	Biomedical Technologies Inc., Stoughton, USA
Fötale Kälberserum (FKS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Gelatine	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
L-Glutamin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Hank's Balanced Salt Solution (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-sRNA	Synvolux Therapeutics B.V., Groningen, Belgien
Trypsin/EDTA (0,05 %/0,02 %)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Vitamin C	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

2.1.3 Inhibitoren und Stimulantien

In den Experimenten wurden die Inhibitoren und Stimulantien aus Tabelle 3 verwendet.

Tabelle 3: Inhibitoren und Stimulanzen

Substanz	Hersteller
Deoxyglukose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Hydroxyurea	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Natriumdiphosphat tetrabasisch (Na ₄ P ₂ O ₇)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Natriumorthovanadat (Na ₃ VO ₄)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Complete, EDTA-free Protease inhibitor cocktail tablets (PIC)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
recombinant human VEGF ₁₆₅	R & D Systems Minneapolis, USA No: 296-VE

2.1.4 Antikörper

Die in den Versuchen der Arbeit verwendeten Antikörper sind Tabelle 4 bis Tabelle 9 zu entnehmen. Die primären Antikörper für den Western Blot wurden in Tris/NaCl (TN)/Tween-Puffer mit 5 % bovinem Serumalbumin (BSA) verdünnt. Um Kontaminationen zu vermeiden, wurden die primären Antikörperlösungen bei 4 °C gelagert und es wurde 0,02 % Natriumazid zugesetzt. Die sekundären Antikörper für den Western Blot wurden frisch in TN/Tween-Puffer mit 5 % Milch verdünnt und nicht wiederverwendet.

Tabelle 4: Antikörper für Western Blot

Antigen	Typ (IgG)	Verdg.	Kat.Nr.	Hersteller
Primärantikörper				
ACC	Kaninchen monoklonal	1:1000	3676	CST
AMPK α 1	Kaninchen monoklonal	1:1000	2795	CST
AMPK α 2	Kaninchen monoklonal	1:1000	2757	CST
AMPK α	Kaninchen monoklonal	1:1000	2532	CST
CaMKK2	Maus monoklonal	1:1000	H00010645-M02	Abnova GmbH, Heidelberg
eNOS	Maus polyklonal	1:2500	610297	BD
GAPDH	Maus monoklonal	1:35000	NB110-40405	Novus Biologicals, Centennial, USA
HIF-1 α	Kaninchen polyklonal	1:1000	3716	CST

Material und Methoden

iNOS	Kaninchen monoklonal	1:1000	13120	CST
p16	Maus monoklonal	1:500	51-1325GR	BD
p21	Kaninchen monoklonal	1:1000	2947	CST
p53	Maus monoklonal	1:1000	2524	CST
Phospho-ACC (S79)	Kaninchen monoklonal	1:1000	3661	CST
Phospho-AMPK (T172)	Kaninchen monoklonal	1:1000	2535	CST
Phospho-AMPK Substrat	Kaninchen monoklonal	1:1000	5759	CST
Phospho-p53 (S15)	Kaninchen polyklonal	1:1000	9284	CST
Phospho-ULK1 (S555)	Kaninchen monoklonal	1:1000	5869	CST
ULK1	Kaninchen polyklonal	1:1000	4776	CST
VEGF	Maus monoklonal	1:1000	sc-7269	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA
VEGFR2	Kaninchen monoklonal	1:1000	2479	CST
β -Aktin	Kaninchen monoklonal	1:5000	4970	CST
Sekundärantikörper				
Anti-Maus IgG (H+L)	Ziege polyklonal, Peroxidase- gekoppelt	1:5000	074-1806	KPL
Anti-Kaninchen IgG (H+L)	Ziege polyklonal, Peroxidase- gekoppelt	1:5000	074-1506	KPL

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

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

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

Primäre und sekundäre Antikörper für Immunfluoreszenz wurden in PBS mit 1 % BSA-C™ und 5 % Ziegenserum verdünnt.

Tabelle 5: Primärantikörper für Immunfluoreszenz

Antigen	Typ (IgG)	Verdg.	Kat.Nr.	Hersteller
p21	Maus monoklonal	1 µg/ml	NBP2- 29463	Novus Biologicals, Centennial, USA
γH2AX (S139)	Kaninchen monoklonal	1:400	9718	Cell Signaling Technology® Inc., Danvers, USA

Tabelle 6: Sekundärantikörper für Immunfluoreszenz

Typ	Fluorophor	Verdg.	Kat.Nr.	Hersteller
Ziege Anti-Maus IgG	AlexaFluor 488 (AF488)	1:500	A11029	Life Technologies GmbH, Carlsbad, USA
Ziege Anti- Kaninchen IgG	AlexaFluor 488 (AF488)		A11034	Thermo Fisher Scientific, Lafayette, USA

Tabelle 7: Primärantikörper für Durchflusszytometrie

Antigen	Typ (IgG)	Verdg.	Kat.Nr.	Hersteller
CD31	Ratte monoklonal	1:25	550274	BD Biosciences- Pharmingen, Heidelberg
Phospho- Histon H3 (S10)	Kaninchen polyklonal	1:200	06-570	Millipore Corporation, Billerica, USA

Tabelle 8: Sekundärantikörper für Durchflusszytometrie

Typ	Fluorophor	Verdg.	Kat.Nr.	Hersteller
Ziege Anti-Ratte IgG	Cyanin5	1:100	AP136S	Millipore Corporation, Billerica, USA
Ziege Anti- Kaninchen IgG	AlexaFluor 488 (AF488)	1:500	A11034	Thermo Fisher Scientific, Lafayette, USA

Tabelle 9: Antikörper und Beads zur MLEC-Isolation

Antigen/ Beads	Typ (IgG)	Verdg.	Kat.Nr.	Hersteller
CD102 (Anti-Maus)	Ratte monoklonal	1:25	553326	BD Biosciences- Pharmingen, Heidelberg
Dynabeads® (Anti-Ratte)	Schaf polyklonal	1:25	110.35	Dynal Biotech ASA, Oslo, Norway

2.1.5 Small interfering RNA (siRNA)

Bei den verwendeten siRNAs (Tabelle 10) handelt es sich um SMARTpool® siRNAs. Dies ist eine Mischung aus 4 verschiedenen siRNAs, die spezifisch gegen die Ziel-messenger RNA (mRNA) gerichtet sind.

Tabelle 10: siRNA

siRNA Design	Ziel	Kat.Nr.	Hersteller
Dharmacon, On-Targetplus™ siCONTROL Nontargeting Pool	Non (Kontrolle)	D-001810-10	Thermo Fisher Scientific, Lafayette, USA
Dharmacon, On-Targetplus™ SMARTpool® siRNA reagent	AMPKα1	L-005027-00	Thermo Fisher Scientific, Lafayette, USA
Dharmacon, On-Targetplus™ SMARTpool® siRNA reagent	AMPKα2	M-005361-02	Thermo Fisher Scientific, Lafayette, USA

2.1.6 Primer

Die in Tabelle 11 aufgeführten Primer wurden von Sigma-Aldrich® bezogen. QuantiTect Primer für β-Aktin stammen von Qiagen.

Tabelle 11: Primer

Oligoname	Primertyp	Ziel	Sequenz (5'-3')
α WT F	<i>forward</i>	AMPKα1 Wildtyp-Allel	AGCCGACTTTGGTAAGGATG
α WT R	<i>reverse</i>	AMPKα1 Wildtyp-Allel	CCCACCTTTCCATTTTCTCCA
IRES Fa2	<i>forward</i>	AMPKα1 <i>Knockout</i> -Allel	GGGCTGCAGGAATTTCGATATCAAGC
3.0 Ra1	<i>reverse</i>	AMPKα1 <i>Knockout</i> -Allel	CCTTCCTGAAATGACTTCTGGTGC
lox F1	<i>forward</i>	AMPKα2 Wildtyp-Allel <i>Knockout</i> -Allel	GCTTAGCACGTTACCCTGGATGG
lox R1	<i>reverse</i>	AMPKα2 Wildtyp-Allel	GTTATCAGCCCACTAATTACAC
KOTneoR_2	<i>reverse</i>	AMPKα2 <i>Knockout</i> -Allel	GCATTGAACCACAGTCCTTCCTC
FM1_CDKN1A	<i>forward</i>	p21	ACCTGATGATACCCAACACTAC
RM1_CDKN1A	<i>reverse</i>	p21	CTGTGGCACCTTTTATTCTG
Actin_forw	<i>forward</i>	β-Aktin	GGGACGACATGGAGAAAATCTG
Actin_rev	<i>reverse</i>	β-Aktin	GAAGGTCTCAAACATGATCTGGG

2.1.7 Kits

Die verwendeten Kits sind in Tabelle 12 aufgeführt.

Tabelle 12: Kits

Kit	Kat.Nr.	Hersteller
AMPK Kinase Assay Kit	CY-1182	CycLex®, Nagano, Japan
DC™ Protein Assay Kit II	#500-0112	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
First strand cDNA synthesis Kit	K1612	Thermo Fisher Scientific, Lafayette, USA
Lysosomal Intracellular Activity Assay Kit	K448	BioVision, Milpitas, USA
Maxima SYBR Green ROX qPCR Master Mix	K0221	Thermo Fisher Scientific, Lafayette, USA
NucleoSpin® RNA-Kit	740955.50	Macherey-Nagel™, Düren

2.1.8 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 13 zu entnehmen.

Tabelle 13: Materialien

Material	Hersteller
Cell Scraper blue 25,0 cm	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Coverslips	Menzel-Gläser, Braunschweig
Deckgläser, 24x50	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Einmal-Reagenz-Reservoirs	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Falcon® Polystyrene Round Bottom Tube	Corning Inc., Durham, USA
Feather Microtome Blade R35	pfm medical AG, Köln
Filterpapier Chrom-Paper Sheets	Sartorius Stedim Biotech S.A., Aubagne Cedex, Frankreich
Fotofilm	Fujifilm Corporation, Tokio, Japan
Hamilton-Spritze	Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Schweiz
Immobilon™-P Transfer Membranen	Millipore Corporation, Billerica, USA
Sterican® 21 G x ½ “	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Küvetten	SARSTEDT AG & Co., Numbrecht
Minisart® (Sterilfilter)	Sartorius AG, Göttingen
Monoject™ Blunt Cannula (stumpfe Kanülen)	Covidien, Mansfield, USA
Mörser	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

Nabelklemmen ratiomed	Plazotta Onlineshop. München
Parafilm	American Can Company, Greenwich
Polysine®-slides	Thermo Fisher Scientific GmbH Diagnostics/Anatomical Pathology, Dreieich
Präparierbesteck	Aesculap, B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Skalpell	P.J. Dahlhausen & Co. GmbH, Köln
Wattestäbchen	NOBA Verbandmittel Danz GmbH u. Ko KG, Wetter Int. Ltd. Maidstone England
Whatman Paper, Grade 3	Whatman International Ltd., Maidstone, England
Zellkulturgefäße cellstar®	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen

2.1.9 Geräte

Die verwendeten Geräte sind in Tabelle 14 aufgeführt.

Tabelle 14: Geräte

Gerät	Hersteller
Biofuge primo R (Kühlzentrifuge)	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Bio Rad Modell 200/2.0 Power Supply	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
Bio Rad Power Pac 200 / 1000 (Stromversorgung)	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
Bio Rad Trans Blot™ Cell	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
Biostep Dark Hood DH-10	biostep GmbH, Burkhardtsdorf
BP 61 (Feinwaage)	Sartorius AG, Göttingen
BP310P (Oberschalenwaage)	Sartorius AG, Göttingen
BD FACS Canto™ (Durchflusszytometer)	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA
DRÄGER Vapor 19.3 für Isofluran	Drägerwerk AG, Lübeck
EasyCast™ Horizontal System	Owl Scientific Inc., Woburn, MA, USA
Filterabzug mc6	Waldner Laboreinrichtungen GmbH & Co. KG
Heracell 150 (Brutschrank)	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Hofer Mighty Small (Elektrophoreseapparatur)	Hofer, Inc., Holliston, USA
KH-3 (Kühlung Blottingapparatur)	Biometra® biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen
Kreisschüttler KS501 digital	IKA® Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Kühlschränke +4 °C / -20 °C	Liebherr-International Deutschland GmbH
Labofuge 400R	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Laminarbox Herasafe	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Magnetrührer	R3T GmbH, Taufkirchen
Mastercycler® ep	Eppendorf AG, Hamburg
MC1 Laboratory LC4200 (Waage)	Sartorius AG, Göttingen

Membranvakuumpumpe MP20/ System II	Biometra® biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen
Microm EC 350 Modular tissue embedding center	Thermo Fisher Scientific GmbH Diagnostics/Anatomical Pathology, Dreieich
Microm HM 335 E (Mikrotom)	Thermo Fisher Scientific GmbH Diagnostics/Anatomical Pathology, Dreieich
Microprocessor ph-Meter pH537	WTW Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Weilheim
Mikrowelle	Sharp Electronics GmbH, Hamburg
Nikon TMS-F Inversmikroskop	Nikon Instruments Inc., Melville, USA
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 Uvikon 930	Tresser instruments, Groß-Zimmern
STP 120 Spin Tissue Processor (Histokinette)	Thermo Fisher Scientific GmbH Diagnostics/Anatomical Pathology, Dreieich
Taumelschüttler WT17	Biometra® biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen
Tecan Sunrise	Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim
Thermomixer 5437	Eppendorf AG, Hamburg
Thermostat Julabo	JULABO Labortechnik GmbH, Seelbach
Trans-Blot™ Cell	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
Vortex	IKA® Werke GmbH & Co KG, Staufen
Wärmeinkubator Heraeus functionline	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Wärmeinkubator OV3	Biometra® biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen
Wasserbad M6 Lauda	MS Laborgeräte, Wiesloch
Zentrifuge 5451C	Eppendorf AG, Hamburg

2.1.10 Mäuse

In dieser Arbeit wurden AMPK α 1-*Knockout*-Mäuse und AMPK α 2-*Knockout*-Mäuse sowie deren Wildtyp-Zuchtgeschwister verwendet. Beide Mausstämme wurden von Benoit Viollet (Institut Cochin, Paris) hergestellt. International sind die AMPK α 1-KO-Mäuse unter dem Namen 129S2-Prkaa1tm1Sbj/Orl verzeichnet. Sie haben einen 129S2/SvPas-Hintergrund. Die AMPK α 2-KO-Mäuse sind international unter dem Namen B6.129/Sv-Prkaa2tm1.1Vio/Orl verzeichnet. Sie haben einen C57BL/6J-Hintergrund.

Die Zucht wurde mit heterozygoten Mäusen durchgeführt. Die neugeborenen Mäuse wurden anhand von Schwanz- und Ohrbiopsien genotypisiert. Die für die Genotypisierung verwendeten Primer sind in Tabelle 11 aufgeführt. Es wurde eine 100 mM-Stammlösung hergestellt, die zum Gebrauch 1:10 verdünnt wurde.

2.2 Methoden *in vitro*

2.2.1 Zellkultur von HUVEC

2.2.1.1 Präparation von HUVEC

Experimente wurden mit primären Endothelzellen aus der humanen Nabelschnurvene (*human umbilical vein endothelial cells*, HUVEC) durchgeführt. Die Präparation und Aussaat der Zellen erfolgte unter sterilen Bedingungen unter einer Sicherheitswerkbank mit Strömungsabzug. Vor Beginn der Präparation wurden die Nabelschnüre äußerlich mit 70 % Ethanol desinfiziert. Zuerst wurden Kanülen in die Vene eingeführt und die Vene mit physiologischer Kochsalzlösung gespült. Anschließend wurde 0,01 % Kollagenaselösung (Tabelle 15) in die Vene gefüllt. Um die Endothelzellen im Inneren der Vene abzulösen, wurde die Nabelschnur vorsichtig im Wasserbad für 3 min bei 37 °C massiert. Die Zellsuspension wurde anschließend in ein 50 ml-Röhrchen überführt und die Vene wurde erneut mit M199/10 % FKS gespült, um noch verbleibende Zellen abzulösen. Nach Zentrifugation der Zellen für 6 min bei 500 x g wurde das Zellpellet in M199/10 % FKS aufgenommen und in eine mit 0,2 % Gelatine beschichtete Zellkulturflasche ausgesät. Es erfolgte eine Inkubation im Brutschrank über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit PBS gewaschen, um nicht anhaftende Zellen zu entfernen, und danach in Wachstumsmedium (Tabelle 15) bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Ein Halbmediumwechsel erfolgte alle 2-3 Tage.

Tabelle 15: Zusammensetzung der zur Präparation und Kultivierung von HUVEC verwendeten Lösungen und Medien

Lösung / Medium	Zusammensetzung	
	Konzentration	Komponente
0,01 % Kollagenaselösung	0,1 mg/ml	Kollagenase in M199
Wachstumsmedium	80 %	M199
	17,5 %	FKS
	2,5 %	Humanserum
	5000 U/ml	Penicillin
	5000 µg/ml	Streptomycin
	10 µg/ml	Ciprofloxacin
	680 µM	L-Glutamin
	25 µg/ml	Heparin
	100 µM	Vitamin C
	7,5 µg/ml	<i>endothelial mitogen</i>
20 mM Vitamin C-Stammlösung	3,5 mg / 800 µl M199 mit 200 µl 0,1 N NaOH neutralisieren	Vitamin C
PBS (pH 7,4)	145 mM	NaCl
	2,7 mM	KCl
	1,5 mM	KH ₂ PO ₄
	8,1 mM	Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O

2.2.1.2 Passagieren, Einfrieren und Auftauen von HUVEC

Nach Erreichen der Konfluenz, ca. 5 Tage nach der Präparation, wurden die Zellen passagiert. Zum Ablösen der Zellen wurden diese zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mit Trypsin/EDTA (0.05 %/0.02 %) für 2-3 min inkubiert. Die Enzymreaktion wurde durch Zugabe von M199/10 % FKS gestoppt. Die abgelösten Zellen wurden in ein 50 ml-Röhrchen überführt und für 6 min bei 500 x g zentrifugiert. Anschließend wurde das Zellpellet in Wachstumsmedium aufgenommen und auf mit 0,2 % Gelatine beschichtete T75-Zellkulturflaschen aufgeteilt (1:2 oder 1:3). Wenn nicht anders vermerkt, wurden HUVEC der ersten und zweiten Passage für Experimente genutzt.

Für die Gewinnung seneszenter Zellen wurden HUVEC bis zum Erreichen von Passage 20 kultiviert. Zellen jeder Passage wurden eingefroren, damit eine spätere zeitgleiche Verwendung von HUVEC niedriger und hoher Passagen desselben Spenders gewährleistet werden konnte. Zum Einfrieren wurden die von jeweils einer T75-Zellkulturflasche abgelösten Zellen zentrifugiert (6 min, 500 x g). Das Zellpellet wurde in 1 ml Wachstumsmedium/20 % FKS/10 % DMSO resuspendiert, in Kryovials

überführt und zunächst langsam bei -80 °C eingefroren. Die langfristige Lagerung erfolgte bei -180 °C.

Das Auftauen der Zellen erfolgte bei 37 °C und die Zellen wurden dann vorsichtig in eine mit 0,2 % Gelatine beschichtete Zellkulturflasche mit 10 ml Wachstumsmedium ohne Ciprofloxacin überführt. Nach dem Anheften der Zellen nach ca. 5 h wurde das Medium durch Wachstumsmedium ersetzt, um DMSO-Rückstände vollständig zu entfernen. Die konfluenten Zellen wurden nach drei Tagen für Experimente ausgesät.

2.2.1.3 Aussaat von HUVEC

Nach Ablösen der Zellen mit Trypsin/EDTA erfolgte die Zellzählung mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer. Für diverse Experimente wurden die Zellen in verschiedenen Zellzahlen auf unterschiedliche mit 0,2 % Gelatine beschichtete Zellkulturgefäße ausgesät und bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert (Tabelle 16). Das Aussaatmedium (experimentelles Medium) enthielt kein Ciprofloxacin. Zwei bis drei Tage nach der Aussaat wurden die konfluenten Zellen im Experiment genutzt.

Tabelle 16: HUVEC Zellzahlen und Medienvolumen

Zellkulturgefäß	Zellzahl	Medium zur Aussaat	Medium zur Stimulation
Coverslips (in 24-well-Platte)	80.000-100.000	0,5 ml	0,5 ml
30 mm-Zellkulturschale	240.000*	2 ml	1 ml
60 mm-Zellkulturschale	300.000	4 ml	2 ml
90 mm-Zellkulturschale	1.200.000	8 ml	5 ml

*Für Transfektionsexperimente wurden 20 % weniger Zellen ausgesät.

2.2.1.4 Transfektion mit siRNA

Zur Herunterregulierung spezifischer Proteine erfolgte die Transfektion der Zellen mit dem *Synthetic, Amphiphilic, Interactive (SAINT)*-siRNA-Transfektions-Kit von Synvolux Therapeutics. Es handelt sich hierbei um eine Lipofektion, bei der das Transfektionsreagenz Komplexe mit siRNA formt, welche durch Endozytose in die Zelle aufgenommen werden. In der Zelle bindet die siRNA dann an spezifische mRNA, welche dadurch abgebaut wird [126, 127].

HUVEC wurden am Tag vor der Transfektion in 30 mm-Zellkulturschalen ausgesät und waren zum Zeitpunkt der Transfektion 50 - 70 % konfluent. Nach zweimaligem Waschen der Zellen mit *Hanks Balanced Salt Solution* wurde die Transfektion unter Verwendung serumfreier Medien durchgeführt. Spezifische siRNA wurde in einer Konzentration von 0,5 µg/ml eingesetzt. Die siRNA wurde in 100 µl HBS verdünnt und mit 20 µl Saint-sRNA, welche in 80 µl HBS verdünnt wurde, vermischt. Nach Zugabe von 800 µl M199/ 0,25 % HSA wurde 1 ml Transfektionslösung pro 30 mm-Zellkulturschale zugegeben und die Zellen wurden für 4 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurden 2 ml Wachstumsmedium hinzugegeben. Experimente mit transfizierten Zellen wurden 72 h nach der Transfektion durchgeführt.

2.2.2 Zellkultur von MLEC

2.2.2.1 Präparation von MLEC

Mouse lung endothelial cells (MLEC) wurden aus den Lungen junger (4 Monate) und alter (24 Monate) Mäuse gewonnen. Nach dem Töten der Maus durch zervikale Dislokation erfolgte eine Desinfektion mit Ethanol und die Eröffnung des Brustkorbs. Die Lunge wurde herausgenommen, in kaltes Medium (DMEM *high glucose*/2 % Penicillin+Streptomycin) überführt und unter der Laminarbox auf 90 mm-Zellkulturschalen gelegt. Nach Entfernung der Hilusregion aus beiden Lungenflügeln wurde das restliche Gewebe sehr fein mit einer sterilen gebogenen Schere zerkleinert. Die entstandene homogene Masse wurde in ein 15 ml-Röhrchen mit 0,1 % Kollagenaselösung (Tabelle 17) überführt und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Alle 10 min wurde die Suspension vorsichtig aufgeschüttelt. Das angedaute Zellmaterial wurde anschließend mit einer stumpfen 15 G Kanüle in eine 20 ml Spritze aufgenommen und zur weiteren Zerkleinerung 20 x durch die Kanüle gepresst und wieder aufgezogen. Unverdautes Gewebe wurde mit Hilfe eines sterilen Zellsiebs entfernt und das Sieb mit 10 ml MLEC-Medium (Tabelle 17) nachgespült. Nach Zentrifugation der erhaltenen Zellsuspension (10 min, 200 x g) wurde das Zellpellet in MLEC-Mitogen-Medium (Tabelle 17) aufgenommen und in eine mit 0,2 % Gelatine beschichtete T75-Zellkulturflasche ausgesät. Am nächsten Tag erfolgte ein Mediumwechsel. Dabei wurden zunächst die anhaftenden Blutzellen durch leichtes Klopfen abgelöst und die adhärenente Zellschicht wurde mit Hilfe einer 10 ml-Pipette 5 x mit dem in der Zellkulturflasche befindlichen Medium überspült. Nach Absaugen des Mediums erfolgten zwei Waschungen mit PBS/2 % FKS, wobei die Zellen erneut jeweils 5 x mit

einer Pipette überspült wurden. Danach wurde der Puffer durch 15 ml MLEC-Mitogen-Medium ersetzt und die Zellen für ca. 3 - 5 Tage kultiviert.

Die erste Selektion von Endothelzellen aus der Mischkultur verschiedener in der Lunge vorkommender Zellen erfolgte, nachdem die Zellen Konfluenz erreicht hatten. Dabei war ein Überwuchern mit Fibroblasten und Muskelzellen zu vermeiden.

Die Isolierung von Endothelzellen erfolgte mit Hilfe magnetischer Beads, die mit endothelspezifischen CD102-Antikörpern konjugiert wurden. Zur Anwendung kamen Dynabeads (beschichtet mit Schaf-anti-Ratte IgG). Diese wurden mit Hilfe eines Magneten 3 x mit 1 ml kaltem PBS/2 % FKS gewaschen, in 500 µl PBS/2 % FKS aufgenommen und mit anti-Maus CD102-Antikörpern 2 h bei 4 °C unter Rotation inkubiert. Für eine T75-Zellkulturflasche wurden jeweils 7,5 µl Beads und 9 µl Antikörper eingesetzt. Um ungebundenen Antikörper nach der Inkubation zu entfernen, wurden die Beads 3 x mit 1 ml PBS/2 % FKS gewaschen. Anschließend wurden 100 µl der Beads-Antikörper-Lösung zu Zellen einer vorgekühlten T75-Zellkulturflasche (5 min, 4 °C) gegeben. Es erfolgte eine Inkubation für 1 h bei 4 °C, sodass die magnetischen Beads an die Endothelzellen binden konnten. Im Folgenden wurden die Zellen mit Trypsin abgelöst, in ein 15 ml-Röhrchen mit vorgelegtem MLEC-Medium überführt und einer magnetischen Separation unterzogen. Dazu wurde ein 15 ml-Röhrchen im Magnetfeld bereitgestellt. Die Zellsuspension wurde mit einer 10 ml-Pipette langsam auf der Magnetseite über die Röhrchenwand pipettiert, sodass die an die Beads gebundenen Endothelzellen haften blieben. Nach 10 min wurde das Medium abgekippt und das 15 ml-Röhrchen aus dem Magnetfeld genommen. Die Zellen wurden in MLEC-Mitogen-Medium aufgenommen und in eine mit 0,2 % Gelatine beschichtete Zellkulturflasche ausgesät. Nach 4 - 5 Tagen wurden konfluente Zellen erneut auf dieselbe Weise selektiert. Ein Halbmediumwechsel erfolgte alle 2 - 3 Tage. Die Reinheit der Kulturen wurde durch eine CD31-Färbung mittels durchflusszytometrischer Analyse (Kapitel 2.2.5.5) bestimmt und lag über 90 %.

Tabelle 17: Zusammensetzung der zur Präparation und Kultivierung von MLEC verwendeten Lösungen und Medien

Lösung / Medium	Zusammensetzung	
	Konzentration	Komponente
0,1 % Kollagenaselösung	1 mg/ml	Kollagenase in DMEM <i>high glucose</i>
MLEC-Mitogen-Medium	38 ml 5000 U/ml 5000 µg/ml 20 % 25 µg/ml 2 mM 75 µg/µl	DMEM/F12 Penicillin Streptomycin FKS Heparin L-Glutamin <i>endothelial mitogen</i>
MLEC-Medium	38 ml 5000 U/ml 5000 µg/ml 20 % 2 mM	DMEM/F12 Penicillin Streptomycin FKS L-Glutamin

2.2.2.2 Aussaat von MLEC

MLEC wurden nach der zweiten Selektion für Experimente ausgesät. Die Zellen wurden mit Trypsin/EDTA wie für HUVEC beschrieben (Kapitel 2.2.1.3) abgelöst und in einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Für diverse Experimente wurden die Zellen in verschiedenen Zellzahlen auf unterschiedliche mit 0,2 % Gelatine beschichtete Zellkulturgefäße ausgesät und bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert (Tabelle 18). Zwei bis drei Tage nach der Aussaat wurden die dann konfluenten Zellen im Experiment genutzt.

Tabelle 18: MLEC Zellzahlen und Medienvolumen

Zellkulturgefäß	Zellzahl	Medium zur Aussaat	Medium zur Stimulation
30 mm-Zellkulturschale	200.000	2 ml	1 ml
60 mm-Zellkulturschale	300.000	4 ml	2 ml
90 mm-Zellkulturschale	1.000.000	8 ml	5 ml

2.2.3 Stimulationsbedingungen

Vor Zusatz von VEGF oder 2-Deoxyglukose wurden die Zellen für 4 h in M199/0,25 % HSA und anschließend für 30 min in Hapes/CaCl₂/HSA-Puffer (Tabelle 19) vorinkubiert. Somit wurde der Einfluss von Serum und Mediumkomponenten auf die

Stimulation verhindert. Die Stimulation mit VEGF bzw. 2-Deoxyglukose erfolgte im Hepes/CaCl₂/HSA-Puffer. Dagegen wurde die Stimulation der Zellen mit H₂O₂ im Wachstumsmedium durchgeführt, da es sich hierbei um eine Langzeitinkubation über 8 Tage handelte. Das Medium wurde dabei täglich erneuert und H₂O₂ wurde jeweils frisch nachgesetzt. Als Positivkontrolle für die γH2AX-Färbung wurde Hydroxyurea zum Wachstumsmedium zugegeben. Bafilomycin A1 wurde als Negativkontrolle der Lysosomenaktivitätsmessung dem Wachstumsmedium zugesetzt. Die Kontrollen erhielten gleiche Mengen der jeweiligen Lösungsmittel. Die Substanzen zur Zellstimulation sind in Tabelle 20 aufgeführt.

Tabelle 19: Hepes/CaCl₂/HSA-Puffer

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

Tabelle 20: Substanzen zur Zellstimulation

Substanz	Lösungsmittel	Finale Konzentration
2-Deoxyglukose	H ₂ O	20 mM
Bafilomycin A1	DMSO	50 nM
H ₂ O ₂	H ₂ O	50 µM, 100 µM
Hydroxyurea	PBS	2 mM
VEGF	PBS/0,1 % HSA	50 ng/ml

2.2.4 Proteinanalytik

2.2.4.1 Zellyse

Nach zweimaligem Waschen der Zellen mit Waschpuffer (Tabelle 21) wurden 60 µl Lysepuffer (Tabelle 21) pro 30 mm-Zellkulturschale zugegeben. Die Zellen wurden für 15 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellreste von der Zellkulturschale abgeschabt und gemeinsam mit dem Zelllysat in ein Eppendorf-Reaktionsgefäßen überführt. Nach Zentrifugation für 6 min bei 700 x g und 4 °C wurde der Überstand abgenommen und in ein *safe lock* Eppendorf-Reaktionsgefäßen überführt. Es wurden von jeder Probe 2 x 2 µl zur Proteinbestimmung nach Lowry (Kapitel 2.2.4.2)

entnommen. Laemmli-Puffer (Tabelle 21) wurde im Verhältnis von 1:3 zum Lysat gegeben und die Proben wurden bei 95 °C für 5 min gekocht. Die Lagerung der Proben erfolgte bei -20 °C.

Tabelle 21: Puffer zur Zellyse

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

2.2.4.2 Proteinbestimmung nach Lowry

Um sicher zu stellen, dass die in der SDS-PAGE aufgetragenen Proben die gleiche Proteinmenge enthalten, wurde in allen Proben die Proteinbestimmung nach Lowry mit Hilfe des BIO-RAD DC Protein-Assays durchgeführt [128]. Es wurden 2 µl jeder Probe mit 20 µl Wasser in einer 96 well-Platte verdünnt. Anschließend wurde 10 µl von Reagenz A' (Gemisch aus 100 µl Reagenz A und 2 µl Reagenz S) und 80 µl von Reagenz B zugegeben. Nach einer Inkubation für 15 min bei Raumtemperatur wurde die Absorption bei 750 nm mit dem Sunrise™-Mikroplatten-Reader und der Magellan™ Software bestimmt. Die Proteinbestimmung erfolgte als Doppelbestimmung, für jede Probe wurde der Mittelwert bestimmt. Die Proteinmenge wurde mit Hilfe einer Standardkurve ermittelt.

2.2.4.3 SDS-PAGE

Zur Ermittlung der Expression bestimmter Proteine und deren Phosphorylierungsstatus wurde eine SDS-PAGE durchgeführt. Zellysate (Kapitel 2.2.4.1) mit gleicher Proteinmenge wurden auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und elektrophoretisch nach ihrer Größe aufgetrennt. Im Allgemeinen wurden 7,5 % Trenngelle, zur Detektion von Proteinen mit sehr geringem Molekulargewicht auch 15 % Trenngelle verwendet (Tabelle 22). Es wurden 25 µg - 35 µg pro Probe aufgetragen. Die beladenen Gele wurden in einer mit Elektrodenpuffer (Tabelle 23) gefüllten Elektrophoresekammer platziert. Die Elektrophorese lief 110 min mit einer Stromstärke von 45 mA pro Gel.

Tabelle 22: Zusammensetzung der Polyacrylamidgele

Gel	Zusammensetzung	
	Menge	Komponente
7,5 % Trenngel	16 ml	Wasser
	6 ml	Tris/HCl-Puffer (pH 8,8)
	7,6 ml	Acrylamid
	300 µl	10 % SDS
	100 µl	APS
	15 µl	TEMED
15 % Trenngel	8,6 ml	Wasser
	6 ml	Tris/HCl-Puffer (pH 8,8)
	15 ml	Acrylamid
	300 µl	10 % SDS
	100 µl	APS
	15 µl	TEMED
5 % Sammelgel	7,2 ml	Wasser
	1 ml	Tris/HCl-Puffer (pH 6,8)
	1,6 ml	Acrylamid
	100 µl	10 % SDS
	34 µl	APS
	10 µl	TEMED

Tabelle 23: Puffer für Elektrophorese

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

2.2.4.4 Western Blot

Die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden vom Gel auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran durch Tankblotting übertragen. Das SDS-PAGE-Gel und die durch Methanol aktivierte PVDF-Membran wurden zwischen Filterpapiere in eine Blottingkassette eingespannt. Diese Kassetten wurden in einem Puffertank mit Platinelektroden eingesetzt. Der Proteintransfer erfolgte für 60 - 100 min bei einer Stromstärke von 0,75 A pro Gel. Der Puffertank war an ein Kühlsystem angeschlossen. Die negativ geladenen Proteine bewegen sich zur positiv geladenen Platinelektrode und wurden so auf die PVDF-Membran transferiert und immobilisiert. Nach dem Proteintransfer wurden die Membranen für 5 min in TN-Puffer (Tabelle 24) gewaschen und anschließend in 5 % Milch in TN/Tween-Puffer für mindestens 1 h blockiert. Anschließend wurden die Membranen 3 x 5 min in TN/Tween-Puffer gewaschen und danach mit dem primären Antikörper über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Zusammensetzungen der benötigten Puffer sind der Tabelle 24 zu entnehmen. Die verwendeten Antikörper und deren Verdünnungen sind in Tabelle 4 des Kapitels 2.1.4 aufgeführt.

Tabelle 24: Puffer für Western Blot

Puffer	Zusammensetzung	
	Konzentration	Komponente
Blotting-Puffer	25 mM	Tris
	192 mM	Glycin
	10 %	Methanol
TN-Puffer	10 mM	Tris
	1,5 M	NaCl
TN/Tween-Puffer	10 mM	Tris
	1,5 M	NaCl
	0,1 %	Tween®20

2.2.4.5 Immundetektion von Proteinen

Nach der Inkubation mit dem primären Antikörper wurden die Membranen 3 x 5 min mit TN/Tween-Puffer (Tabelle 24) gewaschen und anschließend mit dem sekundären Antikörper (an *Horseradish*-Peroxidase gekoppelt, in 5 % Milch in TN/Tween-Puffer gelöst) für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Membranen wurden danach erneut 3 x 5 min mit TN/Tween-Puffer gewaschen. Der letzte Waschschrift für 5 min wurde mit TN-Puffer ohne Tween durchgeführt. Die auf der Membran befindlichen Proteine

wurden durch die ECL (*enhanced chemiluminescence*)-Methode mittels eines Lichtsignals nachgewiesen. Dabei kamen *Amersham™ ECL Western Blotting Reagents* und *Amersham™ ECL prime Western Blotting Reagents* sowie *Western Lightning® Plus-ECL* (Perkin Elmer) zum Einsatz. Die Membranen wurden für 1 min mit dem ECL-Reagenz inkubiert, wobei das Substrat Luminol durch die *Horseradish-Peroxidase* des sekundären Antikörpers oxidiert wird. Das Oxidationsprodukt emittiert Licht, welches mit Hilfe eines fotosensitiven Films detektiert werden kann. Die Lichtintensität korreliert mit der Proteinmenge. Die Filme wurden mit Hilfe des Kodak GBX Systems entwickelt.

2.2.4.6 Strippen von Membranen

Das Strippen der PVDF-Membranen erfolgte, um gebundenen Antikörper von der Membran zu entfernen und die Immundetektion eines weiteren primären Antikörpers auf derselben Membran zu ermöglichen. Die Membran wurde für 35 min bei 55 °C mit Strippingpuffer (Tabelle 25) inkubiert, dabei leicht geschüttelt und dann 2 x 10 min mit TN-Puffer (Tabelle 24) gewaschen, um den Strippingpuffer zu entfernen. Nach der anschließenden Blockierung in 5 % Milch in TN/Tween-Puffer für 1 h bei Raumtemperatur, folgten drei weitere Waschungen mit TN/Tween-Puffer für jeweils 5 min. Eine Membran wurde maximal 3 x gestrippt.

Tabelle 25: Strippingpuffer

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

2.2.4.7 Densitometrische Auswertung der Western Blots

Zur Quantifizierung der ECL-Signale wurden die entwickelten Filme eingescannt. Die Intensität der Banden und der jeweiligen Hintergründe wurde mit dem Programm Image J (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA) gemessen. Die Differenzen zwischen den jeweiligen Hintergründen und den spezifischen Proteinbanden wurden als artifizielle Einheiten angegeben. Zur Analyse der Proteinexpression wurden die erhaltenen Werte gegen die Bandenintensitäten von

β -Aktin oder GAPDH normiert. Um den Phosphorylierungsstatus von Proteinen zu analysieren, wurde das Verhältnis des Phosphosignals zum Signal des Gesamtproteins gebildet.

2.2.5 Färbungen

2.2.5.1 Seneszenz-assoziierte β -Galaktosidase (SA- β -Gal)-Färbung

Das Prinzip der SA- β -Gal-Färbung beruht auf einem Überschuss an β -Galaktosidase in den Lysosomen der seneszenten Zellen, so dass eine enzymatische Spaltung des Substrates X-Gal bei einem suboptimalen pH-Wert von 6,0 nachgewiesen werden kann [101, 102] (Abbildung 5). Die zu färbenden Zellen wurden in niedriger Dichte ausgesät (150.000 Zellen/ 30 mm-Zellkulturschale), da ein konfluenter Zellrasen durch Kontaktinhibition zu falsch positiven Signalen der SA- β -Gal-Färbung führen kann. Die Färbung erfolgte ein bis zwei Tage nach der Aussaat. Zunächst wurde das Medium abgesaugt und die Zellen wurden zweimal mit 1 ml kaltem PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Fixierung der Zellen mit Fixierlösung (Tabelle 26) für 3 - 5 min und zwei Waschungen mit 1 ml kaltem PBS. Nach Zugabe von 1,5 ml Färbelösung (Tabelle 26) pro 30 mm-Zellkulturschale wurden die Zellen über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen fotografiert und in den Bildern der Anteil an positiv gefärbten blauen Zellen durch Auszählen ermittelt.

Tabelle 26: Lösungen zur SA- β -Gal-Färbung

Lösung	Zusammensetzung	
	Konzentration/Menge	Komponente
Fixierlösung	2 % 0,2 % in PBS	Formaldehyd Glutaraldehyd
Färbelösung	40 mM 5 mM 5 mM 150 mM 2 mM 5 % in destilliertem Wasser pH 6,0 einstellen	Zitronensäure/ Natriumphosphat-Puffer K ₄ [Fe(CN) ₆]x 3H ₂ O K ₃ [Fe(CN) ₆] NaCl MgCl ₂ x 6H ₂ O X-Gal-Lösung
Zitronensäure-Stammlösung	100 mM	C ₆ H ₈ O ₇ x H ₂ O
Natriumphosphat-Stammlösung	200 mM	Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O

0,2 M Zitronensäure/ Natriumphosphat Puffer	36,85 ml	Zitronensäure- Stammlösung
	63,15 ml	Natriumphosphat- Stammlösung
	pH 6,0 einstellen	
X-Gal-Lösung	20 mg/1 ml DMF frisch lösen	X-Gal

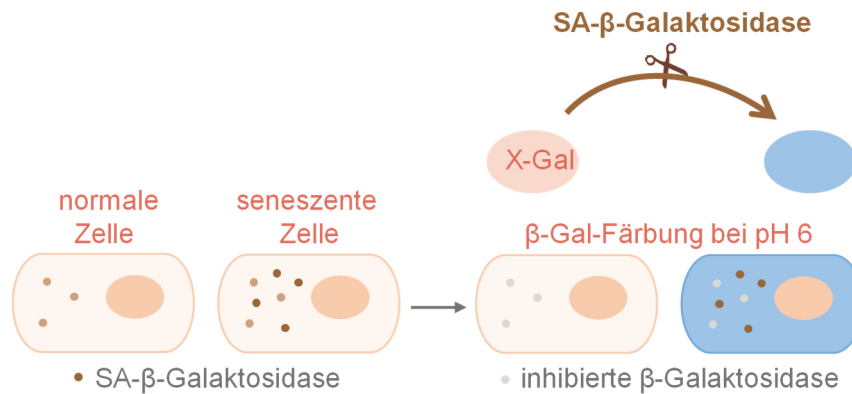


Abbildung 5: Prinzip der Seneszenz-assoziierten (SA)-β-Galaktosidase-Färbung.

Seneszente Zellen verfügen über einen erhöhten Lysosomengehalt und über einen Überschuss des Enzyms β-Galaktosidase, welches als SA-β-Galaktosidase bezeichnet wird. Die Färbung wird bei einem suboptimalen pH-Wert von 6,0 durchgeführt, sodass nur die Zellen mit erhöhter Menge an β-Galaktosidase erfasst werden. Das Enzym spaltet das Substrat X-Gal in ein blaues Produkt, welches als blaue Färbung der Zellen sichtbar wird und die Aktivität der SA-β-Galaktosidase widerspiegelt (nach [101, 102]).

2.2.5.2 Immunfluoreszenzfärbungen

Zur Immunfluoreszenzfärbung wurden HUVEC auf Coverslips in einer 24-well-Platte ausgesät. Die Coverslips wurden zuvor doppelt mit 1 % Gelatine beschichtet. Vor der Färbung wurden die Zellen mit warmen HEPES/CaCl₂-Puffer (Tabelle 27) gewaschen und anschließend mit 4 % PFA für 15 min auf Eis fixiert. Anschließend erfolgten zwei Waschungen mit PBS, die Permeabilisierung der Zellen mit PBS/0,3 % Triton für 5 min, eine Inkubation der Zellen für 30 min in Blockierungslösung (Tabelle 27) und zwei weitere Waschungen mit PBS-T (Tabelle 27). Nach Überführung der Coverslips in eine feuchte Kammer wurden 60 µl primäre Antikörperlösung pro Probe zugegeben und die Zellen für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgten zwei Waschungen mit PBS-T, die Zugabe von 60 µl der sekundären Antikörperlösung (fluoreszenzgekoppelt) und eine Inkubation für 1 h in der feuchten Kammer. Die Zellen wurden dann einmal mit PBS-T und einmal mit PBS gewaschen, da Triton die folgende DAPI-Färbung stören kann. Zur Färbung der Zellkerne wurde den Zellen 60 µl DAPI-Lösung

(1 µg/ml in PBS) für 10 min zugesetzt. Im Folgenden wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und die Coverslips in Fluoromount eingebettet. Die verwendeten Antikörper und deren Verdünnungen sind Tabelle 5 und 6 des Kapitels 2.1.4 zu entnehmen.

Tabelle 27: Lösungen für Immunfluoreszenzfärbung

Lösung	Zusammensetzung	
	Konzentration	Komponente
Hepes/CaCl ₂ -Puffer (pH 7,4)	10 mM	Hepes
	145 mM	NaCl
	10 mM	Glukose
	5 mM	KCl
	1 mM	MgSO ₄
	1,5 mM	CaCl ₂
Blockierungslösung	1 %	BSA-C
	5 %	Ziegenserum
	in PBS-T	
PBS-Triton (PBS-T)-Puffer	0,01 % in PBS	Triton X-100

2.2.5.3 Bildauswertung der Immunfluoreszenzfärbung

Zur Auswertung der Immunfluoreszenzbilder wurde das Programm Image J (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA) benutzt. Zur Auswertung der p21-Färbung und der γH2AX-Färbung wurden *regions of interest* für alle Zellkerne erstellt, in denen das AF488-Signal als *mean gray value* ermittelt wurde.

2.2.5.4 Zellzyklus-Färbung

Die Zellzyklusanalyse wurde in transfizierten Zellen von 60 mm-Zellkulturschalen durchgeführt (Kapitel 2.2.1.4). Dazu erfolgte 72 h nach Transfektion der Zusatz von 10 µM 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) für 30 min. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit je 2 ml warmen PBS gewaschen, mit 0,5 ml Trypsin abgelöst und in 4 ml Stopp-Lösung (Tabelle 28) überführt. Die Zellkulturschalen wurden noch einmal mit 4 ml Stopp-Lösung nachgespült. Die Zellsuspension wurde für 5 min bei 500 x g zentrifugiert und das Zellpellet anschließend in 1 ml Waschpuffer (Tabelle 28) resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation (3 min, 500 x g) und Aufnahme in 100 µl Waschpuffer wurden die Zellen mit 100 µl 4 % PFA fixiert. Die Zellsuspension wurde gut gemischt und im Dunkeln für 15 min inkubiert. Danach wurden die Proben

zentrifugiert (3 min, 500 x g) und die Zellpellets in jeweils 300 µl PBS aufgenommen. Nun erfolgte, unter ständigem leichtem Schütteln der Proben die tropfenweise Zugabe von 700 µl 100 % Ethanol. Die Proben wurden über Nacht bei -20 °C eingefroren. Nach dem Auftauen erfolgte eine Zentrifugation (5 min, 700 x g). Das Zellpellet wurde in 1 ml Waschpuffer aufgenommen und erneut zentrifugiert. Danach erfolgten die Permeabilisierung der Zellen in 100 µl TB-Puffer (Tabelle 28) für 30 min im Dunkeln, eine Zentrifugation (3 min, 500 x g), die Resuspension in 500 µl Waschpuffer und eine Inkubation für 1 h in Dunkeln. Nach erneuter Zentrifugation (3 min, 500 x g) wurde das Zellpellet in 150 µl der primären Antikörperlösung (1:200 p-H3 (S10) in TB-Puffer) aufgenommen und für 2 h im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden 500 µl TB-Puffer zugegeben, die Proben zentrifugiert (3 min, 500 x g) und die Zellen mit 150 µl AF488-konjugiertem sekundären Antikörper (1:500 in TB-Puffer) für 1 h im Dunkeln inkubiert. Nach der erneuten Zugabe von 500 µl TB-Puffer, Zentrifugation (3 min, 500 x g) und einem Waschschrift mit 1 ml Waschpuffer wurde das Zellpellet in 100 µl Click-iT-Reaktionslösung (Tabelle 28) aufgenommen und für 30 min inkubiert. Es folgten Zentrifugation (3 min, 500 x g) und ein weiterer Waschschrift. Das Zellpellet wurde dann in 300 µl DAPI-Lösung (1,35 µg/ml in Waschpuffer) resuspendiert und für 30 min im Dunkeln inkubiert. Die Verteilung von HUVEC in verschiedenen Zellzyklusphasen wurde mittels einer Dreifach-Färbung (AF488, AF647, DAPI) durchflusszytometrisch mit Hilfe des BD FACS Fortessa bestimmt. Dazu wurden Zellen mit EdU inkubiert, dass in die DNA eingebaut wird und zum Nachweis von Zellen in der S-Phase dient. Um Zellen in der M-Phase zu erfassen und von G2-Zellen zu unterscheiden, wurden Zellen gegen p-H3 (S10) gefärbt, dessen Signal spezifisch in der M-Phase ansteigt. Eine DAPI-Färbung diente zur Detektion von Zellen in der G0/G1-Phase. Die Gating-Strategie ist in Abbildung 6 dargestellt. Der Prozentsatz der Zellen in den jeweiligen Zellzyklusphasen wurde unter Verwendung der FlowJo™-Software (Ashland, Oregon, USA) berechnet.

Tabelle 28: Lösungen für Zellzyklus-Färbung

Lösung	Zusammensetzung	
	Konzentration/Menge	Komponente
Hepes-Puffer	10 mM	Hepes
	145 mM	NaCl
	10 mM	Glukose
	5 mM	KCl
	1 mM	MgSO ₄

Material und Methoden

Stopp-Lösung	10 % In Hepes-Puffer	FKS
Waschpuffer	1 % In PBS	BSA
TB-Puffer	0,2 % In Waschpuffer	Triton X-100
Click-iT-Reaktionslösung	88 µl 2,5 µl 0,5 µl 10 µl	PBS CuSO ₄ (100 mM) AF647-Azid Na-Ascorbat (0,5 M)

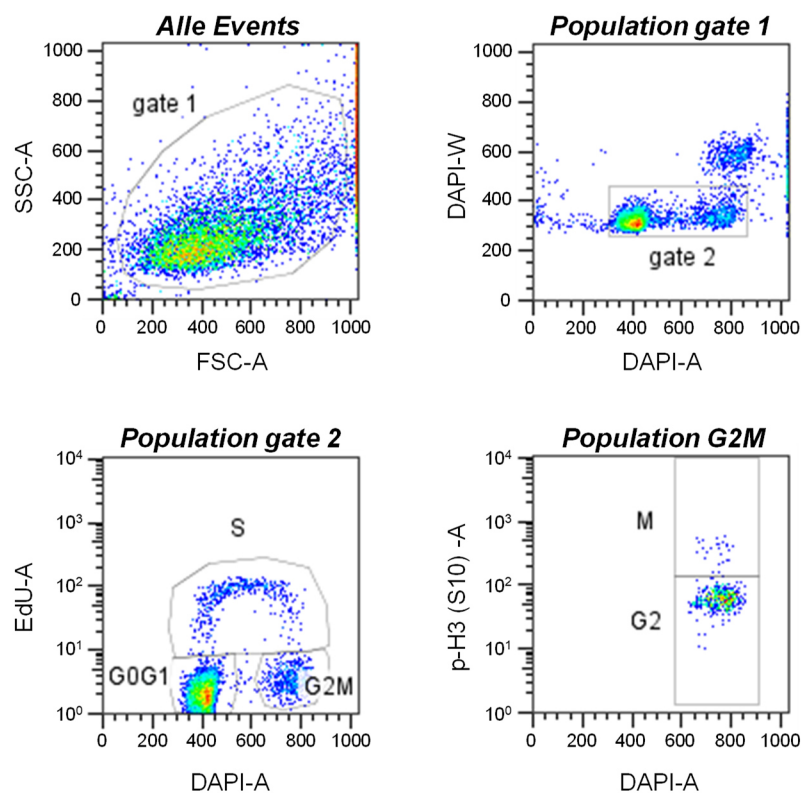


Abbildung 6: Gating-Strategie der Zellzyklus-Färbung. Zur Analyse des Zellzyklus wurden die Zellpopulationen zuerst nach FSC/SSC gated, um Zelldebris auszuschließen. Danach folgte ein DAPI-A/DAPI-W-Gating zum Ausschluss von Doublets. Die resultierenden Zellen aus Gate 2 wurden weiter in Subpopulationen der jeweiligen Zellzyklusphasen (G1/G0-Phase, S-Phase, G2M-Phase, unteres linkes Feld) gemäß ihrer EdU- (APC-A) und DAPI-A-Verteilung eingeteilt. Die G2M-Population wurde dann weiter nach AF488-A und DAPI-A unterteilt, um zwischen p-H3 (S10)-positiven Zellen (M-Phase) und p-H3 (S10)-negativen Zellen (G2-Phase) zu unterscheiden. Repräsentative Dot Plots mit den entsprechenden Gates sind dargestellt. Zellen in der jeweiligen Zellzyklusphase wurden als Prozentsätze des zugehörigen originalen Gates angegeben (Gate 2 oder G2M).

2.2.5.5 Nachweis von CD31 mittels Durchflusszytometrie

CD31 ist ein Adhäsionsmolekül, welches als Oberflächenmarker für die Identifizierung von Endothelzellen eingesetzt wird. Der Nachweis von CD31 mittels Durchflusszytometrie diente der Bestimmung der Reinheit der MLEC-Kulturen. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und für 3 min auf Eis mit 0,5 % Paraformaldehyd fixiert. Anschließend wurden die Zellen erneut mit PBS gewaschen, mit Trypsin abgelöst, in PBS/10 % FKS aufgenommen und zentrifugiert (500 x g für 6 min). Es folgten zwei Waschschriffe mit PBS und anschließender Zentrifugation bei 500 x g für 6 min. Das Zellpellet wurde in 0,2 % BSA-C/PBS resuspendiert und zur Blockierung unspezifischer Antikörperbindung 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgte der Zusatz des primären Antikörpers (Ratte anti-Maus CD31, 1:25 in 0,2 % BSA-C/PBS) für 30 min. Nach erneutem Waschen der Zellen mit PBS folgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (Ziege anti-Ratte IgG, Cy5-gekoppelt, 1:100 in 0,2 % BSA-C/PBS). Nach einem Waschschriff mit PBS wurde das Zellpellet in PBS resuspendiert. Die Proben wurden einer durchflusszytometrischen Analyse unter Verwendung eines BD FACS Canto unterzogen. Die Auswertung erfolgte mit der FlowJo™-Software (Ashland, Oregon, USA).

2.2.5.6 Messung der Lysosomenaktivität

Die Messung der Lysosomenaktivität wurde mit dem *Lysosomal Intracellular Activity Assay Kit* von BioVision durchgeführt. HUVEC wurden zunächst auf 30 mm-Zellkulturschalen ausgesät und wie in Kapitel 2.2.1.4 beschrieben 72 h lang mit siRNA transfiziert. 1 h vor Beginn der Messung wurde der Negativkontrolle 50 nM Bafilomycin A1 zur Hemmung der lysosomalen Aktivität zugesetzt. Anschließend erfolgte ein Mediumwechsel zu M199/0,5 % FKS. Bafilomycin wurde zur Negativkontrolle nachgesetzt und allen Proben wurde Substratlösung zugegeben. Während der nachfolgenden Inkubation für 1 h wurde das Substrat von den Zellen aufgenommen und in Lysosomen zu einem fluoreszierenden Produkt abgebaut, dessen Fluoreszenzsignal mit der lysosomalen Aktivität korreliert (BioVision). Anschließend erfolgten eine Waschung der Zellen mit 600 µl kaltem Assay-Puffer, eine weitere Waschung mit warmen PBS und die Ablösung der Zellen mit Trypsin. Die Einwirkung des Trypsins wurde mit Stopp-Lösung (Tabelle 28) beendet, die Zelllösung in ein 15 ml-Röhrchen überführt und auf 15 ml mit Hepes-Puffer (Tabelle 28) aufgefüllt. Nach Zentrifugation bei 500 x g für 30 Sekunden wurde der Überstand vorsichtig abgesaugt

und das Zellpellet in 300 µl kaltem PBS aufgenommen. Die Proben wurden einer durchflusszytometrischen Analyse unter Verwendung eines BD FACS Canto unterzogen. Die Auswertung erfolgte mit der FlowJo™-Software (Ashland, Oregon, USA).

2.2.5.7 Messung der AMPK-Aktivität

Die Messung der AMPK-Aktivität wurde mit dem *AMPK Kinase Assay Kit* von CycLex nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Dazu wurden die Zellen mit PBS gewaschen und unter Verwendung des Lysepuffers aus Tabelle 26, wie in Kapitel 2.2.4.1 beschrieben, lysiert. Nach Zentrifugation des Lysats (16.500 x g, 4 °C, 10 min) erfolgte die Proteinbestimmung nach Lowry (siehe Kapitel 2.2.4.2) und die Einstellung der Proteinkonzentration auf 0,5 µg/µl. Reaktionsansätze mit Aliquots der Zellysate (Tabelle 29) wurden in AMPK-Substrat-Peptid-beschichtete Wells einer 96 Well-Platte pipettiert und 30 min bei 30 °C unter leichtem Schütteln inkubiert. Danach wurden die Wells gewaschen und der Primärantikörper (Anti-Phospho-mouse IRS-1 S789 mAb), welcher spezifisch den phosphorylierten Serin-Rest des Substratpeptides bindet, zugegeben. Nach erneuter Inkubation für 30 min bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln und anschließenden Waschschritten erfolgten die Zugabe des Sekundärantikörpers (Peroxidase-gekoppelt, Anti-mouse IgG), eine erneute Inkubation (30 min, unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur), ein Waschschriff und die Zugabe des Peroxidase-Substrats. Während der nachfolgenden Inkubation der Proben für 5-15 min bei Raumtemperatur und unter leichtem Schütteln wurde die Farbentwicklung beobachtet und die Reaktion gestoppt, bevor es zu einer Farbübersättigung kommen konnte. Innerhalb von 30 min nach Stoppen der Reaktion erfolgte die Messung der Proben im Plattenreader bei 450 nm (Referenzwellenlänge 540 nm).

Tabelle 29: Lösungen für AMPK-Aktivität

Lösung	Zusammensetzung	
	Konzentration/Menge	Komponente
Lysepuffer	50 mM	Tris (pH 7,4)
	2 mM	EDTA
	1 mM	EGTA
	50 mM	NaF
	150 mM	NaCl
	1 mM	Na ₃ VO ₄
	1 %	Triton X-100
	frisch zusetzen:	
	1 mM	DTT
	0,2 M	PMSF
10 µl/ml	PIC	
Reaktionspuffer (n=1)	90 µl	Kinasepuffer (im Kit)
	5 µl	ATP (20x)
	5 µl	DTT (20x)
Reaktionsansatz (n=1)	80 µl	Reaktionspuffer
	10 µl	Compound C oder Vehicle
	10 µl	Zelllysat

2.2.5.8 Messung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS)

Die Detektion von mitochondrialen ROS erfolgte mit dem Indikator MitoSOX, dessen Oxidation durch mitochondriales Superoxid ein rotes Fluoreszenzsignal erzeugt. Der Nachweis von zellulären ROS erfolgte durch CM-H₂DCFDA. Durch Oxidation entsteht ein fluoreszierendes Addukt (2',7'-Dichlorfluorescein (DCF)) (Thermo Fisher Scientific). Zunächst wurden die Zellen mit PBS gewaschen und für 30 min mit 600 µl MitoSOX-Lösung (3 µM) oder CM-H₂DCFDA-Lösung (5 µM) je 30 mm-Zellkulturschale inkubiert. Die Verdünnung erfolgte in HEPES/CaCl₂/HSA-Puffer (Tabelle 19). Im Anschluss wurden die Zellen mit warmen PBS gewaschen und mit Trypsin abgelöst. Die Einwirkung des Trypsins wurde mit Stopp-Lösung (Tabelle 28) beendet und die Zelllösung wurde in ein 15 ml-Röhrchen überführt, welches mit HEPES/CaCl₂-Puffer (Tabelle 27) aufgefüllt wurde. Nach Zentrifugation bei 500 x g für 30 Sekunden wurde der Überstand vorsichtig abgesaugt und das Zellpellet in 300 µl kaltem PBS aufgenommen. Die Proben wurden einer durchflusszytometrischen Analyse unter Verwendung eines BD FACS Canto unterzogen. Die Auswertung erfolgte mit der FlowJo™-Software (Ashland, Oregon, USA).

2.2.6 RNA-Isolation und RNA-Sequenzierung

Die RNA-Isolierung erfolgte mit dem NucleoSpin® RNA-Kit von Macherey-Nagel™ nach Angaben des Herstellers. Die RNA-Sequenzierung wurde im Leibniz-Institut für Altersforschung in Jena mit Hilfe des Illumina HiSeq 2500 (Modus: single-end 50 bp, Rapid v2) durchgeführt.

2.3 Methoden *in vivo* – Tierversuche

2.3.1 Genotypisierung von Mäusen

2.3.1.1 DNA-Isolation aus Mausschwanzbiopsien

Die Mausschwanzbiopsien wurden mit je 300 µl Verdaupuffer (Tabelle 30) für mindestens 3 h bei 55 °C unter leichtem Schütteln in Eppendorf-Reaktionsgefäßen im Thermoblock inkubiert, was zur Auflösung des Gewebes führte. Anschließend wurden die Proben zur Sedimentierung von Zelltrümmern und Gewebebestandteilen für 10 min bei 4 °C und 12.500 x g zentrifugiert. Nach Überführung des Überstands in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäßen wurden zur DNA-Fällung 300 µl Isopropanol zugegeben. Es folgte eine Zentrifugation für 20 min bei 4 °C und 12.500 x g zur Pelletierung der DNA. Das DNA-Pellet wurde mit 300 µl 70 % Ethanol gewaschen und erneut für 10 min bei 4 °C und 12.500 x g zentrifugiert. Nach vorsichtiger Abnahme des Überstands wurde das DNA-Pellet bei 42 °C für ca. 30 min im Thermoblock getrocknet und anschließend in 40 µl DEPC-H₂O (Tabelle 30) gelöst (10 min, unter leichtem Schütteln bei 60 °C). Die genomische DNA wurde bei 4 °C gelagert.

Tabelle 30: Lösungen zur Genotypisierung

Lösung	Zusammensetzung	
	Konzentration/Menge	Komponente
Verdaupuffer	292,2 mg	NaCl
	5 ml	1 % SDS-Lösung
	25 ml	Tris-HCl (0,1 M, pH 8,0)
	146,1 mg	EDTA
	45 ml	H ₂ O
	steril filtrieren, Lagerung bei RT	
DEPC-Wasser	16 µl/ml Verdaupuffer	Proteinase K
	0,1 %	DEPC
	in ddH ₂ O, über Nacht rühren, autoklavieren	

2.3.1.2 Genotypisierungs-Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Genotypisierungs-PCR wurde mit dem Dream Taq Green PCR Master Mix von Fermentas durchgeführt. Für den AMPK α 1-Mausstamm und den AMPK α 2-Mausstamm wurden die PCR-Ansätze getrennt als Wildtyp- und Transgen-Ansatz auf Eis pipettiert (Tabelle 31). Die PCR wurde im Eppendorf-Cycler durchgeführt (Tabelle 32).

Tabelle 31: Ansätze für Genotypisierungs-PCR

Genotyp	Zusammensetzung Komponente	Menge	
		Wildtyp	Transgen
AMPK α 1	DreamTaq Mastermix	6 μ l	6 μ l
	Forward Primer	0,26 μ l WT F	0,26 μ l IRES Fa2
	Reverse Primer	0,26 μ l WT R	0,26 μ l Ra1
	DEPC Wasser	11 μ l	11 μ l
	mischen und vorlegen + DNA	1 μ l	1 μ l
AMPK α 2	DreamTaq Mastermix	6 μ l	6 μ l
	Forward Primer	0,26 μ l loxF1	0,26 μ l loxF1
	Reverse Primer	0,26 μ l loxR1	0,26 μ l KOTneoR1
	DEPC Wasser	11 μ l	11 μ l
	mischen und vorlegen + DNA	1 μ l	1 μ l

Tabelle 32: PCR-Programme für Genotypisierung

Genotyp	PCR Programm			
AMPK α 1	Denaturierung	5 min	95 °C	
	Denaturierung	30 s	95 °C	
	Primerhybridisierung	30 s	56 °C	40 Zyklen
	Elongation	1 min	72 °C	
	Elongation	5 min	72 °C	
AMPK α 2	Denaturierung	5 min	95 °C	
	Denaturierung	30 s	95 °C	
	Primerhybridisierung	30 s	60 °C	40 Zyklen
	Elongation	1 min	72 °C	
	Elongation	5 min	72 °C	

2.3.1.3 Agarose-Gelelektrophorese

Die PCR-Produkte (2.3.1.2) wurden in einer Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und bewertet. Um die DNA sichtbar zu machen, wurde das 1,5 % Agarosegel in TAE-Puffer (Tabelle 33) mit 5 µl SafeRed pro 100 ml Gel versetzt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte für ca. 30 min bei 150 V. Anschließend wurde das Gel mit UV-Licht beleuchtet und fotografiert. Durch zusätzliches Auftragen von DNA-Markern, konnten die Größe der DNA-Fragmente beurteilt werden. Die PCR-Produkte für die Genotypisierung von AMPK α 1-Mäusen waren bei 450 bp (Wildtyp-Allel) beziehungsweise 350 bp (*Knockout*-Allel) detektierbar, während die PCR-Produkte für die Genotypisierung von AMPK α 2-Mäusen 200 bp (Wildtyp-Allel) beziehungsweise 600 bp (*Knockout*-Allel) nachgewiesen wurden.

Tabelle 33: Puffer zur Agarose-Gelelektrophorese

Lösung	Zusammensetzung	
	Konzentration/Menge	Komponente
TAE (Tris-Acetat-EDTA)-Puffer	40 mM 19 mM 2 mM	Tris Essigsäure (100 %) Na ₂ EDTA*2H ₂ O

2.3.2 Retrospektive Überlebensstudie

In der retrospektiven Überlebensstudie wurden die Daten der Mäuse berücksichtigt, welche zwischen 2018 und 2020 eines natürlichen Todes gestorben waren. Dabei wurden die Daten anhand einer Kaplan-Meier-Kurve ausgewertet.

2.3.3 Gewichtsmessung, Blutanalyse und Organentnahme

Die Mäuse wurden mit Isofluran anästhesiert, gewogen und anschließend durch Genickbruch getötet. Nach Eröffnung des Bauchraums erfolgten die schnelle Freilegung der *Vena cava* und die Entnahme von ca. 800 µl Blut mit einer Heparin-beschichteten Spritze. Das Blut wurde anschließend in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und mit 10 µl Heparin versetzt, um Gerinnung zu vermeiden. Direkt im Anschluss wurde die Analyse der Blutzellen mit Hilfe des SciVet+ durchgeführt. Nach Blutentnahme wurden die Organe entnommen, von Fett und Bindegewebe befreit und gewogen.

2.3.4 Histologie

2.3.4.1 Einbetten von Organen in Paraffin und Herstellen von Paraffinschnitten

Die entnommenen Organe mit Ausnahme der Aorta wurden über Nacht in 4 % PFA fixiert, anschließend in Plastikkassetten gelegt und für 1,5 h mit kaltem Leitungswasser gewässert. Die Aorta wurde aufgrund ihrer geringen Größe für nur 2 h in 4 % PFA fixiert und für 1 h gewässert. Die Plastikkassetten wurden in eine Histokinette platziert. Hier wurde das Gewebe zunächst durch eine aufsteigende Ethanolreihe (50 %, 70 %, 96 %, 99 % Ethanol) und im Folgenden durch ein Gemisch aus Ethanol und Xylol im Verhältnis 2:1 und später im Verhältnis 1:2 entwässert. Daraufhin wurden die Organe in purem Xylol inkubiert. Im letzten Schritt erfolgte die Inkubation in flüssiges Paraffin. Im Anschluss an das Histokinette-Programm wurden die paraffinierten Organstücke in Paraffin-Blöcke eingebettet. Nach dem Aushärten des Paraffinblocks, konnten im Mikrotom 5 µm dicke Organschnitte angefertigt werden. Diese Schnitte wurden nach Glättung im 37 °C-Wasserbad auf Polylysin-beschichtete Objektträger überführt. Nach Antrocknen der Schnitte auf den Objektträgern für mindestens 3 Tage, wurden diese für immunhistochemische Färbungen eingesetzt.

2.3.4.2 Entparaffinieren und Rehydrieren von Gewebeschnitten

Zur Gewebefärbung mussten die Schnitte entparaffiniert werden. Hierzu wurden sie 3-mal für 15 min in Xylol inkubiert. Anschließend wurde das Gewebe durch Inkubation in einer absteigenden Ethanolreihe rehydriert. Dazu wurden die Gewebeschnitte für jeweils 3 min in 99 %, 96 %, 70 % und 50 % Ethanol inkubiert. Die letzte Inkubation erfolgte in ddH₂O für 5 min.

2.3.4.3 Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung

Zur Untersuchung der Gewebestruktur der Mausorgane wurde die HE-Färbung durchgeführt, wobei Hämatoxylin die Zellkerne und Eosin das Zellplasma anfärbt. Die entparaffinierten und rehydrierten Gewebeschnitte (Kapitel 2.3.4.2) wurden für 20 min in filtrierter Hämatoxylin-Lösung inkubiert. Nach einem Waschschrift in ddH₂O erfolgte eine Wässerung der Präparate mit laufendem lauwarmem Leitungswasser und damit eine Bläuung durch die Erhöhung des pH-Wertes. Anschließend wurden die Schnitte in ddH₂O überführt und mit filtrierter alkoholischer Eosin-Lösung für mehrere

Sekunden gefärbt (Dauer abhängig von der Gewebearart). Danach wurden die Schnitte mit ddH₂O gewaschen, bis die Waschlösung farblos war. Abschließend erfolgte eine Dehydrierung der Präparate in aufsteigender Ethanolreihe (50 %, 70 %, 96 %, 99 %). Nach Inkubation für mindestens 10 min in Xylol erfolgte die Einbettung in Neo-Mount®. Die mikroskopische Beurteilung der Gewebeschnitte erfolgte mit dem EVOS FL Auto Mikroskop (Life Technologies).

2.3.5 SA-β-Gal-Färbung der Aorta

Nach der Entnahme der Aorta wurde diese in warmes M199-Medium überführt und unter Zuhilfenahme eines Binokularmikroskops und einer feinen Micro-Federschere von äußerem Fett befreit. Zur Färbung und Beurteilung der luminalen Seite wurde die Aorta vorsichtig mit der Micro-Federschere längs eröffnet, zweimal in kaltem PBS gewaschen und vorsichtig mit einem Pinsel, um das Gewebe nicht zu beschädigen, in ein Well einer 12 Well-Zellkulturplatte überführt. Alle Wasch- und Färbelösungen befanden sich in den Wells verschiedener 12-well-Platten. Die Aorta wurde für 10 min in Fixierlösung (Tabelle 26) inkubiert, zweimal mit PBS gewaschen und anschließend in die SA-β-Gal-Färbelösung (Tabelle 26) überführt. Die Inkubation in der Färbelösung erfolgte über Nacht bei 37 °C auf einem Orbitalschüttler.

2.3.6 Einbettung der Aorta und Herstellung von Kryoschnitten

Nach der SA-β-Gal-Färbung der Aorta (Kapitel 2.3.5) wurde diese zweimal in PBS gewaschen. Anschließend wurde sie in ein mit Einfriermedium (Tabelle 34) gefülltes Förmchen aus dünner Aluminiumfolie überführt, mit Hilfe einer Nadel mittig ausgerichtet und für 20-30 Sekunden in Stickstoff-gekühltes Isopentan getaucht, um das vollständige Einfrieren zu ermöglichen. Das Förmchen wurde erst in das Isopentan eingetaucht, wenn dieses am Boden des Einfrierbehälters sichtbar weiß zu gefrieren begann. Dann war das Isopentan kalt genug, um ein rasches Einfrieren des Gewebes zu gewährleisten. Der Transport der eingebetteten Aorten erfolgte auf Trockeneis und die Lagerung des Gewebes bei -80°C.

Am Kryostaten wurden 12 µm dicke Gewebeschnitte angefertigt und auf Objektträger überführt. Nach ca. 1 h und vollständiger Trocknung erfolgte die Einbettung der Schnitte in Fluoromount-G™.

Tabelle 34: Einfriermedium für Gewebe

Lösung	Zusammensetzung	
	Konzentration	Komponente
Einfriermedium für Gewebe	30 % in Neg-50™ Gefrierschnittmedium	Sucrose

2.3.7 RNA-Isolation, cDNA-Synthese und PCR

Die RNA-Isolierung aus Gewebeproben der Maus erfolgte mit dem NucleoSpin® RNA-Kit von Macherey-Nagel™ nach Angaben des Herstellers. Für die jeweiligen Organe wurden gleiche Mengen an RNA zur cDNA-Synthese eingesetzt, welche mit dem First Strand cDNA Synthesis Kit von Thermo Scientific™ nach Angaben des Herstellers durchgeführt wurde. Die PCR wurde mit dem Maxima SYBR Green qPCR Master Mix von Thermo Scientific™ durchgeführt. Die verwendeten Primer sind Tabelle 11 (Kapitel 2.1.6) zu entnehmen. Die Real-Time PCR wurde im QuantStudio™ 3 Real-Time PCR Cycler durchgeführt (Tabelle 35). Die Werte wurden zu β -Aktin normalisiert. Anschließend wurde die Abweichung der jeweiligen Einzelwerte von *Knockout* und Wildtyp vom Mittelwert aller Wildtyp-Werte ermittelt.

Tabelle 35: PCR-Programm für Mausorgane

PCR-Programm			
Denaturierung	5 min	94 °C	
Denaturierung	30 s	94 °C	
Primerhybridisierung	30 s	56 °C	40 Zyklen
Elongation	1 min	72 °C	
Elongation	5 min	72 °C	

2.4 Statistik

Die Ergebnisse sind als Mittelwerte mit SEM unabhängiger Experimente dargestellt. Zum Vergleich von zwei Gruppen wurde ein t-Test angewendet. Um mehr als zwei Gruppen zu vergleichen, wurde die statistische Auswertung mittels ANOVA mit PostHoc-Verfahren nach Holm-Sidak durchgeführt. Ein p-Wert kleiner als 0,05 wurde als statistisch signifikant angesehen und dementsprechend gekennzeichnet.

3. Ergebnisse

3.1. AMPK in seneszenten und chronologisch gealterten Endothelzellen

Das Ziel der Experimente in diesem Kapitel war es, die Rolle der AMPK und des AMPK-Signalwegs in verschiedenen Modellen der Endothelalterung unter basalen und Stimulationsbedingungen zu analysieren. Als Modelle wurden replikativ seneszente HUVEC, stress-induzierte Seneszenz in HUVEC und chronologisch gealterte Endothelzellen aus Mäusen eingesetzt.

3.1.1 Charakterisierung replikativ seneszenten Endothelzellen

Im Modell der replikativen Seneszenz wurden HUVEC kontinuierlich gesplittet, bis sie nach ca. 20 Passagen verschiedene Seneszenz-Charakteristika aufzeigten. Dieses Alterungsmodell wurde durch Dr. Odetta Meçe in der Arbeitsgruppe etabliert und hier erneut charakterisiert. In Abbildung 7A ist zu sehen, dass Zellen der Passage 20 einen signifikanten Anstieg der Seneszenzmarker p53, p21 und p16 im Western Blot zeigten. Parallel dazu war ein Abfall der Expression von eNOS und ein Anstieg von iNOS zu beobachten, ein weiteres Merkmal seneszenten Endothelzellen. Weiterhin war eine positive SA- β -Gal-Färbung nachweisbar, die im Allgemeinen als klassischer Parameter seneszenten Zellen betrachtet wird. Hierbei spaltet lysosomale β -Galaktosidase das Substrat X-Gal zu einem blauen Produkt. Das Enzym ist im Überschuss in seneszenten Zellen vorhanden, so dass die Reaktion auch bei suboptimalem pH-Wert von 6,0 positiv ist [101, 102]. Zellen der Passage 20 wiesen ca. 80% SA- β -Gal-positive Zellen auf (Abbildung 7B). In Übereinstimmung mit den Western Blot-Daten, zeigte die Immunfluoreszenz-Färbung von p21 einen deutlichen Anstieg des p21-Signals im Zellkern von seneszenten HUVEC (Abbildung 8).

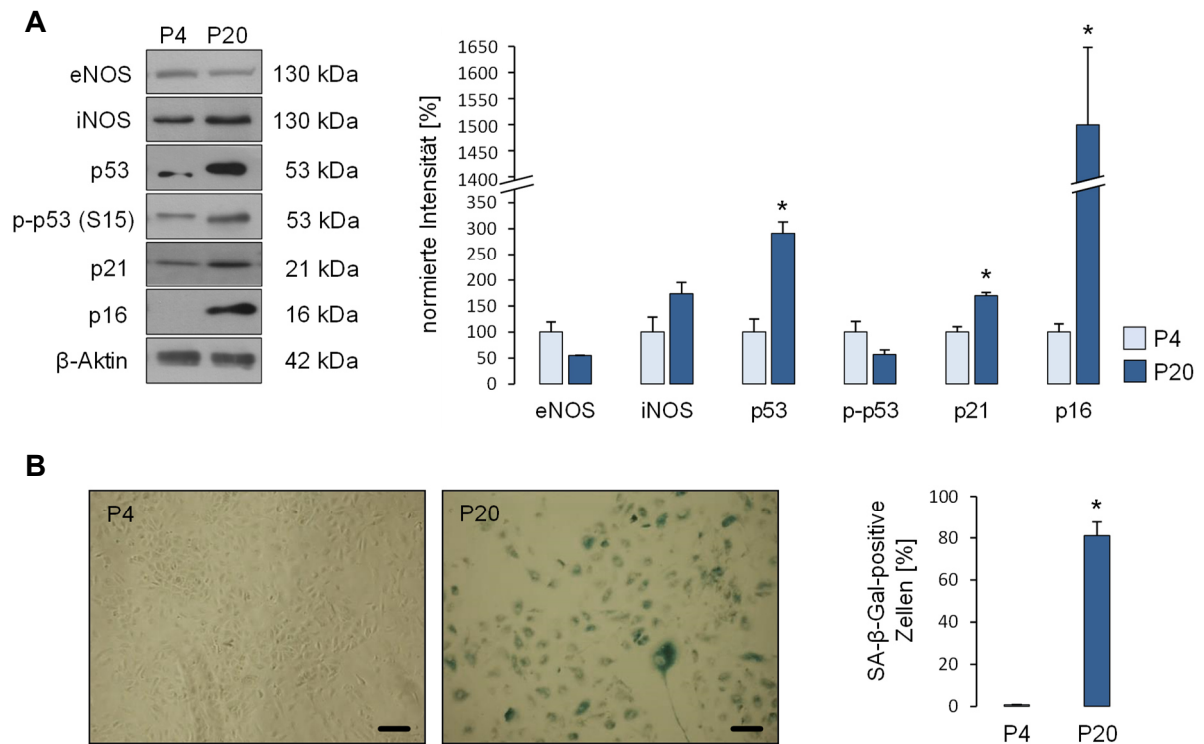


Abbildung 7: Replikativ gealterte HUVEC zeigen typische Merkmale der Seneszenz.
A. HUVEC der Passage 4 (P4) und Passage 20 (P20) wurden lysiert und im Western Blot mit spezifischen Antikörpern gegen die dargestellten Signalproteine angefärbt. Die Proteinbanden wurden densitometrisch ausgewertet. Gezeigt sind jeweils ein repräsentativer Blot und die Mittelwerte der densitometrischen Auswertung mit SEM. Die Normierung von phospho-p53 (p-p53) erfolgte auf p53, die restlichen Signalproteine wurden auf β-Aktin normiert. * $p < 0,05$ im Vergleich zu HUVEC P4. $n = 3$. **B.** Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Bild der SA-β-Gal-Färbung von HUVEC der Passage 4 und Passage 20 und die Quantifizierung durch Auszählung der Zellen. Maßstabsleiste = 20 μm . * $p < 0,05$ im Vergleich zu HUVEC P4. $n = 3$. (Western Blot-Analyse und SA-β-Gal-Färbung durchgeführt von Dr. Odetta Meçe) [129]

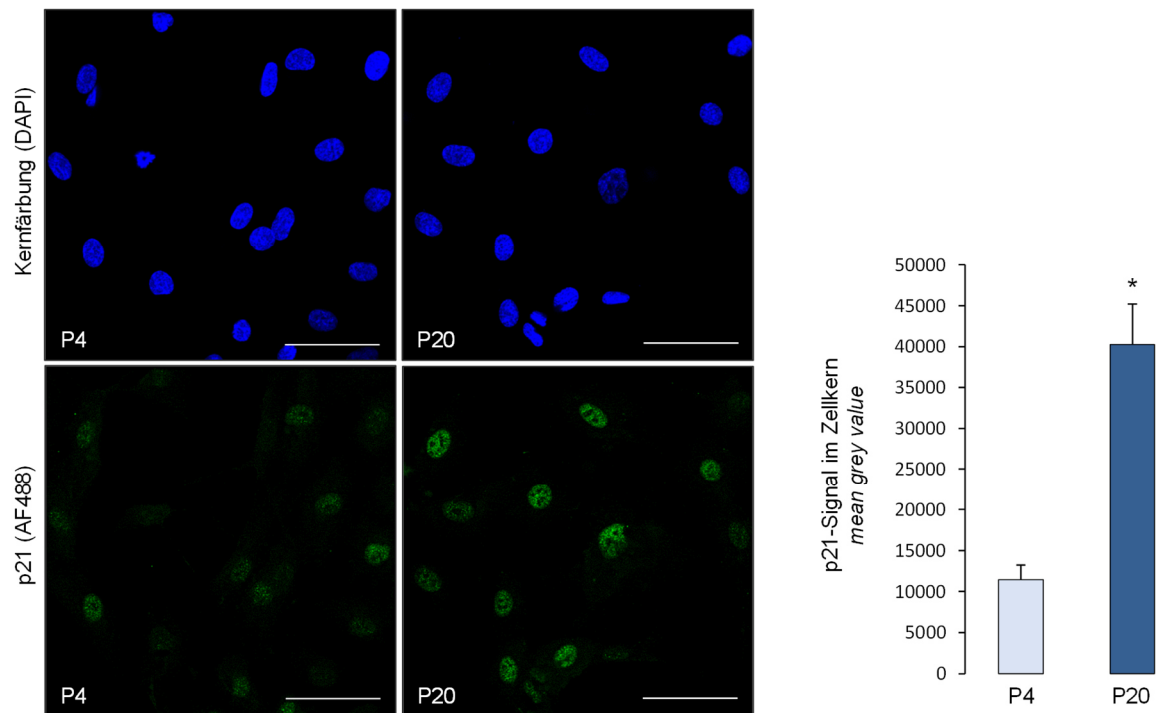


Abbildung 8: Replikativ gealterte HUVEC zeigen eine erhöhte p21-Expression in Immunfluoreszenz-Analysen. HUVEC der Passage 4 (P4) und der Passage 20 (P20) wurden mit einem Antikörper gegen p21 und mit DAPI angefärbt. Der *mean grey value* des p21-Signals im Zellkern wurde berechnet. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Bild pro Bedingung und Mittelwert mit SEM. Maßstabsleiste=50 μ m. * $p < 0,05$ im Vergleich zu HUVEC P4. $n=3$.

3.1.2 Expression und Aktivität der AMPK in replikativ seneszenten Zellen

Zur Charakterisierung des AMPK-Signalwegs wurden zunächst die Expression und die Aktivität der AMPK in replikativ seneszenten Zellen unter basalen Bedingungen untersucht. Abbildung 9 zeigt, dass die AMPK-Expression in seneszenten HUVEC deutlich erhöht war.

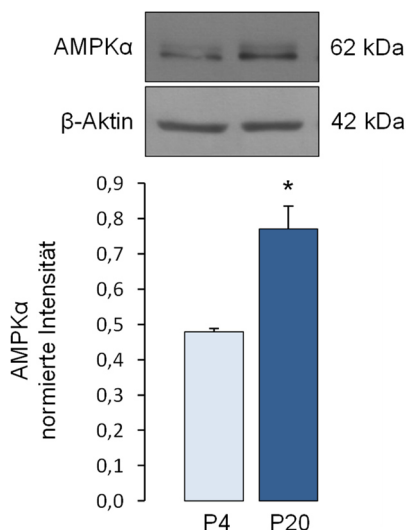


Abbildung 9: Die Expression der AMPK ist in seneszenten HUVEC erhöht. Zellysate von HUVEC der Passage 4 (P4) und der Passage 20 (P20) wurden mittels Western Blot analysiert und mit Antikörpern gegen AMPK α und β -Aktin angefärbt. Die Signale wurden densitometrisch ausgewertet. Dargestellt sind ein repräsentativer Blot und die Mittelwerte der Daten mit SEM. * $p < 0,05$ gegen HUVEC P4. $n=3$.

Zur Ermittlung der basalen Aktivität wurden zwei Zugänge gewählt, einmal die Bestimmung der Serin-Phosphorylierung eines artifiziellen Substrat-Peptides durch die AMPK in Zelllysaten und zum anderen der Nachweis der Phosphorylierung von AMPK-Substraten in Zelllysaten anhand eines Phospho-AMPK-Substrat-Motiv-Antikörpers (LXRXX(pS/pT)).

In Abbildung 10 ist zu sehen, dass die basale Aktivität der AMPK in Lysaten von seneszenten HUVEC, gemessen als *in-vitro*-Phosphorylierung eines spezifischen Peptides, nicht verändert ist. Bei Betrachtung der Phosphorylierungsmuster, die durch eine Anfärbung der Zellproteine mit dem Substrat-Motiv-Antikörper erhalten wurden, zeigte sich in der Summe keine signifikante Veränderung des Phosphorylierungsmusters (Abbildung 11A). Einzelne Banden wiesen aber Verringerungen oder Anstiege des Phosphorylierungssignals auf. Dies wird in Abbildung 11B anhand von zwei Beispielbanden verdeutlicht. Bande 1 zeigte eine signifikante Verringerung der Substratphosphorylierung in seneszenten HUVEC, wohingegen Bande 2 einen signifikanten Anstieg aufwies. Eine derartige Veränderung des Phosphorylierungsmusters kann durch eine geänderte Substratverfügbarkeit in alten Zellen erklärt werden oder aber auch auf eine unterschiedliche Substratspezifität der AMPK in seneszenten HUVEC hinweisen.

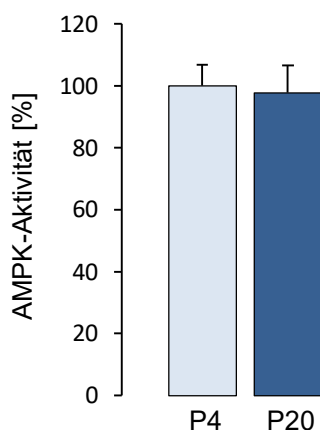


Abbildung 10: Die basale Aktivität der AMPK ist in seneszenten HUVEC nicht verändert. HUVEC der Passage 4 (P4) und der Passage 20 (P20) wurden lysiert. Die AMPK-Aktivität wurde mit dem Cyclex® AMPK Kinase Assay Kit bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte der Daten mit SEM. n=6. (AMPK Kinase Assay durchgeführt von Dr. Katrin Spengler)

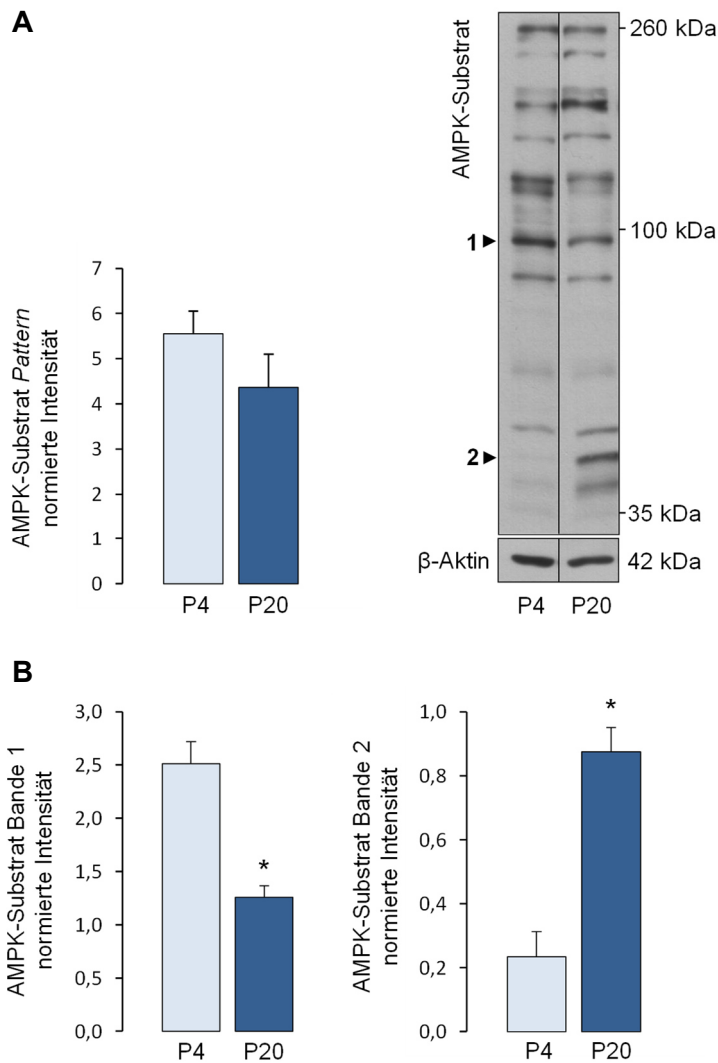


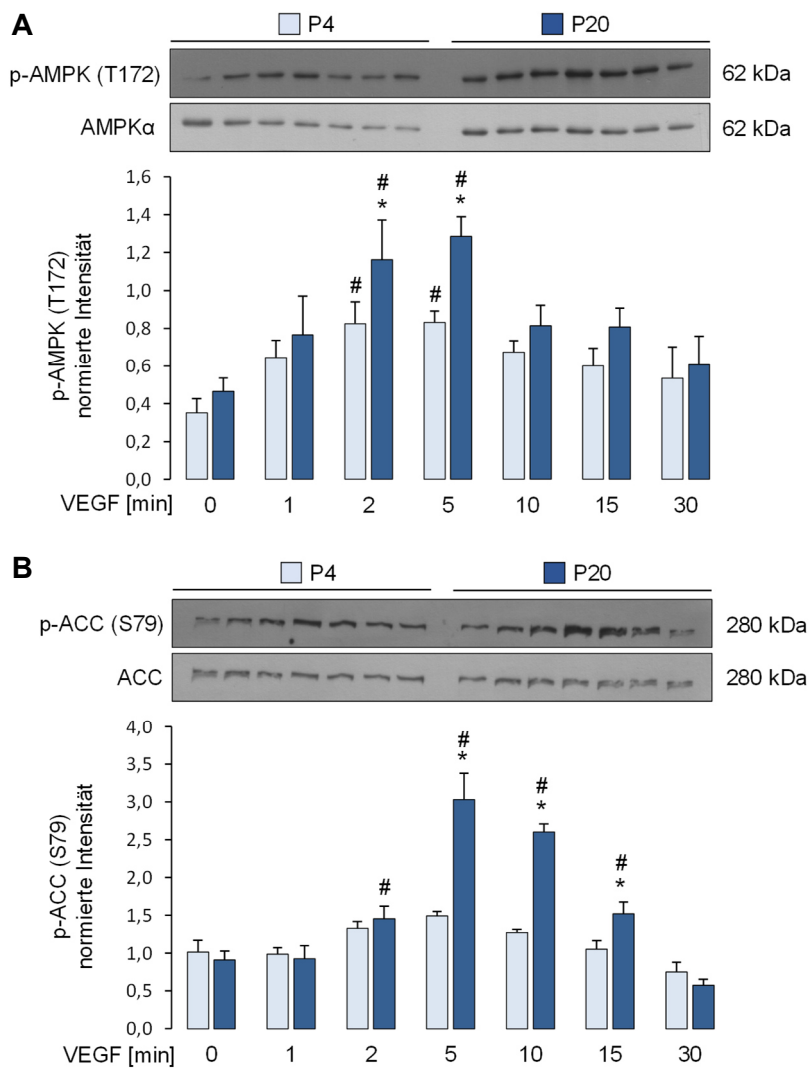
Abbildung 11: Die AMPK-Substratphosphorylierung ist in seneszenten HUVEC verändert. HUVEC der Passage 4 (P4) und der Passage 20 (P20) wurden lysiert. Die Zellysate wurden mittels Western Blot analysiert und mit Antikörpern gegen AMPK-Substrat und β -Aktin angefärbt. Die Signale wurden densitometrisch ausgewertet. **A.** Dargestellt sind ein repräsentativer Blot und die Mittelwerte der Intensität aller AMPK-Substrat-Banden mit SEM. **B.** Mittelwerte der Auswertung von zwei Beispielbanden mit SEM. * $p < 0,05$ gegen HUVEC P4. $n=3$ (A+B).

3.1.3 Aktivierbarkeit der AMPK in replikativ seneszenten Zellen durch physiologische Stimuli

Um herauszufinden, ob die Aktivierbarkeit der AMPK in seneszenten HUVEC verändert ist, wurden junge (Passage 4) und seneszente HUVEC (Passage 20) mit verschiedenen AMPK-Aktivatoren stimuliert. Als einer dieser Stimuli wurde VEGF gewählt, ein potenter AMPK-Agonist in Endothelzellen, der über eine Bindung an den VEGFR2 und Aktivierung der AMPK-Kinase CaMKK2 wirkt [31]. Als Maß für die AMPK-Aktivierung diente der Nachweis der Phosphorylierung am Threoninrest T172.

Abbildung 12 zeigt, dass es nach Zusatz von 50 ng/ml VEGF zu jungen Zellen zu einem signifikanten transienten Anstieg der T172-Phosphorylierung mit höchsten Werten nach 2 min und 5 min kam. Diese Phosphorylierung war in seneszenten HUVEC signifikant erhöht (Abbildung 12A).

Die Beobachtungen spiegeln sich auch bei Betrachtung der Phosphorylierung der AMPK-Substrate ACC und ULK1 wider. Die VEGF-vermittelte zeitabhängige Phosphorylierungen von ACC und ULK1 waren in seneszenten HUVEC ebenfalls signifikant gesteigert (Abbildung 12B und C).



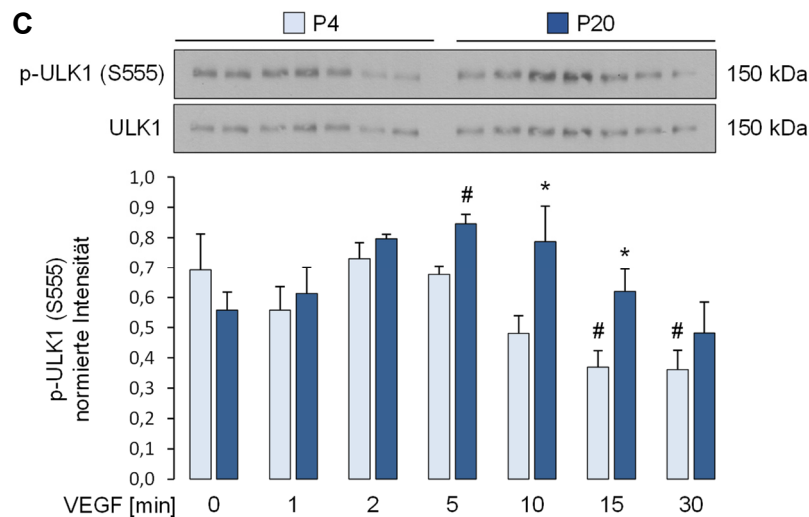


Abbildung 12: Die VEGF-induzierte AMPK-Aktivierung ist in seneszenten HUVEC erhöht. HUVEC wurden für die angegebenen Zeiten mit 50 ng/ml VEGF stimuliert. Zelllysate wurden im Western Blot mit spezifischen Antikörpern gegen p-AMPK(T172)/AMPK (A), p-ACC(S79)/ACC (B) und p-ULK1(S555)/ULK1 (C) angefärbt und die Proteinbanden wurden densitometrisch ausgewertet. Gezeigt sind jeweils ein repräsentativer Blot und die Mittelwerte der Daten mit SEM. * $p < 0,05$ gegen HUVEC P4. # $p < 0,05$ gegen unstimulierte Kontrolle der jeweiligen Passage. $n = 4-5$.

Als zweiter AMPK-Agonist wurde 2-DG gewählt, welche durch Inhibierung der Glykolyse zum Abfall des ATP-Spiegels und somit hauptsächlich zur AMP/LKB1-abhängigen Aktivierung der AMPK führt [31]. Nach Stimulierung der Zellen mit 20 mM 2-DG kam es nach 10 min zu einem signifikanten Anstieg der AMPK-Phosphorylierung in jungen und seneszenten Zellen, welcher bis 30 min andauerte. Die 2-DG-induzierte AMPK-Aktivierung war jedoch in seneszenten HUVEC gegenüber jungen Zellen geringer und nach 30 min signifikant vermindert (Abbildung 13A).

Die Phosphorylierungen der AMPK-Zielproteine ACC und ULK1 wiesen ebenfalls einen signifikanten Anstieg nach 10-30 min im Vergleich zu unstimulierten Kontrollzellen auf und auch diese Signale waren in seneszenten HUVEC gegenüber jungen Zellen signifikant vermindert (Abbildung 13B und C).

Diese Daten zeigen, dass die Aktivierbarkeit der AMPK in seneszenten HUVEC vom jeweiligen Stimulus abhängig ist. Die LKB1-abhängige Aktivierung der AMPK durch 2-DG führte zu einer verminderten Aktivierung der AMPK in seneszenten Zellen, wohingegen die CaMKK2-abhängige AMPK-Aktivierung durch VEGF in seneszenten HUVEC erhöht war.

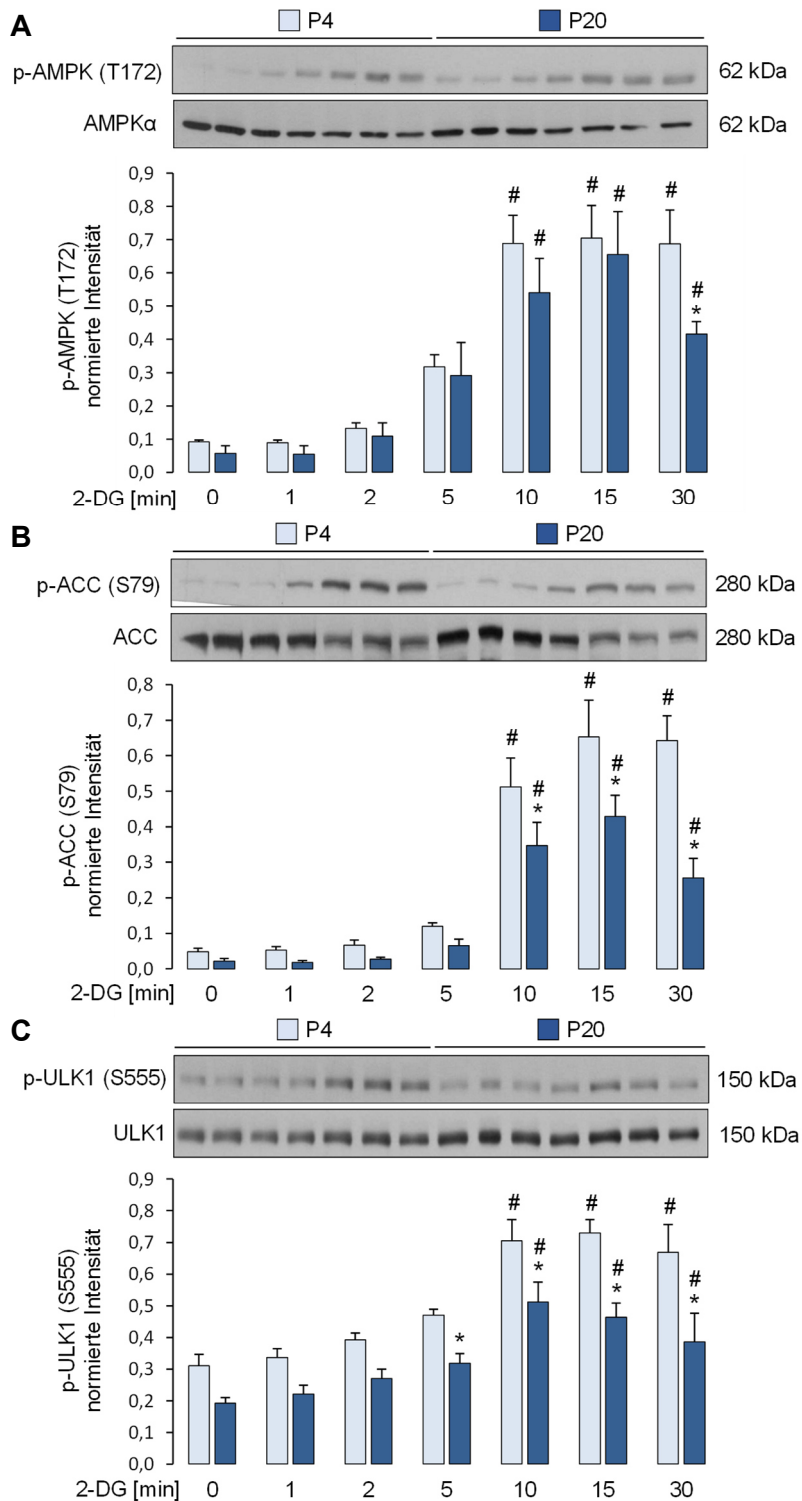


Abbildung 13: Die 2-Deoxyglukose (2-DG)-induzierte AMPK-Aktivierung ist in seneszenten HUVEC vermindert. HUVEC wurden für die angegebenen Zeiten mit 20 mM 2-DG stimuliert und lysiert. Zelllysate wurden im Western Blot mit spezifischen Antikörpern gegen p-AMPK(T172)/AMPK (A), p-ACC(S79)/ACC (B) und p-ULK1(S555)/ULK1 (C) angefärbt und die Proteinbanden wurden densitometrisch ausgewertet. Gezeigt sind jeweils ein repräsentativer Blot und die Mittelwerte der Daten mit SEM. * $p < 0,05$ gegen HUVEC P4. # $p < 0,05$ gegen unstimulierte Kontrolle der jeweiligen Passage. $n = 4$. (2-DG-Stimulation und Western Blot durchgeführt von Dr. Katrin Spengler)

Da eine mögliche Erklärung für diese Diskrepanz eine Hochregulation des VEGF-Signalwegs war, wurde im nächsten Schritt die Expression von VEGF, VEGFR2 und CaMKK2 untersucht. Abbildung 14-15 demonstrieren, dass alle drei Signalproteine in seneszenten HUVEC signifikant erhöht exprimiert sind. Das weist darauf hin, dass die Verstärkung der VEGF-Induzierten AMPK-Aktivierung auf einem erhöhten *Upstream-Signaling* beruht, welches eventuell sogar eine autokrine Regulation durch endogen freigesetzten VEGF einschließt.

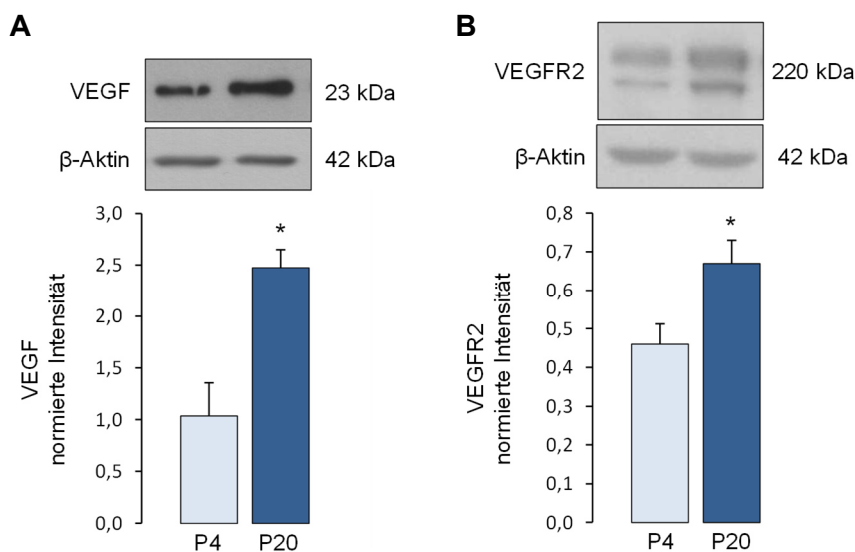


Abbildung 14: Die Expression von VEGF und VEGFR2 ist in seneszenten HUVEC erhöht. Zellysate von HUVEC der Passage 4 (P4) und der Passage 20 (P20) wurden mittels Western Blot analysiert und mit Antikörpern gegen VEGF (A), VEGFR2 (B) und β-Aktin angefärbt. Die Signale wurden densitometrisch ausgewertet. Dargestellt sind jeweils ein repräsentativer Blot und die Mittelwerte der Daten mit SEM. * $p < 0,05$ gegen HUVEC P4. $n=3$ (A), $n=6$ (B).

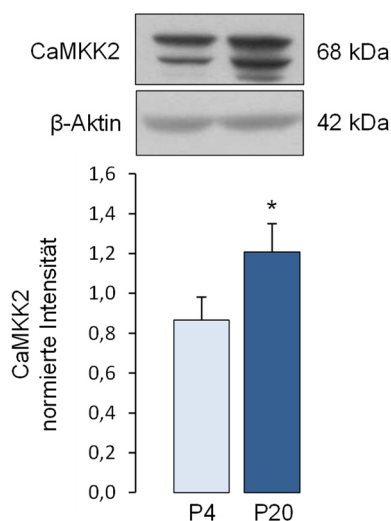


Abbildung 15: Die Expression von CaMKK2 ist in seneszenten HUVEC erhöht. Zellysate von HUVEC der Passage 4 (P4) und der Passage 20 (P20) wurden mittels Western Blot analysiert und mit Antikörpern gegen CaMKK2 und β-Aktin angefärbt. Die Signale wurden densitometrisch ausgewertet. Dargestellt sind ein repräsentativer Blot und die Mittelwerte der Daten mit SEM. * $p < 0,05$ gegen HUVEC P4. $n=6$.

3.1.4 Aktivierbarkeit der AMPK nach stress-induzierter Seneszenz

Die Behandlung von Endothelzellen mit H₂O₂ (50 oder 100 µM, 8 Tage) wird in der Arbeitsgruppe als Modell der Stress-induzierten vorzeitigen Seneszenz genutzt (Daten nicht gezeigt). Wie in Abbildung 16 zu sehen ist, ist in diesem Modell eine Erhöhung der AMPK-Aktivität, gemessen als T172-Phosphorylierung, zu sehen, während die Expression der AMPK nicht verändert ist. Behandlung der Zellen mit H₂O₂ für 8 Tage führt zudem zu einer signifikanten Erhöhung der VEGF-vermittelten AMPK-Phosphorylierung und zum Anstieg der Phosphorylierung des AMPK-Substrats ULK1.

Da oxidativer Stress ähnliche Veränderungen der AMPK-Aktivierbarkeit induziert wie replikative Seneszenz, sollte geprüft werden, ob in seneszenten Zellen oxidativer Stress nachweisbar ist und oxidativer Stress daher zur Erhöhung der VEGF-induzierten AMPK-Aktivierung beitragen kann. In Abbildung 17 ist jedoch zu sehen, dass weder mitochondriale ROS (detektiert mit dem Indikator MitoSox) noch zelluläre ROS (detektiert durch 2',7'-Dichlorfluorescein (DCF)) in seneszenten HUVEC erhöht waren.

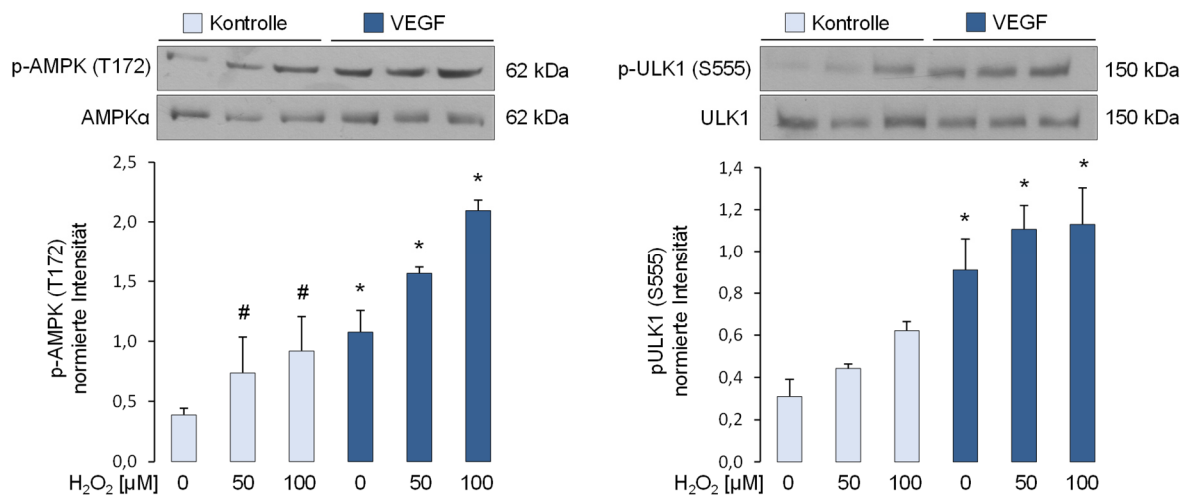


Abbildung 16: Oxidativer Stress kann zur Erhöhung der VEGF-induzierten AMPK-Aktivierung beitragen. HUVEC wurden für 8 Tage mit 50 µM oder 100 µM H₂O₂ behandelt und lysiert. Zelllysate wurden im Western Blot mit spezifischen Antikörpern gegen die dargestellten Signalproteine angefärbt und die Proteinbanden wurden densitometrisch ausgewertet. Gezeigt sind jeweils ein repräsentativer Blot und die Mittelwerte der Daten mit SEM. * p<0,05 gegen jeweilige nicht-VEGF-stimulierte Kontrolle. # p<0,05 gegen unstimulierte Kontrolle. n=3.

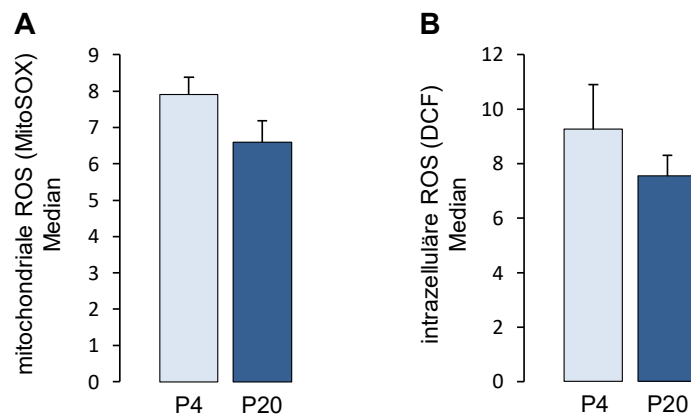


Abbildung 17: Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) sind in seneszenten HUVEC nicht erhöht. HUVEC der Passage 4 (P4) und der Passage 20 (P20) wurden für 30 min mit MitoSOX-Färbelösung (A) oder CM-H2DCFDA-Lösung (B) inkubiert, abgelöst und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte der Daten mit SEM. * $p < 0,05$ gegen HUVEC P4. **A+B.** $n=4$ (MitoSOX-, DCF-Färbung und Durchflusszytometrie durchgeführt von Dr. Katrin Spengler).

3.1.5 Charakterisierung von chronologisch gealterten Endothelzellen aus Mäusen

Vor der Untersuchung des AMPK-Signalwegs wurden Endothelzellen, die aus alten Mäusen (24 Monate) isoliert wurden, im Vergleich zu Zellen aus jungen Mäusen (2 Monate) hinsichtlich verschiedener Alterungs- und Seneszenz-Parameter charakterisiert. Die Reinheit der aus dem Lungengewebe isolierten MLEC-Kulturen lag bei über 98 %. In Abbildung 18A ist zu sehen, dass MLEC aus alten Mäusen einen Anstieg der Seneszenzmarker p53 und p21 im Western Blot zeigten. Des Weiteren ist eine signifikante Erhöhung der iNOS in alten Zellen und ein signifikant gesteigerter Anteil an SA- β -Gal-positiven Zellen in MLEC aus alten Mäusen zu erkennen. Letzterer war jedoch deutlich geringer als bei replikativ seneszenten HUVEC und lag bei ca. 5 % (Abbildung 18B).

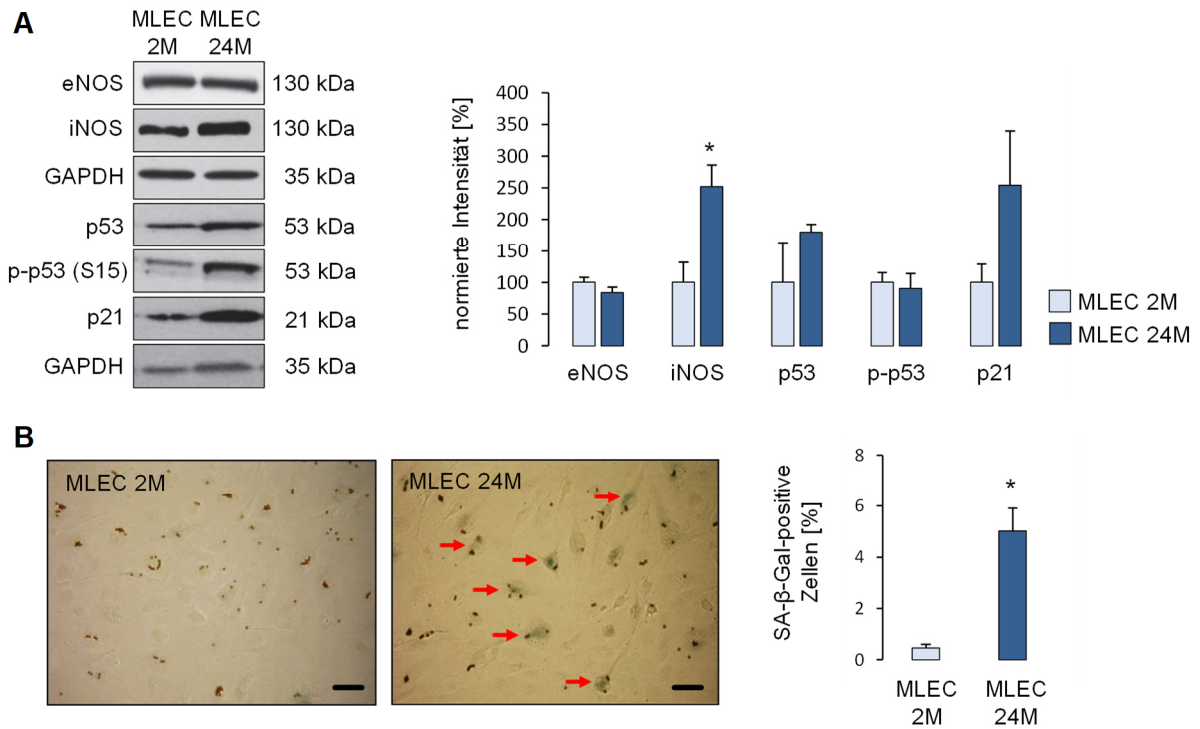


Abbildung 18: MLEC aus alten Mäusen zeigen Seneszenzmerkmale. A. MLEC aus 2 Monate alten Mäusen (MLEC 2M) und 24 Monate alten Mäusen (MLEC 24M) wurden lysiert und im Western Blot mit spezifischen Antikörpern gegen die dargestellten Signalproteine angefärbt. Die Proteinbanden wurden densitometrisch ausgewertet. Gezeigt sind jeweils ein repräsentativer Blot und die Mittelwerte der densitometrischen Auswertung mit SEM. Die Normierung von phospho-p53 erfolgte auf p53, die restlichen Signalproteine wurden auf β -Aktin normiert. * $p < 0,05$ im Vergleich zu MLEC 2M. $n = 3$. **B.** Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Bild der SA- β -Gal-Färbung von MLEC 2M und MLEC 24M und die Quantifizierung durch Auszählung der Zellen. Rote Pfeile: SA- β -Gal-positive Zellen. Maßstabsleiste = 20 μm . * $p < 0,05$ im Vergleich zu MLEC 2M. $n = 7$. (Western Blot-Analyse und SA- β -Gal-Färbung durchgeführt von Dr. Odeta Meçe) [129]

3.1.6 Expression und Aktivität der AMPK in chronologisch gealterten Endothelzellen

Zunächst wurden auch in chronologisch gealterten Endothelzellen die Expression und Aktivität der AMPK unter basalen Bedingungen untersucht. Abbildung 19 zeigt, dass die Expression der AMPK in MLEC aus alten Mäusen signifikant erhöht ist.

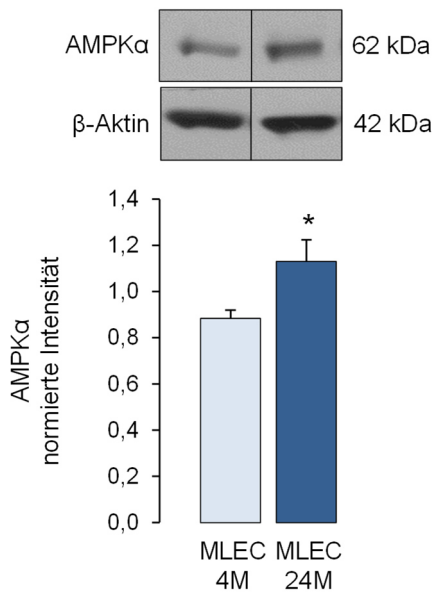


Abbildung 19: Die Expression der AMPK ist in MLEC aus alten Mäusen erhöht. Zellsate von MLEC aus 4 Monate alten Mäusen (MLEC 4M) und 24 Monate alten Mäusen (MLEC 24M) wurden mittels Western Blot analysiert und mit Antikörpern gegen AMPK α und β -Aktin angefärbt. Die Signale wurden densitometrisch ausgewertet. Dargestellt sind ein repräsentativer Blot und die Mittelwerte der Daten mit SEM. * $p < 0,05$ gegen MLEC 4M. $n = 5$.

In Abbildung 20 ist zu sehen, dass die basale Aktivität der AMPK gemessen als *in-vitro*-Phosphorylierung eines AMPK-spezifischen Substratpeptids in MLEC aus alten Mäusen leicht erhöht war. Dieser Unterschied wird deutlicher, wenn man die Phosphorylierung der mit einem Phospho-AMPK-Substrat-Motiv-Antikörper angefärbten Proteine im Western Blot betrachtet. Wie in Abbildung 21 zu erkennen, war die AMPK-Substratphosphorylierung in chronologisch gealterten MLEC signifikant erhöht. In Übereinstimmung damit, kann man in Abbildung 22 eine signifikant erhöhte basale Phosphorylierung der ACC erkennen.

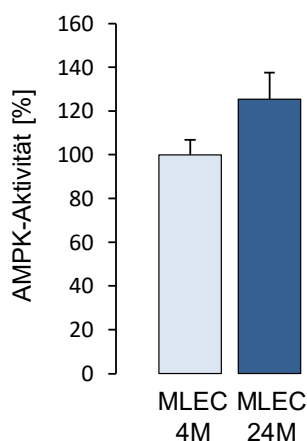


Abbildung 20: Die basale Aktivität der AMPK ist in MLEC aus alten Mäusen tendenziell erhöht. MLEC aus 4 Monate alten Mäusen (MLEC 4M) und 24 Monate alten Mäusen (MLEC 24M) wurden lysiert. Die AMPK-Aktivität wurde mit dem Cyclex® AMPK Kinase Assay Kit bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte der Daten mit SEM. $n = 6$. (AMPK Kinase Assay durchgeführt von Dr. Katrin Spengler)

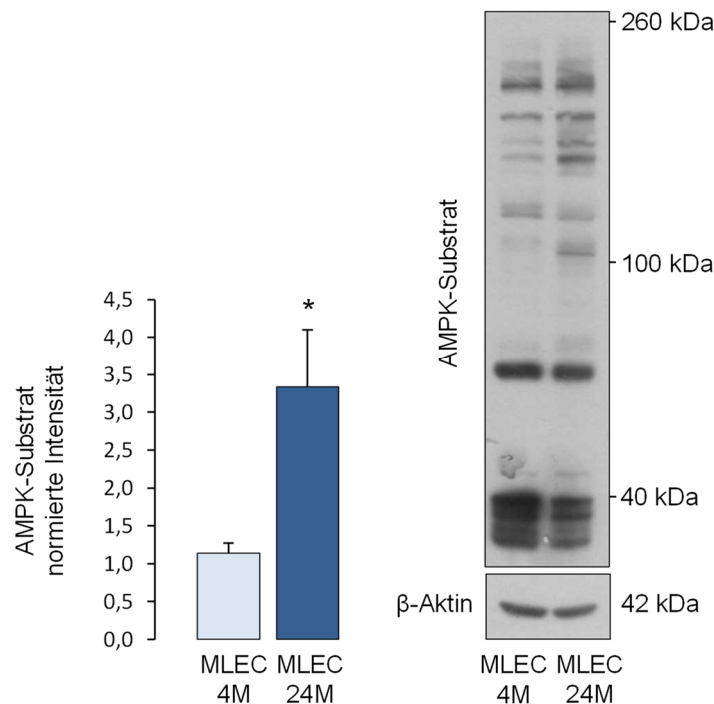


Abbildung 21: Die AMPK-Substratphosphorylierung ist in MLEC aus alten Mäusen erhöht. MLEC aus 4 Monate alten Mäusen (MLEC 4M) und 24 Monate alten Mäusen (MLEC 24M) wurden lysiert. Die Zellysate wurden mittels Western Blot analysiert und mit Antikörpern gegen AMPK-Substrat und β -Aktin angefärbt. Die Signale wurden densitometrisch ausgewertet. Dargestellt sind ein repräsentativer Blot und die Mittelwerte der Daten mit SEM. * $p < 0,05$ gegen HUVEC P4. $n = 5$.

3.1.7 Aktivierbarkeit der AMPK in chronologisch gealterten Endothelzellen durch physiologische Stimuli

In Analogie zu den in Kapitel 3.1.3 beschriebenen Experimenten in HUVEC wurden auch MLEC aus jungen und alten Mäusen mit den AMPK-Agonisten VEGF und 2-DG behandelt, um herauszufinden, ob die Aktivierbarkeit der AMPK Veränderungen aufweist. Dazu wurde die aktivierende Phosphorylierung der AMPK am Threoninrest T172 untersucht.

VEGF-Stimulation führte auch in MLEC zu einem signifikanten Anstieg der T172-Phosphorylierung mit den höchsten Werten nach 2 und 5 min (Abbildung 22A). Diese Phosphorylierung war in MLEC, die aus alten Mäusen präpariert worden waren, gegenüber den Zellen aus jungen Mäusen verringert. Das zeigte sich besonders in frühen Zeiten nach VEGF-Zusatz (1 und 2 min), wo signifikante Veränderungen zu beobachten waren (Abbildung 22A).

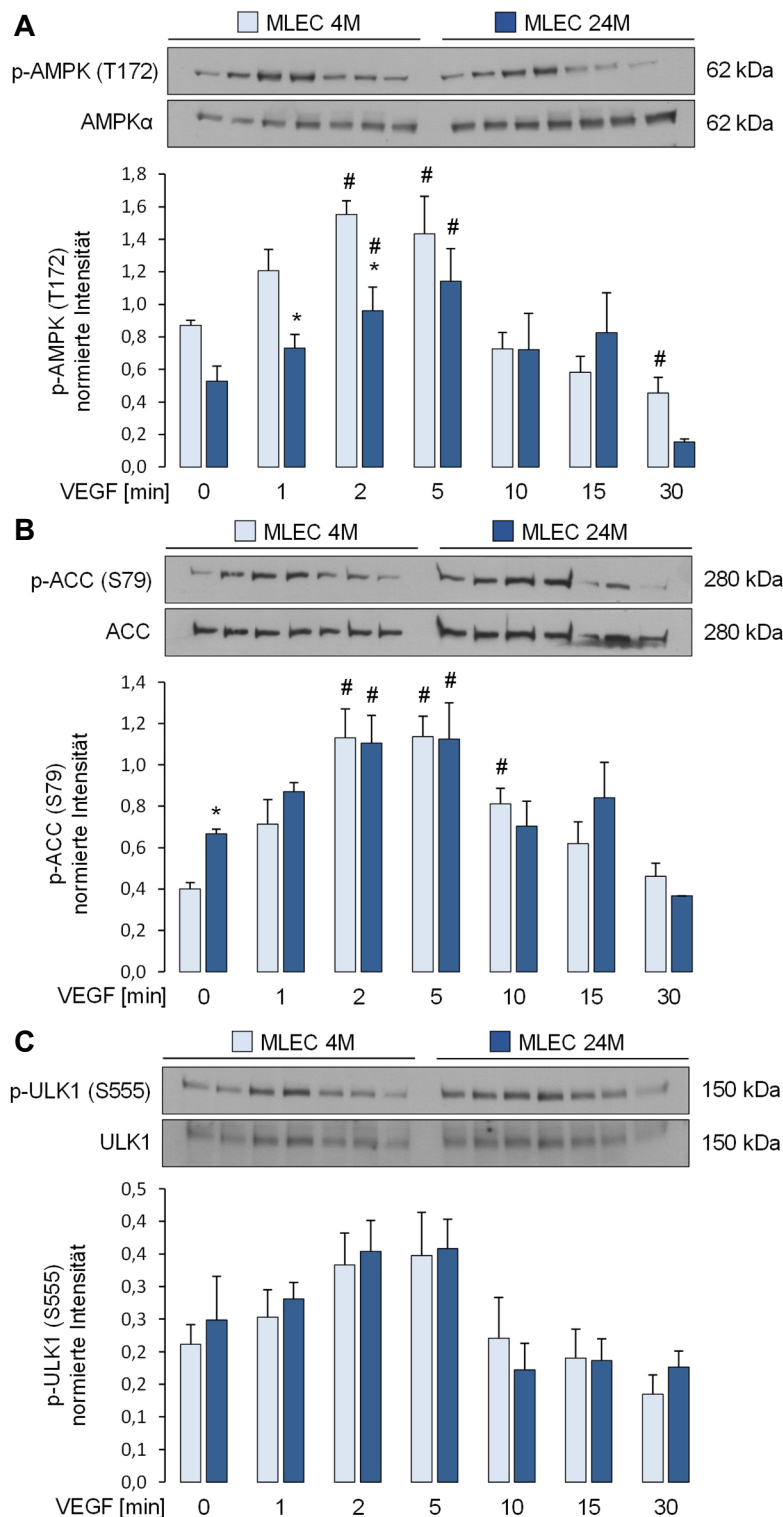


Abbildung 22: Die verringerte VEGF-induzierte AMPK-Aktivierung in MLEC aus alten Mäusen bewirkt keine Veränderungen der Phosphorylierung von ACC und ULK1. MLEC aus 4 Monate alten Mäusen (MLEC 4M) und 24 Monate alten Mäusen (MLEC 24M) wurden für die angegebenen Zeiten mit 50 ng/ml VEGF stimuliert. Zelllysate wurden im Western Blot mit spezifischen Antikörpern gegen p-AMPK(T172)/AMPK (A), p-ACC(S79)/ACC (B) und p-ULK1(S555)/ULK1 (C) angefärbt und die Proteinbanden wurden densitometrisch ausgewertet. Gezeigt sind jeweils ein repräsentativer Blot und die Mittelwerte der Daten mit SEM. * $p < 0,05$ gegen MLEC 4M. # $p < 0,05$ gegen unstimulierte Kontrolle der jeweiligen MLEC-Charge. $n = 4-5$.

Hervorzuheben ist, dass bei alleinigem Vergleich der T172-Phosphorylierungssignale zwischen jungen und alten MLEC keine Unterschiede sichtbar waren, sondern diese nur nach Normierung auf die jeweilige Expression der AMPK deutlich wurden. Das weist darauf hin, dass die erhöhte Expression der AMPK in chronologisch gealterten Mäusen eine Verringerung der AMPK-Aktivität kompensieren kann. Im Einklang damit war auch die Phosphorylierung der AMPK-Zielproteine in alten Zellen weiterhin gewährleistet. Die VEGF-vermittelte zeitabhängige Phosphorylierung von ACC und ULK1 ist in MLEC aus alten und jungen Mäusen vergleichbar (Abbildung 22B und C).

Stimulierung der Zellen mit 20 mM 2-DG führt auch in MLEC zu einem signifikanten zeitabhängigen Anstieg der AMPK-Phosphorylierung (Abbildung 23A). Dabei erfolgt die AMPK-Phosphorylierung in MLEC aus alten Mäusen im Vergleich zu MLEC aus jungen Mäusen früher und ist nach 5 und 10 min signifikant erhöht. Betrachtet man die 2-DG-vermittelte Phosphorylierung des AMPK-Zielproteins ACC, so zeigte sich ein ähnliches Bild. Bereits 5 min nach 2-DG-Stimulation war die ACC-Phosphorylierung in MLEC aus alten Mäusen signifikant erhöht und blieb auch nach 10 min deutlich stärker ausgeprägt (Abbildung 23B). Im Unterschied dazu zeigte sich die 2-DG-induzierte ULK1-Phosphorylierung in MLEC aus alten Mäusen im Vergleich zu MLEC aus jungen Mäusen verringert, was nach 2 und 10 min Signifikanz erreichte (Abbildung 23C).

Diese Daten zeigen, dass auch chronologische Alterung die Aktivierbarkeit der AMPK verändert und dass diese Veränderungen stimulusabhängig sind. Im Gegensatz zu seneszenten HUVEC führt die LKB1-abhängige Aktivierung der AMPK durch 2-DG zu einer gesteigerten Aktivierung der AMPK in gealterten MLEC, wohingegen die CaMKK2-vermittelte AMPK-Aktivierung nach VEGF eher verringert zu sein scheint.

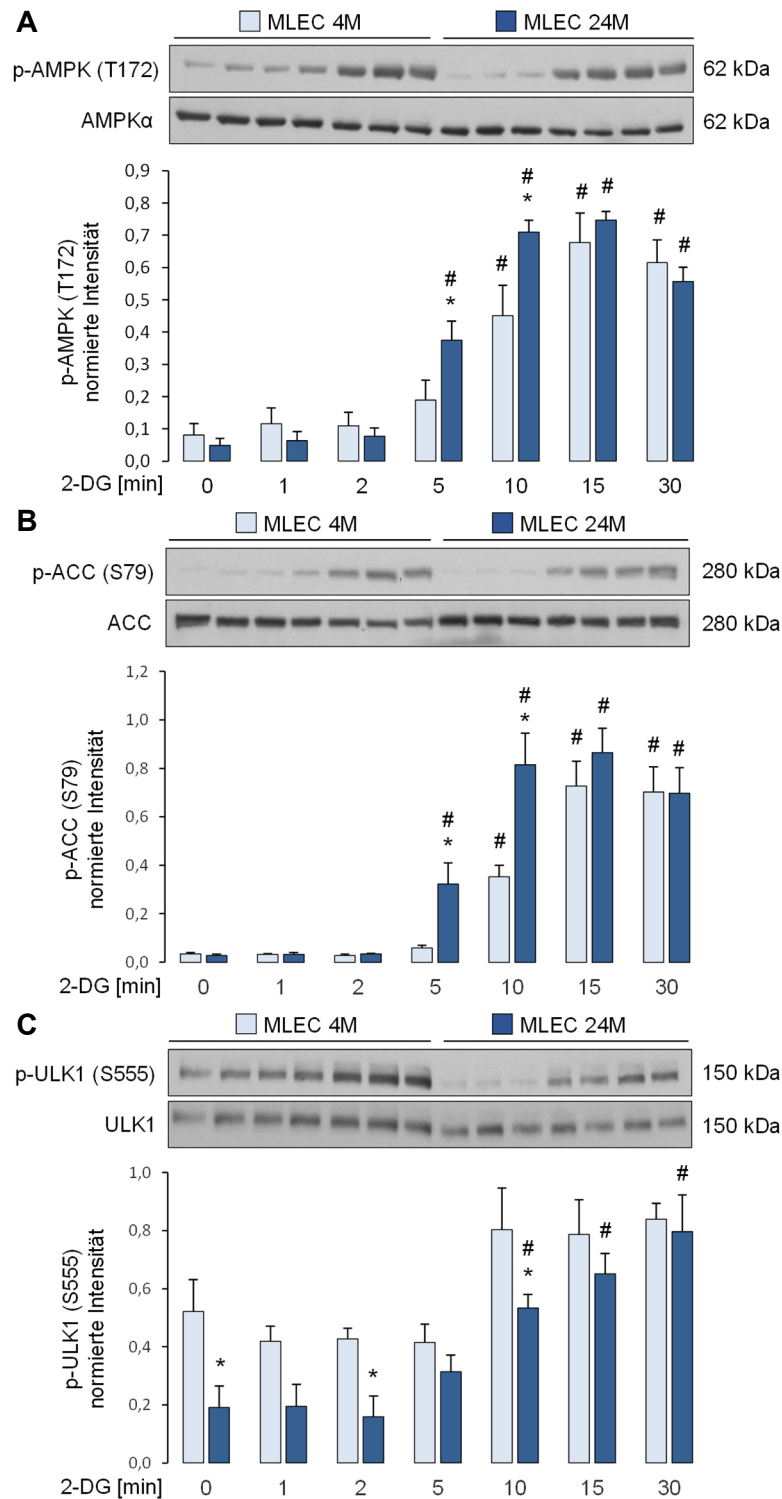


Abbildung 23: 2-Deoxyglukose(2-DG) führt in MLEC von alten Mäusen zur schnelleren Phosphorylierung von AMPK und ACC, aber zur niedrigen Phosphorylierung von ULK1. MLEC aus 4 Monate alten Mäusen (MLEC 4M) und 24 Monate alten Mäusen (MLEC 24M) wurden für die angegebenen Zeiten mit 20 mM 2-DG stimuliert und lysiert. Zelllysate wurden im Western Blot mit spezifischen Antikörpern gegen p-AMPK(T172)/AMPK (A), p-ACC(S79)/ACC (B) und p-ULK1(S555)/ULK1 (C) angefärbt und die Proteinbanden wurden densitometrisch ausgewertet. Gezeigt sind jeweils ein repräsentativer Blot und die Mittelwerte der Daten mit SEM. * p<0,05 gegen MLEC 4M. # p<0.05 gegen unstimulierte Kontrolle der jeweiligen MLEC-Charge. n=4. (2-DG-Stimulation und Western Blot durchgeführt von Dr. Katrin Spengler)

Letzteres kann mit einer geringeren Expression des VEGFR2 in MLEC aus alten Mäusen (Abbildung 24) in Zusammenhang stehen, während die Expression der CaMKK2 nicht signifikant verändert war (Abbildung 25).

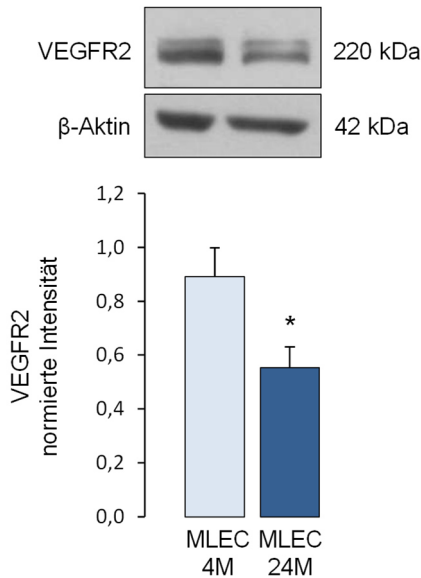


Abbildung 24: Die Expression von VEGFR2 ist in MLEC aus alten Mäusen vermindert. Zellysate von MLEC aus 4 Monate alten Mäusen (MLEC 4M) und 24 Monate alten Mäusen (MLEC 24M) wurden mittels Western Blot analysiert und mit Antikörpern gegen VEGFR2 und β -Aktin angefärbt. Die Signale wurden densitometrisch ausgewertet. Dargestellt sind ein repräsentativer Blot und die Mittelwerte der Daten mit SEM. * $p < 0,05$ gegen MLEC 4M. $n = 4-6$.

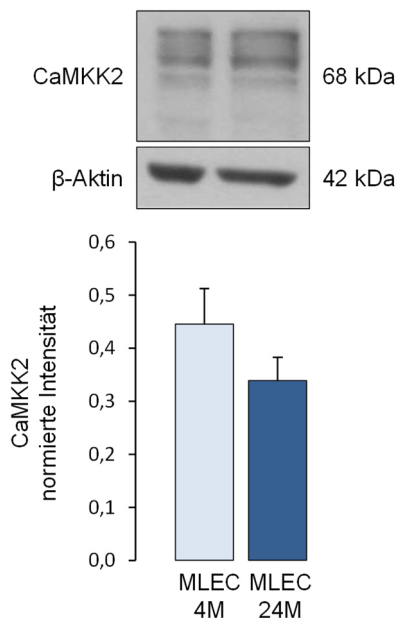


Abbildung 25: Die Expression von CaMKK2 ist in MLEC aus alten Mäusen unverändert. Zellysate von MLEC aus 4 Monate alten Mäusen (MLEC 4M) und 24 Monate alten Mäusen (MLEC 24M) wurden mittels Western Blot analysiert und mit Antikörpern gegen CaMKK2 und β -Aktin angefärbt. Die Signale wurden densitometrisch ausgewertet. Dargestellt sind ein repräsentativer Blot und die Mittelwerte der Daten mit SEM. * $p < 0,05$ gegen MLEC 4M. $n = 4-6$.

Möglicherweise spielt bei der gesteigerten 2-DG-induzierten Aktivierbarkeit der AMPK in chronologisch gealterten MLEC oxidativer Stress eine Rolle. Im Gegensatz zu seneszenten HUVEC, sind mitochondriale ROS in MLEC aus alten Mäusen signifikant

erhöht, während keine Veränderungen der durch DCF nachgewiesenen intrazellulären ROS nachweisbar waren (Abbildung 26).

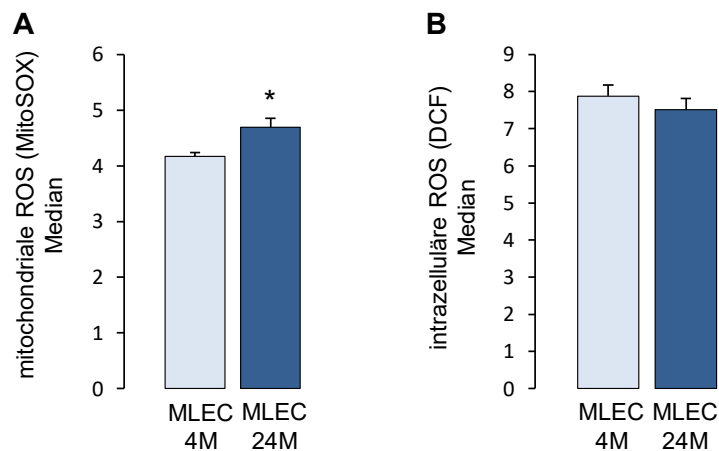


Abbildung 26: Mitochondriale reaktive Sauerstoffspezies (ROS) sind in MLEC aus alten Mäusen erhöht. MLEC aus 4 Monate alten (MLEC 4M) und 24 Monate alten (MLEC 24M) wurden für 30 min mit MitoSOX-Färbelösung (**A**) oder CM-H2DCFDA-Lösung (**B**) inkubiert, abgelöst und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte der Daten mit SEM. * $p < 0,05$ gegen HUVEC P4. **A+B**. $n=6$. (MitoSOX-, DCF-Färbung und Durchflusszytometrie durchgeführt von Dr. Katrin Spengler).

Zusammenfassend konnte in Kapitel 3.1 gezeigt werden, dass die AMPK-Expression sowohl in seneszenten HUVEC als auch in chronologisch gealterten MLEC signifikant erhöht ist. Die Aktivierbarkeit der AMPK scheint in beiden Alterungsmodellen verschieden reguliert zu sein. Die VEGF-induzierte AMPK-Phosphorylierung am T172 war in seneszenten HUVEC erhöht, was vermutlich auf den Anstieg der VEGFR2- und CaMKK2-Expression in diesen Zellen zurückzuführen ist. In MLEC aus alten Mäusen war dagegen eine Verminderung der AMPK-Phosphorylierung nach VEGF-Stimulation und eine Verringerung der VEGFR2 Expression zu erkennen. Eine Steigerung der 2-DG-induzierten Phosphorylierung der AMPK in MLEC aus alten Mäusen steht möglicherweise mit erhöhtem oxidativem Stress in diesen Zellen in Zusammenhang.

3.2 Seneszenz und zelluläre Alterung nach *Knockdown* der AMPK

Der AMPK-Signalweg spielt eine wichtige antiinflammatorische und antioxidative Rolle und kann so vermutlich der zellulären Alterung entgegenwirken. Das Ziel der Experimente in diesem Kapitel war es, zu untersuchen, ob die Herunterregulierung der AMPK mittels RNAi-Technologie in HUVEC Alterung und Seneszenz beeinflussen.

3.2.1 Einfluss der AMPK α -siRNA auf Marker der zellulären Seneszenz

Zunächst wurde der Einfluss der AMPK-Herunterregulierung auf die Expression von Seneszenzmarkern untersucht. Hierfür wurden HUVEC mit spezifischer siRNA gegen AMPK α 1 und/oder AMPK α 2, den beiden Isoformen der katalytischen Untereinheit der AMPK, behandelt. Wie in Abbildung 27A zu sehen ist, zeigen Endothelzellen, in denen AMPK α 1 durch siRNA herunterreguliert wurde, einen signifikanten Anstieg der Seneszenzmarker p53, phospho-p53 und p21 im Western Blot. Des Weiteren war eine signifikante Verringerung der eNOS sowie ein signifikanter Anstieg der iNOS zu erkennen. Damit waren in AMPK α 1-defizienten Zellen die gleichen Veränderungen zu sehen, die auch in replikativ seneszenten Zellen zu beobachten waren (Kapitel 3.1.1). Bemerkenswert ist, dass die Herunterregulierung der AMPK α 1 durch siRNA zu einem Anstieg der AMPK α 2 führte (Abbildung 27A).

Im Gegensatz zu den Veränderungen nach AMPK α 1-siRNA zeigen HUVEC, in denen AMPK α 2 durch siRNA herunterreguliert wurde, keine signifikante Änderung der Seneszenzmarker p53, phospho-p53 und p21, aber einen signifikanten Anstieg der eNOS und eine signifikante Verringerung der iNOS (Abbildung 27B). In Zellen, in denen beide AMPK α -Isoformen durch siRNA herunterreguliert wurden, war eine Tendenz zum Anstieg von Seneszenzmarkern und ein signifikanter Anstieg von p21 im Western Blot nachzuweisen (Abbildung 27C).

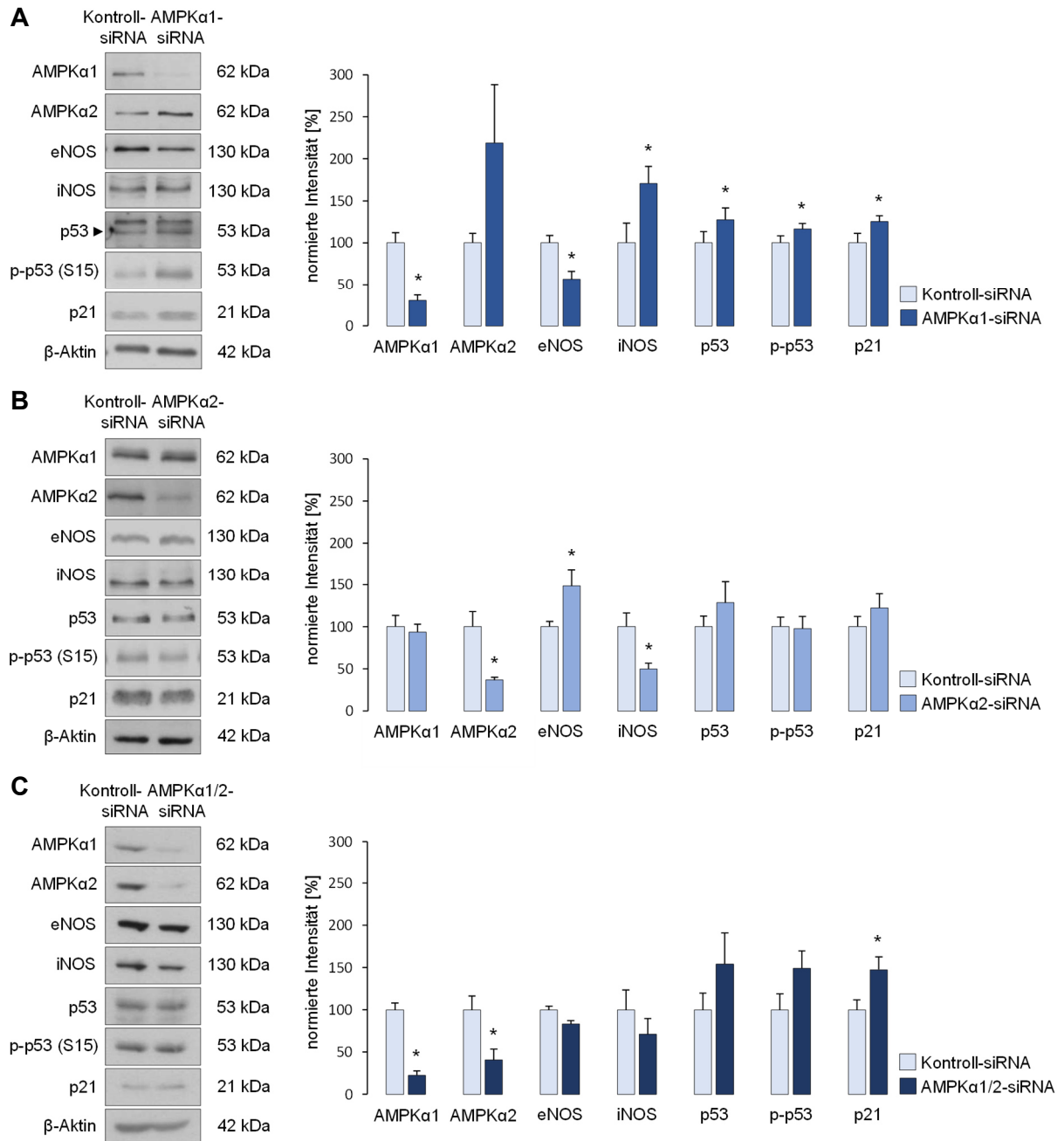


Abbildung 27: Herunterregulierung der AMPKα1 führt zur Erhöhung von Seneszenzmarkern. HUVEC wurden mit siRNA gegen AMPKα1 (A), AMPKα2 (B) oder AMPKα1/2 (C), behandelt. 72 h nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert. Zelllysate wurden im Western Blot mit spezifischen Antikörpern gegen die dargestellten Signalproteine angefärbt und die Proteinbanden wurden densitometrisch ausgewertet. Gezeigt sind jeweils ein repräsentativer Blot und die Mittelwerte der Daten mit SEM. Die Normierung von phospho-p53 erfolgte auf p53, die restlichen Signalproteine wurden auf β-Aktin normiert. * p<0,05 gegen Kontroll-siRNA. n=3-11 (A) , n=3-9 (B) , n=6 (C).

In Übereinstimmung mit den Western Blot-Daten konnte auch ein signifikanter Anstieg des p21-Immunfluoreszenz-Signals im Zellkern AMPK α 1-defizienter Zellen nachgewiesen werden, während in AMPK α 2-defiziente Zellen kein Unterschied zu Kontroll-siRNA-behandelten Zellen zu sehen war (Abbildung 28).

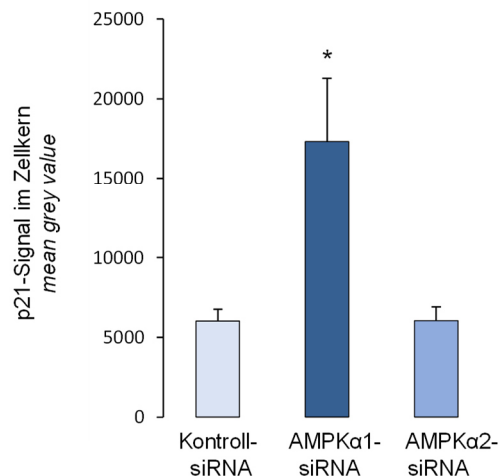
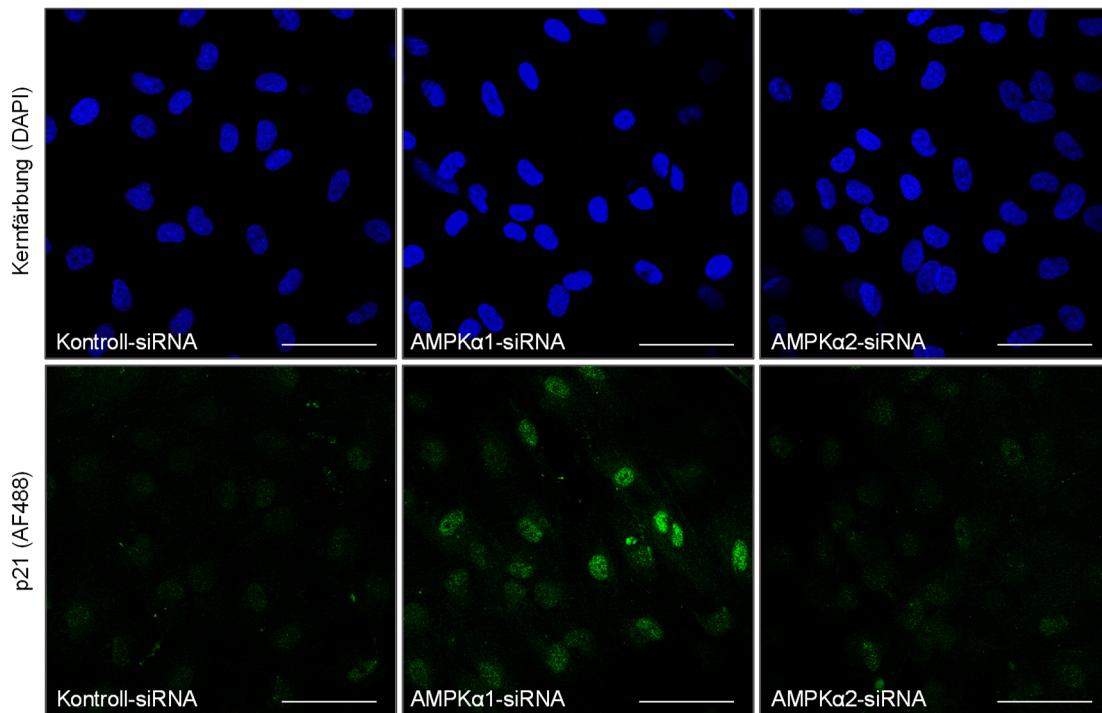


Abbildung 28: Herunterregulierung der AMPK α 1 führt zu einem Anstieg von p21 in Immunfluoreszenz-Analysen. HUVEC wurden mit siRNA gegen AMPK α 1 oder AMPK α 2 behandelt. Nach 72 h wurden die Zellen mit einem Antikörper gegen p21 und mit DAPI angefärbt. Der *mean grey value* des p21 Signals im Zellkern wurde berechnet. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Bild pro Bedingung und Mittelwert mit SEM. * $p < 0,05$ im Vergleich zur Kontroll-siRNA. $n=3$.

Die Herunterregulierung der AMPK α 1 führte auch zu einem signifikanten Anstieg SA- β -Gal-positiver Zellen, was einen weiteren Hinweis auf die Entwicklung einer Seneszenz darstellt. Demgegenüber zeigen Zellen, in denen AMPK α 2 durch siRNA herunterreguliert wurde, im Vergleich zu Kontroll-siRNA-behandelten Zellen keine Veränderung der SA- β -Gal-Färbung. Die Herunterregulierung beider AMPK α -Isoformen führte zu einem signifikanten Anstieg SA- β -Gal-positiver Zellen, der jedoch geringer ausfiel als bei AMPK α 1-defizienten Zellen (Abbildung 29). Da die Herunterregulierung beider AMPK α -Isoformen in den bisher gezeigten Experimenten zu ähnlichen Ergebnissen führte wie die alleinige Depletion der AMPK α 1, wurde in den folgenden Versuchen auf den Doppel-*Knockdown* verzichtet.

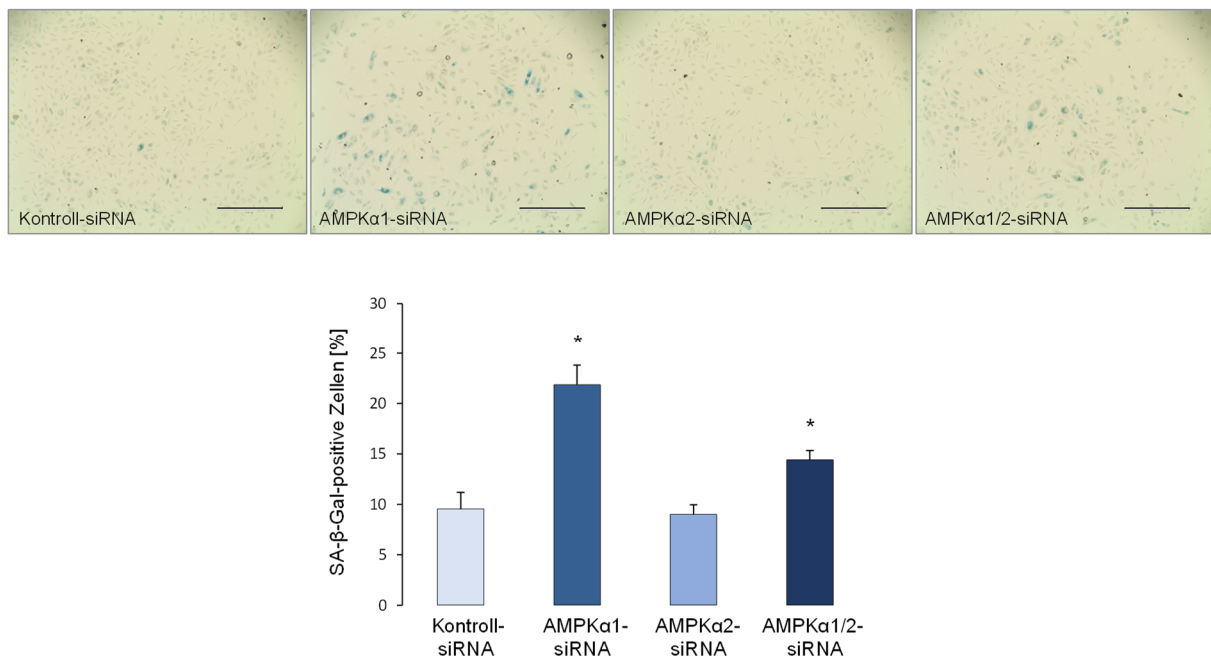


Abbildung 29: Herunterregulierung der AMPK α 1 führt zu einem Anstieg seneszenz-assoziiertes β -Galaktosidase (SA- β -Gal)-positiver Zellen. HUVEC wurden mit siRNA gegen AMPK α 1, AMPK α 2 oder AMPK α 1/2 behandelt. 72 h nach der Transfektion wurde die SA- β -Gal-Färbung durchgeführt. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Bild der SA- β -Gal-Färbung pro Bedingung und die Quantifizierung durch Auszählung der Zellen. Maßstabsleiste=400 μ m. * $p < 0,05$ im Vergleich zur Kontrolle. $n = 4$.

3.2.2 Einfluss der AMPK α -siRNA auf die Funktion der Lysosomen

Da eine Erhöhung der SA- β -Gal-Färbung in seneszenten Zellen mit einer Akkumulation von Lysosomen einhergeht, wurde überprüft, ob die Herunterregulierung der AMPK α -Isoformen zu Veränderungen der lysosomalen Aktivität führt. Untersuchungen mit dem *Lysosomal Intracellular Activity Assay Kit* zeigten einen

Anstieg der Lysosomenaktivität in Zellen, in denen AMPK α 1 mit siRNA herunterreguliert wurde, während in AMPK α 2-defizienten Zellen keine Veränderung beobachtet werden konnte (Abbildung 30). Als Negativkontrolle dienten Zellen, die mit Bafilomycin A1 behandelt wurden. Bafilomycin A1 ist ein Inhibitor der lysosomalen V-ATPase, der bewirkt, dass lysosomale Enzyme, die ihr pH-Optimum im sauren Bereich haben, gehemmt werden [130].

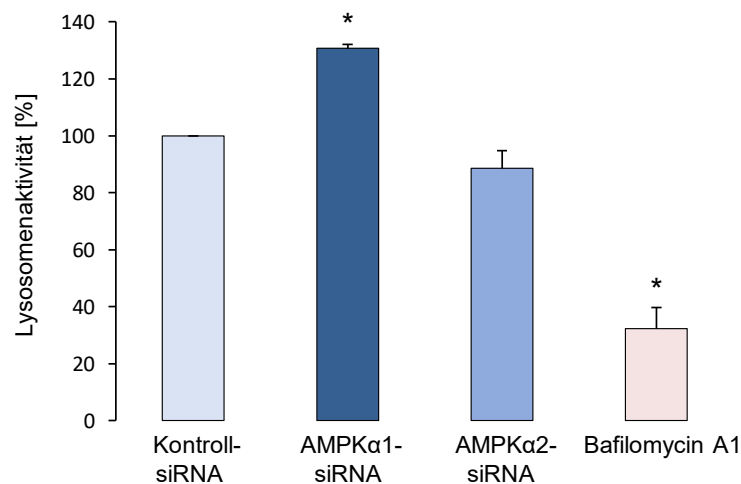


Abbildung 30: Herunterregulierung der AMPK α 1 führt zu einem Anstieg der Lysosomenaktivität. HUVEC wurden mit siRNA gegen AMPK α 1 oder AMPK α 2 behandelt. 72 h nach der Transfektion wurde die Lysosomenaktivität mit dem *Lysosomal Intracellular Activity Assay Kit* von Biovision bestimmt. Die Zellen wurden mit der Substratlösung für 1 h inkubiert, abgelöst und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die Negativkontrolle wurde für 1 h mit 50 nM Bafilomycin A1 vorinkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte der Daten mit SEM. * $p < 0,05$ gegen HUVEC P4. $n = 5$ (Aktivitätsassay und Durchflusszytometrie durchgeführt von Dr. Katrin Spengler).

3.2.3 Einfluss der AMPK α -siRNA auf zelluläre ROS und DNA-Schädigung

Die Entwicklung der Seneszenz ist häufig an intrazellulären oxidativen Stress gekoppelt. Um dies zu untersuchen, wurden in AMPK α -defizienten HUVEC ROS gemessen. Abbildung 31 zeigt einen signifikanten Anstieg mitochondrialer und intrazellulärer ROS in AMPK α 1-defizienten Zellen. Im Gegensatz dazu, waren ROS in AMPK α 2-defizienten Zellen nicht erhöht (Abbildung 31).

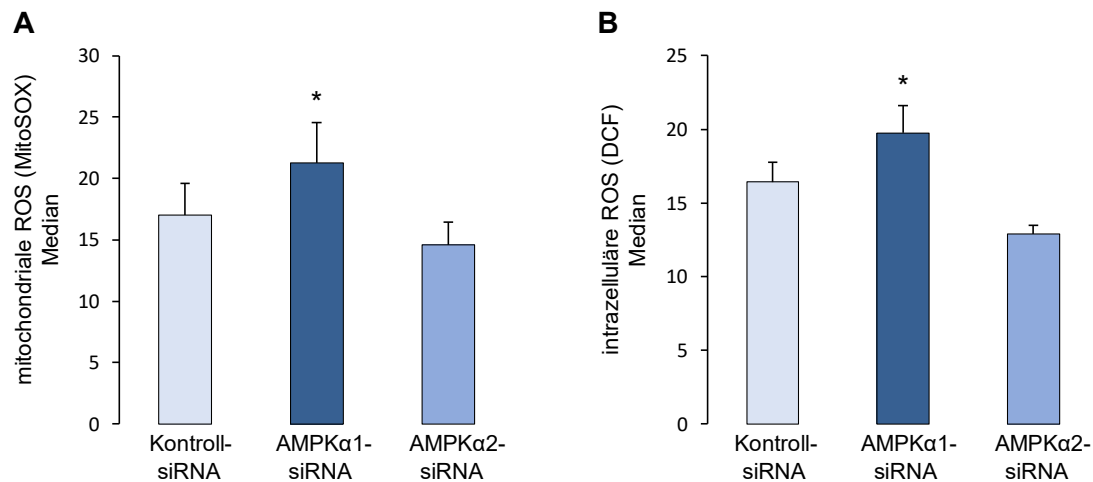


Abbildung 31: Herunterregulierung der AMPK α 1 führt zu einem Anstieg reaktiver Sauerstoffspezies (ROS). HUVEC wurden mit siRNA gegen AMPK α 1, AMPK α 2 oder AMPK α 1/2 behandelt. 72 h nach der Transfektion wurden die Zellen für 30min mit MitoSOX-Färbelösung (A) oder CM-H2DCFDA-Lösung (B) inkubiert, abgelöst und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte der Daten mit SEM. * $p < 0,05$ gegen Kontroll-siRNA. A+B. $n=8$.

Oxidativer Stress kann zu DNA-Schäden und einer Aktivierung der DNA-Schadensantwort führen. Zum Beispiel initiieren DNA-Doppelstrangbrüche die Phosphorylierung des Histons H2AX [111]. Die phosphorylierte Form von H2AX wird als γ H2AX bezeichnet und markiert die Stellen des DNA-Schadens im Zellkern [131]. Abbildung 32 zeigt, dass in Zellkernen von HUVEC, in denen AMPK α 1 mit siRNA herunterreguliert wurde, ein signifikanter Anstieg des γ H2AX-positiven Signals vorlag, was als Hinweis auf vorliegende DNA-Schäden zu deuten ist. Diese Daten befinden sich in Übereinstimmung mit der in Kapitel 3.2.1 beschriebenen Aktivierung des p53-p21-Signalwegs in AMPK α 1-defizienten Zellen, eines weiteren Anzeichens einer DNA-Schadensantwort. In AMPK α 2-defizienten Zellen war dagegen keine signifikante Veränderung der γ H2AX-Immunfluoreszenz im Vergleich zu Kontrollzellen zu erkennen. Als Positivkontrolle wurden Zellen mit Hydroxyurea behandelt, was zur Bildung von DNA-Doppelstrangbrüchen führt [132] (Abbildung 32).

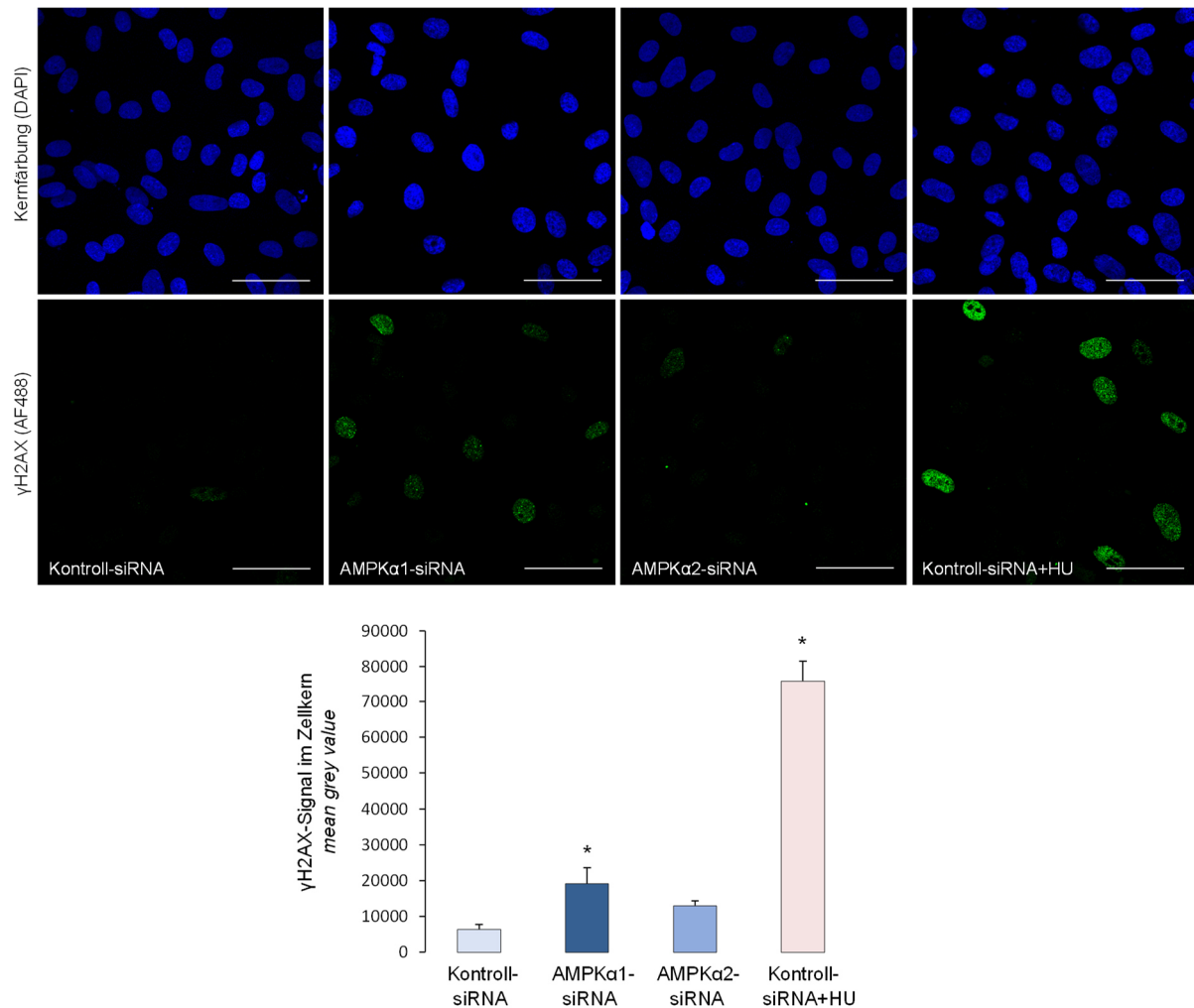


Abbildung 32: Herunterregulierung der AMPKα1 führt zu einem Anstieg von γH2AX. HUVEC wurden mit siRNA gegen AMPKα1 oder AMPKα2 behandelt. Nach 72h wurden die Zellen mit einem Antikörper gegen γH2AX und mit DAPI angefärbt. Die Positivkontrolle wurde 2 h vor Beginn der Färbung mit 1 mM Hydroxyurea behandelt. Der *mean grey value* des γH2AX Signals im Zellkern wurde berechnet. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Bild pro Bedingung und Mittelwert mit SEM. Maßstabsleiste=50 μm.* p<0,05 im Vergleich zur Kontroll-siRNA. n=6.

3.2.4 Einfluss der AMPKα-siRNA auf die Endothelzellproliferation

Eine Aktivierung des p53-p21-Signalwegs als Folge von DNA-Schäden kann zu einem Zellzyklusarrest führen [133]. In Übereinstimmung damit wurde in Zellen, 72 h nach der Transfektion mit AMPKα1-siRNA, eine signifikant verminderte Proliferation der Endothelzellen beobachtet, während die Proliferation in AMPKα2-defiziente Zellen signifikant erhöht war (Abbildung 33).

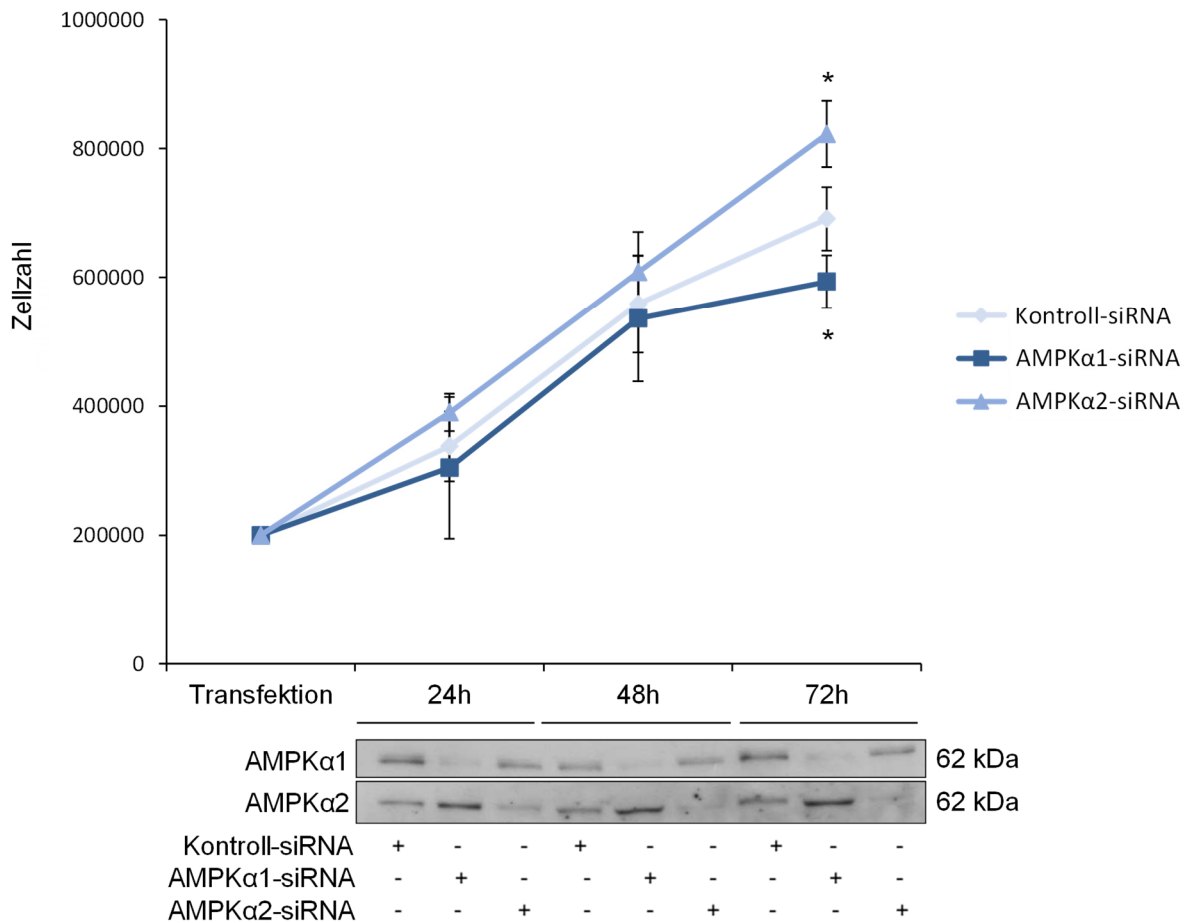


Abbildung 33: Herunterregulierung von AMPKα1 oder AMPKα2 verändert das Zellwachstum. HUVEC wurden mit siRNA gegen AMPKα1 oder AMPKα2 behandelt. Nach 24 h, 48 h und 72 h wurden die Zellen abgelöst, gezählt und anschließend lysiert. Mit den Lysaten wurden Western Blot-Analysen durchgeführt. * $p < 0,05$ im Vergleich zur Kontroll-siRNA. $n = 3$.

Zur näheren Untersuchung der veränderten Zellproliferation wurde eine Zellzyklus-Analyse durchgeführt, in welcher der prozentuale Anteil der Zellen in den Zellzyklusphasen G0/G1, S, G2 und M quantifiziert wurde. Die in Abbildung 34 dargestellten Daten zeigen, dass die Herunterregulierung von AMPKα1 zu einem Anstieg von Zellen in der G0/G1-Phase und zu einer deutlichen Verringerung des Anteils von Zellen in der S-Phase führte, was auf einen Zellzyklusarrest in der G0/G1-Phase hinweist. Dagegen war der prozentuale Anteil von Zellen in der G2- und M-Phase durch AMPKα1-siRNA nicht beeinflusst. Die Herunterregulierung der AMPKα2-Isoform führte tendenziell zu mehr Zellen in S- und M-Phase, was aber statistisch nicht zu sichern war.

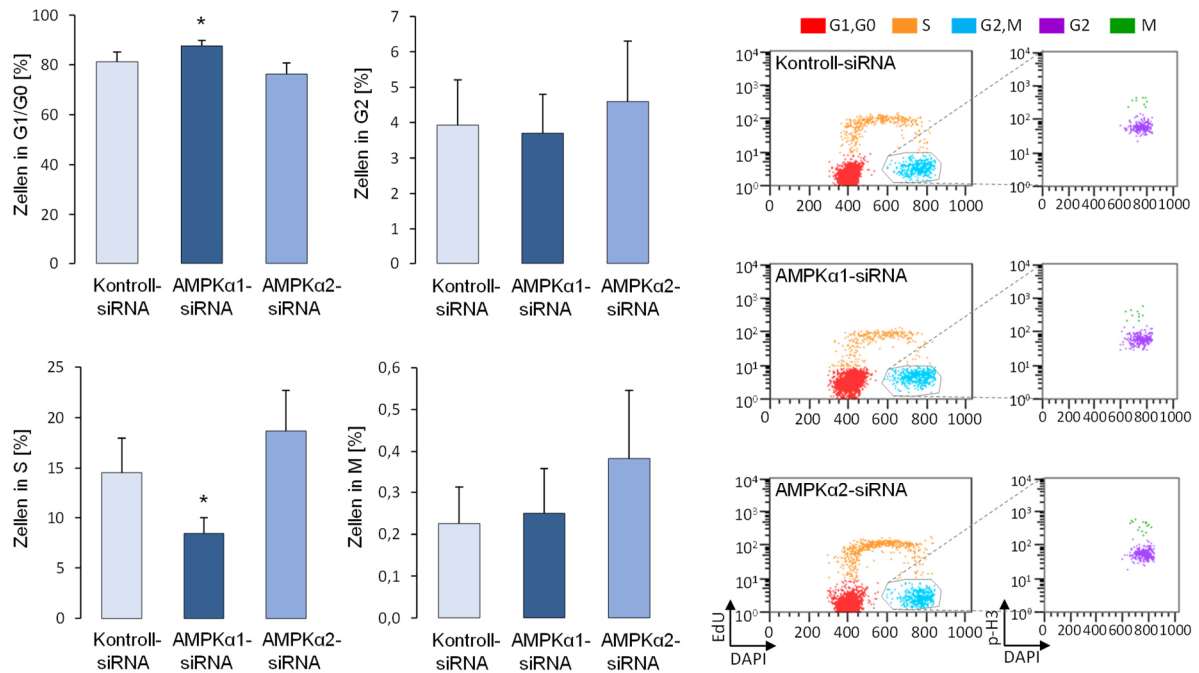


Abbildung 34: Herunterregulierung von AMPKα1 führt zu einem G1-Arrest im Zellzyklus. HUVEC wurden mit siRNA gegen AMPKα1 oder AMPKα2 behandelt. 72 h nach der Transfektion wurde die Zellzyklus-Färbung durchgeführt und die Zellen wurden mittels Durchflusszytometrie analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte der Daten mit SEM. n=7. (Zellzyklus-Färbung und Durchflusszytometrie durchgeführt von Dr. Katrin Spengler)

3.2.5 Einfluss der AMPKα-siRNA auf die Transkripte von Proliferation- und Seneszenz-regulierenden Genen

Die RNA-Sequenzierungsanalysen von Zellen, in denen AMPKα1 herunterreguliert wurde, zeigen, dass Transkripte, die in die Regulation der Proliferation einbezogen sind, vermindert sind. Des Weiteren sind Gene, die den zellulären Abbau, die Stress-Antwort und den Wnt-Signalweg betreffen in AMPKα1-defizienten Zellen herunterreguliert (Abbildung 35A). Dagegen zeigen AMPKα2-defiziente Zellen eine Hochregulierung von Transkripten, die für die Proliferation relevant sind (Abbildung 35B).

A	Kontroll-siRNA			AMPK α 1-siRNA			MW		
	I	II	III	I	II	III			
ERF	-0,70	-0,83	-0,86	0,22	0,50	1,66	0,80	Proliferation	
ETS2	0,42	1,74	0,03	-0,63	-0,47	-1,09	-0,73		
H1F0	-1,12	-0,37	-0,67	-0,18	0,74	1,60	0,72		
HMGA1	-0,14	-0,28	1,67	-1,00	-0,86	0,62	-0,41		
HMGA2	0,44	-0,15	1,77	-0,46	-1,07	-0,53	-0,69		
JUN	-0,30	1,82	0,13	-1,17	-0,02	-0,45	-0,55		
MAP4K4	0,13	1,35	0,94	-1,10	-0,37	-0,96	-0,81		
RPS6KA2	0,38	1,51	-0,24	-0,11	0,04	-1,58	-0,55		
RPS27A	-0,29	-0,19	1,57	-0,88	-1,01	0,80	-0,36		
UBE2D1	0,84	1,12	0,62	-0,33	-1,22	-1,03	-0,86		Abbau
UBE2E1	0,63	1,60	0,22	-0,88	-0,82	-0,74	-0,81		
IGFBP7	0,01	-1,56	-0,24	0,68	-0,29	1,40	0,60		Zelladhäsion
NFKB1	-0,16	1,18	1,25	-0,89	-0,32	-1,06	-0,76	Stress-Antwort	
TNIK	-0,39	1,35	0,91	-1,39	0,03	-0,52	-0,62	Wnt-Signalweg	

B	Kontroll-siRNA			AMPK α 2-siRNA			MW	
	I	II	III	I	II	III		
CDK2	-0,47	-0,39	-1,40	0,00	1,36	0,90	0,75	Proliferation
E2F2	-0,57	-1,09	-0,67	0,78	0,00	1,55	0,78	
TFDP1	-0,45	-1,18	-0,03	0,32	-0,42	1,76	0,56	
H2AFV	-0,54	-1,36	0,38	0,08	-0,19	1,63	0,51	
HMGA1	-0,84	-0,97	0,97	-0,18	-0,46	1,47	0,28	
ID1	-0,04	-0,52	-1,58	1,15	0,95	0,04	0,71	
LMNB1	-0,55	-1,20	-0,29	0,32	-0,03	1,75	0,68	
RBBP7	-0,65	-1,18	0,55	-0,15	-0,25	1,67	0,43	

Abbildung 35: RNA-Sequenzierungsanalyse der Herunterregulierung von AMPK α 1 oder AMPK α 2 hinsichtlich Seneszenz-Signalwegen. HUVEC wurden mit siRNA gegen AMPK α 1 (A) oder AMPK α 2 (B) behandelt. Nach 72h wurden die Zellen abgelöst und lysiert. Nach RNA-Isolierung wurden RNA-Sequenzierungsanalysen durchgeführt. Dargestellt sind Z-Scores für den Vergleich von Kontroll-siRNA zu AMPK α 1-siRNA oder AMPK α 2-siRNA aus unterschiedlich regulierten Genen. MW: Mittelwert, rot: Hochregulierung nach AMPK-siRNA, blau: Herunterregulierung nach AMPK-siRNA. n=3.

CDK2: cyclin dependent kinase 2, E2F: E2 transcription factor, ERF: ETS2 repressor factor, ETS2: ETS proto-oncogene 2, H1F0: histone gene, H2AFV: H2A.Z variant histone 2, HMGA1/2: high mobility group AT-Hook 1/2, ID1: inhibitor of DNA binding 1, Jun: Jun proto-oncogene, MAP4K4: mitogen-activated protein kinase kinase kinase kinase 4, LMNB1: lamin B1, RBBP7: RB binding protein 7, RPS6KA2: ribosomal protein S6 kinase A2, RPS27A: ribosomal protein S27a, TFDP1: transcription factor Dp-1, UBE2D1/E1: ubiquitin conjugating enzyme E2 D1/E1, IGFBP7: insulin like growth factor binding protein 7, NFKB1: nuclear factor kappa B subunit 1, TNIK: TRAF2 and NCK interacting kinase.

Zusammenfassend zeigen die Daten aus Kapitel 3.2, dass die Herunterregulierung der AMPK α 1 durch siRNA in Endothelzellen zur Entwicklung eines Seneszenz-Phänotyps mit positiven Seneszenzmarken und Hemmung der Proliferation führt.

3.3 Charakterisierung der AMPK $\alpha 1^{-/-}$ und AMPK $\alpha 2^{-/-}$ Mäuse

Da die Herunterregulierung der AMPK $\alpha 1$ zu zellulärer Seneszenz führte, war das nächste Ziel dieser Arbeit, im Modell der AMPK $\alpha 1$ -*Knockout*-Maus nach Korrelaten von Seneszenz und vorzeitiger Alterung zu suchen und die Befunde mit denen aus AMPK $\alpha 2$ -*Knockout*-Mäusen zu vergleichen.

3.3.1 Beurteilung der Lebensspanne der AMPK $\alpha 1^{-/-}$ und AMPK $\alpha 2^{-/-}$ Mäuse

Alterungsprozesse im Organismus beeinflussen die Lebensspanne. Um den Einfluss der AMPK auf die Lebensspanne zu untersuchen, erfolgte eine retrospektive Analyse von AMPK $\alpha 1^{-/-}$ und AMPK $\alpha 2^{-/-}$ Mäusen und deren Wildtyp-Wurfgeschwistern. In Abbildung 36 ist zu sehen, dass AMPK $\alpha 1^{-/-}$ Mäuse eine signifikant verkürzte Lebensspanne haben. Im Vergleich dazu unterschieden sich die Lebensspannen von AMPK $\alpha 2^{-/-}$ Mäusen und AMPK $\alpha 2^{+/+}$ Mäusen nicht (Abbildung 36).

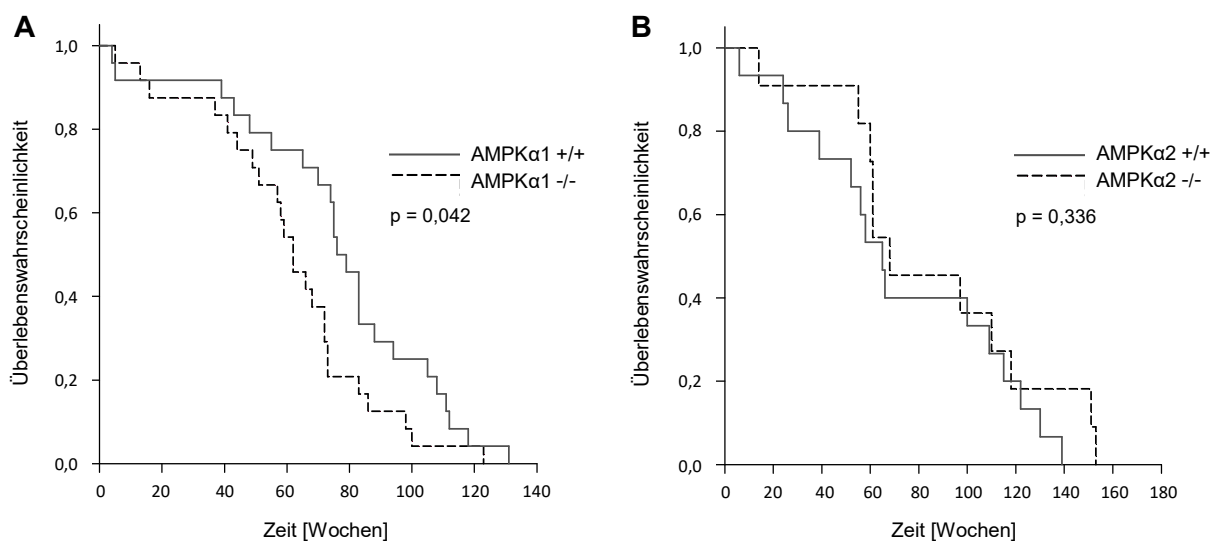


Abbildung 36: AMPK $\alpha 1^{-/-}$ Mäuse haben eine verkürzte Lebensspanne. Die Daten von verstorbenen AMPK $\alpha 1^{-/-}$ und AMPK $\alpha 1^{+/+}$ Mäusen (**A**) oder AMPK $\alpha 2^{-/-}$ und AMPK $\alpha 2^{+/+}$ Mäusen (**B**) wurden in einer retrospektiven Analyse berücksichtigt. Es wurden die Daten von drei Jahren erfasst. Auswertung dargestellt als Kaplan-Meier-Kurve. n=24 pro Genotyp.

3.3.2 Beurteilung der Organe von AMPK $\alpha 1^{-/-}$ Mäusen

Im Folgenden wurden verschiedene Organe (Herz, Niere, Milz, Leber) von jungen (8 Wochen) und alten AMPK $\alpha 1^{-/-}$ Mäusen AMPK $\alpha 1^{+/+}$ Mäusen (60 Wochen) hinsichtlich des Gewichts, des Seneszenzmarkers p21 und morphologischer

Parameter charakterisiert. Auffällig war eine signifikante vergrößerte Milz, die bereits bei 8 Wochen alten AMPK α 1 $^{-/-}$ Mäusen auftrat, wie zuvor schon von Wang et al. beschrieben [134], und nach 60 Wochen deutlich stärker ausgeprägt war (Abbildung 37). Die Gewichte anderer Organe (Herz, Niere, Leber) sowie das Gesamtkörpergewicht waren in AMPK α 1 $^{-/-}$ Mäusen nicht verändert (Abbildung 37). Repräsentative Bilder der gewogenen Organe aus 60 Wochen alten AMPK α 1 $^{-/-}$ und AMPK α 1 $^{+/+}$ Mäusen sind in Abbildung 38 dargestellt.

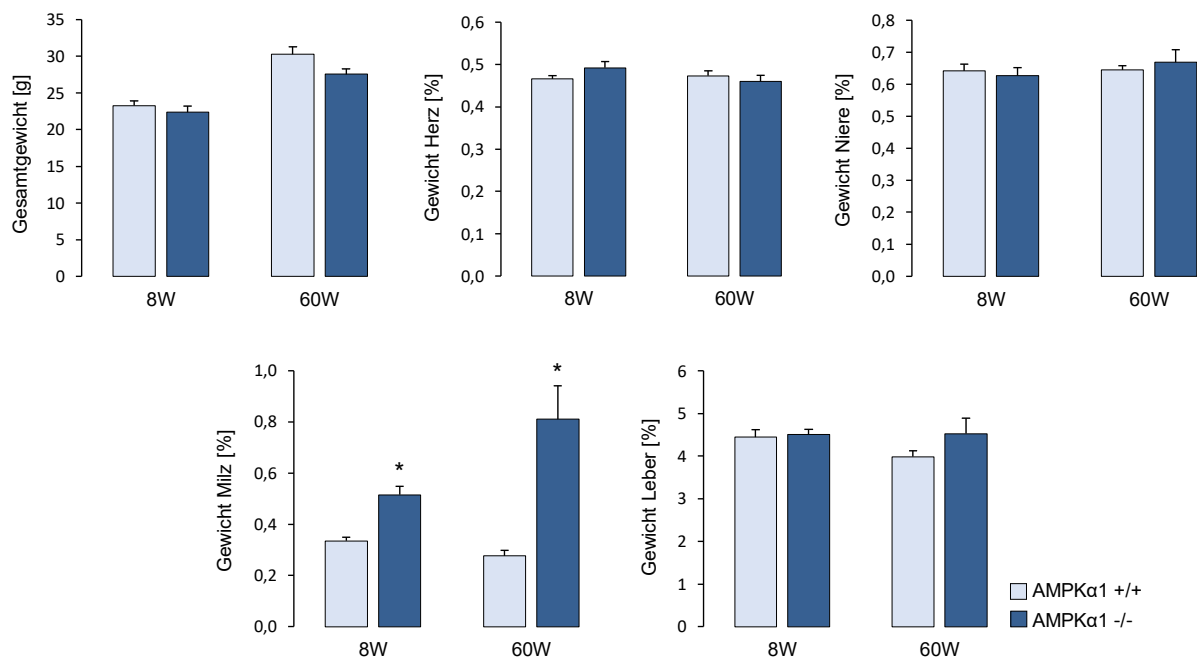


Abbildung 37: AMPK α 1 $^{-/-}$ Mäuse haben ein erhöhtes Milzgewicht. Gewichte der Organe von 8 Wochen alten (8W) und 60 Wochen alten (60W) AMPK α 1 $^{-/-}$ Mäusen und AMPK α 1 $^{+/+}$ Mäusen wurden erfasst und der Anteil am Gesamtgewicht der Mäuse wurde berechnet. Dargestellt sind die Mittelwerte mit SEM. * $p < 0,05$ im Vergleich zu AMPK α 1 $^{+/+}$ der jeweiligen Altersgruppe. $n = 13$ (AMPK α 1 $^{+/+}$ 8W), $n = 7$ (AMPK α 1 $^{-/-}$ 8W), $n = 12$ (AMPK α 1 $^{+/+}$ 60W), $n = 8$ (AMPK α 1 $^{-/-}$ 60W).

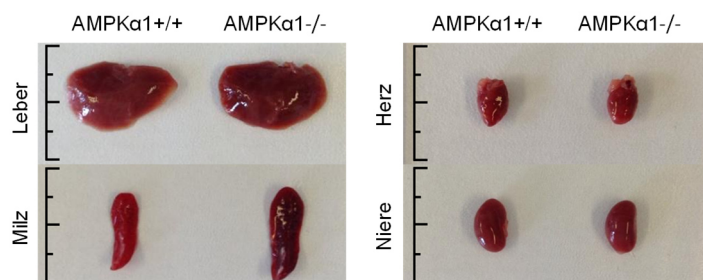


Abbildung 38: AMPK α 1 $^{-/-}$ Mäuse haben eine vergrößerte Milz. Organe von 60 Wochen alten AMPK α 1 $^{-/-}$ Mäusen und AMPK α 1 $^{+/+}$ Mäusen wurden analysiert. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Bild von Leber, Milz, Herz und Niere. Maßstabsleiste Teilstriche = 0,5 cm.

Zur Beurteilung der Alterung, wurde die p21-Genexpression in den Geweben von 60 Wochen alten AMPK α 1 $^{-/-}$ und AMPK α 1 $^{+/+}$ Mäusen analysiert. Wie in Abbildung 39 zu sehen ist, zeigt sich in Herz und Niere keine Veränderung der p21-Genexpression zwischen AMPK α 1 $^{-/-}$ Mäusen und Wildtyp-Wurfgeschwistern. In Leber und Milz von AMPK α 1 $^{-/-}$ Mäusen ist dagegen ein Anstieg der Genexpression von p21 zu erkennen (Abbildung 39).

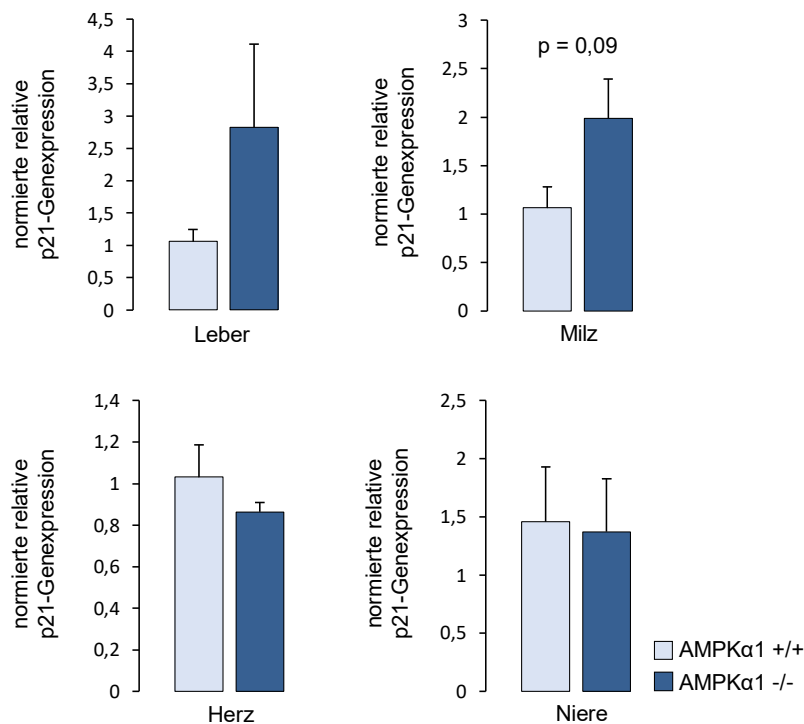


Abbildung 39: Die Genexpression von p21 zeigt einen Trend zum Anstieg in Leber und Milz von 60 Wochen alten AMPK α 1 $^{-/-}$ Mäusen. Aus den aufgeführten Organen von 60 Wochen alten AMPK α 1 $^{-/-}$ und AMPK α 1 $^{+/+}$ Mäusen wurde RNA isoliert und cDNA synthetisiert. Mittels RT-PCR wurde die relative p21-Genexpression bestimmt und gegen β -Aktin normiert. n=5 (Leber), n=4 (Milz), n=4 (Herz), n=4 (Niere).

Zur weiteren Untersuchung wurden HE-Färbungen der Organe aus jungen und alten AMPK α 1 $^{-/-}$ Mäusen und AMPK α 1 $^{+/+}$ Mäusen angefertigt. In HE-Färbungen der Leber von 8 Wochen alten AMPK α 1 $^{-/-}$ Mäusen sind im Vergleich zu AMPK α 1 $^{+/+}$ Mäusen vereinzelt kleine braune Ablagerungen im Kanalraum zwischen den Hepatozyten zu erkennen (Abbildung 40). Dies deutet auf eine beginnende Cholestase, die Blockierung des Gallenflusses, hin [135-137].

In 60 Wochen alten $AMPK\alpha1^{-/-}$ Mäusen ist die fortgeschrittene Cholestase zu erkennen. Größere Bereiche des Gallenrückstaus sind zu sehen, sowie inflammatorische Areale und apoptotische Hepatozyten (Abbildung 40). Diese Veränderungen weisen auf eine cholestatische Leberschädigung hin [135].

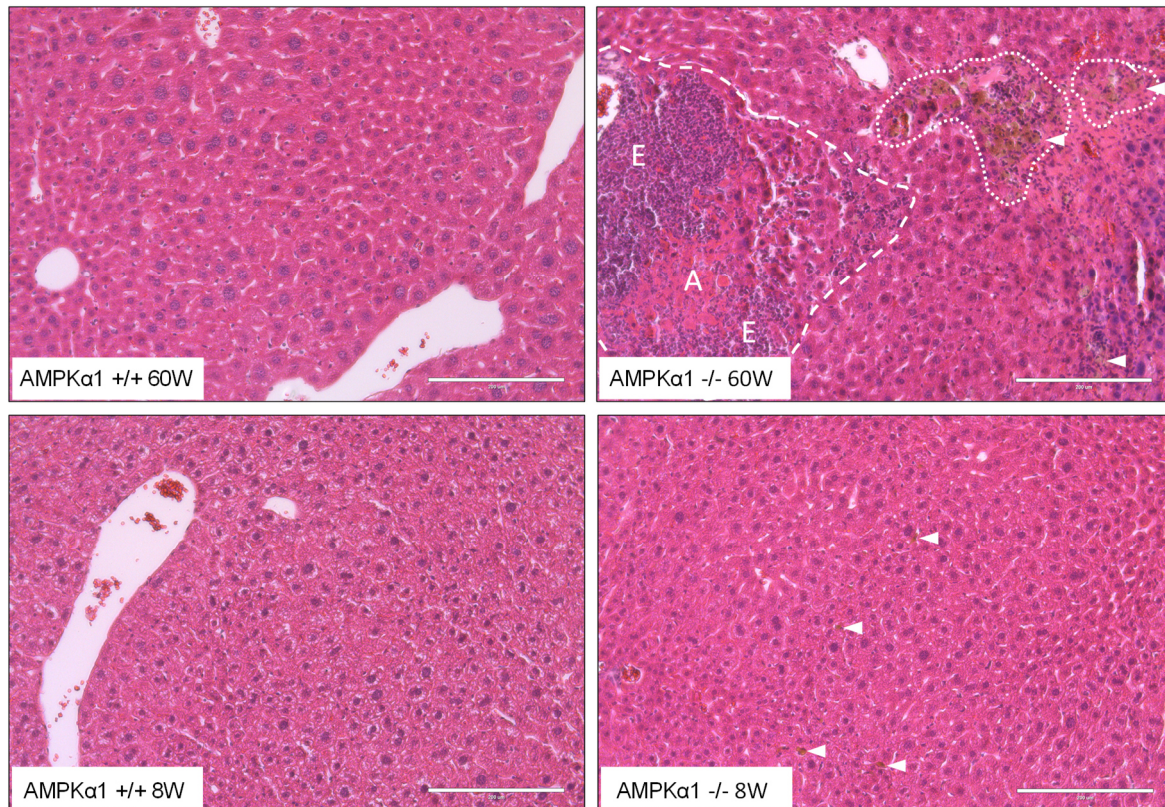


Abbildung 40: $AMPK\alpha1^{-/-}$ Mäuse weisen Erkrankungen der Leber auf. Die Leber von 8 und 60 Wochen alten $AMPK\alpha1^{-/-}$ und $AMPK\alpha1^{+/+}$ Mäusen wurde mit 4 % PFA fixiert und in Paraffin eingebettet. 5 μ m Gewebeschnitte wurden angefertigt und eine HE-Färbung wurde durchgeführt. Dargestellt ist ein repräsentatives Bild pro Genotyp und Altersgruppe. Pfeilspitze: Cholestase, E: Entzündung, A: apoptotische Zellen. Maßstabsleiste=200 μ m. n=1 ($AMPK\alpha1^{+/+}$ 8W), n=2 ($AMPK\alpha1^{-/-}$ 8W), n=5 ($AMPK\alpha1^{+/+}$ 60W, $AMPK\alpha1^{-/-}$ 60W).

In Abbildung 41 sind HE-Färbungen der Milz dargestellt. In der Milz von $AMPK\alpha1^{-/-}$ Mäusen ist im Vergleich zu $AMPK\alpha1^{+/+}$ Mäusen eine Vergrößerung der roten Pulpa zu erkennen (Abbildung 41A).

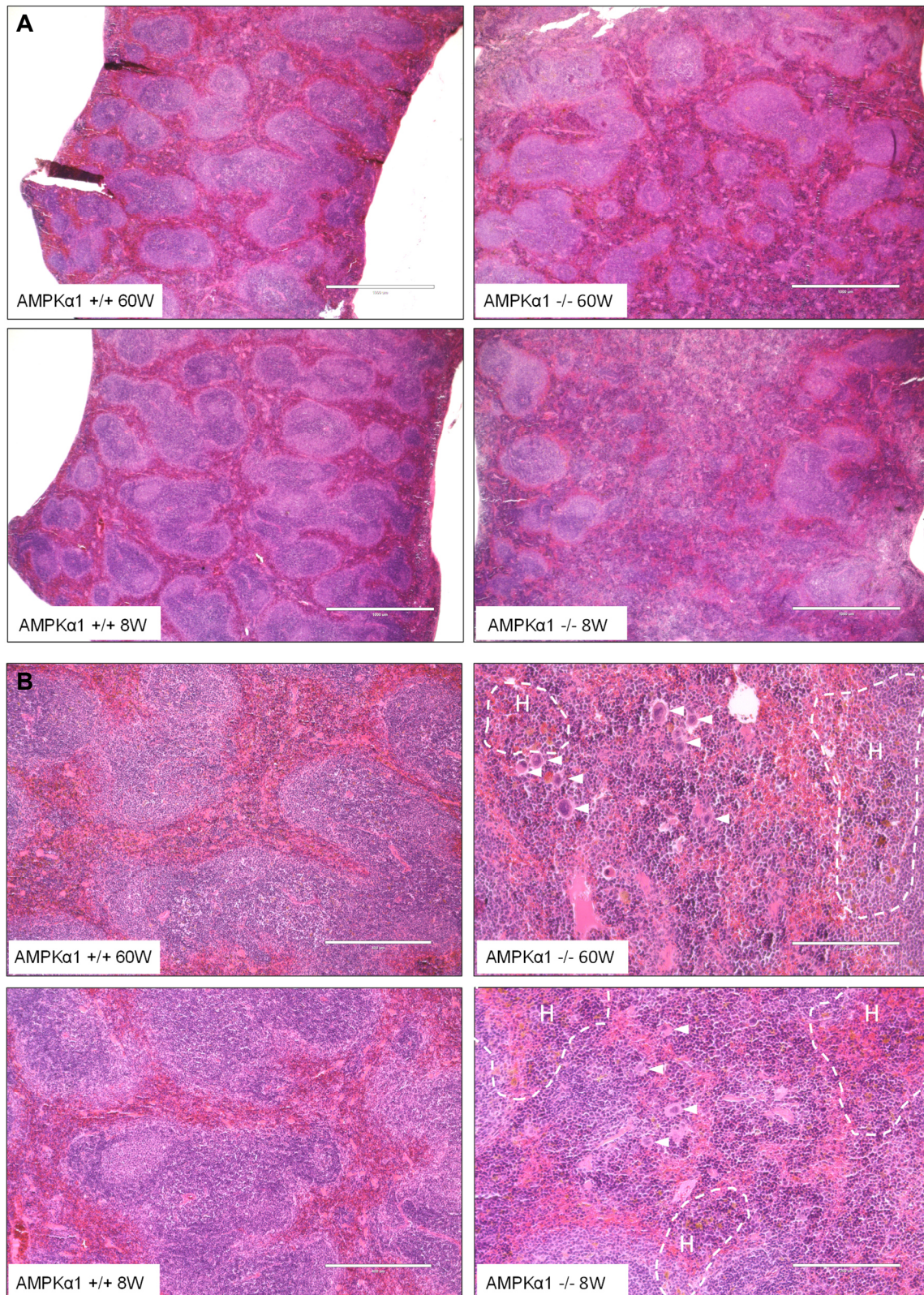


Abbildung 41: AMPK α 1-/- Mäuse weisen Veränderungen der Milz auf. Die Milz von 8 und 60 Wochen alten AMPK α 1-/- und AMPK α 1+/+ Mäusen wurde mit 4 % PFA fixiert und in Paraffin eingebettet. 5 μ m Gewebeschnitte wurden angefertigt und eine HE-Färbung durchgeführt. Dargestellt ist ein repräsentatives Bild pro Genotyp und Altersgruppe: **A.** Übersichtsbild. Maßstabsleiste=1000 μ m **B.** Nahaufnahme. Pfeilspitze: Megakaryozyten, H: Areal mit viel Hämosiderin. Maßstabsleiste=200 μ m. **A.+B.** n=2 (AMPK α 1+/+ 8W, AMPK α 1-/- 8W), n=5 (AMPK α 1+/+ 60W, AMPK α 1-/- 60W).

Bei Vergrößerung der Bildausschnitte (Abbildung 41B) sind in der Milz von AMPK α 1^{-/-} Mäusen vermehrt Zellen zu sehen, bei denen es sich vermutlich um Megakaryozyten handelt, was auf extramedulläre Hämatopoese hindeuten könnte. Zusätzlich sind viele braune Ablagerungen in der Milz 8 und 60 Wochen alter AMPK α 1^{-/-} Mäuse zu sehen. Hierbei handelt es sich vermutlich um Hämosiderinablagerungen. Hämosiderin enthält gespeichertes Eisen, welches hauptsächlich dem Erythrozytenabbau entstammt [138].

Die HE-Färbungen in Abbildung 42 und 43 zeigen, dass AMPK α 1^{-/-} Mäuse keine Veränderungen des Herzens und der Niere aufweisen.

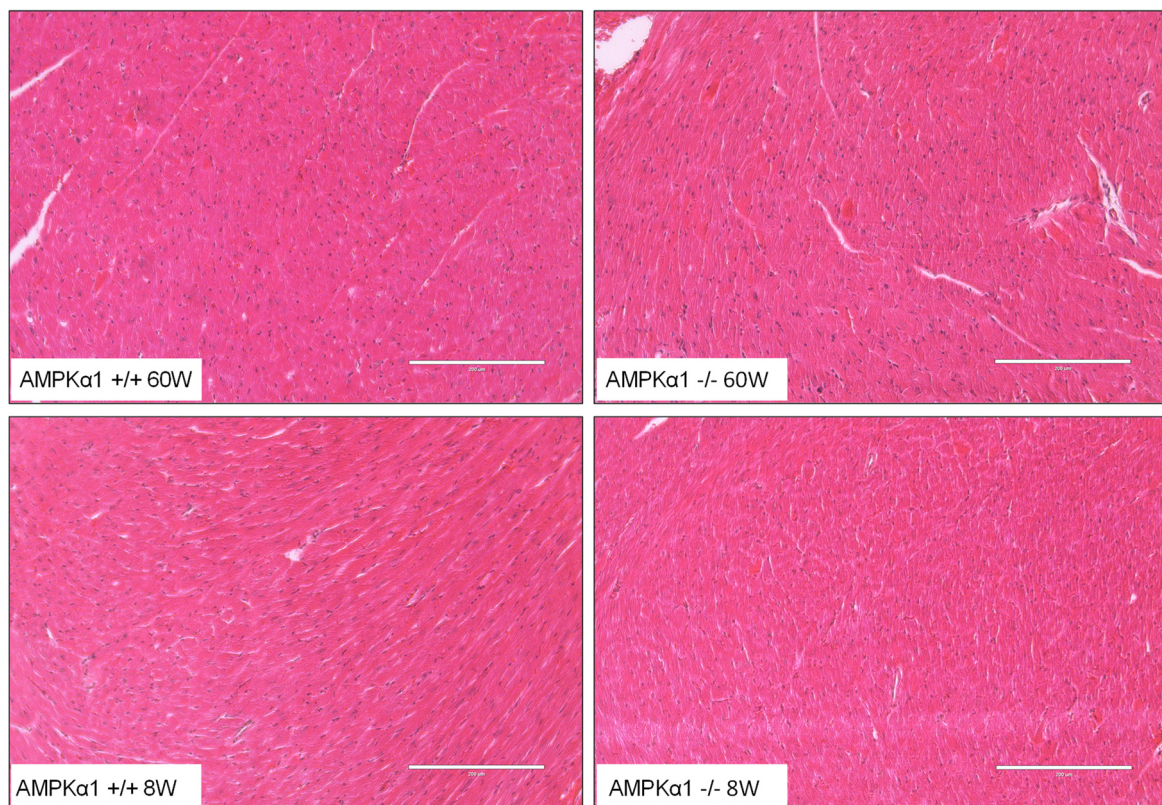


Abbildung 42: AMPK α 1^{-/-} Mäuse zeigen keine Veränderung des Herzens. Das Herz von 8 und 60 Wochen alten AMPK α 1^{-/-} und AMPK α 1^{+/+} Mäusen wurde mit 4 % PFA fixiert und in Paraffin eingebettet. 5 μ m Gewebeschnitte wurden angefertigt und eine HE-Färbung durchgeführt. Dargestellt ist ein repräsentatives Bild pro Genotyp und Altersgruppe. Maßstabsleiste=200 μ m. n=2 (AMPK α 1^{+/+} 8W), n=2 (AMPK α 1^{-/-} 8W), n=5 (AMPK α 1^{+/+} 60W), n=5 (AMPK α 1^{-/-} 60W).

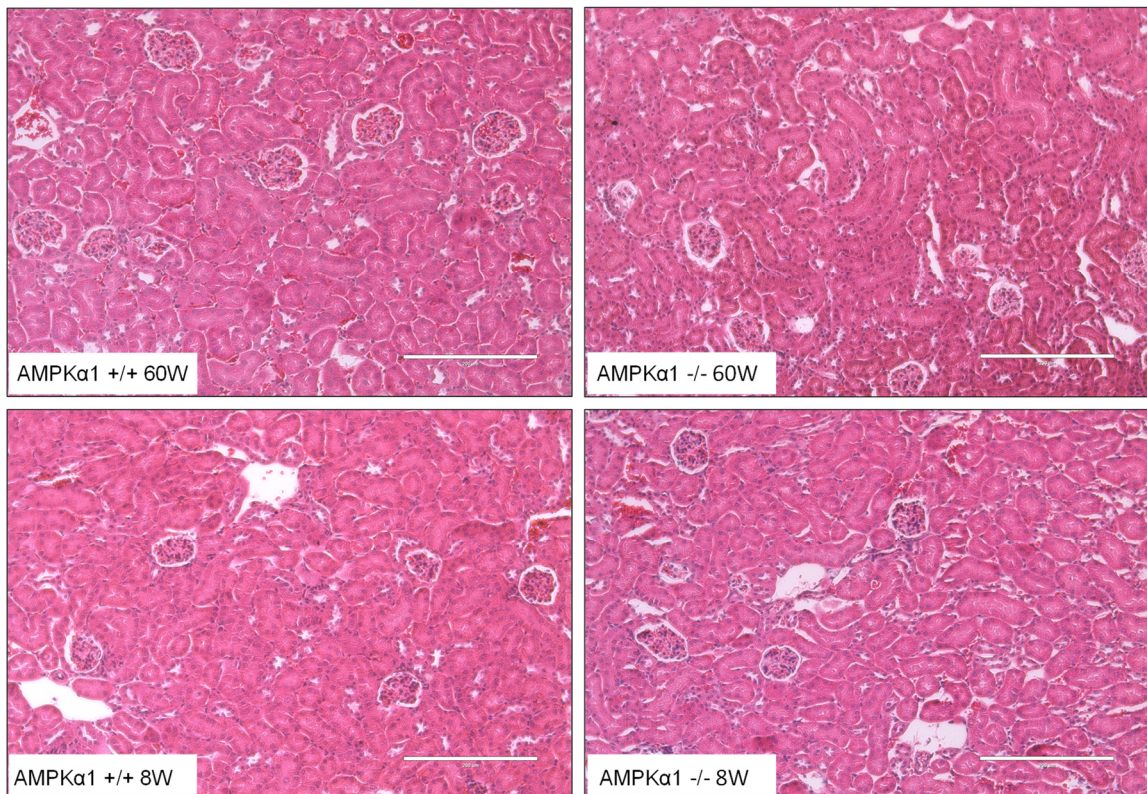


Abbildung 43: AMPK α 1^{-/-} Mäuse zeigen keine Veränderung der Niere. Die Niere von 8 und 60 Wochen alten AMPK α 1^{-/-} und AMPK α 1^{+/+} Mäusen wurde mit 4 % PFA fixiert und in Paraffin eingebettet. 5 μ m Gewebeschnitte wurden angefertigt und eine HE-Färbung durchgeführt. Dargestellt ist ein repräsentatives Bild pro Genotyp und Altersgruppe. Maßstabsleiste=200 μ m. n=2 (AMPK α 1^{+/+} 8W, AMPK α 1^{-/-} 8W), n=5 (AMPK α 1^{+/+} 60W, AMPK α 1^{-/-} 60W).

3.3.3 Veränderungen des Blutbildes in AMPK α 1^{-/-} Mäusen

Splenomegalie kann im Zusammenhang mit Veränderungen der Blutbildung und dem vermehrten Abbau der roten Blutkörperchen stehen [139-141]. Um zu untersuchen, ob dies in AMPK α 1^{-/-} Mäusen der Fall ist, erfolgte eine Analyse der Erythrozytenzahl und der Werte von Hämoglobin (HGB), Hämatokrit (HCT) und mittlerem Volumen der Erythrozyten (MCV). Abbildung 44 zeigt, dass AMPK α 1^{-/-} Mäuse im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen eine Anämie aufwiesen. Diese war bereits bei 8 Wochen alten Mäusen nachweisbar (signifikante Verminderungen von HGB, HCT und MCV) und deutlich stärker ausgeprägt bei 60 Wochen alten Mäusen, die zusätzlich auch eine Reduktion der roten Blutkörperchen aufwiesen.

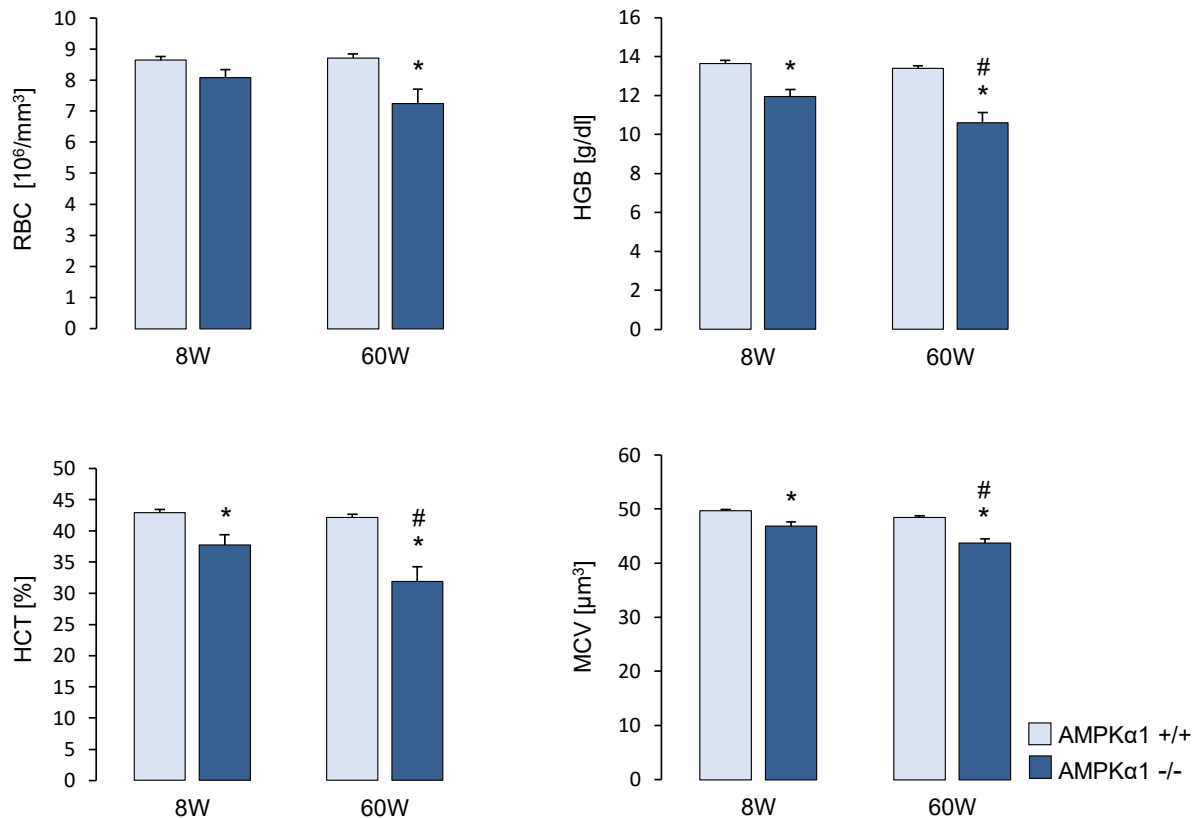


Abbildung 44: Das Blutbild von AMPK α 1^{-/-} Mäusen zeigt eine Anämie. Im Alter von 8 Wochen (8W) und 60 Wochen (60W) wurde AMPK α 1^{-/-} Mäusen und AMPK α 1^{+/+} Mäusen Blut entnommen. Die Blutanalyse wurde mit dem scil Vet abc Plus+ durchgeführt. RBC: *red blood cell count*, HGB: Hämoglobin, HCT: Hämatokrit, MCV: *mean corpuscular volume*. n=10 (AMPK α 1^{+/+} 8W), n=6 (AMPK α 1^{-/-} 8W), n=14 (AMPK α 1^{+/+} 60W), n=10 (AMPK α 1^{-/-} 60W).

3.3.4 Veränderungen der Aorta von AMPK α 1^{-/-} Mäusen

In einer weiteren Serie von Experimenten wurden die Aorten von AMPK α 1^{-/-} und AMPK α 1^{+/+} Mäusen sowie AMPK α 2^{-/-} und AMPK α 2^{+/+} Mäusen hinsichtlich der Expression von Seneszenzmarkern untersucht. In Abbildung 45 ist zu sehen, dass Aorten von AMPK α 1^{-/-} Mäusen unabhängig vom Alter (8 oder 60 Wochen) eine SA- β -Gal-positive Färbung aufwiesen, während Aorten von AMPK α 1^{+/+} Mäusen SA- β -Gal-negativ waren. Des Weiteren war auch bei 60 Wochen alten AMPK α 2^{+/+} und AMPK α 2^{-/-} Mäusen keine positive SA- β -Gal-Färbung nachzuweisen (Abbildung 45).

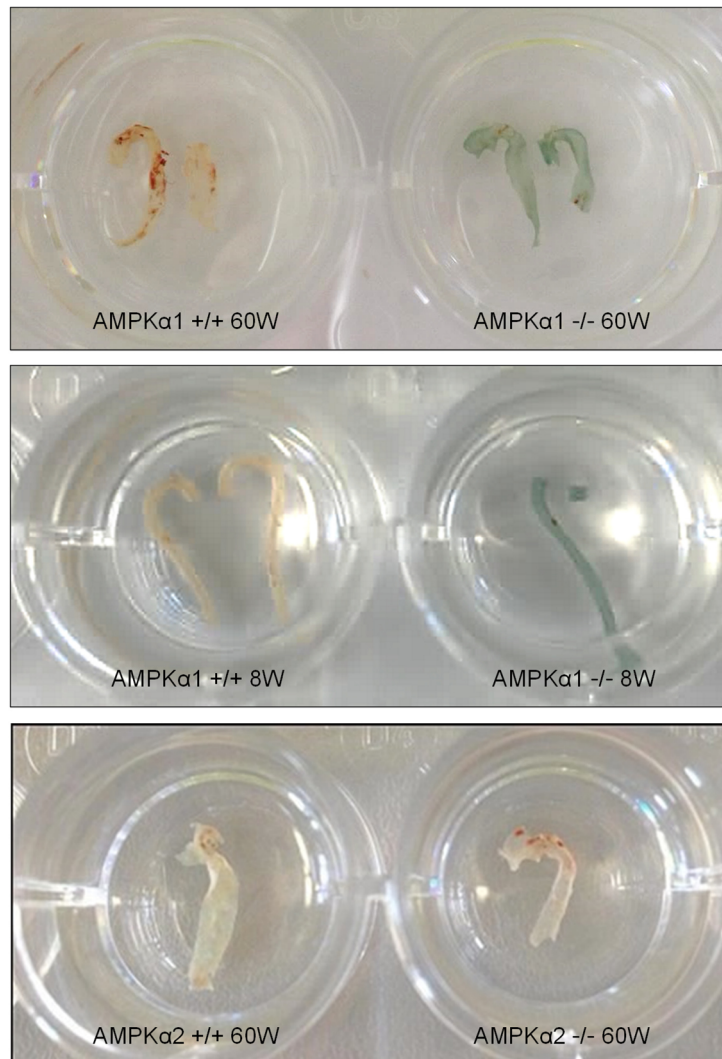


Abbildung 45: Aorten von AMPK α 1^{-/-} Mäusen zeigen eine seneszenz-assoziierte β -Galaktosidase (SA- β -Gal)-positive Färbung im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen und AMPK α 2^{-/-} Mäusen. Die Aorten wurden entnommen und mit feinen Gefäßscheren längs aufgeschnitten, mit PBS gewaschen und mit 4% Formaldehyd fixiert. Anschließend erfolgte die SA- β -Gal-Färbung über Nacht. Repräsentative Bilder zeigen die Aorten nach der Färbung in PBS. n = 4 (AMPK α 1^{+/+} 8W), n=3 (AMPK α 1^{-/-} 8W), n=3 (AMPK α 1^{+/+} 60W), n=4 (AMPK α 1^{-/-} 60W), n=3 (AMPK α 2^{+/+} 60W), n=2 (AMPK α 2^{-/-} 60W).

Um zu untersuchen, welche Schichten der Aortenwand SA- β -Gal-positive Zellen beinhalten, wurden Kryoschnitte angefertigt. Wie in Abbildung 46 zu sehen ist, konnten SA- β -Gal-positive Zellen in allen Schichten der Aorta nachgewiesen werden.

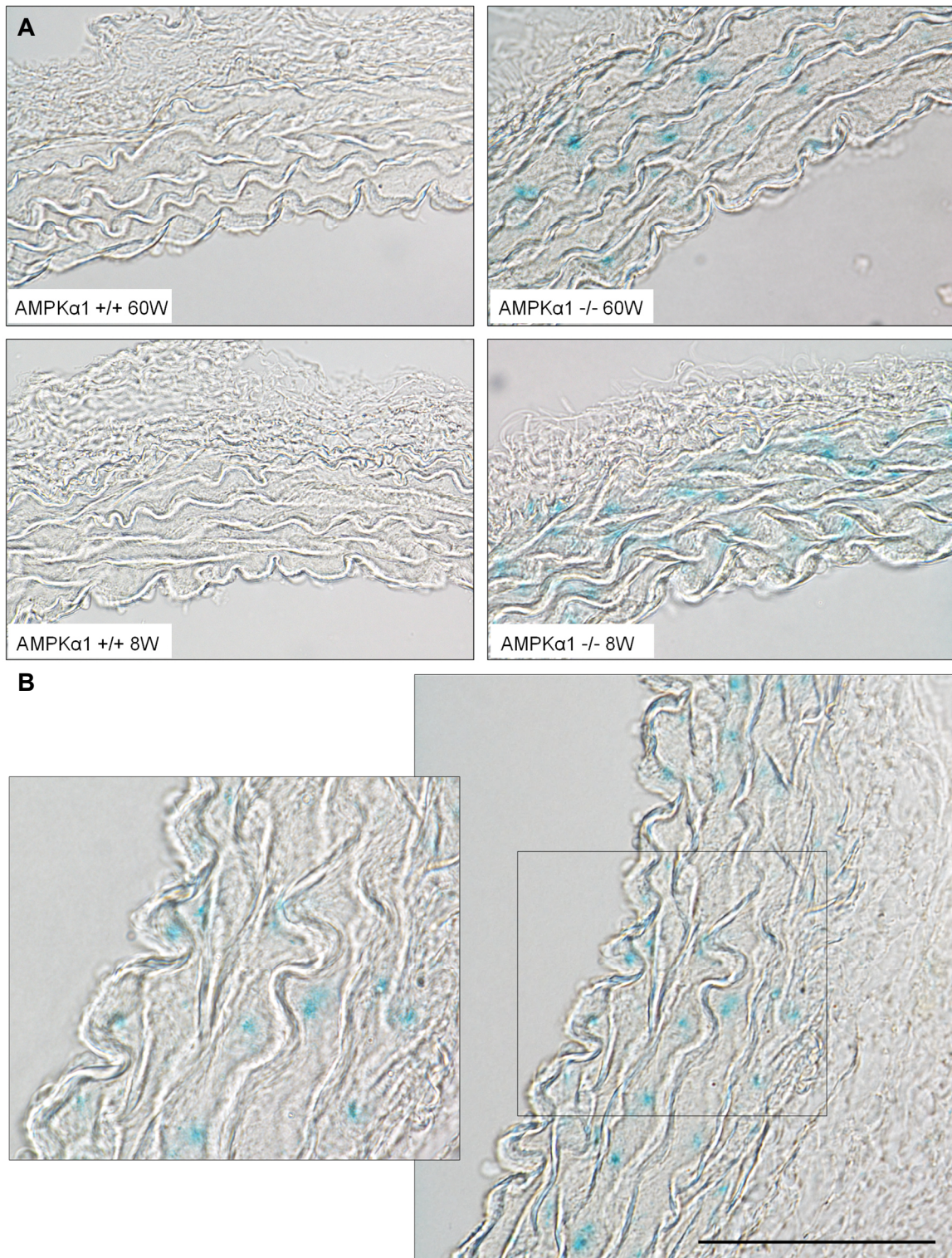


Abbildung 46: AMPKα1^{-/-} Mäuse zeigen seneszenz-assoziierte β-Galaktosidase (SA-β-Gal)-positive Zellen in allen Schichten der Aorta. Die Aorten von 8 und 60 Wochen alten AMPKα1^{-/-} Mäusen wurden entnommen, mit PBS gewaschen und mit 4% Formaldehyd fixiert. Anschließend erfolgte die SA-β-Gal-Färbung über Nacht. Im Folgenden wurden die Aorten eingebettet und eingefroren. Mit dem Kryostat wurden 12 μm dicke Schnitte angefertigt, auf Objektträger aufgezoogen, getrocknet und eingebettet. **A.** Dargestellt sind repräsentative Bilder von beiden Genotypen und Altersgruppen. n=3 (AMPKα1^{+/+} 8W), n=3 (AMPKα1^{-/-} 8W), n=3 (AMPKα1^{+/+} 60W), n=3 (AMPKα1^{-/-} 60W). **B.** Nahaufnahme der gefärbten Aorta einer 60 Wochen alten AMPKα1^{-/-} Maus. Maßstabsleiste=50 μm.

Zur weiteren Untersuchung wurde die p21-Genexpression in den Aorten von 60 Wochen alten AMPK α 1^{-/-} und AMPK α 1^{+/+} Mäusen analysiert. Wie in Abbildung 47 zu sehen ist, zeigt sich in der Aorta keine Veränderung der p21-Genexpression zwischen AMPK α 1^{-/-} und AMPK α 1^{+/+} Mäusen.

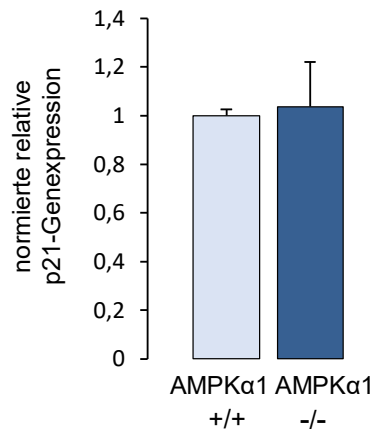


Abbildung 47: AMPK α 1^{-/-} Mäusen zeigen keine Veränderung der p21-Genexpression in der Aorta. Aus den Aorten von 60 Wochen alten AMPK α 1^{-/-} und AMPK α 1^{+/+} Mäusen wurde RNA isoliert und cDNA synthetisiert. Mittels RT-PCR wurde die relative p21-Genexpression bestimmt und gegen β -Aktin normiert. n=2-4.

Die in Kapitel 3.3 gezeigte verringerte Lebensspanne sowie das Auftreten von Seneszenzmarkern in Milz, Leber und Aorta deuten auf einen Alterungsphänotyp in AMPK α 1^{-/-} Mäusen hin, der jedoch in weiteren Untersuchungen bestätigt und charakterisiert werden muss.

3.4 Hypoxie und Seneszenz von Endothelzellen

Die in AMPK α 1^{-/-} Mäusen nachgewiesene Anämie könnte möglicherweise zu anämischer Hypoxie führen, das heißt, dass durch die Verringerung des Hämoglobins nicht mehr genug Sauerstoff im Blut transportiert wird und eine Sauerstoffunterversorgung im Gewebe auftreten kann [142]. Um zu prüfen, ob Hypoxie eventuell Seneszenzentwicklung begünstigt kann, wurden HUVEC bei vermindertem Sauerstoffdruck kultiviert (5 % CO₂, 1 % Sauerstoff, 24 h) und hinsichtlich Seneszenzparametern und Proliferation charakterisiert. In Abbildung 48 ist zu sehen, dass Hypoxie zu einem signifikanten Anstieg SA- β -Gal-positiver Zellen in HUVEC führt.

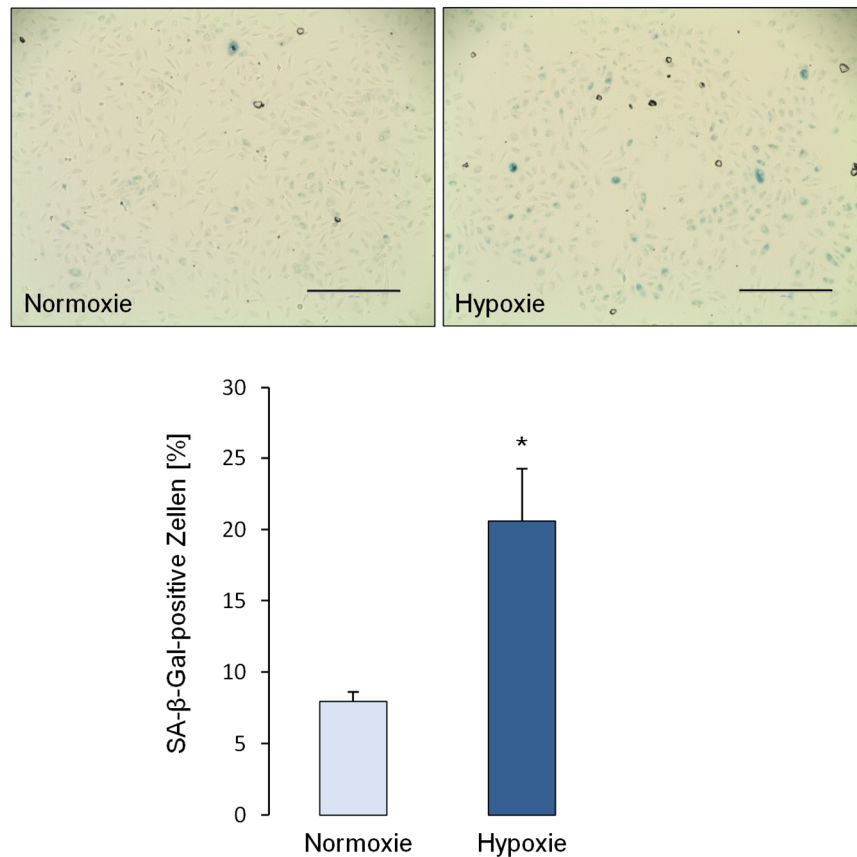


Abbildung 48: Hypoxie führt zu einem Anstieg seneszenz-assoziiertes β -Galaktosidase (SA- β -Gal)-positiver Zellen in HUVEC. Konfluente HUVEC wurden für 24 h unter hypoxischen (5 % CO₂, 1 % O₂) oder normoxischen Bedingungen vorinkubiert, neu ausgesät und erneut unter hypoxischen oder normoxischen Bedingungen kultiviert. 48 h nach der Aussaat wurde die SA- β -Gal-Färbung durchgeführt. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Bild der SA- β -Gal-Färbung pro Bedingung und die Quantifizierung durch Auszählung der Zellen. Maßstabsleiste=400 μ m. * p<0,05 im Vergleich zu Normoxie. n=3.

Des Weiteren zeigt Abbildung 49 einen durch Hypoxie induzierten Proliferationsstopp der Endothelzellen. Im Western Blot zeigt sich eine Tendenz zum Anstieg von p53 bei Hypoxie, aber interessanterweise eine signifikante Verringerung von p21. Das weist darauf hin, dass die Hypoxie-induzierte Hemmung der Proliferation p21-unabhängig ist. Bemerkenswert ist, dass Hypoxie eine signifikante Verminderung von AMPK α 1 bewirkt, wohingegen die Expression der AMPK α 2 ansteigt (Abbildung 50). Die Hypoxie wurde durch einen signifikanten Anstieg des Hypoxie-Markers HIF1 α verifiziert (Abbildung 50).

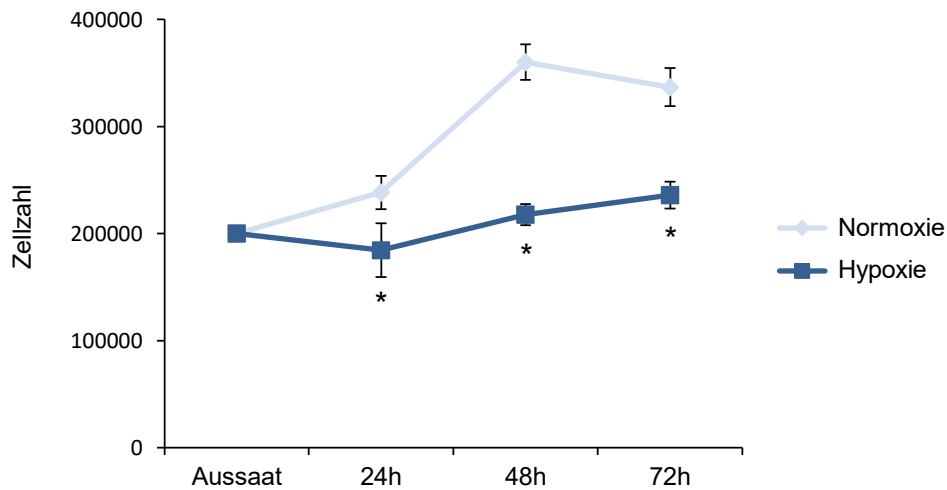


Abbildung 49: Hypoxie führt zu einem Wachstumsstopp in HUVEC. Konfluente HUVEC wurden für 24 h unter hypoxischen (5 % CO₂, 1 % O₂) oder normoxischen Bedingungen vorinkubiert, neu ausgesät und erneut unter hypoxischen oder normoxischen Bedingungen kultiviert. 24 h, 48 h und 72 h nach der Aussaat wurden die Zellen abgelöst und gezählt. * p<0,05 im Vergleich zu Normoxie. n=3.

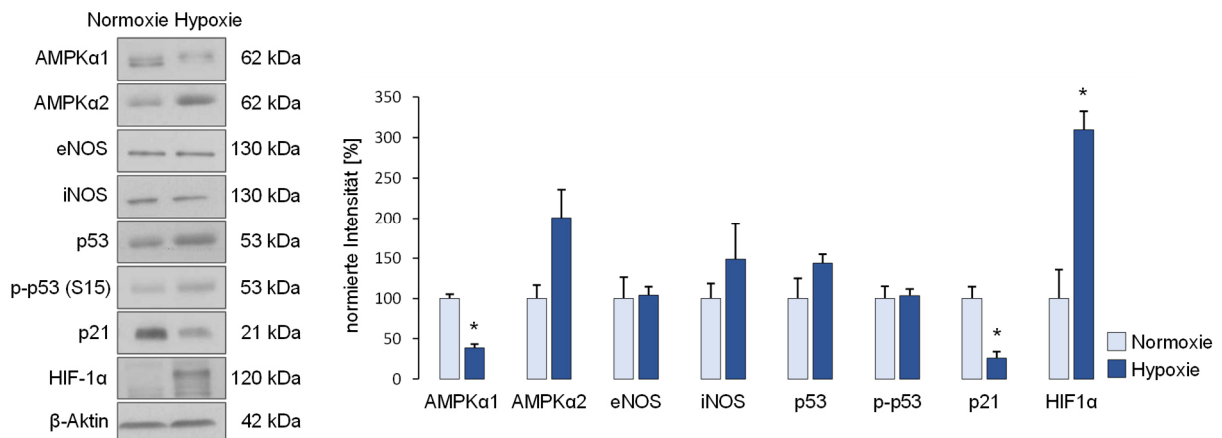


Abbildung 50: Hypoxie führt zur Verringerung von AMPKα1 und p21 in HUVEC. Konfluente HUVEC wurden unter hypoxischen (5 % CO₂, 1 % O₂) oder normoxischen Bedingungen kultiviert. Nach 72 h wurden die Zellen lysiert. Zellysate wurden im Western Blot mit spezifischen Antikörpern gegen die dargestellten Signalproteine angefärbt und die Proteinbanden wurden densitometrisch ausgewertet. Gezeigt sind ein repräsentativer Blot und die Mittelwerte der Daten mit SEM. Die Normierung von phospho-p53 erfolgte auf p53, die restlichen Signalproteine wurden auf β-Aktin normiert. * p<0,05 gegen Normoxie. n=3.

4. Diskussion

Die Erhöhung des Durchschnittsalters der Bevölkerung ist ein globales Ereignis, von dem besonders Westeuropa stark betroffen ist [143]. In Deutschland führt die steigende Lebenserwartung zusammen mit einer niedrigen Geburtenrate zu einer rasant alternden Bevölkerung [143]. Damit steigt auch die Zahl der Patienten mit altersbedingten Krankheiten, wie beispielsweise Herz-Kreislauf-Erkrankungen [144]. Letztere beruhen unter anderem auf einer Dysfunktion des Endothels, die mit zunehmendem Alter stärker ausgeprägt ist und zu Veränderungen der vaskulären Homöostase führt [51]. Aufgrund antioxidativer und antiinflammatorischer Funktionen stellt die AMPK ein potenzielles Target zur Behandlung der altersbedingten endothelialen Dysfunktion dar [145]. Die vorliegende Arbeit hatte das Ziel, die Rolle der AMPK im vaskulären Alterungsprozess näher zu charakterisieren und damit eine Basis für therapeutische Strategien zu schaffen.

4.1 Zelluläre Modelle für Seneszenz und Alterung

Für die Untersuchungen wurden zwei verschiedene Alterungsmodelle genutzt: replikative Seneszenz in primären humanen Endothelzellen (HUVEC) und chronologisch gealterte Endothelzellen aus den Lungen von alten Mäusen (MLEC). Beide Modelle wurden hinsichtlich der Erhöhung typischer Seneszenzmarker, wie p16, p21, p53 und SA- β -Gal charakterisiert [129]. Alle vier Parameter waren in replikativ seneszenten HUVEC erhöht. MLEC aus alten Mäusen zeigten verstärkte p53- und p21-Expression, der Seneszenzmarker p16 war nicht nachweisbar und der prozentuale Anteil an SA- β -Gal-positiver Zellen fiel deutlich geringer aus als in seneszenten HUVEC. Die beiden Modelle sind nur bedingt vergleichbar. HUVEC durchlaufen in einem kurzen Zeitraum von ca. 2,5 Monaten in Kultur 20 Zellpassagen, was ca. 15-17 Populationsverdopplungen entspricht [129]. Endothelzellen aus den Lungen von Mäusen sind hingegen über längere Zeit Faktoren ausgesetzt, die zur Akkumulation verschiedener Schäden und dadurch zur Zellalterung führen und erreichen *in vivo* vermutlich nicht die hohe Replikationsrate wie eine Langzeitkultur *in vitro*. In der Literatur wird beschrieben, dass die Anzahl seneszenten Zellen innerhalb eines Organismus bei alten Tieren sehr gering ausfällt [146-148]. Der fehlende Nachweis von p16 in MLEC aus alten Mäusen kann verschiedene Gründe haben. Die Western Blot-Analyse kann nicht sensitiv genug sein, um geringe Mengen

von p16 nachzuweisen. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass sich die Zellen in einem frühen Seneszenzstadium befinden. Nach Literaturangaben steigt p21 im frühen Stadium der Seneszenz an, wohingegen es erst später zu einem Anstieg von SA- β -Gal und p16 kommt [115]. Des Weiteren ist auch p16-unabhängige Seneszenz in der Literatur beschrieben [149, 150]. Schließlich ist auch nicht auszuschließen, dass während der Isolation von MLEC und ihrer Kultivierung seneszente Zellen verloren wurden. Da der Zustand der Seneszenz aber immer mit mehreren Markern verifiziert sein sollte, werden MLEC in unserem Modell als gealterte und nicht als seneszente Zellen betrachtet.

4.2 Regulation der AMPK in seneszenten und gealterten Zellen

Unsere Daten zeigen sowohl in seneszenten HUVEC als auch in MLEC aus alten Mäusen eine signifikante Erhöhung der Expression der AMPK, die allerdings nur in MLEC mit einer leichten Steigerung der basalen Aktivität einher ging. Letzteres wurde im *in vitro*-Assay in Zelllysaten und im Western Blot mit Hilfe eines Phospho-AMPK-Substrat-Motiv-Antikörpers gemessen. In seneszenten HUVEC war die AMPK-Aktivität dagegen nicht verändert. Eine Hochregulierung der AMPK-Expression könnte daher einen kompensatorischen Mechanismus zur Aufrechterhaltung der basalen Aktivität darstellen. Literaturdaten beschreiben, dass die basale Aktivität der AMPK im Alter abnimmt [94]. Beispielsweise berichteten Turdi et al. über eine deutliche Verringerung der basalen AMPK-Aktivität im Herzen von alten Mäusen [151]. Zudem wurde eine verringerte basale AMPK-Phosphorylierung in Arterien von alten Mäusen sowie alten Ratten beobachtet [152, 153]. Interessanterweise ist in seneszenten HUVEC eine veränderte Substratphosphorylierung zu erkennen, die darauf hinweist, dass die AMPK-Aktivität hinsichtlich einzelner Substrate vermindert oder erhöht sein könnte. Andererseits kann dies auch mit einer unterschiedlichen Substratverfügbarkeit in alten Zellen zusammenhängen. Gründe hierfür könnten eine veränderte Expression oder die Unzugänglichkeit der Phosphorylierungsstelle durch altersbedingte Proteinmodifikationen sein. In MLEC aus alten Mäusen zeigte sich dagegen ein genereller Anstieg der AMPK-Substratphosphorylierung, was daran liegen könnte, dass hier deutlich weniger seneszente Zellen nachweisbar waren.

Die Stimulus-induzierte Aktivierung der AMPK wurde mit Hilfe von zwei verschiedenen AMPK-Aktivatoren untersucht, VEGF und 2-DG. VEGF führt durch Bindung an den

VEGFR2 zur Calcium-vermittelten Aktivierung der CaMKK2 und nachfolgenden Phosphorylierung der AMPK am T172 [31]. Die Behandlung der Zellen mit dem Glykolyse-Inhibitor 2-DG induziert dagegen eine durch Energiemangel bedingte Aktivierung der AMPK durch die Kinase LKB1 [31]. Gleichzeitig kann es aber auch unter 2-DG zu einem zytosolischen Anstieg von Calcium kommen, da dieses nicht mehr durch ATP-betriebene Pumpen aus dem Cytoplasma abtransportiert werden kann. Somit ist auch die CaMKK2 in die 2-DG-vermittelte Aktivierung der AMPK involviert [31].

Die VEGF-induzierte AMPK-Aktivierung und die nachfolgenden Phosphorylierungen von AMPK-Zielproteinen sind in seneszenten HUVEC erhöht. Dies kann vor allem auf eine Hochregulierung des VEGF-Signalwegs zurückgeführt werden. Sowohl die Expression des VEGFR2 als auch die der CaMKK2 waren in seneszenten Zellen erhöht. Interessanterweise war auch eine verstärkte Expression von VEGF in seneszenten HUVEC zu beobachten, was eine gesteigerte autokrine Aktivierung der Endothelzellen vermuten lässt. Allerdings war, wie bereits diskutiert, keine Erhöhung der basalen AMPK-Aktivität in seneszenten HUVEC zu beobachten, so dass die funktionelle Konsequenz der erhöhten VEGF-Expression noch offen ist. Möglicherweise ist aber die Sekretion von VEGF in das extrazelluläre Medium gestört. Emerich et al. konnten zum Beispiel zeigen, dass die VEGF-Freisetzung aus neuronalen Epithelzellen alter Ratten signifikant verringert ist [154]. Frühere Studien haben auch gezeigt, dass VEGF-Expression und VEGF-regulierte Angiogenese in unterschiedlichen Geweben im Alter verringert ist [155-159] und die Entstehung einer endothelialen Dysfunktion begünstigt, da VEGF durch die Regulierung von NO und PGI₂ die endotheliale Stabilität und Homöostase aufrechterhält [160, 161]. Die erhöhte VEGFR2- und CaMKK2-Expression in seneszenten Endothelzellen könnte einen Mechanismus darstellen, um die VEGF-induzierten Signalwege bei verminderter VEGF-Expression funktionsfähig zu erhalten. Unsere Beobachtungen in MLEC aus alten Mäusen stützen diese Vermutung jedoch nicht. In diesen Zellen war die VEGFR2-Expression verringert, die Expression der CaMKK2 unverändert und die VEGF-induzierte AMPK-Aktivierung vermindert. Allerdings scheint hier die Erhöhung der AMPK-Expression die reduzierte Aktivierbarkeit auszugleichen, da die Phosphorylierung der AMPK-Substrate ACC und ULK1 nicht verändert war. Insgesamt zeigen die Daten, dass die VEGF-induzierte AMPK-Aktivierung bei Seneszenz und Altern verändert ist und entscheidend durch unterschiedliche Ausprägung des VEGF-

Signalwegs in den untersuchten Modellen bestimmt wird. Eine verminderte VEGF-induzierte Aktivierung der AMPK kann vermutlich durch die veränderte Expression der Kinase kompensiert werden.

Im Gegensatz zu den nach VEGF erhobenen Daten ist die 2-DG-induzierte AMPK-Aktivierung sowie die Phosphorylierung der AMPK-Substrate in seneszenten HUVEC vermindert. Diese Daten lassen darauf schließen, dass der Signalweg, der zur AMPK-Aktivierung führt, eine wichtige Rolle spielt und dass die energieabhängige Aktivierung durch LKB1 bei Seneszenz gehemmt ist. In MLEC aus alten Mäusen hingegen erfolgt die 2-DG-vermittelte Aktivierung der AMPK und die folgende Phosphorylierung der ACC deutlich früher als in MLEC, die aus jungen Mäusen isoliert wurden, während die 2-DG-stimulierte ULK1-Phosphorylierung ebenfalls gehemmt war. Die komplexen Prozesse im AMPK-Signalweg scheinen daher vielfältig beeinflussbar zu sein. Verschiedene Literaturdaten zeigen, dass die Aktivierbarkeit der AMPK im Alter abnimmt [47]. Ljubicic und Hood konnten beispielsweise eine verminderte Aktivierbarkeit der AMPK in Skelettmuskeln alter Ratten nach Anstieg des AMP:ATP-Verhältnisses durch Muskelkontraktionen zeigen [162]. Durch die verringerte Aktivierbarkeit der AMPK im Alter kommt es zu einer Abnahme der Fähigkeit, auf Stressoren zu reagieren, was den Alterungsprozess weiter vorantreiben und schwerwiegende Folgen haben kann [94]. Liu et al. konnten zeigen, dass die basale AMPK-Phosphorylierung in den Gehirnen alter Mäuse im Vergleich zu jungen Mäusen erhöht war, die Aktivierung der AMPK nach experimentell induziertem Schlaganfall in alten Tieren jedoch vermindert war und das mit höherer Mortalität einherging [47, 163].

AMPK-Aktivierung kann auch durch ROS beeinflusst werden [164, 165]. In Übereinstimmung damit wurde hier gezeigt, dass H_2O_2 zu einer Erhöhung der AMPK-Aktivität führte und die VEGF-induzierte AMPK-Aktivierung verstärkte. Im Modell der seneszenten HUVEC scheinen ROS unter unseren Bedingungen jedoch eine geringe Rolle zu spielen, da keine Erhöhung zytosolischer oder mitochondrialer ROS zu beobachten war. Im Gegensatz dazu wurde in der Literatur beschrieben, dass seneszente Zellen verstärkt ROS produzieren, was meistens auf dysfunktionale Mitochondrien zurückgeführt wurde [166]. ROS sind generell dafür bekannt, die Entwicklung der Seneszenz, auch der replikativen Seneszenz, zu fördern [167]. Eine Erklärung dafür, dass es im hier vorgestellten replikativen Seneszenzmodell nicht zu einem Anstieg von ROS kommt, könnte die Zusammensetzung des Zellkulturmediums

liefern. Das Kulturmedium der HUVEC wurde mit Vitamin C, einem effizienten Antioxidans, welches der Entwicklung von oxidativem Stress entgegenwirkt, supplementiert [168]. Im Gegensatz zu HUVEC zeigten MLEC aus alten Mäusen, welche ohne zusätzliches Vitamin C kultiviert wurden, eine signifikante Erhöhung mitochondrialer ROS, was auf eine mitochondriale Dysfunktion hinweist.

4.3 Die Herunterregulierung der AMPK α 1 durch siRNA führt zu Seneszenz

Beide Isoformen der katalytischen Untereinheit der AMPK (AMPK α 1 und AMPK α 2) kommen in Endothelzellen vor. Die AMPK α 1 wird jedoch höher exprimiert und stellt die dominante Isoform in Endothelzellen dar [23].

HUVEC, in denen AMPK α 1 mittels siRNA herunterreguliert wurde, entwickeln deutliche Anzeichen der Seneszenz. Dies zeigte sich in einer Erhöhung von Seneszenzmarkern im Western Blot (p21, p53, phospho-p53) und in der Immunfluoreszenz (p21) sowie in einem signifikanten Anstieg SA- β -Gal-positiver Zellen. Des Weiteren ist eine Steigerung der iNOS- und eine Verminderung der eNOS-Expression zu beobachten, was auf eine endotheliale Dysfunktion hinweist. Neben der Phosphorylierung der eNOS scheint AMPK auch deren Expression regulieren zu können, was den Abfall der eNOS-Expression in AMPK α 1-defizienten Zellen erklären könnte [169, 170]. AMPK α 1-defiziente HUVEC sind weiterhin durch einen Anstieg mitochondrialer und intrazellulärer ROS und durch Marker von DNA-Schäden gekennzeichnet. Zusammenfassend führt die AMPK-Depletion damit zu der Ausbildung einer stress-induzierten vorzeitigen Seneszenz.

Der Anstieg mitochondrialer und zytosolischer ROS in AMPK α 1-defizienten Zellen ist vermutlich ursächlich in die Entwicklung der Seneszenz einbezogen. Literaturdaten zeigen, dass die AMPK α 1 in HUVEC eine wichtige antioxidative Funktion besitzt und dass es in AMPK α 1-defizienten Zellen zu einem Anstieg von ROS kommt [171]. ROS können DNA-Schäden induzieren und somit die DNA-Schadensantwort in Gang setzen. Letztere umfasst auch die Phosphorylierung des Histons H2AX nach DNA-Doppelstrangbrüchen, woraufhin die Rekrutierung von DNA-Reparaturproteinen erfolgt [131]. Die phosphorylierte Form von H2AX wird als γ H2AX bezeichnet und wird zur Visualisierung der DNA-Schadensstellen mit Hilfe eines gegen γ H2AX gerichteten Antikörpers genutzt. Hierzu müssen die Zellen allerdings im konfluenten, das heißt nicht-proliferierenden Zustand sein, da DNA-Doppelstrangbrüche auch unabhängig

von DNA-Schäden während der Mitose auftreten, welches falsch-positive Signale bewirken kann [172]. In unserer Studie wurde in AMPK α 1-defizienten Zellen ein signifikanter Anstieg von γ H2AX-markierten DNA-Schäden beobachtet, was auf deren Rolle in der Seneszenzentwicklung nach AMPK-Depletion hinweist. In diesen Experimenten diente die Behandlung der Zellen mit Hydroxyurea als Positivkontrolle [132].

γ H2AX kann durch Aktivierung des p53-p21-Signalwegs zum Zellzyklusarrest führen [133]. Beides wurde in der vorliegenden Studie in AMPK α 1-defizienten Zellen beobachtet. Die Hemmung der Proliferation wurde durch die Ergebnisse der Zellzählung und der Zellzyklusanalyse belegt, die zeigt, dass sich bei AMPK-Defizienz mehr Zellen in der G0/G1-Phase und weniger Zellen in der S-Phase befinden, was auf einen Zellzyklusarrest in der G1-Phase hindeutet. Diese Daten wurden durch die Ergebnisse der RNA-Sequenzierungsanalyse zusätzlich untermauert. Gene, welche die Proliferation positiv regulieren, sind in AMPK α 1-defizienten Zellen herunterreguliert. Auch Colombo und Moncada konnten eine verminderte Proliferation AMPK α 1-defizienter Zellen zeigen, welche in Verbindung mit einer Erhöhung von ROS stand [171]. Für schnelles Wachstum benötigen Endothelzellen ATP, welches hauptsächlich durch aerobe Glykolyse generiert wird [173-175]. Yang et al. konnten zeigen, dass die Herunterregulierung von AMPK α 1 in Endothelzellen zu einer Abnahme der Glykolyse und auf diesem Weg zu einer Verminderung des Zellwachstums führt [173].

Der Anstieg SA- β -Gal-positiver Zellen in AMPK α 1-defizienten HUVEC wurde durch den Nachweis einer generell erhöhten lysosomalen Aktivität untermauert. Um die Lysosomenaktivität zu ermitteln, wurden die Zellen mit einem Substrat inkubiert, welches nach der Aufnahme in die Lysosomen gespalten wird und daraufhin ein Fluoreszenzsignal emittiert. Dies spiegelt die Aktivität lysosomaler Proteasen wider, wohingegen die SA- β -Gal-Färbung die Aktivität der SA- β -Galaktosidase, die im Überschuss in seneszenten Zellen vorkommt, nachweist [101]. Der Anstieg der Lysosomen in seneszenten Zellen könnte einen kompensatorischen Mechanismus zur gestörten Autophagie darstellen [101]. Störungen der Autophagie treten auch bei AMPK-Mangel auf. Jang et al. konnten zeigen, dass die Herunterregulierung von AMPK α 1 in HEK-Zellen zu einer Störung der Fusion von Autophagosomen und Lysosomen führt [176]. Dies könnte eine kompensatorische Hochregulation der

lysosomalen Biogenese und einen dadurch bedingten Anstieg SA- β -Gal-positiver Zellen bewirken.

Betrachtet man die RNA-Sequenzierungsanalyse hinsichtlich Seneszenz-Signalwegen, erkennt man, dass auch Gene, welche für Ubiquitin-konjugierende-Enzyme kodieren, und somit den zellulären Abbau betreffen, in AMPK α 1-defizienten Zellen herunterreguliert sind. Die Ubiquitinierung von Proteinen ist sowohl für den proteosomalen Abbau aber auch für die Autophagie von Bedeutung [177]. Die Beeinträchtigung zellulärer Abbauprozesse im Alter führt zur Anhäufung beschädigter Proteine und Zellorganellen, was zytotoxisch sein kann, den Alterungsprozess weiter vorantreiben kann und sich somit negativ auf die Lebensdauer auswirken kann [178]. Liu und Pfleger konnten beispielsweise zeigen, dass die Deaktivierung des Ubiquitin-aktivierenden Enzyms 1 zu einer Verkürzung der Lebensspanne von *D. melanogaster* führt [178, 179].

Das verminderte eNOS:iNOS-Verhältnis ist ebenfalls ein Zeichen endothelialer Seneszenz. Literaturdaten haben bereits auf eine Rolle der AMPK in der Regulation dieses Gleichgewichts hingewiesen. Pilon et al. konnten zeigen, dass AMPK-Aktivatoren die Expression und Aktivität der iNOS vermindern können, während eine Herunterregulierung der AMPK zur Aufhebung dieser Effekte führt [180]. Würde die iNOS also durch AMPK reprimiert, könnte eine Herunterregulierung der AMPK zu einer Hochregulierung der iNOS führen.

In AMPK α 1-defizienten Zellen ist die AMPK α 2-Isoform hochreguliert, wie bereits in früheren Untersuchungen beschrieben wurde [181]. Inwieweit die erhöhte AMPK α 2-Expression die nach AMPK α 1-siRNA beobachteten Veränderungen beeinflusst, ist jedoch noch unklar. Herunterregulierung der AMPK α 2 scheint keinen signifikanten Einfluss auf die hier untersuchten Parameter der Seneszenz zu haben. Weder im Western Blot (p21, p53, phospho-p53) noch in der Immunfluoreszenz (p21) waren Veränderungen von Seneszenzmarkern nach AMPK α 2-Depletion zu beobachten. Zellen, in denen AMPK α 2 herunterreguliert wurde, zeigten auch keinen Anstieg von ROS oder von γ H2AX-markierten DNA-Schäden, was darauf hinweist, dass AMPK α 2 keine antioxidative Funktion in Endothelzellen besitzt. Auch die lysosomale Aktivität war in Zellen, in denen AMPK α 2 herunterreguliert wurde, nicht verändert. AMPK α 2-Depletion scheint jedoch Parameter wie Wachstum oder eNOS-Expression, gegensätzlich zu den bei AMPK α 1-Herunterregulierung beobachteten Effekten, zu

beeinflussen. So war in AMPK α 2-defizienten Zellen die eNOS-Expression erhöht und die iNOS-Expression verringert, was vermuten lässt, dass AMPK α 2 im Gegensatz zu AMPK α 1 eNOS reprimiert und iNOS induziert. Wang et al. beschreiben dagegen, dass die AMPK α 2 in Endothelzellen eine antioxidative Rolle hat und ihre Herunterregulierung zu endothelialer Dysfunktion führen kann [182]. AMPK α 2-defiziente Zellen zeigten in der hier vorliegenden Arbeit im Vergleich zu Kontrollzellen eine erhöhte Proliferation. Dies wurde in Wachstumskurven und in der RNA-Sequenzierungsanalyse deutlich. Letztere wies einen Anstieg von Genen auf, welche das Zellwachstum positiv regulieren. Das würde im Umkehrschluss bedeuten, dass die AMPK α 2 antiproliferative Eigenschaften besitzt. In Übereinstimmung damit konnten Fox et al. zeigen, dass die AMPK α 2 die Tumorentwicklung und damit unkontrolliertes Zellwachstum im Brustepithel hemmt. In Brustkrebs-Gewebeproben und der MCF-7-Brustkrebszelllinie war die AMPK α 2 deutlich herunterreguliert [183]. Die Daten zeigen, dass die AMPK α 2 das normale Wachstum von Brustepithelzellen kontrolliert und zu einer Hemmung des Zellwachstums bei Nährstoffrestriktion führt. Dieser Kontrollmechanismus entfiel in AMPK α 2-defizienten Brustkrebszellen, konnte aber durch die Überexpression von AMPK α 2 wiederhergestellt werden [183]. Über die Rolle der AMPK α 2 in Endothelzellen ist insgesamt wenig bekannt, so dass weitere Studien notwendig sind. Die gegensätzlichen Effekte der beiden AMPK α -Isoformen auf das eNOS:iNOS-Gleichgewicht und die Proliferation sind hier interessante Ansatzpunkte.

Die gleichzeitige Herunterregulierung beider AMPK α -Isoformen führte zu einem signifikanten Anstieg von p21 im Western Blot, der Anstieg von p53 war hingegen nicht signifikant. Auch das eNOS:iNOS-Verhältnis war nicht verändert und der Anstieg SA- β -Gal-positiver Zellen fiel geringer aus, als nach alleiniger Herunterregulation der AMPK α 1. Dies lässt vermuten, dass die Ergebnisse nach AMPK α 1-siRNA nicht allein auf das Fehlen der AMPK α 1 zurückzuführen sind, sondern dass der gleichzeitige Anstieg der AMPK α 2 ebenfalls eine Rolle spielt.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass eine Herunterregulierung der AMPK α 1 in Endothelzellen durch siRNA zu Seneszenz führt, während das Fehlen der AMPK α 2 hier keinen Einfluss hat. Unsere Daten weisen zudem auf verschiedene Rollen der beiden katalytischen Isoformen der AMPK in Endothelzellen hin, welche in weiterführenden Studien aufzuklären sind. Interessant ist, dass der Seneszenz-Phänotyp bereits 3 Tage nach siRNA-Behandlung auftritt. Um die *in-vivo*-Relevanz

dieser Befunde überprüfen zu können, wurden Untersuchungen in AMPK α 1- und AMPK α 2-*Knockout*-Mäusen durchgeführt.

4.4 Der *Knockout* von AMPK α 1 weist auf einen Alterungsphänotyp in Mäusen hin

In der vorliegenden Arbeit wurden AMPK α 1-/- und AMPK α 2-/- Mäuse eingesetzt, welche verschiedenen Hintergrundstämmen entstammen und daher nur bedingt einander gegenübergestellt werden können. Der korrekte Vergleich erfolgte mit den zugehörigen Wildtyp-Wurfgeschwistern des jeweiligen Mausstammes. AMPK α 1-/- Mäuse wiesen eine moderat aber signifikant verkürzte Lebensspanne auf. Sie starben im Durchschnitt ca. 10 Wochen früher als ihre Wildtyp-Wurfgeschwister. Dieser frühe Tod der AMPK α 1-/- Mäuse tritt ab einem Alter von ca. 20 Wochen auf und die Wahrscheinlichkeit nimmt mit dem Alter etwas zu. Die Lebensspanne der AMPK α 2-/- Mäuse unterscheidet sich hingegen nicht von den Wildtyp-Wurfgeschwistern.

Über einen Zusammenhang zwischen AMPK und Lebensspanne wurde bereits in früheren Studien berichtet. In Wirbellosen wurde beobachtet, dass eine Erhöhung der AMPK-Aktivität oder eine Hochregulierung der AMPK-Expression dem Alterungsprozess entgegenwirkt [47]. Eine indirekte Aktivierung der AMPK, zum Beispiel durch sportliche Aktivität oder kalorische Restriktion, führt auch in Säugetieren zu verbesserter Gesundheit und verlängerter Lebensspanne, obwohl hier neben der AMPK auch andere Proteine eine Rolle spielen [47]. Umfangreiche Altersstudien von AMPK-*Knockout*-Mäusen sind in der Literatur bisher nicht bekannt. Wang et al. konnten lediglich zeigen, dass der Doppel-*Knockout* von AMPK α 2 und Akt2, die Hauptisoform von Akt im Herzen, die Herzalterung beeinflusst, jedoch keine Auswirkung auf die Lebensspanne der Mäuse hat [184].

Da die Überlebenswahrscheinlichkeit der AMPK α 1-/- Mäuse im Alter von 60 Wochen bei ca. 50 % lag, wurde dieses Alter für experimentelle Ansätze gewählt und Mäuse im Alter von 60 Wochen mit Mäusen im Alter von 8 Wochen hinsichtlich verschiedener pathologisch relevanter und/oder altersassoziierter Parameter verglichen. Wir beobachteten, dass die Milz von 8 Wochen alten AMPK α 1-/- Mäusen signifikant vergrößert war und ihr Gewicht mit dem Alter noch zunahm. Das Gewicht von Herz, Niere und Leber und das Körpergewicht war in AMPK α 1-/- Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Kontrollmäusen dagegen nicht verändert. Eine Splenomegalie in AMPK α 1-/-

Mäusen war bereits in einer Studie von Wang et al. in 10-12 Wochen alten AMPK α 1-/- Mäusen aufgefallen, bei älteren Mäusen jedoch nicht untersucht worden [134]. In dieser früheren Studie wurde die vergrößerte Milz auf den erhöhten Abbau der durch die AMPK-Depletion fragileren Erythrozyten zurückgeführt. Die Abwesenheit der AMPK α 1 resultierte in einer verminderten Expression des FoxO3 Transkriptionsfaktors und der Herunterregulierung antioxidativer Gene in Erythrozyten mit nachfolgendem oxidativem Stress und vermehrter Oxidation intrazellulärer Proteine. Dies wiederum erhöhte die Rigidität der Erythrozyten, so dass sie die engen venösen Sinus nicht passieren konnten und daraufhin abgebaut wurden [134]. Kompensatorisch beobachteten Wang et al. anhand des Anstiegs erythroider Vorläuferzellen eine gesteigerte Erythropoese in der Milz, die allerdings eine milde Anämie nicht verhindern konnte. Interessanterweise bewirkte die Verabreichung des Antioxidans Tempol eine Abnahme des Erythrozytenabbaus sowie einer Verringerung der Milzgröße in AMPK α 1-/- Mäusen [134].

Unsere Daten bestätigen die Ergebnisse der Studie von Wang et al. [134] und zeigen, dass die beschriebenen Veränderungen in Milz und rotem Blutbild mit dem Alter der AMPK α 1-/- Mäuse stark zunehmen. Genau wie Wang et al. [134] beobachteten wir eine Erweiterung der roten Pulpa, die bei 60 Wochen alten Mäusen deutlich stärker ausgeprägt war und Einlagerungen großer Zellen aufwies, bei denen es sich vermutlich um Megakaryozyten, die Vorläuferzellen für Thrombozyten, handelte [185]. Auch dies deutet auf eine verstärkte extramedulläre Hämatopoese, eine Blutbildung außerhalb des Knochenmarks, hin [140, 186]. Die extramedulläre Hämatopoese in Milz und Leber, die vorwiegend im Fetus auftritt, kann im Rahmen von Immunantworten, Knochenmarkserkrankungen und/oder als kompensatorische Reaktion bei Anämie auch im adulten Organismus eine Rolle spielen [186, 187]. Eine Anämie war auch in unserer Studie in AMPK α 1-/- Mäusen nachweisbar und in alten AMPK α 1-/- Mäusen verstärkt ausgeprägt. Während in 8 Wochen alten AMPK α 1-/- Mäusen Hämoglobin- und Hämatokritwerte sowie das durchschnittliche Volumen der Erythrozyten vermindert waren, zeigte sich in 60 Wochen alten AMPK α 1-/- Mäusen zusätzlich eine signifikante Verminderung der roten Blutkörperchen. Als Hinweis darauf, dass ein verstärkter Abbau der Erythrozyten in der Milz die Ursache der Anämie in AMPK α 1-/- Mäusen sein kann, wie von Wang et al. beschrieben [134], sind Hämosiderinablagerungen in der Milz zu betrachten, obwohl dies noch durch

spezifische Anfärbungen verifiziert werden muss. Hämosiderin enthält gespeichertes Eisen, welches hauptsächlich dem Erythrozytenabbau entstammt [138].

Um zu untersuchen, ob auch in anderen Geweben von jungen und alten AMPK α 1-/- Mäusen pathologische Veränderungen auftreten, wurden histologische Untersuchungen in Leber, Niere und Herz durchgeführt. Niere und Herz blieben morphologisch in allen untersuchten Gruppen unauffällig. Dagegen beobachteten wir eine beginnende Cholestase in der Leber von 8 Wochen alten AMPK α 1-/- Mäusen und ausgeprägte Zeichen von Entzündung, Cholestase und Apoptose in der Leber von 60 Wochen alten AMPK α 1-/- Mäusen. Diese Prozesse sind möglicherweise kausal verknüpft. Es ist bekannt, dass Entzündungsprozesse eine wichtige Rolle bei der cholestatischen Leberschädigung spielen und dass Cholestase durch eine Blockierung des Abflusses der Gallensäure zur Apoptose von Hepatozyten führen kann [135].

Um zu untersuchen, ob sich die *in vitro* beobachtete endotheliale Seneszenz nach AMPK α 1-/- Herunterregulierung auch *in vivo* widerspiegelt, wurde zunächst die p21-Genexpression in den Organen von 60 Wochen alten AMPK α 1-/- Mäusen analysiert und mit der in jungen AMPK α 1-/- Mäusen verglichen. Wir beobachteten tendenziell eine Erhöhung der p21-Genexpression in Milz und Leber von AMPK α 1-/- Mäusen, nicht aber in Herz und Niere. Die verstärkte p21-Expression könnte ein Hinweis auf Seneszenz sein, allerdings aber auch seneszenzunabhängig in Zusammenhang mit den morphologisch nachgewiesenen Pathologien stehen. In der Literatur wird beispielsweise beschrieben, dass die erhöhte p21-Expression in der Leber mit Leberschädigung und Entzündung assoziiert ist [188]. Ebenso kann die erhöhte p21-Genexpression in der Milz von 60 Wochen alten AMPK α 1-/- Mäusen in Verbindung mit der bereits diskutierten Splenomegalie und der gesteigerten Erythropoese in AMPK α 1-/- Mäusen stehen. Lin et al. konnten zeigen, dass p21 in Erythroblasten von Patienten mit Beta-Thalassämie hochreguliert war und die Apoptose der Erythroblasten vermittelte [189]. In ähnlicher Weise könnte die erhöhte p21-Expression in der Milz von 60 Wochen alten AMPK α 1-/- Mäusen den vermehrten Abbau der Erythrozyten in der Milz fördern.

Die Aorten von 60 Wochen alten AMPK α 1-/- Mäusen zeigten keine Veränderung der p21-Expression, dagegen aber eine deutliche SA- β -Gal-positive Färbung. Die

Färbung ist nicht endothelzellspezifisch, sondern konnte anhand von Kryoschnitten in allen Schichten der Aorta nachgewiesen werden. Aorten von Wildtyp-Wurfgeschwistern sowie von 60 Wochen alten AMPK α 2^{-/-} und AMPK α 1^{+/+} Mäusen waren dagegen SA- β -Gal-negativ. Da die SA- β -Gal-positive Färbung der Aorta bereits in 8 Wochen alten AMPK α 1^{-/-} Mäusen nachgewiesen wurde, muss kritisch diskutiert werden, ob dies auch tatsächlich als ein Zeichen für Seneszenz zu interpretieren ist. Neue Studien zeigen, dass bestimmte nicht-seneszente Immunzellen ebenfalls positive SA- β -Gal Färbungen aufweisen können [190]. Es ist nicht geklärt, ob diese Zellen altersassoziiert auftreten oder ob und wie sie mit seneszenten Zellen interagieren [190]. Hall et al. konnten zum Beispiel zeigen, dass seneszente Zellen p16- und SA- β -Gal-positive Makrophagen rekrutieren können und diese möglicherweise eine Rolle bei der Beseitigung seneszenten Zellen spielen [191]. In alten Mäusen konnte zudem gezeigt werden, dass diese speziellen Makrophagen einen erheblichen Anteil der Zellen ausmachen, die im Vorfeld als seneszent definiert wurden [191]. Im alten Organismus könnte es aufgrund von Beeinträchtigungen des Immunsystems zu einer Anreicherung der Makrophagen im Gewebe kommen [191], sodass diese falsch-positive seneszente Ergebnisse vorspiegeln. Eine positive SA- β -Gal-Färbung kann auch im Zusammenhang mit diversen Krankheiten auftreten [192, 193] oder durch Hemmung der Zellproliferation oder Kontaktinhibition verursacht sein [192, 194]. Die SA- β -Gal-Färbung sollte daher nur als Seneszenzmarker interpretiert werden, wenn zusätzliche Indikatoren der Seneszenz nachzuweisen sind. Um eine endgültige Schlussfolgerung aus den erhobenen Daten ziehen zu können, müssen daher weitere Seneszenzmarker in der Aorta von AMPK α 1^{-/-} Mäusen nachgewiesen werden. Leider scheinen derzeit verfügbare Antikörper zum histochemischen Nachweis von p16 in der Maus eher unzuverlässig zu sein, was durch eigene Erfahrung und durch Literaturbefunde bestätigt werden konnte [146]. Insgesamt lassen die in der AMPK α 1^{-/-} Maus gewonnenen Daten jedoch eine wichtige Rolle der AMPK α 1^{-/-} im organismischen Alterungsprozess vermuten. Die verkürzte Lebensspanne in AMPK α 1^{-/-} Mäusen, die SA- β -Gal-positive Aorta und die erhöhte Expression von p21 in einigen Geweben weisen auf einen Alterungsphänotyp hin, welcher jedoch durch weitere Untersuchungen bestätigt werden muss.

4.5 Hypoxie als pro-Seneszenzfaktor

Durch die Verringerung des Hämoglobins bei Anämie kann nicht mehr genug Sauerstoff gebunden und im Blut transportiert werden, was zu einer Sauerstoffunterversorgung im Gewebe führen kann und als anämische Hypoxie bezeichnet wird [142]. Letztere könnte die Entwicklung von pathologischen Gewebeveränderungen und Alterung begünstigen. Um zu prüfen, ob Hypoxie generell zur Entwicklung von Seneszenz beitragen kann, wurden HUVEC einem verminderten Sauerstoffdruck ausgesetzt und anschließend hinsichtlich verschiedener Seneszenzparameter charakterisiert. Hypoxie führte zu einem Anstieg SA- β -Gal-positiver Zellen und zu einem Stopp der Proliferation in HUVEC. Interessanterweise war p21 jedoch im Western Blot unter hypoxischen Bedingungen herunterreguliert, was vermuten lässt, dass die Hemmung der Zellproliferation unabhängig von p21 erfolgte. Die Rolle von p21 bei Hypoxie wird in der Literatur unterschiedlich gesehen. Zum einen wurde unter hypoxischen Bedingungen in vielen Zelltypen eine durch HIF-1 α induzierte Hochregulation von p21 und ein p21-induzierter Zellzyklusarrest beobachtet [195]. Zum anderen wurde aber auch gezeigt, dass Hypoxie zu einem Zellzyklusarrest führt, der unabhängig von p53 und p21 ist und durch p27 vermittelt wird [196]. Interessanterweise wurde außerdem beschrieben, dass im Gegensatz zu HIF-1 α der ebenfalls bei Hypoxie erhöhte Transkriptionsfaktor HIF-2 α eine Repression von p21 bewirkt, ein Prozess, der über eine Erhöhung der transkriptionalen Aktivität von c-Myc reguliert wird [197]. Ob dieser Mechanismus im hier eingesetzten Model der Hypoxie zutrifft, muss in weiteren Experimenten geklärt werden. Genauso sollte weiter untersucht werden, inwieweit die reduzierte p21-Expression zur Entwicklung der Seneszenz unter Hypoxie beitragen kann. P21 hat je nach Lokalisation in der Zelle verschiedene Funktionen. Im Zellkern vermittelt p21 hauptsächlich Zellzyklusarrest und wirkt als Tumor-Suppressor, wohingegen es im Zellplasma eine anti-apoptotische Funktion besitzt und als Onkogen agieren kann [198, 199].

Die Daten der vorliegenden Arbeit zeigen auch, dass die AMPK α 1 unter hypoxischen Bedingungen herunterreguliert wird, wohingegen eine gesteigerte Expression der AMPK α 2 zu beobachten ist. Diese Veränderung der Isoform-Verteilung kann in Zusammenhang mit der Funktion der AMPK unter hypoxischen Bedingungen stehen und muss weiterführend untersucht werden. Im Rahmen der Hypoxie spielt die AMPK eine wichtige protektive Rolle, indem sie den zellulären ATP-Verbrauch verringert und

Autophagie induziert [200-202]. In der Literatur wird beschrieben, dass Hypoxie zur Aktivierung der AMPK führt [200].

Der Zusammenhang zwischen Hypoxie, Seneszenz und Alterung wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Zum einen wird beschrieben, dass Hypoxie aufgrund des niedrigen Sauerstoffgehaltes, durch die Verminderung von oxidativem Stress Seneszenz entgegenwirken kann [203]. Zum anderen wurde unter hypoxischen Bedingungen auch ein Anstieg von ROS beobachtet [204]. Leontieva et al. konnten zeigen, dass Hypoxie zwar zum Zellzyklusarrest führt, aber den Übergang zur Seneszenz durch Inhibierung des mTOR-Signalweges verhindert [205]. In Zellen, die altersbedingt eine verminderte Stressadaptation haben, scheint Hypoxie jedoch zum zellulären Alterungsprozess beizutragen [206]. Basierend auf Literaturdaten und auf den Beobachtungen der vorgelegten Studie kann daher vermutet werden, dass eine durch Anämie verursachte Hypoxie in AMPK α 1-/- Mäusen durchaus Seneszenz fördern kann, dies aber in weiteren Untersuchungen substantiviert werden muss. In den Aorten der AMPK α 1-/- Mäuse könnte neben Hypoxie auch Scherstress eine Rolle bei der Entwicklung von Seneszenz spielen. Als kompensatorische Folge der Anämie kann es zu einer erhöhten Herzleistung und einem hyperdynamischen Blutfluss kommen, welcher mit erhöhtem Scherstress verbunden ist [207]. Warboys et al. konnten zeigen, dass ein gestörter Blutfluss durch Aktivierung des p53-p21-Signalwegs zu endothelialer Seneszenz führen kann [208].

5. Schlussfolgerung und Ausblick

Die AMPK, ein bedeutender Regulator von zellulärem Energiestoffwechsel und Homöostase, beeinflusst verschiedene Signalwege, die zur Verlängerung der Lebensspanne beitragen können. Die vorgelegte Arbeit diente der Untersuchung des AMPK-Signalwegs im Alterungsprozess von Endothelzellen. Es konnte gezeigt werden, dass die AMPK in seneszenten und chronologisch gealterten Endothelzellen verstärkt exprimiert ist und damit teilweise ein Verlust der basalen Enzymaktivität ausgeglichen wird. Die Aktivierbarkeit der AMPK in seneszenten und gealterten Endothelzellen wurde in Abhängigkeit vom vorgeschalteten Signalweg unterschiedlich beeinflusst. Während nach Energiemangel durch Hemmung der Glykolyse eine weitgehend verminderte AMPK-Aktivierung beobachtet wurde, war die Aktivierung der AMPK nach VEGF, einem wichtigen Stimulus der Kinase, in seneszenten Zellen verstärkt. Letzteres beruhte auf einer Hochregulierung des VEGF-Signalwegs. Umgekehrt war eine verminderte Expression des VEGFR2-Rezeptors in gealterten Zellen mit reduzierter AMPK-Aktivierung verbunden. Ein wichtiges Ergebnis dieser Arbeit ist, dass die Herunterregulierung der katalytischen Untereinheit AMPK α 1 durch siRNA zu Seneszenz in Endothelzellen führt. Dies wurde anhand einer positiven SA- β -Gal-Färbung, einer Proliferationshemmung und der erhöhten Expression verschiedener Seneszenzmarker-Proteine (p53, p21) gezeigt. In Übereinstimmung damit wurden in AMPK α 1 $^{-/-}$ Mäusen verschiedene Charakteristika beschrieben, die auf eine vorzeitige Alterung hinweisen. Dazu zählen die verkürzte Lebensspanne der Mäuse, die SA- β -Gal-positive Aorta, sowie erhöhte p21-Werte in Leber und Milz, die mit morphologischen pathologischen Veränderungen assoziiert waren. Für eine eindeutige Aussage bedarf es der näheren Charakterisierung anhand weiterer Seneszenzmarker. Gewebespezifische AMPK α 1-*Knockout*-Mausmodelle, welche die Untersuchung der vaskulären Alterung erlauben sowie eine genaue Beobachtung und Analyse der Tiere vor ihrem Tod können weitere wichtige Einblicke liefern.

6. Literaturverzeichnis

- [1] Aird WC. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms. *Circulation research*. 2007;100(2):158-73.
- [2] Aird WC. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: II. Representative vascular beds. *Circulation research*. 2007;100(2):174-90.
- [3] Galley HF, Webster NR. Physiology of the endothelium. *British journal of anaesthesia*. 2004;93(1):105-13.
- [4] Ruiter DJ, Schlingemann RO, Westphal JR, Denijn M, Rietveld FJ, De Waal RM. Angiogenesis in wound healing and tumor metastasis. *Behring Institute Mitteilungen*. 1993(92):258-72.
- [5] Ludmer PL, Selwyn AP, Shook TL, Wayne RR, Mudge GH, Alexander RW, et al. Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries. *The New England journal of medicine*. 1986;315(17):1046-51.
- [6] Sitia S, Tomasoni L, Atzeni F, Ambrosio G, Cordiano C, Catapano A, et al. From endothelial dysfunction to atherosclerosis. *Autoimmunity reviews*. 2010;9(12):830-4.
- [7] 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. *Journal of biomedical science*. 2014;21(1):3.
- [8] Farrow KN, Lakshminrusimha S, Reda WJ, Wedgwood S, Czech L, Gugino SF, et al. Superoxide dismutase restores eNOS expression and function in resistance pulmonary arteries from neonatal lambs with persistent pulmonary hypertension. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2008;295(6):L979-87.
- [9] Matsubara K, Higaki T, Matsubara Y, Nawa A. Nitric oxide and reactive oxygen species in the pathogenesis of preeclampsia. *International journal of molecular sciences*. 2015;16(3):4600-14.
- [10] Jessup W, Kritharides L, Stocker R. Lipid oxidation in atherogenesis: an overview. *Biochemical Society transactions*. 2004;32(Pt 1):134-8.
- [11] Brophy ML, Dong Y, Wu H, Rahman HN, Song K, Chen H. Eating the Dead to Keep Atherosclerosis at Bay. *Frontiers in cardiovascular medicine*. 2017;4:2.
- [12] Sena CM, Leandro A, Azul L, Seiça R, Perry G. Vascular Oxidative Stress: Impact and Therapeutic Approaches. *Frontiers in physiology*. 2018;9:1668.
- [13] Bryan HK, Olayanju A, Goldring CE, Park BK. The Nrf2 cell defence pathway: Keap1-dependent and -independent mechanisms of regulation. *Biochemical pharmacology*. 2013;85(6):705-17.
- [14] 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. *European journal of biochemistry*. 1994;223(2):351-7.
- [15] Stapleton D, Mitchelhill KI, Gao G, Widmer J, Michell BJ, Teh T, et al. Mammalian AMP-activated protein kinase subfamily. *The Journal of biological chemistry*. 1996;271(2):611-4.

- [16] Yan Y, Zhou XE, Xu HE, Melcher K. Structure and Physiological Regulation of AMPK. *International journal of molecular sciences*. 2018;19(11).
- [17] Ross FA, MacKintosh C, Hardie DG. AMP-activated protein kinase: a cellular energy sensor that comes in 12 flavours. *The FEBS journal*. 2016;283(16):2987-3001.
- [18] Hardie DG. AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2007;8(10):774-85.
- [19] Crute BE, Seefeld K, Gamble J, Kemp BE, Witters LA. Functional domains of the alpha1 catalytic subunit of the AMP-activated protein kinase. *The Journal of biological chemistry*. 1998;273(52):35347-54.
- [20] McBride A, Ghilagaber S, Nikolaev A, Hardie DG. The glycogen-binding domain on the AMPK beta subunit allows the kinase to act as a glycogen sensor. *Cell metabolism*. 2009;9(1):23-34.
- [21] Scott JW, Hawley SA, Green KA, Anis M, Stewart G, Scullion GA, et al. CBS domains form energy-sensing modules whose binding of adenosine ligands is disrupted by disease mutations. *The Journal of clinical investigation*. 2004;113(2):274-84.
- [22] Li J, Coven DL, Miller EJ, Hu X, Young ME, Carling D, et al. Activation of AMPK alpha- and gamma-isoform complexes in the intact ischemic rat heart. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2006;291(4):H1927-34.
- [23] Fisslthaler B, Fleming I. Activation and signaling by the AMP-activated protein kinase in endothelial cells. *Circulation research*. 2009;105(2):114-27.
- [24] Sanders MJ, Grondin PO, Hegarty BD, Snowden MA, Carling D. Investigating the mechanism for AMP activation of the AMP-activated protein kinase cascade. *The Biochemical journal*. 2007;403(1):139-48.
- [25] Hawley SA, Davison M, Woods A, Davies SP, Beri RK, Carling D, et al. Characterization of the AMP-activated protein kinase kinase from rat liver and identification of threonine 172 as the major site at which it phosphorylates AMP-activated protein kinase. *The Journal of biological chemistry*. 1996;271(44):27879-87.
- [26] 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. *The Journal of biological chemistry*. 2006;281(43):32207-16.
- [27] Shaw RJ, Kosmatka M, Bardeesy N, Hurley RL, Witters LA, DePinho RA, et al. The tumor suppressor LKB1 kinase directly activates AMP-activated kinase and regulates apoptosis in response to energy stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004;101(10):3329-35.
- [28] Davies SP, Helps NR, Cohen PT, Hardie DG. 5'-AMP inhibits dephosphorylation, as well as promoting phosphorylation, of the AMP-activated protein kinase. Studies using bacterially expressed human protein phosphatase-2C alpha and native bovine protein phosphatase-2AC. *FEBS letters*. 1995;377(3):421-5.
- [29] Hawley SA, Pan DA, Mustard KJ, Ross L, Bain J, Edelman AM, et al. Calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta is an alternative upstream kinase for AMP-activated protein kinase. *Cell metabolism*. 2005;2(1):9-19.

- [30] Racioppi L, Means AR. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 2: roles in signaling and pathophysiology. *The Journal of biological chemistry*. 2012;287(38):31658-65.
- [31] Stahmann N, Woods A, Spengler K, Heslegrave A, Bauer R, Krause S, et al. Activation of AMP-activated protein kinase by vascular endothelial growth factor mediates endothelial angiogenesis independently of nitric-oxide synthase. *The Journal of biological chemistry*. 2010;285(14):10638-52.
- [32] Putney JW, Tomita T. Phospholipase C signaling and calcium influx. *Advances in biological regulation*. 2012;52(1):152-64.
- [33] Kim J, Yang G, Kim Y, Kim J, Ha J. AMPK activators: mechanisms of action and physiological activities. *Experimental & molecular medicine*. 2016;48(4):e224.
- [34] Owen MR, Doran E, Halestrap AP. Evidence that metformin exerts its anti-diabetic effects through inhibition of complex 1 of the mitochondrial respiratory chain. *The Biochemical journal*. 2000;348 Pt 3(Pt 3):607-14.
- [35] 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? *European journal of biochemistry*. 1995;229(2):558-65.
- [36] Kemp BE, Stapleton D, Campbell DJ, Chen ZP, Murthy S, Walter M, et al. AMP-activated protein kinase, super metabolic regulator. *Biochemical Society transactions*. 2003;31(Pt 1):162-8.
- [37] Hardie DG, Pan DA. Regulation of fatty acid synthesis and oxidation by the AMP-activated protein kinase. *Biochemical Society transactions*. 2002;30(Pt 6):1064-70.
- [38] O'Neill HM, Lally JS, Galic S, Thomas M, Azizi PD, Fullerton MD, et al. AMPK phosphorylation of ACC2 is required for skeletal muscle fatty acid oxidation and insulin sensitivity in mice. *Diabetologia*. 2014;57(8):1693-702.
- [39] 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. *The EMBO journal*. 1990;9(8):2439-46.
- [40] Gwinn DM, Shackelford DB, Egan DF, Mihaylova MM, Mery A, Vasquez DS, et al. AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Molecular cell*. 2008;30(2):214-26.
- [41] Inoki K, Zhu T, Guan KL. TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell*. 2003;115(5):577-90.
- [42] Horman S, Browne G, Krause U, Patel J, Vertommen D, Bertrand L, et al. Activation of AMP-activated protein kinase leads to the phosphorylation of elongation factor 2 and an inhibition of protein synthesis. *Current biology : CB*. 2002;12(16):1419-23.
- [43] Wu N, Zheng B, Shaywitz A, Dagon Y, Tower C, Bellinger G, et al. AMPK-dependent degradation of TXNIP upon energy stress leads to enhanced glucose uptake via GLUT1. *Molecular cell*. 2013;49(6):1167-75.

- [44] Chavez JA, Roach WG, Keller SR, Lane WS, Lienhard GE. Inhibition of GLUT4 translocation by Tbc1d1, a Rab GTPase-activating protein abundant in skeletal muscle, is partially relieved by AMP-activated protein kinase activation. *The Journal of biological chemistry*. 2008;283(14):9187-95.
- [45] Bando H, Atsumi T, Nishio T, Niwa H, Mishima S, Shimizu C, et al. Phosphorylation of the 6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase/PFKFB3 family of glycolytic regulators in human cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2005;11(16):5784-92.
- [46] Cantó C, Gerhart-Hines Z, Feige JN, Lagouge M, Noriega L, Milne JC, et al. AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD⁺ metabolism and SIRT1 activity. *Nature*. 2009;458(7241):1056-60.
- [47] Salminen A, Kaarniranta K. AMP-activated protein kinase (AMPK) controls the aging process via an integrated signaling network. *Ageing research reviews*. 2012;11(2):230-41.
- [48] Ventura-Clapier R, Garnier A, Veksler V. Transcriptional control of mitochondrial biogenesis: the central role of PGC-1 α . *Cardiovascular research*. 2008;79(2):208-17.
- [49] Viollet B, Athes Y, Mounier R, Guigas B, Zarrinpashneh E, Horman S, et al. AMPK: Lessons from transgenic and knockout animals. *Frontiers in bioscience (Landmark edition)*. 2009;14:19-44.
- [50] Viollet B, Andreelli F, Jørgensen SB, Perrin C, Flamez D, Mu J, et al. Physiological role of AMP-activated protein kinase (AMPK): insights from knockout mouse models. *Biochemical Society transactions*. 2003;31(Pt 1):216-9.
- [51] Herrera MD, Mingorance C, Rodríguez-Rodríguez R, Alvarez de Sotomayor M. Endothelial dysfunction and aging: an update. *Ageing research reviews*. 2010;9(2):142-52.
- [52] Incalza MA, D'Oria R, Natalicchio A, Perrini S, Laviola L, Giorgino F. Oxidative stress and reactive oxygen species in endothelial dysfunction associated with cardiovascular and metabolic diseases. *Vascular pharmacology*. 2018;100:1-19.
- [53] Seals DR, Jablonski KL, Donato AJ. Aging and vascular endothelial function in humans. *Clinical science (London, England : 1979)*. 2011;120(9):357-75.
- [54] Li XN, Song J, Zhang L, LeMaire SA, Hou X, Zhang C, et al. Activation of the AMPK-FOXO3 pathway reduces fatty acid-induced increase in intracellular reactive oxygen species by upregulating thioredoxin. *Diabetes*. 2009;58(10):2246-57.
- [55] Mihaylova MM, Shaw RJ. The AMPK signalling pathway coordinates cell growth, autophagy and metabolism. *Nature cell biology*. 2011;13(9):1016-23.
- [56] Salminen A, Kaarniranta K. Regulation of the aging process by autophagy. *Trends in molecular medicine*. 2009;15(5):217-24.
- [57] Kang C, You YJ, Avery L. Dual roles of autophagy in the survival of *Caenorhabditis elegans* during starvation. *Genes & development*. 2007;21(17):2161-71.
- [58] Kang HT, Lee KB, Kim SY, Choi HR, Park SC. Autophagy impairment induces premature senescence in primary human fibroblasts. *PloS one*. 2011;6(8):e23367.

- [59] Kim J, Kundu M, Viollet B, Guan KL. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nature cell biology*. 2011;13(2):132-41.
- [60] Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *Journal of gerontology*. 1956;11(3):298-300.
- [61] Greer EL, Oskoui PR, Banko MR, Maniar JM, Gygi MP, Gygi SP, et al. The energy sensor AMP-activated protein kinase directly regulates the mammalian FOXO3 transcription factor. *The Journal of biological chemistry*. 2007;282(41):30107-19.
- [62] Xie Z, Zhang J, Wu J, Viollet B, Zou MH. Upregulation of mitochondrial uncoupling protein-2 by the AMP-activated protein kinase in endothelial cells attenuates oxidative stress in diabetes. *Diabetes*. 2008;57(12):3222-30.
- [63] Greer EL, Dowlatshahi D, Banko MR, Villen J, Hoang K, Blanchard D, et al. An AMPK-FOXO pathway mediates longevity induced by a novel method of dietary restriction in *C. elegans*. *Current biology : CB*. 2007;17(19):1646-56.
- [64] Joo MS, Kim WD, Lee KY, Kim JH, Koo JH, Kim SG. AMPK Facilitates Nuclear Accumulation of Nrf2 by Phosphorylating at Serine 550. 2016;36(14):1931-42.
- [65] Tonelli C, Chio IIC, Tuveson DA. Transcriptional Regulation by Nrf2. *Antioxidants & redox signaling*. 2018;29(17):1727-45.
- [66] Liu XM, Peyton KJ, Shebib AR, Wang H, Korthuis RJ, Durante W. Activation of AMPK stimulates heme oxygenase-1 gene expression and human endothelial cell survival. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2011;300(1):H84-93.
- [67] Araujo JA, Zhang M, Yin F. Heme oxygenase-1, oxidation, inflammation, and atherosclerosis. *Frontiers in pharmacology*. 2012;3:119.
- [68] Kim J, Cha YN, Surh YJ. A protective role of nuclear factor-erythroid 2-related factor-2 (Nrf2) in inflammatory disorders. *Mutation research*. 2010;690(1-2):12-23.
- [69] Baker RG, Hayden MS, Ghosh S. NF- κ B, inflammation, and metabolic disease. *Cell metabolism*. 2011;13(1):11-22.
- [70] Yu M, Li H, Liu Q, Liu F, Tang L, Li C, et al. Nuclear factor p65 interacts with Keap1 to repress the Nrf2-ARE pathway. *Cellular signalling*. 2011;23(5):883-92.
- [71] Salminen A, Hyttinen JM, Kaarniranta K. AMP-activated protein kinase inhibits NF- κ B signaling and inflammation: impact on healthspan and lifespan. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*. 2011;89(7):667-76.
- [72] Yeung F, Hoberg JE, Ramsey CS, Keller MD, Jones DR, Frye RA, et al. Modulation of NF-kappaB-dependent transcription and cell survival by the SIRT1 deacetylase. *The EMBO journal*. 2004;23(12):2369-80.
- [73] Alvarez-Guardia D, Palomer X, Coll T, Davidson MM, Chan TO, Feldman AM, et al. The p65 subunit of NF-kappaB binds to PGC-1alpha, linking inflammation and metabolic disturbances in cardiac cells. *Cardiovascular research*. 2010;87(3):449-58.
- [74] Kim HJ, Park KG, Yoo EK, Kim YH, Kim YN, Kim HS, et al. Effects of PGC-1alpha on TNF-alpha-induced MCP-1 and VCAM-1 expression and NF-kappaB activation in human aortic smooth muscle and endothelial cells. *Antioxidants & redox signaling*. 2007;9(3):301-7.

- [75] Lin L, Hron JD, Peng SL. Regulation of NF-kappaB, Th activation, and autoinflammation by the forkhead transcription factor Foxo3a. *Immunity*. 2004;21(2):203-13.
- [76] Hu MC, Lee DF, Xia W, Golfman LS, Ou-Yang F, Yang JY, et al. IkappaB kinase promotes tumorigenesis through inhibition of forkhead FOXO3a. *Cell*. 2004;117(2):225-37.
- [77] Escoubas CC, Silva-García CG, Mair WB. Deregulation of CRTCs in Aging and Age-Related Disease Risk. *Trends in genetics : TIG*. 2017;33(5):303-21.
- [78] Mair W, Morante I, Rodrigues APC, Manning G, Montminy M, Shaw RJ, et al. Lifespan extension induced by AMPK and calcineurin is mediated by CRTC-1 and CREB. *Nature*. 2011;470(7334):404-8.
- [79] Fontana L, Partridge L, Longo VD. Extending healthy life span--from yeast to humans. *Science (New York, NY)*. 2010;328(5976):321-6.
- [80] Most J, Tosti V, Redman LM, Fontana L. Calorie restriction in humans: An update. *Ageing research reviews*. 2017;39:36-45.
- [81] Anderson RM, Shanmuganayagam D, Weindruch R. Caloric restriction and aging: studies in mice and monkeys. *Toxicologic pathology*. 2009;37(1):47-51.
- [82] McCay CM. Effect of Restricted Feeding Upon Aging and Chronic Diseases in Rats and Dogs. *American journal of public health and the nation's health*. 1947;37(5):521-8.
- [83] Berg BN, Simms HS. Nutrition and longevity in the rat. II. Longevity and onset of disease with different levels of food intake. *The Journal of nutrition*. 1960;71:255-63.
- [84] Ross MH. Length of life and caloric intake. *The American journal of clinical nutrition*. 1972;25(8):834-8.
- [85] Apfeld J, O'Connor G, McDonagh T, DiStefano PS, Curtis R. The AMP-activated protein kinase AAK-2 links energy levels and insulin-like signals to lifespan in *C. elegans*. *Genes & development*. 2004;18(24):3004-9.
- [86] Onken B, Driscoll M. Metformin induces a dietary restriction-like state and the oxidative stress response to extend *C. elegans* Healthspan via AMPK, LKB1, and SKN-1. *PloS one*. 2010;5(1):e8758.
- [87] Funakoshi M, Tsuda M, Muramatsu K, Hatsuda H, Morishita S, Aigaki T. A gain-of-function screen identifies *wdb* and *lkb1* as lifespan-extending genes in *Drosophila*. *Biochemical and biophysical research communications*. 2011;405(4):667-72.
- [88] Cantó C, Auwerx J. Caloric restriction, SIRT1 and longevity. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*. 2009;20(7):325-31.
- [89] Bordone L, Cohen D, Robinson A, Motta MC, van Veen E, Czopik A, et al. SIRT1 transgenic mice show phenotypes resembling calorie restriction. *Aging cell*. 2007;6(6):759-67.
- [90] Ma L, Wang R, Wang H, Zhang Y, Zhao Z. Long-term caloric restriction activates the myocardial SIRT1/AMPK/PGC-1 α pathway in C57BL/6J male mice. *Food & nutrition research*. 2020;64.

- [91] Kume S, Uzu T, Horiike K, Chin-Kanasaki M, Isshiki K, Araki S, et al. Calorie restriction enhances cell adaptation to hypoxia through Sirt1-dependent mitochondrial autophagy in mouse aged kidney. *The Journal of clinical investigation*. 2010;120(4):1043-55.
- [92] Viollet B, Horman S, Leclerc J, Lantier L, Foretz M, Billaud M, et al. AMPK inhibition in health and disease. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*. 2010;45(4):276-95.
- [93] Wang MY, Unger RH. Role of PP2C in cardiac lipid accumulation in obese rodents and its prevention by troglitazone. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism*. 2005;288(1):E216-21.
- [94] Salminen A, Kaarniranta K, Kauppinen A. Age-related changes in AMPK activation: Role for AMPK phosphatases and inhibitory phosphorylation by upstream signaling pathways. *Ageing research reviews*. 2016;28:15-26.
- [95] Reznick RM, Zong H, Li J, Morino K, Moore IK, Yu HJ, et al. Aging-associated reductions in AMP-activated protein kinase activity and mitochondrial biogenesis. *Cell metabolism*. 2007;5(2):151-6.
- [96] Qiang W, Weiqiang K, Qing Z, Pengju Z, Yi L. Aging impairs insulin-stimulated glucose uptake in rat skeletal muscle via suppressing AMPKalpha. *Experimental & molecular medicine*. 2007;39(4):535-43.
- [97] Tosato M, Zamboni V, Ferrini A, Cesari M. The aging process and potential interventions to extend life expectancy. *Clinical interventions in aging*. 2007;2(3):401-12.
- [98] López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The hallmarks of aging. *Cell*. 2013;153(6):1194-217.
- [99] Rhinn M, Ritschka B, Keyes WM. Cellular senescence in development, regeneration and disease. *Development (Cambridge, England)*. 2019;146(20).
- [100] Chen H, Li Y, Tollefsbol TO. Cell senescence culturing methods. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)*. 2013;1048:1-10.
- [101] Kurz DJ, Decary S, Hong Y, Erusalimsky JD. Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. *Journal of cell science*. 2000;113 (Pt 20):3613-22.
- [102] Debacq-Chainiaux F, Erusalimsky JD, Campisi J, Toussaint O. Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA-beta-gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo. *Nature protocols*. 2009;4(12):1798-806.
- [103] Jia G, Aroor AR, Jia C, Sowers JR. Endothelial cell senescence in aging-related vascular dysfunction. *Biochimica et biophysica acta Molecular basis of disease*. 2019;1865(7):1802-9.
- [104] Matsushita H, Chang E, Glassford AJ, Cooke JP, Chiu CP, Tsao PS. eNOS activity is reduced in senescent human endothelial cells: Preservation by hTERT immortalization. *Circulation research*. 2001;89(9):793-8.
- [105] Kirkland JL, Tchkonja T. Cellular Senescence: A Translational Perspective. *EBioMedicine*. 2017;21:21-8.

- [106] Hayflick L. THE LIMITED IN VITRO LIFETIME OF HUMAN DIPLOID CELL STRAINS. *Experimental cell research*. 1965;37:614-36.
- [107] Harley CB, Futcher AB, Greider CW. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature*. 1990;345(6274):458-60.
- [108] Zvereva MI, Shcherbakova DM, Dontsova OA. Telomerase: structure, functions, and activity regulation. *Biochemistry Biokhimiia*. 2010;75(13):1563-83.
- [109] Hewitt G, Jurk D, Marques FD, Correia-Melo C, Hardy T, Gackowska A, et al. Telomeres are favoured targets of a persistent DNA damage response in ageing and stress-induced senescence. *Nature communications*. 2012;3:708.
- [110] Kopp B, Khoury L, Audebert M. Validation of the γ H2AX biomarker for genotoxicity assessment: a review. *Archives of toxicology*. 2019;93(8):2103-14.
- [111] Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS, Bonner WM. DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *The Journal of biological chemistry*. 1998;273(10):5858-68.
- [112] Fernandez-Capetillo O, Celeste A, Nussenzweig A. Focusing on foci: H2AX and the recruitment of DNA-damage response factors. *Cell cycle (Georgetown, Tex)*. 2003;2(5):426-7.
- [113] Mijit M, Caracciolo V, Melillo A, Amicarelli F, Giordano A. Role of p53 in the Regulation of Cellular Senescence. *Biomolecules*. 2020;10(3).
- [114] Rufini A, Tucci P, Celardo I, Melino G. Senescence and aging: the critical roles of p53. *Oncogene*. 2013;32(43):5129-43.
- [115] Stein GH, Drullinger LF, Soulard A, Dulić V. Differential roles for cyclin-dependent kinase inhibitors p21 and p16 in the mechanisms of senescence and differentiation in human fibroblasts. *Molecular and cellular biology*. 1999;19(3):2109-17.
- [116] Kulaberoglu Y, Gundogdu R, Hergovich A. Chapter 15 - The Role of p53/p21/p16 in DNA-Damage Signaling and DNA Repair. In: Kovalchuk I, Kovalchuk O, editors. *Genome Stability*. Boston: Academic Press; 2016. p. 243-56.
- [117] Beauséjour CM, Krtolica A, Galimi F, Narita M, Lowe SW, Yaswen P, et al. Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways. *The EMBO journal*. 2003;22(16):4212-22.
- [118] Toussaint O, Royer V, Salmon M, Remacle J. Stress-induced premature senescence and tissue ageing. *Biochemical pharmacology*. 2002;64(5-6):1007-9.
- [119] Thorin E, Thorin-Trescases N. Role of Oxidative Stress in Vascular Endothelial Cells Through Aging – a Double-Edged Sword. In: Laher I, editor. *Systems Biology of Free Radicals and Antioxidants*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2014. p. 1383-403.
- [120] Suo R, Zhao ZZ, Tang ZH, Ren Z, Liu X, Liu LS, et al. Hydrogen sulfide prevents H₂O₂-induced senescence in human umbilical vein endothelial cells through SIRT1 activation. *Molecular medicine reports*. 2013;7(6):1865-70.

- [121] Farhat N, Thorin-Trescases N, Voghel G, Villeneuve L, Mamarbachi M, Perrault LP, et al. Stress-induced senescence predominates in endothelial cells isolated from atherosclerotic chronic smokers. *Canadian journal of physiology and pharmacology*. 2008;86(11):761-9.
- [122] Pham HL, Pham P. High glucose induces early senescence in adipose-derived stem cells by accelerating p16 and mTOR. *Biomedical Research and Therapy*. 2019;6(6):3213-21.
- [123] Maeda M, Hayashi T, Mizuno N, Hattori Y, Kuzuya M. Intermittent high glucose implements stress-induced senescence in human vascular endothelial cells: role of superoxide production by NADPH oxidase. *PloS one*. 2015;10(4):e0123169.
- [124] Chen J, Huang X, Halicka D, Brodsky S, Avram A, Eskander J, et al. Contribution of p16INK4a and p21CIP1 pathways to induction of premature senescence of human endothelial cells: permissive role of p53. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2006;290(4):H1575-86.
- [125] Coleman PR, Hahn CN, Grimshaw M, Lu Y, Li X, Brautigan PJ, et al. Stress-induced premature senescence mediated by a novel gene, SENEX, results in an anti-inflammatory phenotype in endothelial cells. *Blood*. 2010;116(19):4016-24.
- [126] Parker AL, Newman C, Briggs S, Seymour L, Sheridan PJ. Nonviral gene delivery: techniques and implications for molecular medicine. *Expert reviews in molecular medicine*. 2003;5(22):1-15.
- [127] Friend DS, Papahadjopoulos D, Debs RJ. Endocytosis and intracellular processing accompanying transfection mediated by cationic liposomes. *Biochimica et biophysica acta*. 1996;1278(1):41-50.
- [128] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of biological chemistry*. 1951;193(1):265-75.
- [129] Meçe O. The role of the proteasome in endothelial cell senescence [Dissertation]: Universitätsklinikum Jena, Institut für Molekulare Zellbiologie; 2017.
- [130] Yoshimori T, Yamamoto A, Moriyama Y, Futai M, Tashiro Y. Bafilomycin A1, a specific inhibitor of vacuolar-type H(+)-ATPase, inhibits acidification and protein degradation in lysosomes of cultured cells. *The Journal of biological chemistry*. 1991;266(26):17707-12.
- [131] Kuo LJ, Yang LX. Gamma-H2AX - a novel biomarker for DNA double-strand breaks. *In vivo (Athens, Greece)*. 2008;22(3):305-9.
- [132] Kurose A, Tanaka T, Huang X, Traganos F, Dai W, Darzynkiewicz Z. Effects of hydroxyurea and aphidicolin on phosphorylation of ataxia telangiectasia mutated on Ser 1981 and histone H2AX on Ser 139 in relation to cell cycle phase and induction of apoptosis. *Cytometry Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology*. 2006;69(4):212-21.
- [133] Fragkos M, Jurvansuu J, Beard P. H2AX is required for cell cycle arrest via the p53/p21 pathway. *Molecular and cellular biology*. 2009;29(10):2828-40.
- [134] Wang S, Dale GL, Song P, Viollet B, Zou MH. AMPKalpha1 deletion shortens erythrocyte life span in mice: role of oxidative stress. *The Journal of biological chemistry*. 2010;285(26):19976-85.

- [135] Woolbright BL, Jaeschke H. Inflammation and Cell Death During Cholestasis: The Evolving Role of Bile Acids. *Gene expression*. 2019;19(3):215-28.
- [136] Gasmi B, Kleiner DE. Liver Histology: Diagnostic and Prognostic Features. *Clinics in liver disease*. 2020;24(1):61-74.
- [137] Gonzalez RS. Cholestasis. *PathologyOutlines.com* [website] 2020 [updated 06.05.2021; cited 06.07.2021]. Available from: <https://www.pathologyoutlines.com/topic/livercholestasis.html>.
- [138] Boes KM, Durham AC. Bone Marrow, Blood Cells, and the Lymphoid/Lymphatic System. *Pathologic Basis of Veterinary Disease*. 2017:724-804.e2.
- [139] Kucine N, Giardina PJ. *Thalassemia*. Reference Module in Biomedical Sciences. 2014.
- [140] Song MK, Park BB, Uhm JE. Understanding Splenomegaly in Myelofibrosis: Association with Molecular Pathogenesis. *International journal of molecular sciences*. 2018;19(3).
- [141] Pivkin IV, Peng Z, Karniadakis GE, Buffet PA, Dao M, Suresh S. Biomechanics of red blood cells in human spleen and consequences for physiology and disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2016;113(28):7804-9.
- [142] McLellan SA, Walsh TS. Oxygen delivery and haemoglobin. *Continuing Education in Anaesthesia Critical Care & Pain*. 2004;4(4):123-6.
- [143] Kluge FA, Vogt T. The fiscal impact of population ageing in Germany: An unequal challenge for different levels of government. In: Dougherty S, Kim J. (Eds.) *Ageing and Fiscal Challenges across Levels of Government*. OECD fiscal federalism studies. Paris: OECD Publishing; 2020:63-76.
- [144] Costa E, Santos-Silva A, Paúl C, González Gallego J. Aging and Cardiovascular Risk. *BioMed Research International*. 2015;2015:871656.
- [145] Gao F, Chen J, Zhu H. A potential strategy for treating atherosclerosis: improving endothelial function via AMP-activated protein kinase. *Science China Life sciences*. 2018;61(9):1024-9.
- [146] González-Gualda E, Baker AG, Fruk L, Muñoz-Espín D. A guide to assessing cellular senescence in vitro and in vivo. *The FEBS journal*. 2021;288(1):56-80.
- [147] Childs BG, Durik M, Baker DJ, van Deursen JM. Cellular senescence in aging and age-related disease: from mechanisms to therapy. *Nature medicine*. 2015;21(12):1424-35.
- [148] Idda ML, McClusky WG, Lodde V, Munk R, Abdelmohsen K, Rossi M, et al. Survey of senescent cell markers with age in human tissues. *Aging*. 2020;12(5):4052-66.
- [149] Haferkamp S, Scurr LL, Becker TM, Frausto M, Kefford RF, Rizos H. Oncogene-induced senescence does not require the p16(INK4a) or p14ARF melanoma tumor suppressors. *The Journal of investigative dermatology*. 2009;129(8):1983-91.
- [150] Sundar IK, Rashid K, Gerloff J, Li D, Rahman I. Genetic Ablation of p16(INK4a) Does Not Protect against Cellular Senescence in Mouse Models of Chronic Obstructive Pulmonary Disease/Emphysema. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2018;59(2):189-99.

- [151] Turdi S, Fan X, Li J, Zhao J, Huff AF, Du M, et al. AMP-activated protein kinase deficiency exacerbates aging-induced myocardial contractile dysfunction. *Aging cell*. 2010;9(4):592-606.
- [152] Lesniewski LA, Zigler MC, Durrant JR, Donato AJ, Seals DR. Sustained activation of AMPK ameliorates age-associated vascular endothelial dysfunction via a nitric oxide-independent mechanism. *Mechanisms of ageing and development*. 2012;133(5):368-71.
- [153] Pu Y, Zhang H, Wang P, Zhao Y, Li Q, Wei X, et al. Dietary curcumin ameliorates aging-related cerebrovascular dysfunction through the AMPK/uncoupling protein 2 pathway. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*. 2013;32(5):1167-77.
- [154] Emerich DF, Schneider P, Bintz B, Hudak J, Thanos CG. Aging reduces the neuroprotective capacity, VEGF secretion, and metabolic activity of rat choroid plexus epithelial cells. *Cell transplantation*. 2007;16(7):697-705.
- [155] Ahluwalia A, Jones MK, Szabo S, Tarnawski AS. Aging impairs transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor in human microvascular endothelial cells: implications for angiogenesis and cell survival. *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society*. 2014;65(2):209-15.
- [156] Rivard A, Fabre JE, Silver M, Chen D, Murohara T, Kearney M, et al. Age-dependent impairment of angiogenesis. *Circulation*. 1999;99(1):111-20.
- [157] Swift ME, Kleinman HK, DiPietro LA. Impaired wound repair and delayed angiogenesis in aged mice. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 1999;79(12):1479-87.
- [158] Sadoun E, Reed MJ. Impaired angiogenesis in aging is associated with alterations in vessel density, matrix composition, inflammatory response, and growth factor expression. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*. 2003;51(9):1119-30.
- [159] Ahluwalia A, Narula J, Jones MK, Deng X, Tarnawski AS. Impaired angiogenesis in aging myocardial microvascular endothelial cells is associated with reduced importin alpha and decreased nuclear transport of HIF1 alpha: mechanistic implications. *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society*. 2010;61(2):133-9.
- [160] Pandey AK, Singhi EK, Arroyo JP, Ikizler TA, Gould ER, Brown J, et al. Mechanisms of VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) Inhibitor-Associated Hypertension and Vascular Disease. *Hypertension (Dallas, Tex : 1979)*. 2018;71(2):e1-e8.
- [161] Tio RA, Wijpkema J, Tan ES, Asselbergs FW, Hospers GA, Jessurun GA, et al. Reduction of endothelial dysfunction following VEGF gene therapy. *Netherlands heart journal : monthly journal of the Netherlands Society of Cardiology and the Netherlands Heart Foundation*. 2005;13(4):139-41.
- [162] Ljubicic V, Hood DA. Diminished contraction-induced intracellular signaling towards mitochondrial biogenesis in aged skeletal muscle. *Aging cell*. 2009;8(4):394-404.

- [163] Liu F, Benashski SE, Persky R, Xu Y, Li J, McCullough LD. Age-related changes in AMP-activated protein kinase after stroke. *Age (Dordrecht, Netherlands)*. 2012;34(1):157-68.
- [164] Hinchey EC, Gruszczuk AV, Willows R, Navaratnam N, Hall AR, Bates G, et al. Mitochondria-derived ROS activate AMP-activated protein kinase (AMPK) indirectly. *The Journal of biological chemistry*. 2018;293(44):17208-17.
- [165] Choi YH. ROS-mediated activation of AMPK plays a critical role in sulforaphane-induced apoptosis and mitotic arrest in AGS human gastric cancer cells. *General physiology and biophysics*. 2018;37(2):129-40.
- [166] Victorelli S, Passos JF. Reactive Oxygen Species Detection in Senescent Cells. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)*. 2019;1896:21-9.
- [167] Nacarelli T, Torres C, Sell C. Mitochondrial Reactive Oxygen Species in Cellular Senescence. In: Rattan SIS, Hayflick L, editors. *Cellular Ageing and Replicative Senescence*. Cham: Springer International Publishing; 2016. p. 169-85.
- [168] Guaiquil VH, Vera JC, Golde DW. Mechanism of vitamin C inhibition of cell death induced by oxidative stress in glutathione-depleted HL-60 cells. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(44):40955-61.
- [169] Chen ZP, Mitchelhill KI, Michell BJ, Stapleton D, Rodriguez-Crespo I, Witters LA, et al. AMP-activated protein kinase phosphorylation of endothelial NO synthase. *FEBS letters*. 1999;443(3):285-9.
- [170] Lee GH, Park JS, Jin SW, Pham TH, Thai TN, Kim JY, et al. Betulinic Acid Induces eNOS Expression via the AMPK-Dependent KLF2 Signaling Pathway. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2020;68(49):14523-30.
- [171] Colombo SL, Moncada S. AMPK α 1 regulates the antioxidant status of vascular endothelial cells. *The Biochemical journal*. 2009;421(2):163-9.
- [172] Tu WZ, Li B, Huang B, Wang Y, Liu XD, Guan H, et al. γ H2AX foci formation in the absence of DNA damage: mitotic H2AX phosphorylation is mediated by the DNA-PKcs/CHK2 pathway. *FEBS letters*. 2013;587(21):3437-43.
- [173] Yang Q, Xu J, Ma Q, Liu Z, Sudhakar V, Cao Y, et al. PRKAA1/AMPK α 1-driven glycolysis in endothelial cells exposed to disturbed flow protects against atherosclerosis. *Nature communications*. 2018;9(1):4667.
- [174] De Bock K, Georgiadou M, Schoors S, Kuchnio A, Wong BW, Cantelmo AR, et al. Role of PFKFB3-driven glycolysis in vessel sprouting. *Cell*. 2013;154(3):651-63.
- [175] Xu Y, An X, Guo X, Habetsion TG, Wang Y, Xu X, et al. Endothelial PFKFB3 plays a critical role in angiogenesis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2014;34(6):1231-9.
- [176] Jang M, Park R, Kim H, Namkoong S, Jo D, Huh YH, et al. AMPK contributes to autophagosome maturation and lysosomal fusion. *Scientific reports*. 2018;8(1):12637.
- [177] Kocaturk NM, Gozuacik D. Crosstalk Between Mammalian Autophagy and the Ubiquitin-Proteasome System. 2018;6(128).

- [178] Kevei É, Hoppe T. Ubiquitin sets the timer: impacts on aging and longevity. *Nature structural & molecular biology*. 2014;21(4):290-2.
- [179] Liu HY, Pflieger CM. Mutation in E1, the ubiquitin activating enzyme, reduces *Drosophila* lifespan and results in motor impairment. *PloS one*. 2013;8(1):e32835.
- [180] Pilon G, Dallaire P, Marette A. Inhibition of inducible nitric-oxide synthase by activators of AMP-activated protein kinase: a new mechanism of action of insulin-sensitizing drugs. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279(20):20767-74.
- [181] Spengler K. Regulierung endothelialer Funktionen durch Autophagie und den AMPK/Autophagie-Signalweg [Dissertation]: Universitätsklinikum Jena, Institut für Molekulare Zellbiologie; 2016.
- [182] Wang S, Zhang M, Liang B, Xu J, Xie Z, Liu C, et al. AMPK α 2 deletion causes aberrant expression and activation of NAD(P)H oxidase and consequent endothelial dysfunction in vivo: role of 26S proteasomes. *Circulation research*. 2010;106(6):1117-28.
- [183] Fox MM, Phoenix KN, Kopsiaftis SG, Claffey KP. AMP-Activated Protein Kinase α 2 Isoform Suppression in Primary Breast Cancer Alters AMPK Growth Control and Apoptotic Signaling. *Genes & cancer*. 2013;4(1-2):3-14.
- [184] Wang S, Kandadi MR, Ren J. Double knockout of Akt2 and AMPK predisposes cardiac aging without affecting lifespan: Role of autophagy and mitophagy. *Biochimica et biophysica acta Molecular basis of disease*. 2019;1865(7):1865-75.
- [185] Patel SR, Hartwig JH, Italiano JE, Jr. The biogenesis of platelets from megakaryocyte proplatelets. *The Journal of clinical investigation*. 2005;115(12):3348-54.
- [186] Kim CH. Homeostatic and pathogenic extramedullary hematopoiesis. *Journal of blood medicine*. 2010;1:13-9.
- [187] Yang X, Chen D, Long H, Zhu B. The mechanisms of pathological extramedullary hematopoiesis in diseases. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2020;77(14):2723-38.
- [188] Crary GS, Albrecht JH. Expression of cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in human liver. *Hepatology (Baltimore, Md)*. 1998;28(3):738-43.
- [189] Lin M, Menon V, Liang R, Arif T, Breda L, Rivella S, et al. Elevated P21 (CDKN1a) Mediates Apoptosis of Beta-Thalassemic Erythroid Cells in Mice but Its Ablation Doesn't Improve Erythroid Maturation. *Blood*. 2020;136(Supplement 1):19-.
- [190] Prieto LI, Graves SI, Baker DJ. Insights from In Vivo Studies of Cellular Senescence. *Cells*. 2020;9(4).
- [191] Hall BM, Balan V, Gleiberman AS, Strom E, Krasnov P, Virtuoso LP, et al. Aging of mice is associated with p16(Ink4a)- and β -galactosidase-positive macrophage accumulation that can be induced in young mice by senescent cells. *Aging*. 2016;8(7):1294-315.
- [192] Morgunova GV, Kolesnikov AV, Klebanov AA, Khokhlov AN. Senescence-associated β -galactosidase—A biomarker of aging, DNA damage, or cell proliferation restriction? *Moscow University Biological Sciences Bulletin*. 2015;70(4):165-7.

- [193] Cristofalo VJ. SA beta Gal staining: biomarker or delusion. *Experimental gerontology*. 2005;40(10):836-8.
- [194] Yegorov YE, Akimov SS, Hass R, Zelenin AV, Prudovsky IA. Endogenous beta-galactosidase activity in continuously nonproliferating cells. *Experimental cell research*. 1998;243(1):207-11.
- [195] Ortmann B, Druker J, Rocha S. Cell cycle progression in response to oxygen levels. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2014;71(18):3569-82.
- [196] Gardner LB, Li Q, Park MS, Flanagan WM, Semenza GL, Dang CV. Hypoxia inhibits G1/S transition through regulation of p27 expression. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(11):7919-26.
- [197] Gordan JD, Bertout JA, Hu CJ, Diehl JA, Simon MC. HIF-2alpha promotes hypoxic cell proliferation by enhancing c-myc transcriptional activity. *Cancer cell*. 2007;11(4):335-47.
- [198] Blagosklonny MV. Are p27 and p21 cytoplasmic oncoproteins? *Cell cycle (Georgetown, Tex)*. 2002;1(6):391-3.
- [199] Kreis NN, Louwen F, Yuan J. The Multifaceted p21 (Cip1/Waf1/CDKN1A) in Cell Differentiation, Migration and Cancer Therapy. *Cancers*. 2019;11(9).
- [200] Dengler F. Activation of AMPK under Hypoxia: Many Roads Leading to Rome. *International journal of molecular sciences*. 2020;21(7).
- [201] Kondo Y, Sueyoshi K, Zhang J, Bao Y, Li X, Fakhari M, et al. Adenosine 5'-Monophosphate Protects from Hypoxia by Lowering Mitochondrial Metabolism and Oxygen Demand. *Shock (Augusta, Ga)*. 2020;54(2):237-44.
- [202] Chi Y, Shi C, Zhao Y, Guo C. Forkhead box O (FOXO) 3 modulates hypoxia-induced autophagy through AMPK signalling pathway in cardiomyocytes. *Bioscience reports*. 2016;36(3).
- [203] Welford SM, Giaccia AJ. Hypoxia and senescence: the impact of oxygenation on tumor suppression. *Molecular cancer research : MCR*. 2011;9(5):538-44.
- [204] Clanton T. Yet another oxygen paradox. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md : 1985)*. 2005;99(4):1245-6.
- [205] Leontieva OV, Natarajan V, Demidenko ZN, Burdelya LG, Gudkov AV, Blagosklonny MV. Hypoxia suppresses conversion from proliferative arrest to cellular senescence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012;109(33):13314-8.
- [206] Yeo EJ. Hypoxia and aging. *Experimental & molecular medicine*. 2019;51(6):1-15.
- [207] Mozos I. Mechanisms linking red blood cell disorders and cardiovascular diseases. *Biomed Res Int*. 2015;2015:682054.
- [208] Warboys CM, de Luca A, Amini N, Luong L, Duckles H, Hsiao S, et al. Disturbed flow promotes endothelial senescence via a p53-dependent pathway. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2014;34(5):985-95.

6. Anhang

6.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: AMPK-Aktivierung durch AMP-Bindung und Phosphorylierung.....	3
Abbildung 2: Stoffwechselregulierung durch AMPK.....	5
Abbildung 3: AMPK-abhängige Signalwege und die Folgen der verminderten AMPK-Aktivierung im Alter.....	7
Abbildung 4: Ursachen vaskulärer Seneszenz.	12
Abbildung 5: Prinzip der Seneszenz-assoziierten (SA)- β -Galaktosidase-Färbung.....	38
Abbildung 6: Gating-Strategie der Zellzyklus-Färbung.....	41
Abbildung 7: Replikativ gealterte HUVEC zeigen typische Merkmale der Seneszenz.....	52
Abbildung 8: Replikativ gealterte HUVEC zeigen eine erhöhte p21-Expression in Immunfluoreszenz-Analysen.	53
Abbildung 9: Die Expression der AMPK ist in seneszenten HUVEC erhöht.....	53
Abbildung 10: Die basale Aktivität der AMPK ist in seneszenten HUVEC nicht verändert. ...	54
Abbildung 11: Die AMPK-Substratphosphorylierung ist in seneszenten HUVEC verändert. .	55
Abbildung 12: Die VEGF-induzierte AMPK-Aktivierung ist in seneszenten HUVEC erhöht...	57
Abbildung 13: Die 2-Deoxyglucose(2-DG)-induzierte AMPK-Aktivierung ist in seneszenten HUVEC vermindert.	58
Abbildung 14: Die Expression von VEGF und VEGFR2 ist in seneszenten HUVEC erhöht. .	59
Abbildung 15: Die Expression von CaMKK2 ist in seneszenten HUVEC erhöht.	59
Abbildung 16: Oxidativer Stress kann zur Erhöhung der VEGF-induzierten AMPK-Aktivierung beitragen.	60
Abbildung 17: Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) sind in seneszenten HUVEC nicht erhöht... ..	61
Abbildung 18: MLEC aus alten Mäusen zeigen Seneszenzmerkmale.	62
Abbildung 19: Die Expression der AMPK ist in MLEC aus alten Mäusen erhöht.....	63
Abbildung 20: Die basale Aktivität der AMPK ist in MLEC aus alten Mäusen tendenziell erhöht.	63
Abbildung 21: Die AMPK-Substratphosphorylierung ist in MLEC aus alten Mäusen erhöht. .	64
Abbildung 22: Die verringerte VEGF-induzierte AMPK-Aktivierung in MLEC aus alten Mäusen bewirkt keine Veränderungen der Phosphorylierung von ACC und ULK1.	65
Abbildung 23: 2-Deoxyglukose(2-DG) führt in MLEC von alten Mäusen zur schnelleren Phosphorylierung von AMPK und ACC, aber zur niedrigen Phosphorylierung von ULK1.....	67
Abbildung 24: Die Expression von VEGFR2 ist in MLEC aus alten Mäusen vermindert.	68
Abbildung 25: Die Expression von CaMKK2 ist in MLEC aus alten Mäusen unverändert.	68
Abbildung 26: Mitochondriale reaktive Sauerstoffspezies (ROS) sind in MLEC aus alten Mäusen erhöht.....	69
Abbildung 27: Herunterregulierung der AMPK α 1 führt zur Erhöhung von Seneszenzmarkern.	71
Abbildung 28: Herunterregulierung der AMPK α 1 führt zu einem Anstieg von p21 in Immunfluoreszenz-Analysen.	72
Abbildung 29: Herunterregulierung der AMPK α 1 führt zu einem Anstieg seneszenz-assoziiertes β -Galaktosidase (SA- β -Gal)-positiver Zellen.....	73
Abbildung 30: Herunterregulierung der AMPK α 1 führt zu einem Anstieg der Lysosomenaktivität.	74

Abbildung 31: Herunterregulierung der AMPK α 1 führt zu einem Anstieg reaktiver Sauerstoffspezies (ROS).	75
Abbildung 32: Herunterregulierung der AMPK α 1 führt zu einem Anstieg von γ H2AX.	76
Abbildung 33: Herunterregulierung von AMPK α 1 oder AMPK α 2 verändert das Zellwachstum.	77
Abbildung 34: Herunterregulierung von AMPK α 1 führt zu einem G1-Arrest im Zellzyklus. ...	78
Abbildung 35: RNA-Sequenzierungsanalyse der Herunterregulierung von AMPK α 1 oder AMPK α 2 hinsichtlich Seneszenz-Signalwegen.	79
Abbildung 36: AMPK α 1-/- Mäuse haben eine verkürzte Lebensspanne.	80
Abbildung 37: AMPK α 1-/- Mäuse haben ein erhöhtes Milzgewicht.	81
Abbildung 38: AMPK α 1-/- Mäuse haben eine vergrößerte Milz.	81
Abbildung 39: Die Genexpression von p21 zeigt einen Trend zum Anstieg in Leber und Milz von 60 Wochen alten AMPK α 1-/- Mäusen.	82
Abbildung 40: AMPK α 1-/- Mäuse weisen Erkrankungen der Leber auf.	83
Abbildung 41: AMPK α 1-/- Mäuse weisen Veränderungen der Milz auf.	84
Abbildung 42: AMPK α 1-/- Mäuse zeigen keine Veränderung des Herzens.	85
Abbildung 43: AMPK α 1-/- Mäuse zeigen keine Veränderung der Niere.	86
Abbildung 44: Das Blutbild von AMPK α 1-/- Mäusen zeigt eine Anämie.	87
Abbildung 45: Aorten von AMPK α 1-/- Mäusen zeigen eine seneszenz-assoziierte β -Galaktosidase (SA- β -Gal)-positive Färbung im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen und AMPK α 2-/- Mäusen.	88
Abbildung 46: AMPK α 1-/- Mäuse zeigen seneszenz-assoziierte β -Galaktosidase (SA- β -Gal)-positive Zellen in allen Schichten der Aorta.	89
Abbildung 47: AMPK α 1-/- Mäusen zeigen keine Veränderung der p21-Genexpression in der Aorta.	90
Abbildung 48: Hypoxie führt zu einem Anstieg seneszenz-assoziiierter β -Galaktosidase (SA- β -Gal)-positiver Zellen in HUVEC.	91
Abbildung 49: Hypoxie führt zu einem Wachstumsstopp in HUVEC.	92
Abbildung 50: Hypoxie führt zur Verringerung von AMPK α 1 und p21 in HUVEC.	92

6.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Chemikalien und Reagenzien	16
Tabelle 2:	Zellkultur- und Transfektionsreagenzien	18
Tabelle 3:	Inhibitoren und Stimulanzen.....	19
Tabelle 4:	Antikörper für Western-Blot.....	19
Tabelle 5:	Primärantikörper für Immunfluoreszenz	21
Tabelle 6:	Sekundärantikörper für Immunfluoreszenz	21
Tabelle 7:	Primärantikörper für Durchflusszytometrie	21
Tabelle 8:	Sekundärantikörper für Durchflusszytometrie	21
Tabelle 9:	Antikörper und Beads zur MLEC-Isolation	21
Tabelle 10:	siRNA	22
Tabelle 11:	Primer.....	22
Tabelle 12:	Kits	23
Tabelle 13:	Materialien.....	23
Tabelle 14:	Geräte	24
Tabelle 15:	Zusammensetzung der zur Präparation und Kultivierung von HUVEC verwendeten Lösungen und Medien	27
Tabelle 16:	HUVEC Zellzahlen und Medienvolumen	28
Tabelle 17:	Zusammensetzung der zur Präparation und Kultivierung von MLEC verwendeten Lösungen und Medien	31
Tabelle 18:	MLEC Zellzahlen und Medienvolumen.....	31
Tabelle 19:	Hepes/CaCl ₂ /HSA-Puffer	32
Tabelle 20:	Substanzen zur Zellstimulation	32
Tabelle 21:	Puffer zur Zellyse	33
Tabelle 22:	Zusammensetzung der Polyacrylamidgele	34
Tabelle 23:	Puffer für Elektrophorese	34
Tabelle 24:	Puffer für Western-Blot	35
Tabelle 25:	Strippingpuffer	36
Tabelle 26:	Lösungen zur SA-β-Gal-Färbung	37
Tabelle 27:	Lösungen für Immunfluoreszenzfärbung.....	39
Tabelle 28:	Lösungen für Zellzyklus-Färbung.....	40
Tabelle 29:	Lösungen für AMPK-Aktivität	44
Tabelle 30:	Lösungen zur Genotypisierung	45
Tabelle 31:	Ansätze für Genotypisierungs-PCR	46
Tabelle 32:	PCR-Programme für Genotypisierung	46
Tabelle 33:	Puffer zur Agarose-Gelelektrophorese.....	47
Tabelle 34:	Einfriermedium für Gewebe	50
Tabelle 35:	PCR-Programm für Mausorgane	50

6.3 Veröffentlichungen der Ergebnisse dieser Arbeit

Ender C, Meçe O, Heller R: AMPK signaling in young and aged endothelial cells. Jena Ageing Meeting (JAM), 2018, Jena [Poster]

Ender C, Leheis A, Wystub N, Meçe O, Heller R: Enhanced AMPK signaling in senescent and stressed endothelial cells. AMPK - From Mechanisms to New Therapies, 2018, Niagara-on-the-Lake, Kanada [Poster]

Ender C, Meçe O, Heller R: The AMPK pathway in endothelial cells is altered in conditions of senescence and oxidative or glycotoxic stress. Mechanisms of Ageing-From Bench to Translation, 2019, Wittenberg [Poster]

Ender C, Meçe O, Heller R: The AMPK pathway in endothelial cells is altered in conditions of senescence and oxidative or glycotoxic stress. Postgraduate Symposium, 2019, Dornburg [Poster]

Ender C, Meçe O, Doshi H, Heller R: Senescence, aging and high glucose affect the AMPK pathway in endothelial cells. Epigenetics: Playing with the Game of Life, 2019, Halle [Poster]

6.4 Danksagung

Zunächst möchte ich Prof. Dr. Regine Heller für die Bereitstellung des interessanten Projekts und die Möglichkeit, dieses in ihrer Arbeitsgruppe zu bearbeiten, danken. Darüber hinaus bin ich dankbar für die freundliche und kompetente wissenschaftliche und auch persönliche Unterstützung sowie für die zahlreichen interessanten Diskussionen und Ratschläge.

Weiterhin danke ich dem RTG-2155 ProMoAge und allen Mitarbeitern des Instituts für Molekulare Zellbiologie für die freundliche Atmosphäre und Unterstützung. Besonders bedanken möchte ich mich bei Dr. Katrin Spengler, Heena Doshi und Dr. Silke Große, die mich sowohl im Labor mit experimentellen Hilfestellungen als auch persönlich stets unterstützt haben.

Mein herzlicher Dank gilt weiterhin Elke Teuscher für die Arbeit in der Zellkultur und ihre tatkräftige Hilfe und Rose-Marie Zimmer für ihre Unterstützung im Mauslabor und bei der Histologie.

Daneben danke ich nochmals Dr. Katrin Spengler für die experimentelle Unterstützung sowie für Diskussionen und Ratschläge. Ich bedanke mich herzlich bei Dr. Odeta Meçe für die Etablierung der Seneszenzmodelle sowie bei Dr. Bianka Wissuwa und Jacqueline Fischer für die freundliche Kooperation und Unterstützung bei der Blutanalyse der Mäuse.

Weiterhin gilt mein herzlicher Dank für Kooperationen und Ratschläge Prof. Dr. Reinhard Bauer, Dr. Darya Zibrova, Dr. Julia von Maltzahn, Sabine Landmann-Weinsheimer, Dr. Patricia Franzka, Dr. Michael Brodhun und den Mitarbeitern der Abteilung DNA Sequencing am FLI Jena.

Zudem gilt mein Dank Dr. Michael van der Wall und den Mitarbeitern der zentralen Tierhaltung im Forschungszentrum Lobeda für die Durchführung der Mauszucht.

Abschließend möchte ich mich bei meinem Lebensgefährten Christian Bose und meiner Familie bedanken, die mich immer unterstützt haben und mir zur Seite standen.

6.5 Ehrenwörtliche Erklärung

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

ich die Dissertation selbst angefertigt habe, keine Textabschnitte eines Dritten oder eigener Prüfungsarbeiten ohne Kennzeichnung übernommen habe und alle von mir benutzten 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 Manuskripts unterstützt haben: Prof. Dr. Regine Heller (Betreuerin), Dr. Katrin Spengler (Auswertung Zellzyklusfärbung, Lysosomen- und AMPK-Aktivität), die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

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

Jena,

Claudia Ender