



JOHANNES GUTENBERG
UNIVERSITÄT MAINZ

Zell-spezifische Wirkungen der Leptin-Rezeptor- vermittelten Signaltransduktion und ihre Bedeutung für die vaskuläre Wundheilung

Dissertation

zur Erlangung des Grades

„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie

der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von

Astrid Hubert

geb. am 02.10.1983 in Temeschburg

Mainz, November 2017

Angefertigt in der Forschungsgruppe
„Translationale Vaskuläre Biologie“
der Kardiologie I des Zentrums für Kardiologie
(Direktor:)
der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 26.01.2018

Publiziert im Journal „Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology“:

Hubert A, Bochenek ML, Schütz E, Gogiraju R, Münzel T, Schäfer K. **Selective Deletion of Leptin Signaling in Endothelial Cells Enhances Neointima Formation and Phenocopies the Vascular Effects of Diet-Induced Obesity in Mice.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2017 Sep;37(9):1683-1697. doi: 10.1161/ATVBAHA.117.309798. Epub 2017 Jul 13.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis	IX
1. Einleitung	1
1.1 Leptin, Übergewicht und kardiovaskuläres Risiko	1
1.1.1 Definition und Epidemiologie von Übergewicht und Adipositas	1
1.1.2 Übergewicht und Rolle des Fettgewebes für das kardiovaskuläre Risiko	2
1.1.3 Systemische und lokale Hyperleptinämie als Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen.....	4
1.2 Das Hormon Leptin.....	5
1.2.1 Identifizierung des <i>obese</i> -Gens und seines Genprodukts Leptin.....	5
1.2.2 Zentrale und periphere Funktionen von Leptin	6
1.2.3 Leptin-Rezeptoren	8
1.2.4 Leptin-vermittelte Signalwege	11
1.2.5 Leptin-Resistenz	13
1.3 Gefäßfunktion und Atherosklerose.....	16
1.3.1 Aufbau und Funktion der Gefäßwand.....	16
1.3.2 Pathogenese der Atherosklerose	17
1.3.3 Restenose und Neointimabildung	18
1.3.4 Rolle des Fettgewebes in der Pathogenese der Atherosklerose	19
1.4 Vaskuläre Effekte von Leptin	21
1.4.1 Expression und Funktion von Leptin-Rezeptoren auf vaskulären Zellen	21
1.4.2 Rolle von Leptin für die vaskuläre Wundheilung.....	23
1.5 Fragestellung und Ziel der Arbeit.....	24
2. Material	27
2.1 Geräte	27
2.2 Software	29
2.3 Zubehör und Hilfsmittel.....	29
2.4 Verbrauchsmaterialien	31
2.5 Chemikalien und Reagenzien	34
2.6 ELISA und Kits	36

2.7	Enzyme, Inhibitoren und Hormone.....	37
2.8	Marker und Farbstoffe	37
2.9	PCR-Reagenzien (PCR, RT-PCR und qPCR)	38
2.10	Primer.....	38
2.11	Antikörper	40
2.12	Zelllinien und Zellkulturmedien.....	42
2.13	Versuchstiere, Versuchstierhaltung und Futtermittel	43
2.14	Anästhesie.....	43
2.15	Zusammensetzung und Herstellung der Lösungen	44
3.	Methoden.....	51
3.1	Tierexperimentelle Untersuchungen	51
3.1.1	Genehmigung der tierexperimentellen Untersuchungen	51
3.1.2	Versuchstiere und Versuchstierhaltung.....	51
3.1.3	Haltungsfutter und Diäten	52
3.1.4	Generierung von Zell-spezifischen Leptin-Rezeptor (LepR)-defizienten Mäusen.....	52
3.1.5	Genotypisierung.....	56
3.1.6	Versuchsgruppen und Versuchsablauf.....	59
3.1.7	Experimentelle Gefäßverletzung unter Anwendung des FeCl ₃ -Modells.....	61
3.1.8	Serum-Gewinnung und -Analyse	64
3.1.9	Blutdruckmessung	64
3.2	Histologische Untersuchung der Gefäßverletzung	65
3.2.1	Paraffineinbettung und Anfertigung von Paraffinschnitten	65
3.2.2	Morphometrische Quantifizierung der Neointimabildung	65
3.3	Immunhistologische Untersuchungen	68
3.3.1	Immunhistochemie (IHC)	68
3.3.2	Immunfluoreszenz (IF).....	70
3.3.3	Aufnahme und morphometrische Auswertung der immunhistologischen Färbungen	72
3.3.4	Immunzytochemie und konfokale Mikroskopie	73
3.4	<i>Ex vivo</i> und <i>in vitro</i> Untersuchungen.....	75
3.4.1	Isolation und Kultivierung CD31-positiver Endothelzellen aus der Maus- Lunge unter Verwendung von MicroBeads	75
3.4.2	Isolation und Kultivierung primärer glatter Muskelzellen (mSMCs) aus der Aorta von normalgewichtigen und übergewichtigen Mäusen.....	79
3.4.3	Kultivierung der verwendeten Zelllinien.....	81

3.4.4	Untersuchung der Zellkulturüberstände der mPECs von End.LepR-KO und End.LepR-WT Mäusen.....	82
3.4.5	Untersuchung der Zellproliferation, des Migrationsverhaltens und parakriner Effekte	82
3.5	Untersuchungen der RNA-Expression	84
3.5.1	RNA-Isolation aus Zellen und Gewebe	84
3.5.2	Bestimmung der RNA-Konzentration und Reinheit.....	85
3.5.3	Umschreibung in cDNA.....	86
3.5.4	Semi-quantitative RT-PCR.....	86
3.5.5	Real-time quantitative PCR.....	88
3.6	Western Blot.....	91
3.6.1	Herstellung von Proteinlysaten aus Zellen	91
3.6.2	Bestimmung der Proteinkonzentration	91
3.6.3	Gelelektrophorese und Transfer.....	92
3.6.4	Immundetektion und Quantifizierung der Proteinbanden.....	95
3.7	Statistik.....	98
4.	Ergebnisse	99
4.1	Genotypisierung und Nachweis der erfolgreichen Rekombination in Endothelzell- und glatten Muskelzell-spezifischen Leptin-Rezeptor Knockout Mäusen	99
4.2	Nachweis und Effizienz der Endothelzell- und glatten Muskelzell-spezifischen Leptin-Rezeptor-Deletion	101
4.3	Untersuchung von Körpergewicht, metabolischen Parametern und zirkulierenden Leptinspiegeln	104
4.3.1	Auswirkungen der Leptin-Rezeptor-Deletion in Endothelzellen	104
4.3.2	Auswirkungen der Leptin-Rezeptor-Deletion in glatten Muskelzellen	106
4.4	Morphometrische Untersuchung der Gefäßverletzung	109
4.4.1	Auswirkungen der endothelialen Deletion des Leptin-Rezeptors auf die Neointimabildung	109
4.4.2	Auswirkungen der glatten Muskelzell-spezifischen Deletion des Leptin-Rezeptors auf die Neointimabildung	111
4.5	Untersuchung der Zellularität und Zusammensetzung der vaskulären Läsionen Endothelzell-spezifischer Leptin-Rezeptor-Knockout Mäuse.....	113
4.6	Detektion und Quantifizierung inflammatorischer Zellen in den vaskulären Läsionen Endothelzell-spezifischer Leptin-Rezeptor Knockout Mäusen.....	115
4.7	Untersuchung der endothelialen Leptin-Signaltransduktion	117

4.7.1	Reduzierte endotheliale Leptin-Signaltransduktion in Leptin-Rezeptor-defizienten Mäusen.....	117
4.7.2	Endotheliale Leptin-Resistenz in übergewichtigen Mäusen.....	119
4.8	Funktionelle <i>in vitro</i> Untersuchungen.....	122
4.8.1	Parakrine Effekte primärer Leptin-Rezeptor-defizienter Endothelzellen auf die Proliferation und Migration von glatten Muskelzellen.....	122
4.8.2	Auswirkungen von Übergewicht auf die Zellproliferation und das Migrationsverhalten primärer glatter Muskelzellen.....	124
4.9	Untersuchungen der Expression von glatten Muskelzell-Mitogenen in Leptin-Rezeptor-defizienten und Leptin-resistenten Endothelzellen.....	126
4.9.1	RNA-Expressionsanalyse parakriner Mediatoren in Endothelzellen von Leptin-Rezeptor-defizienten und übergewichtigen Mäusen.....	126
4.9.2	Analyse parakriner Faktoren in Zellkulturüberständen primärer Leptin-Rezeptor-defizienter Endothelzellen.....	128
4.9.3	Untersuchung der Expression von parakrinen Mediatoren und endothelialen Markern in unverletzten Carotisarterien und vaskulären Läsionen von Leptin-Rezeptor-defizienten und übergewichtigen Mäusen.....	130
4.9.4	Einfluss der erhöhten endothelialen Expression von Endothelin-1 auf den Blutdruck und die Endothelin-1-Serumspiegel.....	135
4.10	Mechanistische Untersuchungen.....	136
5.	Diskussion.....	141
5.1	Einfluss einer reduzierten Expression des Leptin-Rezeptors auf Endothel- und glatten Muskelzellen auf das Körpergewicht, die metabolischen Parameter und zirkulierenden Leptinspiegel.....	141
5.2	Einfluss einer reduzierten Expression des Leptin-Rezeptors auf Endothelzellen und glatten Muskelzellen auf die Neointimabildung.....	144
5.3	Übergewicht und Leptin-Resistenz.....	147
5.4	Rolle endothelialer parakriner Mediatoren auf die Neointimabildung.....	149
5.5	Fazit und Limitation der Arbeit.....	153
6.	Zusammenfassung / Summary.....	155
7.	Literaturverzeichnis.....	159
	ERKLÄRUNG.....	173
	LEBENS LAUF.....	175
	DANKSAGUNG.....	177

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungen

Abb. 1-1: Übersicht der weltweiten Prävalenz von Übergewicht (BMI \geq 30) in der erwachsenen Bevölkerung (\geq 20 Jahre) 2013	2
Abb.1-2: Schematische Darstellung der Parabiose-Experimente zwischen <i>ob/ob</i> -Mäusen und <i>db/db</i> -Mäusen von Coleman und Kollegen um 1970	6
Abb. 1-3: Zentrale und periphere Funktionen von Leptin	8
Abb. 1-4: Struktur des Leptin-Rezeptors	9
Abb. 1-5: Schematische Darstellung der Isoformen des Leptin-Rezeptors	11
Abb. 1-6: Leptin-Rezeptor-Signalwege.....	13
Abb. 1-7: Übersicht postulierter Mechanismen der Leptin-Resistenz	15
Abb. 1-8: Schematischer Aufbau einer arteriellen Gefäßwand	16
Abb. 1-9: Rolle des Fettgewebes in der Pathogenese der Atherosklerose.....	21
Abb. 3-1: Allgemeines Schema zur Generierung von Zell-spezifischen Knockout (KO) Mäusen unter Verwendung des Cre-loxP Rekombinationssystems	53
Abb. 3-2: Zuchtschema zur Generierung von induzierbaren Endothelzell-spezifischen LepR-KO Mäusen und deren Kontrollen	54
Abb. 3-3: Zuchtschema zur Generierung von induzierbaren glatten Muskelzell-spezifischen LepR-KO Mäusen und deren Kontrollen	55
Abb. 3-4: Zeitlicher Versuchsablauf unter Normalgewicht	60
Abb. 3-5: Zeitlicher Versuchsablauf bei Induktion von Übergewicht durch eine Hochfett-diät (HFD).....	60
Abb. 3-6: Mausmodell der FeCl ₃ -induzierten Gefäßverletzung der <i>Arteria carotis communis sinister</i>	62
Abb. 3-7: Schematische Darstellung der Anfertigung von Serienschnitten mit einem 50 μ m-Intervall im Läsionsbereich 21 Tage nach Gefäßverletzung unter Anwendung des FeCl ₃ -Modells	65
Abb. 3-8: Darstellung der morphometrischen Auswertung.....	67
Abb. 3-9: (A) Schematische Darstellung des Aufbaus der MACS-Apparatur (<i>Magnetic Activated Cell Sorting</i>) zur magnetischen Zellseparation. (B) Prinzip der Zellseparation unter Verwendung von MicroBeads	77
Abb. 3-10: Repräsentative Hellfeldaufnahme primärer muriner pulmonaler Endothelzellen (mPECs) in Kultur	77
Abb. 3-11: Repräsentativer immunzytochemischer Nachweis der Endothelzell-Marker CD31 und VE-Cadherin auf primären murinen pulmonalen Endothelzellen (mPECs)	78
Abb. 3-12: Isolation und Kultivierung von primären murinen glatten Muskelzellen (mSMCs)	80

Abb. 3-13: (A) Prinzip der qPCR und (B) Beispiel einer Amplifizierungskurve	89
Abb. 3-14: Beispiel einer Schmelzkurven-Analyse.....	90
Abb. 3-15: Prinzip der quantitativen colorimetrischen Proteinbestimmung mit Bicinchoninsäure (<i>bicinchoninic acid</i> , BCA) nach Smith <i>et al.</i>	91
Abb. 3-16: Schematischer Aufbau einer Tank-Blot-Apparatur und Richtung des Proteintransfers	95
Abb. 4-1: Schematische Darstellung der Lokalisation der LepR ^{flox} und LepR ^A Primer	99
Abb. 4-2: Repräsentative Genotypisierung und Nachweis der erfolgreichen LepR ^A Rekombination in End.LepR-KO und SMC.LepR-KO Mäusen nach Tamoxifen-Gabe.....	100
Abb. 4-3: Repräsentativer Nachweis und Effizienz der erfolgreichen Endothelzell-spezifischen Leptin-Rezeptor (LepR)-Deletion	102
Abb. 4-4: Repräsentativer Nachweis und Effizienz der erfolgreichen glatten Muskelzell-spezifischen Leptin-Rezeptor (LepR)-Deletion	103
Abb. 4-5: Morphometrische Analyse der Neointimabildung in normalgewichtigen und übergewichtigen End.LepR-WT und -KO Mäusen	110
Abb. 4-6: Morphometrische Analyse der Neointimabildung in normalgewichtigen und übergewichtigen SMC.LepR-WT und -KO Mäusen	112
Abb. 4-7: Visualisierung SMA-positiver glatter Muskelzellen in den vaskulären Läsionen normalgewichtiger und übergewichtiger End.LepR-WT und -KO Mäuse	113
Abb. 4-8: Untersuchung der Zellularität und Zellproliferation der vaskulären Läsion in normalgewichtigen und übergewichtigen End.LepR-WT und -KO Mäusen.....	114
Abb. 4-9: Immunhistologische Detektion und Quantifizierung inflammatorischer Zellen innerhalb der vaskulären Läsionen von normalgewichtigen und übergewichtigen End.LepR-WT und -KO Mäusen	116
Abb. 4-10: Endotheliale Leptin-Signaltransduktion in primären murinen Endothelzellen (mPECs) von End.LepR-WT und -KO Mäusen.....	118
Abb. 4-11: Endotheliale Expression des Leptin-Rezeptors auf mRNA- und Proteinebene in primären murinen Endothelzellen (mPECs) von normalgewichtigen und übergewichtigen End.LepR-WT Mäusen	120
Abb. 4-12: Endotheliale Leptin-Signaltransduktion in primären murinen Endothelzellen (mPECs) von normalgewichtigen und übergewichtigen End.LepR-WT Mäusen	121
Abb. 4-13: Parakrine Effekte primärer Leptin-Rezeptor-defizienter Endothelzellen auf die Proliferation und das Migrationsverhalten von glatten Muskelzellen	123
Abb. 4-14: Untersuchung der Auswirkungen von Übergewicht auf die Zellproliferation und Migration primärer glatter Muskelzellen, basal und nach Leptin-Stimulation.....	125
Abb. 4-15: RNA-Expressionsanalyse parakriner Mediatoren in Leptin-Rezeptor-defizienten und übergewichtigen Mäusen.....	127
Abb. 4-16: Auswirkung der endothelialen Leptin-Rezeptor-Defizienz auf Endothelin-1 (ET-1)	129
Abb. 4-17: Endothelin-1 (ET-1)-Expression in unverletzten Carotiden von normalgewichtigen End.LepR-WT und LepR-KO Mäusen sowie übergewichtigen End.LepR-WT Mäusen	131

Abb. 4-18: Endothelin-1 (ET-1)-Expression in vaskulären Läsionen von normalgewichtigen End.LepR-WT und LepR-KO Mäusen sowie übergewichtigen End.LepR-WT Mäusen	132
Abb. 4-19: Endotheliale CD31-Expression in vaskulären Läsionen von normalgewichtigen End.LepR-WT und LepR-KO Mäusen sowie übergewichtigen End.LepR-WT Mäusen	133
Abb. 4-20: Repräsentativer Nachweis der Expression von ICAM2, eNOS, iNOS, COX1 und COX2 mittels Immunfluoreszenz in unverletzten Carotiden von normalgewichtigen End.LepR-WT und LepR-KO Mäusen sowie übergewichtigen End.LepR-WT Mäusen	134
Abb. 4-21: Effekt der murinen endothelialen Leptin-Rezeptor Defizienz und Leptin-Stimulation auf die nukleäre Lokalisation von <i>c-jun</i>	137
Abb. 4-22: Effekt der PPAR γ -Antagonisierung auf die intrazelluläre Lokalisation von <i>c-jun</i> und die Expression von Endothelin-1 (ET-1) in humanen Endothelzellen	139
Abb. 5-1: Schematische Darstellung der Befunde in Endothelzellen mit intakter und fehlender Leptin-Rezeptor-Signaltransduktion	154

Tabellen

Tab. 1-1: Internationale Klassifizierung von Untergewicht, Normalgewicht, Übergewicht und Adipositas anhand des <i>Body-Mass-Index</i> (BMI) bei Erwachsenen (≥ 20 Jahre; nach WHO)	1
Tab. 3-1: Nährstoffverteilung der Grundnährstoffe der verwendeten Futtermittel	52
Tab. 3-2: PCR-Pipettierschema für die Genotypisierung von Tie2.CreER ^{T2}	57
Tab. 3-3: PCR-Pipettierschema für die Genotypisierung von SMMHC.CreER ^{T2}	57
Tab. 3-4: PCR-Pipettierschema für die Genotypisierung von LepR ^{flα} und zum Nachweis des Rekombination-Produkts <i>LepRΔ</i>	57
Tab. 3-5: PCR-Programm für die Genotypisierung von Tie2.CreER ^{T2}	58
Tab. 3-6: PCR-Programm für die Genotypisierung von SMMHC.CreER ^{T2}	58
Tab. 3-7: PCR-Programm für die Genotypisierung von LepR ^{flα} und <i>LepRΔ</i>	58
Tab. 3-8: Genotypisierungs-Primer und Ergebnisse	59
Tab. 3-9: Übersicht der Versuchsgruppen zur Untersuchung der Rolle des Leptin-Rezeptors auf Endothelzellen (End.LepR) und glatten Muskelzellen (SMC.LepR) nach Gefäßverletzung	59
Tab. 3-10: Manuelle Paraffineinbettung	65
Tab. 3-11: Verhoeff's Elastica-Färbung von paraffinfixierten Carotisarterien	66
Tab. 3-12: Zusammenfassung und Berechnung der morphometrischen Parameter	67
Tab. 3-13: Spezifische Färbebedingungen der verwendeten Antikörper für die Immunhistochemie (IHC)	69
Tab. 3-14: Spezifische Färbebedingungen der verwendeten Antikörper für die Immunfluoreszenz (IF)	72

Tab. 3-15: Spezifische Färbebedingungen der verwendeten Antikörper für die Immunzytometrie (ICC)	74
Tab. 3-16: Pipettierschema der cDNA-Umschreibung.....	86
Tab. 3-17: Allgemeines Pipettierschema zur cDNA-Amplifizierung.....	87
Tab. 3-18: Allgemeine PCR-Bedingungen zur cDNA-Amplifizierung	87
Tab. 3-19: Spezifische PCR-Bedingungen der verwendeten Primer zur cDNA-Amplifizierung	87
Tab. 3-20: Allgemeines qPCR-Pipettierschema	88
Tab. 3-21: qPCR-Bedingungen.....	88
Tab. 3-22: Pipettierschema zur Generierung einer Protein-Standardkurve	92
Tab. 3-23: Pipettierschema zur Herstellung der Gele.....	93
Tab. 3-24: Spezifische Bedingungen der verwendeten Primär-Antikörper zur Immundetektion des Western Blots	97
Tab. 4-1: Körpergewicht und VAT-Gewicht normalgewichtiger und übergewichtiger End.LepR-WT und -KO Mäuse.....	105
Tab. 4-2: Metabolische Parameter und zirkulierende Leptinspiegel normalgewichtiger und übergewichtiger End.LepR-WT und -KO Mäuse im Serum zum Zeitpunkt der Gewebeentnahme	106
Tab. 4-3: Körpergewicht und VAT-Gewicht normalgewichtiger und übergewichtiger SMC.LepR-WT und -KO Mäuse.....	107
Tab. 4-4: Metabolische Parameter und zirkulierende Leptinspiegel normalgewichtiger und übergewichtiger SMC.LepR-WT und -KO Mäuse im Serum zum Zeitpunkt der Gewebeentnahme	108
Tab. 4-5: Systolischer, diastolischer und mittlerer Blutdruck und Endothelin-1-Spiegel im Serum normalgewichtiger und übergewichtiger End.LepR-WT und -KO Mäuse	135

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
<i>A. Carotis</i>	<i>Arteria Carotis</i>
<i>ad libitum</i>	nach Belieben
AEBSF	4-(2-Aminoethyl)benzensulfonylfluorid
AP-1	Aktivator-Protein-1
APS	Ammoniumpersulfat
BMI	<i>Body-Mass-Index</i>
bp	Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumin</i> , Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>complementary deoxyribonucleic acid</i> , komplementäre Desoxyribonukleinsäure
Cre	<i>Causes recombination</i> , <i>Cyclization recombinase</i>
CRP	C-reaktives Protein
COX	Cyclooxygenase
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
db	<i>diabetic</i> , diabetisch
ddH ₂ O	doppelt-demineralisiertes Wasser
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle medium</i> , Dulbecco's modifiziertes Eagle-Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i> , Enhanced Chemilumineszenz
EDTA	<i>ethylenediaminetetraacetic acid</i> , Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
End.	Endothel/ endothelial
eNOS	<i>endothelial NO synthase</i> , endotheliale NO-Synthase
EPCs	<i>endothelial progenitor cells</i> , endotheliale Vorläuferzellen
ER ^{T2}	Cre-Rekombinase-Östrogenrezeptor
ET-1	Endothelin-1
<i>et al.</i>	und andere
FBS	<i>fetal bovine serum</i> , fetales Rinderserum
FeCl ₃	Eisen(III)-chlorid
FGF2	<i>fibroblast growth factor 2</i> , Fibroblasten-Wachstumsfaktor 2

FLI	<i>free leptin index</i> , Freier Leptin Index
flox	loxP-flankiert, gefloxt
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
gDNA	<i>genomic deoxyribonucleic acid</i> , genomische Desoxyribonukleinsäure
h	Stunde
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCl	Salzsäure
HDL	<i>high density lipoprotein</i> , Lipoprotein hoher Dichte
HFD	<i>high fat diet</i> , Hochfettdiät
HUVEC	<i>human umbilical vein endothelial cells</i> , humane umbilikale venöse Endothelzellen
ICAM2	<i>intercellular adhesion molecule 2</i> , Interzelluläres Adhäsionsmolekül 2
IE	Internationale Einheit
IL-6	Interleukin-6
iNOS	<i>inducible NO synthase</i> , induzierbare NO-Synthase
JAK	Januskinase
kcal	Kilokalorie
kDa	Kilodalton
kdM	konditioniertes Medium
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
KHK	Koronare Herzkrankheit
KO	Knockout
l, L	Liter
LDL	<i>low density lipoprotein</i> , Lipoprotein niederer Dichte
LepR	Leptin-Rezeptor
μ	mikro (10 ⁻⁶) als Einheitenpräfix
m	milli (10 ⁻³) als Einheitenpräfix
m	Meter
m ²	Quadratmeter
M	Mol
min	Minute
MOVAS	<i>murine aortic smooth muscle cells</i> , murine aortale glatte Muskelzellen
mPEC	<i>murine pulmonary endothelial cells</i> , murine pulmonale Endothelzellen
mRNA	<i>messenger RNA</i>
mSMC	<i>murine smooth muscle cells</i> , murine glatte Muskelzellen

n	nano (10^{-9}) als Einheitenpräfix
NaCl	Natriumchlorid
NC	<i>normal chow</i> , Normalfutter
NO	<i>nitric oxide</i> , Stickstoffmonoxid
<i>ob</i>	<i>obese</i> , fettleibig, adipös
OP	Operation
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , Phosphatgepufferte Salzlösung
PCNA	<i>proliferating cell nuclear antigen</i> , proliferierendes nukleäres Antigen
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i> , Plättchen-abgeleiteter Wachstumsfaktor
Pen/Strep	Penicillin / Streptomycin
PPAR γ	<i>peroxisome proliferator-activated receptor γ</i> , Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor γ
PTEN	<i>phosphatase and tensin homolog</i> , Phosphatase and Tensin homolog
PTP1B	<i>protein-tyrosine phosphatase 1B</i> , Protein-Tyrosin-Phosphatase 1B
qPCR	<i>real-time quantitative PCR</i> , quantitative Echtzeit PCR
RNA	<i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
rpm	<i>rounds per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase
s	Sekunde
SDS	<i>sodium dodecyl sulfat</i> , Natriumdodecylsulfat
SEM	<i>standard error of mean</i> , Standardfehler des Mittelwerts
Ser	Serin
sLepR	<i>soluble LepR</i> , löslicher Leptin-Rezeptor
Sm22	<i>Smooth muscle protein-22</i>
SMA	<i>smooth muscle actin</i>
SMC	<i>smooth muscle cells</i> , glatte Muskelzellen
SMMHC	<i>smooth muscle myosin heavy chain</i> , glatte Muskelzell-Myosin-schwere Kette
SOCS3	<i>suppressor of cytokine signaling 3</i> , Suppressor der Zytokin-Signalübertragung 3
sog.	sogenannt
STAT	<i>signal transducers and activators of transcription</i>
Tab.	Tabelle
TAE	TRIS-Acetat-EDTA (-Puffer)
TBS(T)	<i>Tris-buffered saline (Tween-20)</i> , Tris-gepufferte Salzlösung (Tween-20)
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TGF β	<i>transforming growth factor β</i> , Transformierender Wachstumsfaktor β

Tie2	endotheliale Rezeptor-Tyrosinkinase
TNF α	<i>tumor necrosis factor α</i> , Tumornekrosefaktor- α
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tyr	Tyrosin
U	unit
u.a.	unter anderem
UV	Ultraviolett
V	Volt
VAT	<i>visceral adipose tissue</i> , viszerales Fettgewebe
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i> , vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
WT	Wildtyp

1. Einleitung

1.1 Leptin, Übergewicht und kardiovaskuläres Risiko

1.1.1 Definition und Epidemiologie von Übergewicht und Adipositas

Die in den letzten drei Jahrzehnten kontinuierliche Zunahme von Übergewicht und Adipositas in der Bevölkerung ist mit zunehmenden gesundheitlichen Problemen verbunden. Sowohl Übergewicht als auch Adipositas sind mit einer erhöhten Inzidenz von multiplen Komorbiditäten wie Diabetes mellitus Typ 2 und kardiovaskuläre Erkrankungen assoziiert [1]. Die Beurteilung von Untergewicht, Normalgewicht und Übergewicht sowie des Schweregrads der Adipositas erfolgt häufig anhand des *Body-Mass-Index* (BMI) gemäß der internationalen Klassifizierung der Weltgesundheitsorganisation (*World Health Organization*; WHO), welche in der nachfolgenden Tabelle 1-1 zusammengefasst ist. Dabei handelt es sich um eine anthropometrische Messmethode, bei welcher das Körpergewicht und die Körpergröße als Maß zur Einschätzung des Ernährungszustands verwendet werden. Zur Berechnung des BMI wird das Körpergewicht (in kg) durch das Quadrat der Körpergröße (in m²) dividiert.

Tabelle 1-1: Internationale Klassifizierung von Untergewicht, Normalgewicht, Übergewicht und Adipositas anhand des *Body-Mass-Index* (BMI) bei Erwachsenen (≥ 20 Jahre; nach WHO)

Klassifizierung	BMI (kg/m ²)
Untergewicht	< 18,5
Normalgewicht	18,5 – 24,9
Übergewicht	25 – 29,9
Adipositas Grad I	30 – 34,9
Adipositas Grad II	35 – 39,9
Adipositas Grad III	> 40

Daten der *Global Burden of Disease* (GBD) Studie verzeichneten zwischen 1980 und 2013 einen weltweiten Anstieg des Anteils der erwachsenen Bevölkerung mit einem BMI von über 25 kg/m², von 28,8% auf 36,9% bei Männern und von 29,8% auf 38,0% bei Frauen (siehe Abb. 1-1). Seit 1980 ist die Prävalenz vor allem bei Kindern und Jugendlichen in den Industrienationen erheblich angestiegen. Dabei waren 23,8% der Jungen und 22,6% der Mädchen im Jahr 2013 übergewichtig oder adipös [2]. In Deutschland sind laut dem 13. Ernährungsbericht (2016) der Deutschen Gesellschaft für Ernährung (DGE) zur Übergewichtsentwicklung 59% der Männer und 37% der Frauen übergewichtig.

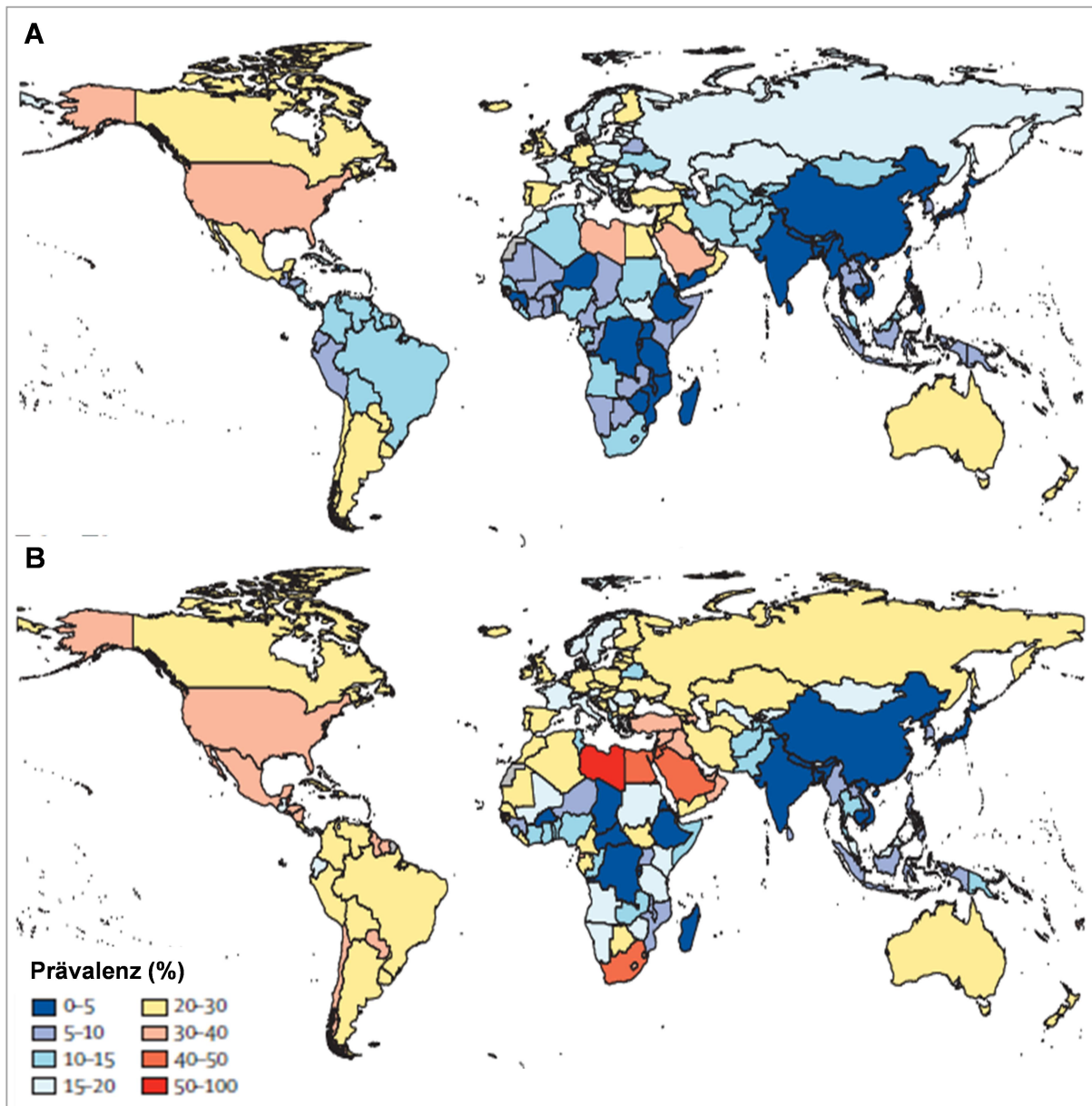


Abbildung 1-1: Übersicht der weltweiten Prävalenz von Übergewicht (BMI ≥ 30) in der erwachsenen Bevölkerung (≥ 20 Jahre) 2013. Die Abbildung zeigt Daten zur Prävalenz der Männer (A) und der Frauen (B) aus der *Global Burden of Disease (GBD)* Studie (modifiziert nach [2]).

1.1.2 Übergewicht und Rolle des Fettgewebes für das kardiovaskuläre Risiko

Übergewicht, vor allem abdominales Übergewicht, gilt als eine Komponente des metabolischen Syndroms, welches aus einem *Cluster* mehrerer eng mit kardiovaskulären Erkrankungen und Diabetes mellitus Typ 2 assoziierter Risikofaktoren besteht. Zu den klinischen Diagnosekriterien des metabolischen Syndroms gehören: (1) abdominales Übergewicht (erhöhter Taillenumfang unter Berücksichtigung der Populations- und Länder-spezifischen Definitionen), (2) Hypertonie, Dyslipidämie mit (3) erhöhten Triglyzeriden und (4) erniedrigtem HDL-Cholesterin sowie eine (5) gestörte Glukosetoleranz bzw. vorliegende

Insulin-Resistenz (erhöhte Nüchtern glukose-Werte im Blut). Laut dem „*Joint-Statement*“ von 2009 des IFD (*International Diabetes Federation*), AHA / NHLBI (*American Heart Association / National Heart, Lung, and Blood Institute*) und anderer Organisationen liegt das metabolische Syndrom vor, wenn drei der fünf oben genannten Kriterien erfüllt sind [3].

Zahlreiche prospektive populationsbasierte Studien belegen eine Assoziation von Übergewicht mit einem erhöhten Risiko für atherosklerotische Erkrankungen, die schwerwiegende gesundheitliche Folgen wie Herzinfarkt und Schlaganfall zur Folge haben können [4-8]. In einer 2009 von Guh *et al.* publizierten großen Meta-Analyse, in der 89 relevante prospektive Studien zur Inzidenz von Komorbiditäten im Zusammenhang mit Übergewicht und Adipositas untersucht wurden, wurde eine statistisch signifikante Assoziation von Übergewicht mit dem Auftreten kardiovaskulärer Erkrankungen aufgezeigt. Dabei wurden elf Studien mit einer Evidenz für koronare Herzerkrankungen, sieben für Schlaganfall und vier für Bluthochdruck im Zusammenhang mit Übergewicht identifiziert [1].

Mehrere klinische Studien zeigen, dass nicht nur Übergewicht *per se*, dessen Schweregrad mit Hilfe des BMI oder der Gesamtkörperfettmasse bestimmt wird, sondern vor allem auch die Fettverteilung eine wichtige Rolle spielt. So ist abdominales oder zentrales Übergewicht, das in vielen epidemiologischen Studien indirekt anhand der Messung des Taillenumfangs oder des Taille-Hüft-Verhältnisses bestimmt wird, unabhängig vom Körpergewicht mit einem erhöhten kardiovaskulären Risiko assoziiert und gilt als stärkerer Prädiktor für atherosklerotische Erkrankungen [9-13]. Die Untersuchung von 15 Kohortenstudien und randomisierten klinischen Studien zum Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen bei abdominalem Übergewicht in einer Meta-Regressions-Analyse von de Koning *et al.* bestätigte eine signifikante Assoziation von abdominalem Übergewicht und der Inzidenz kardiovaskulärer Ereignisse. Dabei war die Zunahme des Taillenumfangs um 1 cm mit einem Risikoanstieg der Inzidenz für zukünftige kardiovaskuläre Ereignisse um 2% assoziiert und der Anstieg von 0,01 im Taille-Hüft-Verhältnis mit einem um 5% höheren kardiovaskulären Risiko verbunden [14]. In klinischen Studien, die eine direkte Messung des viszeralen Fettgewebes mittels Computertomographie durchgeführt haben, konnte gezeigt werden, dass vor allem die Menge des intraabdominalen Viszeralfetts ein wichtiger unabhängiger Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen ist [15-18].

1.1.3 Systemische und lokale Hyperleptinämie als Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen

Das hauptsächlich von den Adipozyten des Fettgewebes produzierte und sezernierte Leptin ist ein wichtiges Hormon für die komplexe Regulation der Nahrungsaufnahme und der Energiehomöostase. Dabei fungiert Leptin unter physiologischen Bedingungen als afferentes Signalmolekül in einem negativen Rückkopplungsmechanismus, an dem vor allem Neurone des Hypothalamus beteiligt sind, mit dem Ziel eine konstante Körperfettmasse und somit ein möglichst konstantes Körpergewicht zu erhalten [19]. Bei Übergewicht sind der erhöhte BMI und die Zunahme der Körperfettmasse mit erhöhten zirkulierenden Leptinspiegeln assoziiert [20, 21]. Jedoch geht Übergewicht in den meisten Fällen mit einer verminderten Responsivität gegenüber den Appetit-unterdrückenden und somit reduzierenden Effekten von Leptin auf die Nahrungsaufnahme einher [22]. Auf die mechanistischen Zusammenhänge dieser sogenannten „Leptin-Resistenz“ wird im Abschnitt 1.2.5 näher eingegangen.

Neben der Regulation des Körpergewichts lieferten weitere Untersuchungen zunehmend Befunde, dass Leptin auch kardiovaskuläre Effekte vermittelt und somit an möglichen atherogenen, thrombotischen und angiogenen Prozessen beteiligt sein könnte [23]. So fanden mehrere klinische Studien eine Assoziation zwischen den zirkulierenden Leptinspiegeln und einem erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen [24-28]. In einer im Rahmen der WOSCOPS-Studie (*West of Scotland Coronary Prevention Study*) durchgeführten prospektiven Fall (n=377)-Kontroll (n=783)-Studie wurden erhöhte Leptinspiegel im Plasma als Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen identifiziert, unabhängig vom BMI und anderen klassischen Risikofaktoren wie Alter, Blutfette und Blutdruck oder Plasma-CRP (C-reaktives Protein)-Spiegeln [27]. Weitere klinische Untersuchungen identifizierten die zirkulierenden Leptinspiegel als unabhängigen Prädiktor für wiederkehrende kardiovaskuläre Ereignisse [29, 30] oder den Kalzifizierungsgrad der Koronararterien [31]. In einer 2017 publizierten Querschnittsstudie wurden adipöse Probanden, die als „metabolisch gesund“ galten mit „metabolisch nicht-gesunden“ verglichen. Zur Definition einer „metabolisch gesunden Adipositas“ wurden Komponenten des metabolischen Syndroms unter Berücksichtigung des kardiovaskulären Risikos verwendet wie: keine Hypertonie oder entsprechende Medikation bzw. Diät, Fehlen jeglicher klinisch diagnostizierter Erkrankungen, keine weitere Medikation oder Einhalten einer speziellen Diät (z.B. im Rahmen einer Diabetes-Erkrankung oder Fettstoffwechselstörung) und keine kardiovaskulären Erkrankungen. Probanden, die diese Kriterien nicht erfüllten, wurden unter dem Begriff „Risiko-Adipositas“ klassifiziert und galten als „metabolisch nicht gesund“. Dabei wiesen die „metabolisch Nicht-Gesunden“ signifikant höhere zirkulierende Leptinspiegel auf im Vergleich zu den „metabolisch Gesunden“ adipösen Probanden, obwohl auch diese hyperleptinämisch waren. Die logistische Regressionsanalyse ergab eine positive

Korrelation der Leptinspiegel mit einem „nicht-gesunden Zustand“, unabhängig vom Alter, Körpergewicht und BMI und die Autoren schlussfolgerten, dass die Leptinspiegel zur kardiovaskulären und metabolischen Risikoerfassung bei übergewichtigen oder adipösen Individuen beitragen könnten [32].

Darüber hinaus geben weitere Untersuchungen Hinweise auf eine lokale, möglicherweise vom Körpergewicht unabhängige Leptin-Expression und -Wirkung. Im Mausmodell resultierte bereits die zweiwöchige Fütterung einer Hochfettdiät in einem massiven Anstieg der Leptin mRNA-Expression im perivaskulären Fettgewebe im Vergleich zu den mit Normalfutter gefütterten Kontrollen, trotz lediglich moderater, nicht signifikanter Gewichtsunterschiede zwischen den beiden Gruppen [33]. In einer klinischen Untersuchung von Cheng *et al.* wurden im epikardialen und abdominalen Fettgewebe von Patienten mit koronarer Herzkrankheit (KHK) gegenüber der nicht an KHK-erkrankten Kontrollgruppe signifikant erhöhte Leptinspiegel in beiden Fettdepots nachgewiesen. Die KHK-Patienten wiesen zwar weitere kardiovaskuläre Risikofaktoren wie eine Hypertonie und Fettstoffwechselstörungen auf, unterschieden sich jedoch interessanterweise nicht bezüglich des BMI und des Taillenumfangs von der Kontrollgruppe [34].

1.2 Das Hormon Leptin

1.2.1 Identifizierung des *obese*-Gens und seines Genprodukts Leptin

Bereits in den 50er und 60er Jahren des 20. Jahrhunderts wurden mit massivem Übergewicht und Diabetes einhergehende spontane Mutationen im *obese* (abgekürzt als *ob*; für fettleibig, adipös) und *diabetes* (abgekürzt als *db*; für diabetisch) Gen von Mäusen identifiziert, die autosomal rezessiv vererbt werden [35, 36]. Homozygote *ob/ob* und *db/db* Mäuse weisen dabei einen identischen Phänotyp auf, welcher dem der morbidem Adipositas beim Menschen ähnelt. Bei den um 1970 von Coleman und Kollegen durchgeführten Parabiose-Experimenten (chirurgische Kopplung der Blutkreisläufe zweier Mäuse) zeigte der *ob/ob*-Partner eine verminderte Nahrungsaufnahme und Gewichtsabnahme, während dies bei dem *db/db*-Partner nicht der Fall war. Coleman stellte die später bestätigte Hypothese auf, dass *ob/ob*-Mäuse nicht in der Lage sind, einen von den Adipozyten des Fettgewebes gebildeten zirkulierenden Faktor zu bilden, jedoch auf neuronaler Ebene den entsprechenden Rezeptor besitzen und somit sensitiv auf die Nahrungsaufnahme und Körpergewicht reduzierenden Effekte dieses Faktors reagieren. Im Gegensatz dazu können *db/db*-Mäuse diesen Faktor zwar produzieren, aufgrund eines fehlenden Rezeptors für diesen Faktor aber nicht auf neuronaler Ebene reagieren (siehe Abb. 1-2) [19, 37-40].

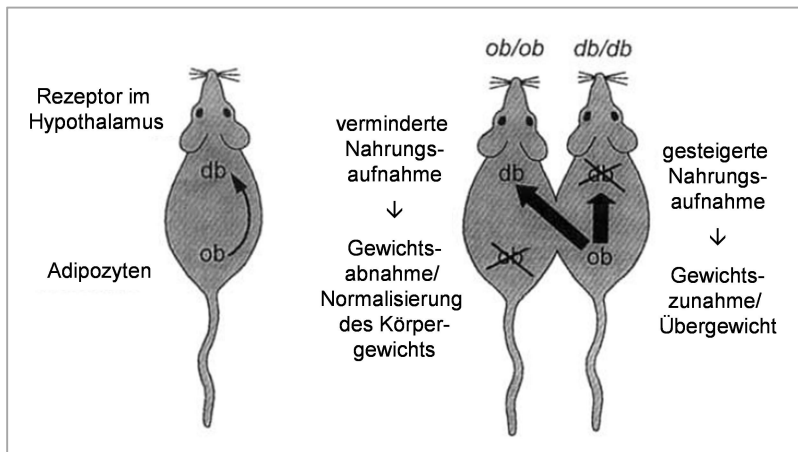


Abbildung 1-2: Schematische Darstellung der Parabiose-Experimente zwischen *ob/ob*-Mäusen und *db/db*-Mäusen von Coleman und Kollegen um 1970 (modifiziert nach [37]).

Im Jahr 1994 gelang es dann schließlich Jeffrey Friedman und seinem Team, das auf Chromosom 6 lokalisierte murine *ob*-Gen und dessen auf Chromosom 7 lokalisiertes humanes Homolog mittels Klonierung und Sequenzierung zu identifizieren. Das *ob*-Gen kodiert für ein 167 Aminosäuren langes sekretiertes Protein mit einem Molekulargewicht von 16 kDa, dessen Aminosäuresequenz in Mensch und Maus zu 84% identisch ist [41, 42] und in seiner Sekundärstruktur eine Vier-Helix-Bündel Konformation mit einer Disulfidbrücke aufweist [43]. Das als Leptin (griechisch *leptós*; für dünn) bezeichnete Hormon wird hauptsächlich von den Adipozyten des Fettgewebes gebildet und daher zu den Adipokinen gezählt, wohingegen lediglich geringe Mengen vom Magenepithel und der Plazenta sezerniert werden [19, 44]. Leptin zirkuliert sowohl in murinem als auch in humanem Plasma [45] und kann die Blut-Hirn-Schranke passieren [46]. Nach der Entdeckung des für die Regulation der Nahrungsaufnahme und des Körpergewichts wichtigen zirkulierenden Moleküls Leptin dauerte es nicht lange bis Tartaglia *et al.* 1995 einen im murinen *Plexus corioideus* exprimierten Leptin-bindenden Rezeptor identifizierten und klonierten. Der Leptin-Rezeptor verfügt über eine einzige Transmembrandomäne und wird aufgrund seiner Ähnlichkeiten zur Signaltransduktion-vermittelnder Glykoprotein gp130 Untereinheit des IL-6 (Interleukin-6)-Rezeptor-Komplexes, zu GCSF-Rezeptoren (*Granulocyte colony-stimulating factor receptor*) sowie LIF-Rezeptoren (*Leukemia inhibitory factor receptor*) zu den Klasse I-Zytokin-Rezeptoren gezählt [47].

1.2.2 Zentrale und periphere Funktionen von Leptin

Leptin-Rezeptoren konnten in zahlreichen Gehirnregionen nachgewiesen werden [48, 49]. Über Leptin-Rezeptoren auf Neuronen des Hypothalamus (u.a. im Kerngebiet des *Nukleus arcuatus*) ist Leptin zusammen mit anderen Hormonen wie Insulin (des Pankreas), Ghrelin (des Magens) und PYY₃₋₃₆ (Peptid YY; des Dünndarms) an der komplexen Regulation von

Hunger und Sättigung beteiligt und beeinflusst damit die Energieaufnahme und den Energieverbrauch. Dabei aktiviert Leptin appetithemmende POMC (*pro-opiomelanocortin*)- und CART (*cocaine- and amphetamine-regulated transcript*)-Interneurone und inhibiert appetitsteigernde AgRP (*agouti-related protein*)- und NPY (Neuropeptid Y)-Interneurone [50, 51]. Die Bedeutung von Leptin für die Energiehomöostase wird in homozygoten *ob/ob*-Mäusen deutlich, bei denen es aufgrund einer Punktmutation im *ob*-Gen zur Synthese eines verkürzten, biologisch nicht-aktiven Leptin-Proteins kommt. Das Fehlen des Sättigungsfaktors Leptin führt zu Hyperphagie, massivem Übergewicht, Diabetes, verminderter metabolischer und körperlicher Aktivität sowie reduzierter Körpertemperatur [42, 52]. Nach täglicher intraperitonealer oder subkutaner Injektion von rekombinantem Leptin konnte in den *ob/ob*-Mäusen eine dosisabhängige signifikante Reduzierung der Nahrungsaufnahme, des Körpergewichts und der Körperfettmasse verzeichnet werden [45, 52-55], aber auch metabolische Verbesserungen und ein Anstieg der Körpertemperatur und Aktivität [52, 55]. Diabetische *db/db*-Mäuse exprimieren aufgrund einer Punktmutation in der genomischen *Lepr*-Sequenz eine Splice-Variante der langen LepR-Isoform mit einer verkürzten, nicht zur Signaltransduktion fähigen intrazellulären Domäne und weisen einen nahezu identischen Phänotyp wie Leptin-defiziente *ob/ob*-Mäuse auf [56-58]. Cohen *et al.* zeigten im Mausmodell, dass die selektive Deletion aller Isoformen des Leptin-Rezeptors in Neuronen zu Übergewicht und massiv erhöhten Leptin-Plasmaspiegeln führt, was die Bedeutung der neuronalen Leptin-Signaltransduktion für die Regulation des Körpergewichts hervorhebt [59]. Des Weiteren wirkt Leptin modulierend auf den Sympathikustonus und auf die Aktivität der Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsen und -Nebennieren-Achse. Das ubiquitäre Vorkommen von Leptin-Rezeptoren auf zahlreichen Organen spiegelt auch die Vielzahl der peripheren Wirkungen wider. Auf periphere Organe wie Pankreas, Leber und Skelettmuskulatur hat Leptin vor allem metabolische Wirkungen im Rahmen des Glukose- und Fettstoffwechsels und ist eng mit dem Insulin-Signalweg verknüpft. In Abbildung 1-3 sind die zentralen und peripheren Funktionen von Leptin zusammengefasst. Weitere periphere Leptin-Effekte auf das Immunsystem, die Hämatopoese, den Knochenstoffwechsel und die Reproduktion wurden ebenfalls beschrieben. Im kardiovaskulären System spielt Leptin unter anderem eine Rolle bei der Vermittlung einer endothelialen Dysfunktion und scheint an vaskulären Umbauprozessen wie der Plaque-Bildung und -Destabilisierung beteiligt zu sein (zur Übersicht siehe [51, 60]). Auf die genaueren Wirkungen von Leptin auf vaskuläre Zellen und seine Rolle für die vaskuläre Wundheilung wird im Abschnitt 1.4 näher eingegangen.

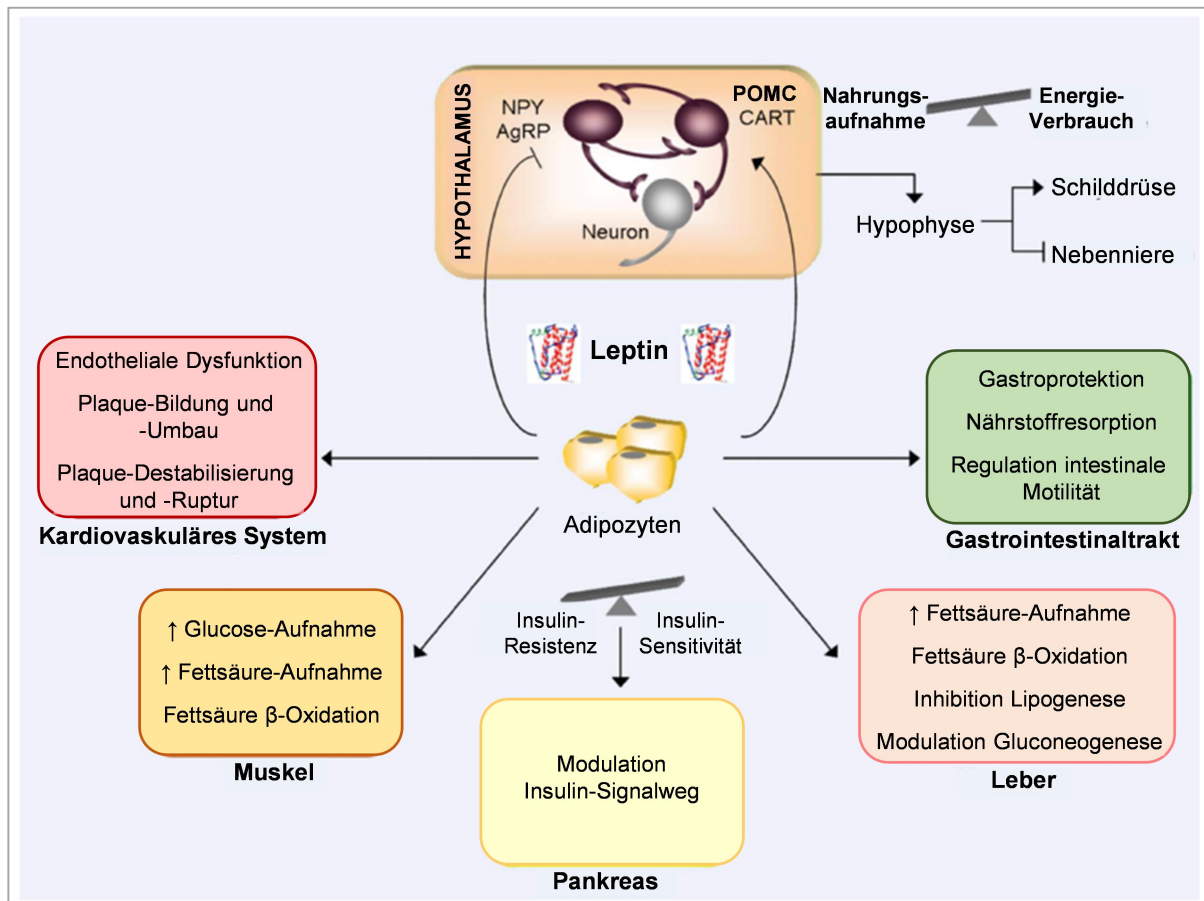


Abbildung 1-3: Zentrale und periphere Funktionen von Leptin. Abkürzungen: POMC, Pro-opiomelanocortin; CART, Cocaine- and amphetamine-regulated transcript; AgRP, Agouti-related protein; NPY, Neuropeptid Y (modifiziert nach [51]).

1.2.3 Leptin-Rezeptoren

Wie andere Klasse I-Zytokin-Rezeptoren verfügt auch der Leptin-Rezeptor über keine eigene intrinsische Tyrosinkinase-Aktivität und ist mit dem JAK (Januskinase) / STAT (*signal transducers and activators of transcription*)-Signalweg assoziiert [61]. Der ungebundene Leptin-Rezeptor weist eine hohe Flexibilität im Bereich der Cytokin-Rezeptor-Homologie-2 (CHR2) auf, welche mit den starren Membran proximalen Fibronectin III (FIII) Domänen verbunden ist. Die Bindung von Leptin an CHR2 führt zur Begrenzung deren Flexibilität und zur Disposition der FIII Domäne. Die Leptin-Bindung an eine zweite Rezeptor-Bindungsstelle im Bereich der Immunglobulin (Ig)-ähnlichen Domäne resultiert in der Bildung eines quartären Signal-Komplexes, welcher als Schlüsselmechanismus für die Transaktivierung der Januskinase auf der intrazellulären Seite des Rezeptors angenommen wird. Die 20 möglichen N-terminal (Aminoende) verknüpften Glykosylierungen haben eine regulierende Funktion auf den Rezeptor, sind jedoch nicht essentiell an der Ligand-Rezeptor Interaktion beteiligt. In der nachfolgenden Abbildung 1-4 sind der Aufbau der Struktur-Domänen (A) und

die Leptin-induzierte Struktur- bzw. Konformationsveränderung des Leptin-Rezeptor-Signalkomplexes (B) schematisch dargestellt [62, 63].

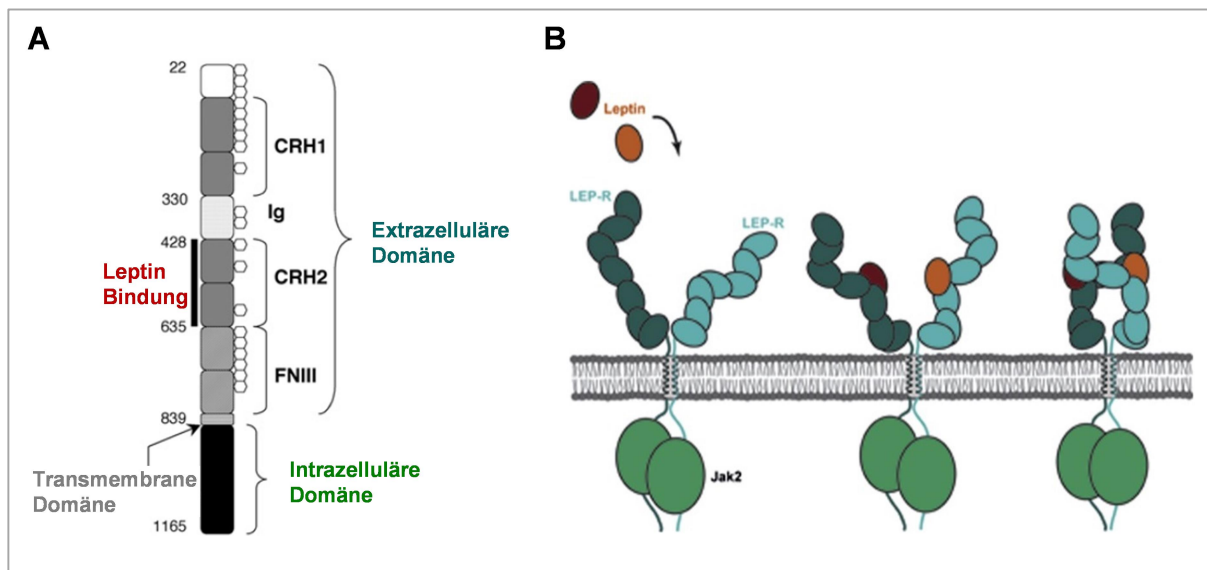


Abbildung 1-4: Struktur des Leptin-Rezeptors. (A) Struktur-Domänen der langen Isoform des humanen Leptin-Rezeptors, welcher 20 mögliche N-verknüpfte Glykosylierungen (angedeutet durch die Hexagone) in der extrazellulären Domäne aufweist. *Abkürzungen:* CRH, Cytokin Rezeptor Homologie; Ig, Immunglobulin; FNIII Fibronectin III (modifiziert nach [62]). (B) Liganden-induzierte Strukturveränderung des Leptin-Rezeptor-Signalkomplexes (modifiziert nach [63]; Abb. B entstammt dem *Graphical Abstract*).

Bisher sind sechs Isoformen des Leptin-Rezeptors (LepR) bekannt, eine lange Isoform LepR-b, fünf kurze Isoformen LepR-a, -c, -d und -f sowie eine lösliche Isoform sLepR (*soluble LepR*), bei welchen es sich um alternative Splicing-Varianten des *Lepr*-Gens handelt (siehe Abb. 1-5) [58, 64]. Die lange LepR-Isoform b wird vorwiegend im zentralen Nervensystem, vor allem im Hypothalamus, und in vergleichsweise geringerem Ausmaß in peripheren Geweben exprimiert, während die kurzen LepR-Isoformen eine vermehrte Expression auf zahlreichen peripheren Organen (u.a. Lunge, Pankreas, Skelettmuskulatur, Gastrointestinaltrakt, Niere, Herz, Leber) aufweisen [47, 48, 58, 65-68]. Bei den Isoformen a, b, c, d und f handelt es sich um Transmembranrezeptoren, die über eine identische extrazelluläre Leptin-bindende Domäne, eine Transmembrandomäne und eine unterschiedlich lange, für jede Isoform spezifische, zytosolische Domäne verfügen, welche auf der zytosolischen Seite ein für die Bindung der Januskinase notwendiges Prolin-reiches Box 1-Motiv aufweist. Die lange Isoform LepR-b verfügt zusätzlich über die intrazellulären (STAT3-bindende) Box 2- und Box 3-Motive. Außerdem besitzt die zytoplasmatische Domäne von LepR-b vier konservierte Tyrosin-Reste in den Positionen Tyr 974, Tyr 985, Tyr 1077 und Tyr 1138, die nach erfolgter Phosphorylierung an der Vermittlung der nachgeschalteten Leptin-Signaltransduktion beteiligt sind [61, 69-71]. Während die Rolle der langen Isoform

LepR-b gut untersucht ist, ist nur wenig bekannt über die Funktion der kurzen Isoformen. Die kurze Isoform LepR-a, die vermehrt im *Plexus corioideus* und zerebralen Mikrogefäßen exprimiert wird, ist möglicherweise beim Transport von Leptin durch die Blut-Hirn-Schranke beteiligt [72-74]. Li *et al.* fanden unter Verwendung eines Isoform-spezifischen LepR-a Knockout Maus-Modells nach Fütterung einer Hochfettdiät einen leichten Anstieg der Körperfettmasse und des Körpergewichts sowie eine moderate Leptin-Resistenz. Dabei scheint sich die Deletion von LepR-a phänotypisch jedoch weit moderater auszuwirken im Vergleich zu einer LepR-b-Deletion [67, 75].

Die LepR-Isoform e verfügt über keine Transmembrandomäne und wird als lösliche (*soluble*) oder sekretierte Isoform (im Weiteren als sLepR abgekürzt) bezeichnet. Der murine sLepR wird entweder durch alternatives Splicing oder durch proteolytische Abspaltung der extrazellulären Domäne membrangebundener LepR-Isoformen generiert. Im Gegensatz dazu kommt der humane sLepR ausschließlich als proteolytisches Abspaltprodukt vor, da beim Menschen bisher kein alternatives Splicing Transkript nachgewiesen werden konnte [76, 77]. Lammert *et al.* identifizierte als Erster den sLepR als Hauptbindungsprotein für zirkulierendes Leptin im humanen Blut [78]. Das Vorliegen von zirkulierendem Leptin in freier oder gebundener Form spielt eine wichtige Rolle bei der Modulation der Bioverfügbarkeit und somit Aktivität von frei zirkulierendem Leptin. So konnte *in vitro* und *in vivo* gezeigt werden, dass sLepR den Transport von Leptin in die Zelle und das Durchqueren der Blut-Hirn-Schranke inhibieren kann [79]. Das Verhältnis von freiem zirkulierendem Leptin und dem zirkulierenden löslichen LepR wird als „Freier Leptin Index“ (*free leptin index*, FLI) bezeichnet und gilt als Indikator für die tatsächlich biologisch aktive Form [80].

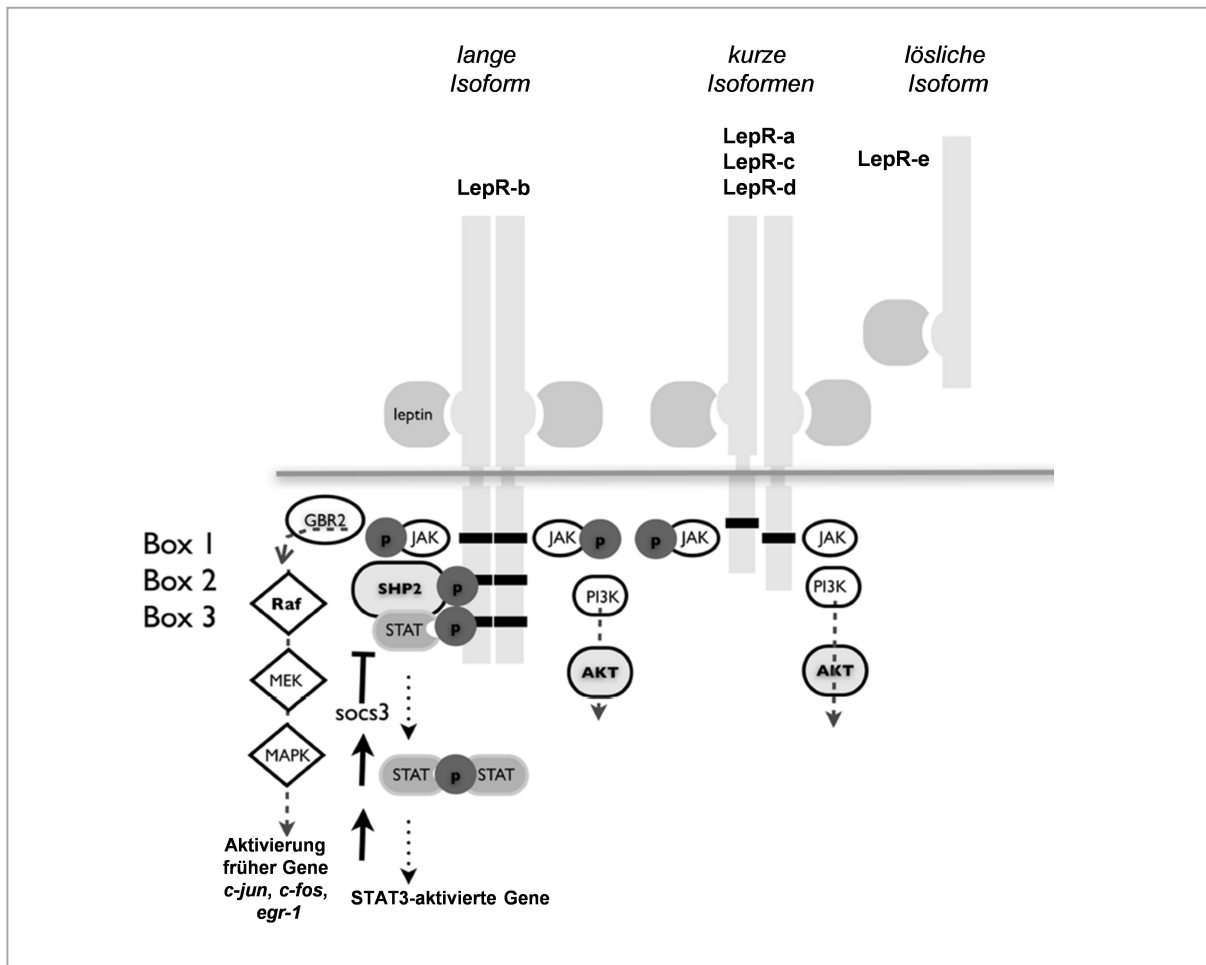


Abbildung 1-5: Schematische Darstellung der Isoformen des Leptin-Rezeptors. Die sechs bekannten Isoformen des Leptin-Rezeptors (LepR) weisen eine identische extrazelluläre Ligandenbindende Domäne auf, unterscheiden sich jedoch in ihrer zytosolischen Domäne. Die lange Isoform LepR-b und die kurzen Isoformen LepR-a, -c, -d und -f (f ist in der Abbildung nicht gezeigt) verfügen über eine Transmembrandomäne und eine Signaltransduktions-vermittelnde zytosolische Domäne, während es sich bei LepR-e um eine sekretorische Isoform mit fehlender Transmembrandomäne handelt (modifiziert nach [81]).

1.2.4 Leptin-vermittelte Signalwege

Die lange Isoform LepR-b ist mit mehreren intrazellulären Signalwegen assoziiert. In Abbildung 1-6 sind die drei Haupt-Signalwege zusammengefasst. Die nach Bindung von Leptin an den LepR-b resultierende Konformationsänderung vermittelt auf der intrazellulären Seite die Autophosphorylierung der mit dem LepR-b assoziierten JAK2 Tyrosinkinase, welche wiederum die Phosphorylierung der drei Tyrosin-Reste (in Position Tyr 985, Tyr 1077 und Tyr 1138) katalysiert, die über Bindungsstellen für Signalproteine mit einer SH2 (Src-Homologie)-Domäne verfügen. Dabei rekrutiert Tyr 1138 den Transkriptionsfaktor STAT3, welcher wiederum von JAK2 phosphoryliert wird, in Folge dessen es zur STAT3-Dimerisierung, Translokation in den Nukleus und Induktion von Zielgenen kommt. Zu den Zielgenen gehören vor allem SOCS3 (*suppressor of cytokine signaling 3*) und andere Gene,

wie z.B. des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors VEGF (*vascular endothelial growth factor*) und POMC (*pro-opiomelanocortin*), welches ein Prohormon für die Bildung von bei der Regulation der Nahrungsaufnahme und der Energiehomöostase beteiligter Neuropeptiden darstellt. SOCS3 wiederum wirkt inhibierend sowohl auf den JAK-STAT-Signalweg als auch den MAP (*mitogen-activated protein kinase*)-Kinase-Signalweg und gilt als wichtiger negativer Regulator des LepR-Signalwegs, der über eine negative Rückkopplung eine Überaktivierung des Leptin-Signalwegs verhindert. Dabei inhibiert SOCS3 die Leptin-induzierte JAK2-induzierte Phosphorylierung des LepR-b sowie die ERK (*extracellular signal-regulated kinases*) des MAP-Kinase-Signalwegs (Abb. 1-6 A). Der phosphorylierte Tyrosin-Rest Tyr 985 führt ebenfalls zur Rekrutierung von SOCS3, aber auch zur Phosphorylierung von SHP2 (Src-Homologie Domäne Protein 2), welches über die Bindung an Grb-2 (*growth factor receptor-bound protein 2*) die MAP-Kinase-Signalkaskade aktiviert (Abb. 1-6 B). Eine erhöhte MAPK / ERK1/2 (*extracellular signal-regulated kinases 1/2*) Aktivität führt zur vermehrten Transkription an der Zellproliferation und Differenzierung beteiligter früher Gene wie *c-fos* und *c-jun* (beide Bestandteile des Transkriptionsfaktors AP-1) sowie *erg-1* (*early growth response protein 1*). Des Weiteren kann Leptin über die JAK2 Phosphorylierung, möglicherweise vermittelt über die Phosphorylierung von IRS1/2 (*insulin receptor substrates 1/2*), den PI3 (Phosphoinositid-3)-Kinase-Signalweg stimulieren, was einen Verknüpfungspunkt zwischen dem Leptin und dem Insulin-Signalweg darstellt (Abb. 1-6 C). Die Aktivierung des PI3-Kinase-Signalwegs kann über den Rac/Rho-Signalweg die Zellmigration und -invasion erhöhen und über Akt (Proteinkinase B) Wachstum und Zellüberleben stimulieren sowie auf metabolische Prozesse Einfluss nehmen. Akt wirkt auch aktivierend auf die endotheliale NO-Synthase (eNOS) und somit NO (*nitric oxide*, Stickstoffmonoxid)-Bildung [61, 69, 82, 83]. Neben SOCS3 ist PTP1B (*protein-tyrosine phosphatase 1B*) ein weiterer negativer Regulator des Leptin-Signalwegs, der über die Dephosphorylierung von JAK2 inhibierend in die Signaltransduktion eingreift [84-86]. Das zytoplasmatische SH2B1-Adapterprotein, welches über die SH2-Domäne eine Vielzahl von Tyrosinkinasen wie JAK2 bindet, spielt eine wichtige Rolle als endogener Verstärker der Leptin-Sensitivität. *In vitro* konnte gezeigt werden, dass SH2B1 durch Entgegenwirken der inhibitorischen Effekte negativer Regulatoren wie PTP1B den Leptin-Signalweg verstärken kann [87-89].

Da, wie bereits beschrieben, sowohl die lange Isoform LepR-b als auch die kurzen Isoformen das Box1-Motiv aufweisen sind alle membrangebundenen Isoformen in der Lage JAK2 zu aktivieren, während nur die lange Isoform LepR-b STATs aktivieren kann (siehe auch Abb. 1-5) [90-93].

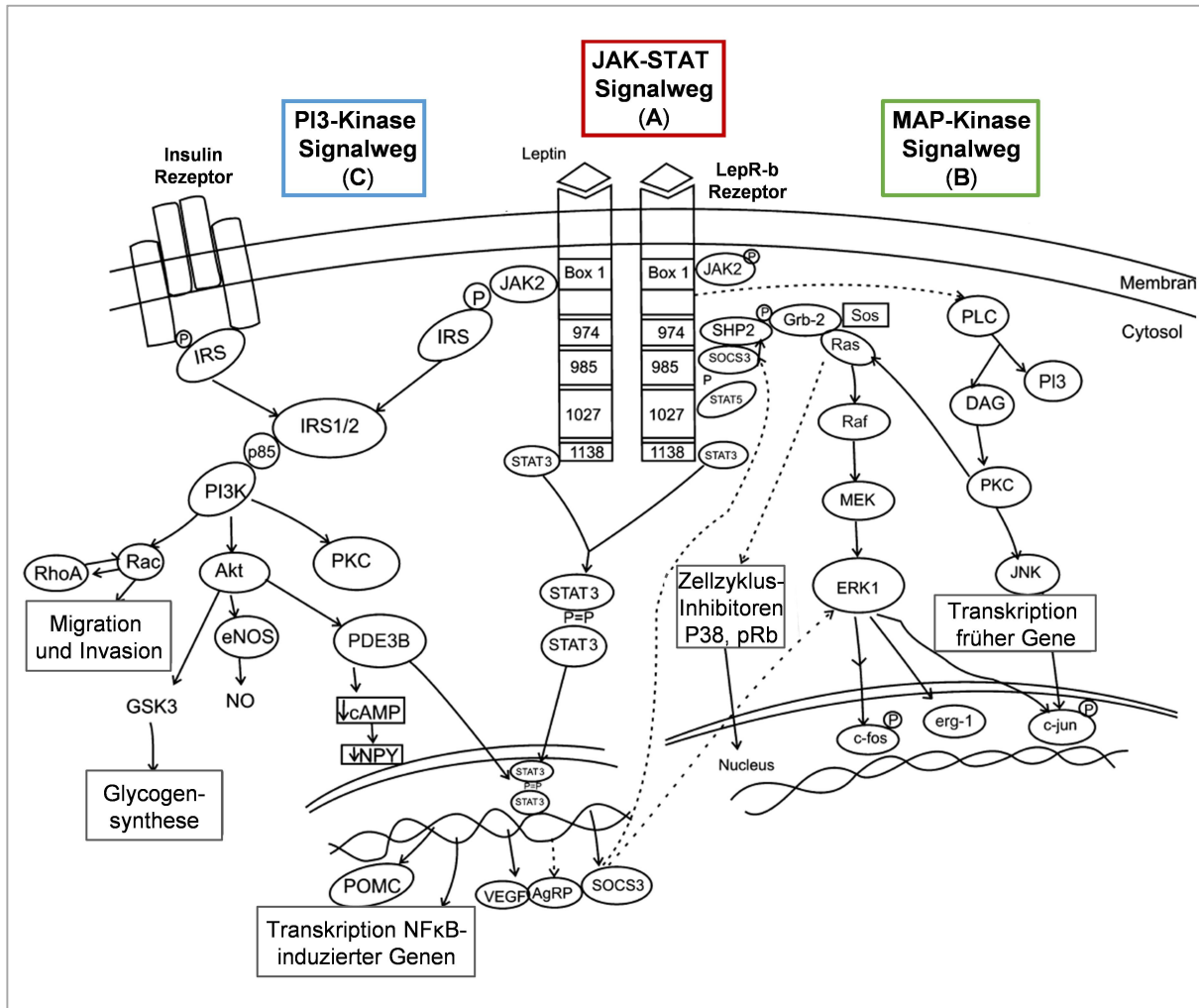


Abbildung 1-6: Leptin-Rezeptor-Signalwege. Schematische Übersicht der mit der langen Leptin-Rezeptor Isoform (LepR-b) assoziierten intrazellulären Hauptsignalwege. Die relevanten Abkürzungen sind in Abschnitt 1.2.4 erläutert (modifiziert nach [82]).

1.2.5 Leptin-Resistenz

Paradoxerweise führt eine Leptin-Defizienz, wie sie in *ob/ob*-Mäusen vorkommt, einerseits zu einer massiven Zunahme des Körpergewichts, das durch die Administration von rekombinantem Leptin wieder normalisiert werden kann [45, 52-55], andererseits weisen Diät-induzierte übergewichtige Mäuse deutlich erhöhte zirkulierende Leptinspiegel auf [94-96]. Beim Menschen ist die kongenitale Leptin-Defizienz eine sehr seltene Ursache von ausgeprägter Adipositas bereits im Kindesalter, bei der aufgrund einer homozygoten Mutation im Leptin-Gen, im Verhältnis zu der stark erhöhten Körperfettmasse inadäquat geringe Leptinspiegel vorliegen [97]. In den meisten Fällen ist Übergewicht auch beim Menschen mit einer Hyperleptinämie assoziiert. So konnten in mehreren Humanstudien signifikant erhöhte Leptinspiegel im Plasma oder Serum von übergewichtigen Probanden im Vergleich zu den schlanken Kontrollen dokumentiert werden. Dabei zeigte sich eine starke

positive Korrelation zur Körperfettmasse und zum BMI und in Übereinstimmung mit diesen Befunden war eine Gewichtsabnahme auch mit einer Abnahme der zirkulierenden Leptinspiegel assoziiert [20, 21, 98]. Zudem konnte im subkutanen und omentalen Fettgewebe bzw. *ex vivo* in isolierten omentalen Adipozyten von übergewichtigen Personen eine mRNA-Leptin Überexpression gegenüber den normalgewichtigen Kontrollen nachgewiesen werden [20, 99, 100]. Da in den meisten Fällen von Übergewicht auch gleichzeitig eine Hyperleptinämie vorliegt, wird von einer Resistenz gegenüber den Effekten von Leptin auf zentraler, aber auch peripherer Ebene ausgegangen. Die hohen Leptinspiegel stellen möglicherweise, ähnlich wie bei einer Insulin-Resistenz, einen Mechanismus zur Kompensation der verminderten oder fehlenden Wirkung von Leptin dar. Die genauen Ursachen für die Entwicklung dieser sogenannten Leptin-Resistenz sind unklar, es werden jedoch einige mögliche Mechanismen postuliert (siehe Abb. 1-7). Auf zentraler Ebene wird ein verminderter Transport von Leptin durch die Blut-Hirn-Schranke und damit Beeinträchtigung der Wirkung auf die an der Regulation der Nahrungsaufnahme beteiligten Zielneurone angenommen [101-103]. Aber auch jegliche Störungen in der Leptin-Rezeptor-Signalkaskade, wie eine verminderte Expression von Leptin-Rezeptoren [104-106], eine Herunterregulation positiver (wie SH2B1) oder Hochregulation negativer Regulatoren (wie SOCS3 und PTP1B) des Leptin-Signalwegs, werden als mögliche Ursachen der Leptin-Resistenz auf zentraler und peripherer Ebene angenommen. Diesbezüglich konnte gezeigt werden, dass Leptin-resistente Mäuse eine signifikant erhöhte SOCS3-Expression im Hypothalamus aufweisen [107-109], während eine heterozygote oder eine Neuronenspezifische bzw. POMC-Neuronenspezifische SOCS3-Deletion die Leptin-Sensitivität verbesserte und vor Diät-induziertem Übergewicht schützte [110-112]. In tierexperimentellen Untersuchungen ging der Sensitivitätsverlust gegenüber Leptin auch mit einer erhöhten hypothalamischen PTP1B-Expression einher [113, 114] und sowohl eine systemische als auch neuronale PTP1B-Deletion führte zur Verbesserung der Leptin-Sensitivität sowie zur Gewichtsreduzierung [86, 115, 116]. Im Gegensatz dazu führte das systemische Fehlen des positiven Regulators SH2B1 im Mausmodell zu starkem Übergewicht und Leptin-Resistenz, während eine Neuronenspezifische Überexpression vor der Entwicklung von Hochfett-induziertem Übergewicht und einer Leptin-Resistenz schützte. Daher scheint für den Erhalt der zellulären Leptin-Sensitivität unter anderem ein Gleichgewicht zwischen positiven und negativen Regulatoren von Bedeutung zu sein [88, 89]. Des Weiteren könnte die mit der Hyperleptinämie bei Übergewicht assoziierte niedriggradige Inflammation zur Entwicklung einer Leptin-Resistenz beitragen [117]. *In vitro* und tierexperimentelle Untersuchungen zeigen auch eine mögliche Beteiligung der Stressantwort des Endoplasmatischen Retikulums (ER) an der Vermittlung der zentralen Leptin-Resistenz durch Inhibition des Leptin-Signalwegs [118-121]. Eine Deletion der Bardet-Biedl-Syndrom (BBS) Proteine, die

an der Vermittlung des intrazellulären LepR-Transports zur Zellmembran beteiligt sind, konnte im Mausmodell ebenfalls mit der Entwicklung einer Leptin-Resistenz und Übergewicht in Verbindung gebracht werden [122, 123] (zur Übersicht siehe [124-126]).

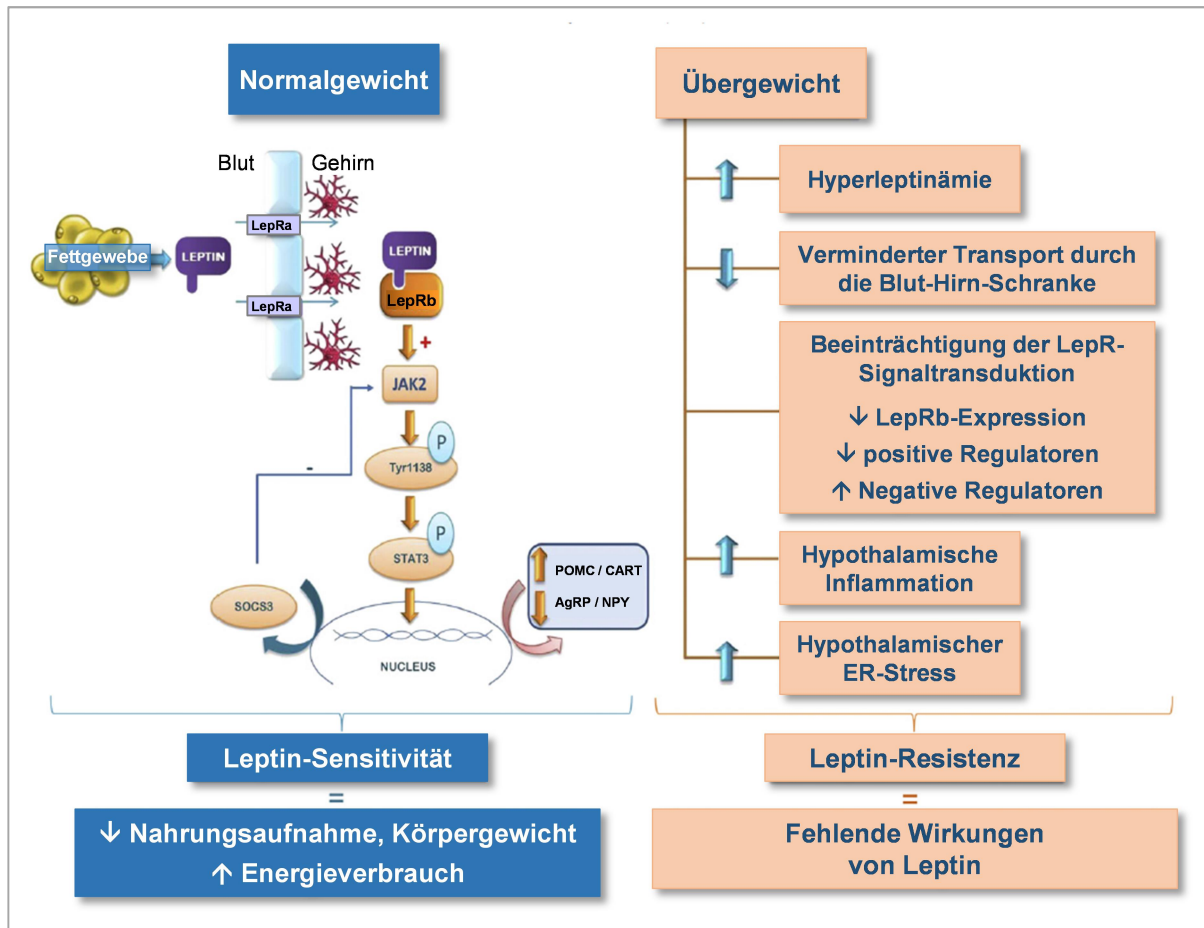


Abbildung 1-7: Übersicht postulierter Mechanismen der Leptin-Resistenz. Schematische Darstellung der physiologischen Effekte von Leptin bei Normalgewicht (*links*) und mögliche Veränderungen bei Übergewicht (*rechts*). *Abkürzungen:* LepRa, kurze Leptin-Rezeptor-Isoform a; LepRb, lange Leptin-Rezeptor-Isoform b; JAK, Januskinase; Tyr, Tyrosin; STAT, *signal transducer and activator of transcription*; SOCS, *suppressor of cytokine signaling*; POMC, *pro-opiomelanocortin*; CART, *cocaine- and amphetamine-regulated transcript*; AgRP, *agouti-related protein*; NPY, *Neuropeptid Y*; ER, Endoplasmatisches Retikulum (modifiziert nach [126]).

1.3 Gefäßfunktion und Atherosklerose

1.3.1 Aufbau und Funktion der Gefäßwand

Die Gefäßwand besteht aus mehreren Schichten verschiedener Gewebe- und Zelltypen, welche in Arterien, Kapillaren und Venen entsprechend ihrer jeweiligen Funktion unterschiedlich ausgeprägt sind. Der allgemeine anatomische Aufbau einer arteriellen Gefäßwand (siehe Abb. 1-8) wird in drei Schichten unterteilt: Intima (*Tunica intima*), Media (*Tunica media*) und Adventitia (*Tunica adventitia*). Die Intima besteht aus einer einzigen dem Gefäßlumen zugewandten und somit direkt mit dem Blut in Kontakt stehenden Endothelzellschicht, die einer subendothelialen Bindegewebsschicht aufliegt und von der *Membrana elastica interna* zur Media hin abgegrenzt wird. Endothelzellen stellen keine passive Schicht dar, sondern übernehmen für eine ungestörte Gefäßfunktion äußerst wichtige Barriere- und Vermittlungsfunktionen in der Regulation des Stoffaustausches zwischen dem Blut und der restlichen Gefäßwand. Darüber hinaus ist das Endothel auch an der Regulation der Hämostase und des Gefäßtonus sowie an immunologischen Prozessen beteiligt. Die Media besteht vor allem aus den für den Gefäßtonus verantwortlichen glatten Muskelzellen, die je nach Gefäßtyp und -größe mehrere Schichten und eine unterschiedliche Anordnung aufweisen können, welche in einer extrazellulären Matrix aus elastischen Fasern und Kollagen eingebettet sind. Die *Membrana elastica externa* grenzt die Media von der äußersten, das Gefäß umgebenden Adventitia ab. Die Adventitia ist eine von einer eigenen Mikrovaskulatur durchzogene Bindegewebsschicht, die Kollagen und andere extrazelluläre Matrixproteine sowie Fibroblasten und Immunzellen enthält. Somit ist die Adventitia für die Nährstoffversorgung und Verankerung der Gefäßwand verantwortlich und übernimmt auch wichtige immunologische Aufgaben [127-129].

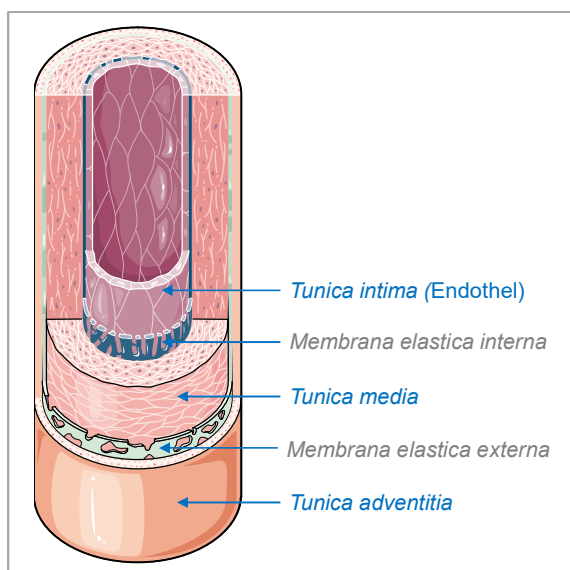


Abbildung 1-8: Schematischer Aufbau einer arteriellen Gefäßwand. (Die Abbildung wurde unter Verwendung der -Powerpoint image bank- von Servier Medical Art zusammengestellt.)

1.3.2 Pathogenese der Atherosklerose

Unter normalen homoöstatischen Bedingungen spielt das gesunde Endothel eine wichtige Rolle bei der Regulation der Balance zwischen Vasodilatation und Vasokonstriktion, Inhibition und Stimulation der glatten Muskelzell-Proliferation und -Migration sowie der Thrombogenese und Fibrinolyse und weist eine nur geringe Expression proinflammatorischer Faktoren auf. Atherosklerose ist eine chronisch-progressive inflammatorische Erkrankung, die vor allem in mittleren und großen Arterien vorkommt und durch die Ablagerung von Lipiden und fibröser Elemente sowie die Einwanderung von inflammatorischen Zellen und glatten Muskelzellen gekennzeichnet ist. Trotz wachsender wissenschaftlicher Erkenntnisse sind die komplexen Mechanismen der Pathogenese der Atherosklerose noch nicht vollständig aufgeklärt.

Im Jahr 1977 postulierte Russell Ross in seiner „*Response-to-injury*“-Hypothese eine Verletzung und folglich Denudation der Endothelzellen als initialen Ausgangspunkt für die Bildung und Progression einer atherosklerotischen Läsion. Dabei wurden eine chronische Hyperlipidämie, chemische (wie u.a. Metabolite, Infektionen, immunologische Prozesse) und mechanische (wie Blutfluss-bedingter erhöhter Scherstress) Faktoren als mögliche Quellen einer Endothelverletzung vorgeschlagen [130]. In einem späteren Ansatz wurde nicht mehr von einer Denudation des Endothels infolge einer Verletzung, sondern von einer endothelialen Dysfunktion als Initiator der Atherogenese gesprochen. Dabei wird davon ausgegangen, dass die ersten Veränderungen im Endothel stattfinden und infolge der sogenannten endothelialen Aktivierung die normalen homöostatischen Funktionen des Endothels beeinträchtigt werden. Als mögliche Ursachen einer endothelialen Dysfunktion werden ein erhöhtes und modifiziertes LDL-Cholesterin, Risikofaktoren wie Rauchen, Hypertonie und Diabetes mellitus, die unter anderem zur vermehrten Bildung von freien Radikalen führen können, aber auch genetische Prädispositionen, erhöhte Plasma-Homocystein-Spiegel oder Infektionen angenommen. Die ersten Veränderungen des aktivierten Endothels sind gekennzeichnet durch eine erhöhte endotheliale Produktion vasoaktiver Moleküle, Zytokine und Wachstumsfaktoren. Des Weiteren weist das Endothel eine erhöhte Permeabilität sowie Adhäsivität für Leukozyten und Thrombozyten auf, infolge dessen es zur vermehrten Infiltration und Akkumulation von Lipiden und inflammatorischen Zellen im subendothelialen Raum kommt. Akkumuliertes oxidativ modifiziertes LDL-Cholesterin kann unkontrolliert mittels *Scavenger*-Rezeptoren von Makrophagen aufgenommen werden, welche sich zu sog. Schaumzellen weiterentwickeln. Die inflammatorischen Prozesse stimulieren die Proliferation und Migration glatter Muskelzellen aus der Media in die Intima sowie die Kollagen-Synthese. Fortdauernde inflammatorische Bedingungen und das Vorliegen von Risikofaktoren führen zur weiteren Akkumulation inflammatorischer Zellen, Proliferation und Migration glatter Muskelzellen und Bildung von

fibrösem Gewebe, was in einer Umstrukturierung und Vergrößerung der Läsion resultiert. Im fortgeschrittenen Stadium kommt es häufig zur Bildung einer sog. fibrösen Kappe, die den Lipidkern und das nekrotische Gewebe umschließt. Nekrotische Lipidkerne entstehen als Folge der vermehrten Apoptose und Nekrose sowie proteolytischen Aktivität und weiterer Akkumulation von Lipiden. Schreitet die Erkrankung weiter fort, kann die Arterie ab einem gewissen Punkt die Läsion nicht mehr durch Dilatation kompensieren und es kommt zur Einengung des Gefäßlumens und somit zur Beeinträchtigung der Hämodynamik des Blutflusses. Während eine dicke fibröse Kappe als eine eher „stabile“ Plaque gilt, ist eine instabile und vulnerable Plaque anfälliger für eine Plaqueruptur und tritt vor allem in Bereichen mit einer dünnen fibrösen Kappe auf. An den Veränderungen der fibrösen Kappe sind Degradierungsprozesse der Extrazellulärmatrix, aufgrund der Freisetzung von Metalloproteasen und andere proteolytische Enzyme durch aktivierte Makrophagen, beteiligt. Kommt es zu einer Plaqueruptur werden aufgrund des Kontakts des Plaqueinhalts mit dem Blut koagulatorische Prozesse in Gang gesetzt. Verschließt der dabei gebildete Thrombus das Gefäß, kann dies, je nachdem welches Gefäß betroffen ist, akute kardiovaskuläre Ereignisse wie Herzinfarkt, Schlaganfall oder bei Ablösung des Thrombus eine Embolie zur Folge haben (zur Übersicht siehe [128, 131, 132]).

1.3.3 Restenose und Neointimabildung

Als Restenose wird eine erneute Einengung einer mittels Ballonangioplastie (mit und ohne Stent-Implantation) bereits erfolgreich behandelten Gefäßstenose bezeichnet, die im schlimmsten Fall zu einem erneuten Gefäßverschluss und der Notwendigkeit einer Revaskularisierung führen kann. In einer klinischen Studie mit 6.186 Patienten konnte gezeigt werden, dass Übergewicht nach koronarer Stent-Implantation mit einer höheren Wahrscheinlichkeit einer Restenose assoziiert war [133]. Trotz der Weiterentwicklung Medikamenten-freisetzender Stents, welche die Wahrscheinlichkeit einer Restenose reduzieren, sind diese aufgrund nicht vollständig re-endothelialisierter Bereiche mit einem höheren Risiko einer späten Stent-Thrombose verbunden. Angioplastische Eingriffe mit und ohne Stent-Implantation initiieren Gefäßwandveränderungen, die über die folgenden postulierten Mechanismen, in der Bildung einer sogenannten Neointima oder wiederkehrenden Verdickung der Intima und der Media resultieren können. Inflammatorische Zytokine und Wachstumsfaktoren, die in Folge der Gefäßwandschädigung von lokal aktivierten Endothelzellen, aktivierten Blutplättchen und zirkulierenden inflammatorischen Zellen (wie Makrophagen und T-Zellen) freigesetzt werden, stimulieren die Proliferation und Migration glatter Muskelzellen aus der Media entlang der *Membrana elastica interna* in die Intima. Die lokale Produktion von Wachstumsfaktoren begünstigt die Differenzierung

subendothelialer glatter Muskelzellen in einen synthetischen Phänotyp, der durch eine vermehrte Proliferation und Produktion extrazellulärer Matrixproteine charakterisiert ist und damit zur weiteren Vergrößerung der Läsion beiträgt. Letztlich resultieren diese Prozesse in einer sukzessiven Verdickung der Intima im Bereich der Läsion, was eine Lumeneinengung und Beeinträchtigung der Hämodynamik des Blutflusses zur Folge hat. Auch in der Adventitia der verletzten Gefäßwand lokalisierte Fibroblasten/ Myofibroblasten und Vorläuferzellen sind an der Neointimabildung beteiligt. Dabei spielt unter anderem die Transdifferenzierung zu glatten Muskelzell-ähnlichen Zellen und deren Migration in die Intima eine Rolle. Neben den Zellen der Gefäßwand sind auch zirkulierende vaskuläre Vorläuferzellen beteiligt, die zur Differenzierung sowohl in einen endothelialen als auch glatten Muskelzell Phänotyp in der Lage sind. Die Freisetzung von Zytokinen und das inflammatorische Milieu im Läsionsbereich stimulieren den Influx zirkulierender Vorläuferzellen, die über direkte zelluläre Effekte, Bildung extrazellulärer Matrix und über parakrine Effekte zur Neointimabildung beitragen [134].

Im experimentellen Tiermodell existieren zahlreiche Gefäßverletzungsmodelle unter Verwendung unterschiedlicher Techniken [135]. Häufig erfolgt eine arterielle Gefäßverletzung mit folgender Neointimabildung an der relativ leicht zugänglichen *Arteria carotis communis* oder *Arteria femoralis*, welche unter Anwendung von mechanischen (z.B. Ballonkatheter, Ligatur) oder chemischen (wie Eisen(III)-chlorid) Interventionen zur Gefäßwandverletzung induziert wird [136-139].

1.3.4 Rolle des Fettgewebes in der Pathogenese der Atherosklerose

Das Fettgewebe ist nicht nur ein passives Energiespeicherorgan in Form von Triglyzeriden, sondern auch ein aktives endokrines und parakrines Organ. Die zahlreichen, direkt von den Adipozyten, aber auch von Makrophagen des Fettgewebes, produzierten und sezernierten inflammatorischen Zytokine und Hormone (u.a. Leptin, TNF α , IL-6) werden dafür verantwortlich gemacht, eine lokale oder systemische niedriggradige Inflammation zu induzieren und somit entzündliche Prozesse in der Gefäßwand zu fördern, die zur Pathogenese der verschiedenen Stadien der Atherosklerose beitragen können (siehe Abb. 1-9) [140, 141].

Wie in Abschnitt 1.1.3 bereits erwähnt, konnten in epikardialen und abdominalen Fettgewebeproben von KHK-Patienten, die sich einer Bypass-Operation unterziehen mussten, im Vergleich zur Kontrollgruppe, die aufgrund einer nicht-KHK-bedingten Erkrankung am Herzen operiert wurde, in beiden Fettdepots erhöhte Spiegel inflammatorischer Zytokine wie TNF α und IL-6 und des Adipokins Leptin nachgewiesen werden. Dabei waren im abdominalen Fettgewebe insgesamt höhere Spiegel im Vergleich zum epikardialen Fettgewebe zu verzeichnen. Im Gegensatz dazu waren die Spiegel des mit protektiven

kardiovaskulären Effekten assoziierten Adiponektins in beiden Fettdepots der KHK-Patienten signifikant reduziert und wiesen die niedrigsten Spiegel im abdominalen Fettgewebe auf [34]. Des Weiteren konnte in kardialen (im Bereich der Aortenwurzel und Koronararterien) perivaskulären Fettgewebsproben von Patienten, die sich einer Koronararterienbypass-Operation unterziehen mussten, im Vergleich zum perivaskulären Fettgewebe um die *Arteria mammaria interna*, ein gegenüber artherosklerotischen Veränderungen besonders resistentes Gefäß, eine von den Serum-Leptinspiegeln unabhängige erhöhte Leptin-Proteinexpression sowie Inflammation und Fibrose nachgewiesen werden [142]. In einer Untersuchung der eigenen Arbeitsgruppe wurden im viszeralen Fettgewebe (*visceral adipose tissue*; VAT) und perivaskulären Fettgewebe von mit einer Hochfettdiät gefütterten übergewichtigen Mäusen auf RNA- und Protein-Ebene signifikant erhöhte Leptin-Expressionen im Vergleich zu den normalgewichtigen Kontrollen nachgewiesen. Wurde immundefizienten *nu/nu (nude)*-Mäusen nach Induzierung einer chemischen Gefäßwandverletzung der *Arteria carotis* (mittels Eisen(III)-chlorid) das VAT übergewichtiger Mäuse perivaskulär im Läsionsbereich transplantiert, zeigten diese im Vergleich zur Transplantation des VAT der normalgewichtigen Kontrollen eine signifikante Zunahme der Neointimabildung. Die fehlende erhöhte Neointimabildung nach perivaskulärer Transplantation von VAT Leptindefizienter *ob/ob*-Mäuse verdeutlicht die kausale Bedeutung von Leptin auf die Entstehung einer Neointima-Hyperplasie. Auf der anderen Seite resultierte die perivaskuläre Transplantation des VAT von mit einer Hochfettdiät gefütterten *ob/ob*-Mäusen, welche durch eine Akkumulation von inflammatorischen Zellen charakterisiert war, in einer Neointima-Hyperplasie auch in Abwesenheit von Leptin, was neben Leptin auch die Rolle von anderen perivaskulären Faktoren, wie beispielsweise Immunzellen, auf die Neointimabildung bei Vorliegen von extremem Übergewicht unterstreicht [143].

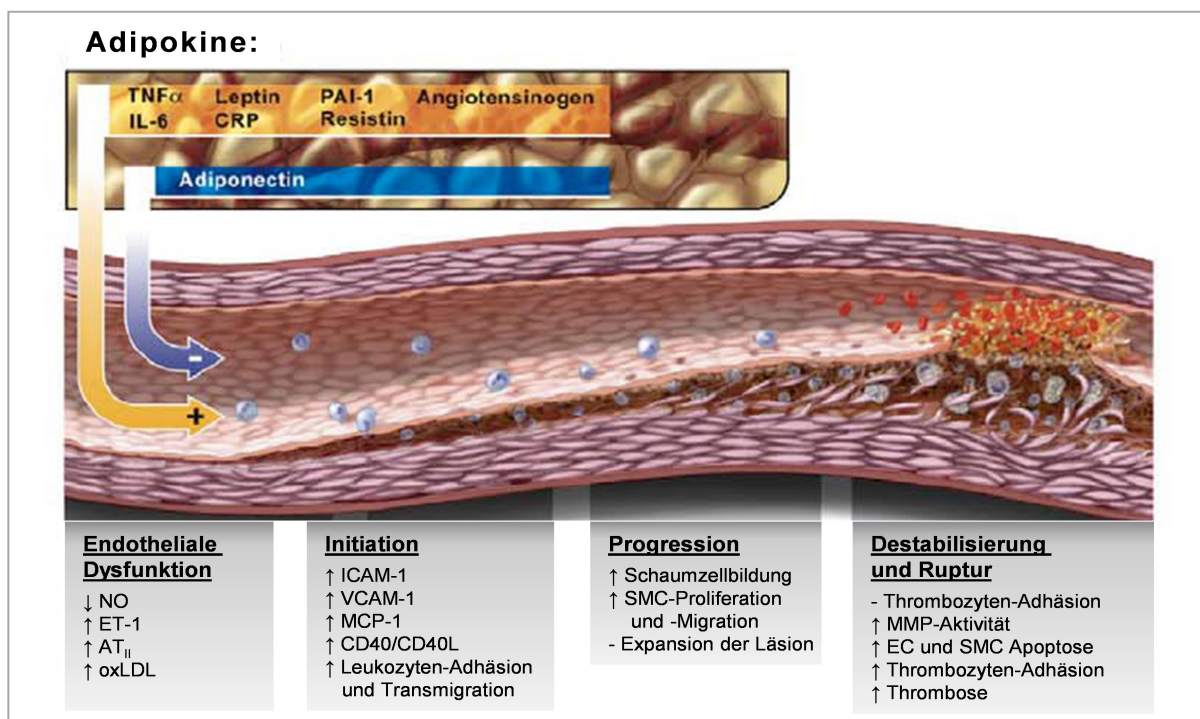


Abbildung 1-9: Rolle des Fettgewebes in der Pathogenese der Atherosklerose. *Abkürzungen:* TNF α , Tumornekrosefaktor- α ; IL-6, Interleukin-6; CRP, C-reaktives Protein; PAI-1, Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1; NO, *nitric oxide* (Stickstoffmonoxid); ET-1, Endothelin-1; AT_{II}, Angiotensin II; oxLDL, oxidiertes LDL-Cholesterin; ICAM-1, *intercellular adhesion molecule-1*; VCAM-1, *vascular cell adhesion molecule-1*; MCP-1, *monocyte chemoattractant protein-1*; CD, *cluster of differentiation*; MMP, Matrix-Metalloproteasen; EC, *endothelial cells* (Endothelzellen); SMC, *smooth muscle cells* (glatte Muskelzellen) (modifiziert nach [140]).

1.4 Vaskuläre Effekte von Leptin

1.4.1 Expression und Funktion von Leptin-Rezeptoren auf vaskulären Zellen

Leptin-Rezeptoren werden auf vielen verschiedenen Zelltypen, darunter auch auf vaskulären Zellen wie den Endothelzellen und glatten Muskelzellen, aber auch auf an der Pathogenese der Atherosklerose beteiligten Monozyten/ Makrophagen exprimiert. Histologische Untersuchungen muriner und humaner Arterien konnten zeigen, dass Leptin-Rezeptoren in allen Schichten (Intima, Media, Adventitia) einer normalen Gefäßwand exprimiert werden. Des Weiteren konnten Leptin-Rezeptoren sowohl in der Neointima und Media nach chemischer (Eisen(III)-chlorid) oder mechanischer (Ballondilatation ohne und mit Stent-Implantation) Gefäßverletzung im Maus- bzw. Schweinmodell als auch in unterschiedlichen Stadien (früh, fortgeschritten, kompliziert) humaner atherosklerotischer Läsionen nachgewiesen werden. In humanen atherosklerotischen Läsionen waren Leptin-Rezeptoren vor allem auf Endothelzellen, Monozyten/ Makrophagen, subendothelialen glatten Muskelzellen und in einem geringeren Ausmaß auf glatten Muskelzellen innerhalb der Media lokalisiert [96, 144].

In vitro Experimente konnten in kultivierten humanen und murinen aortalen glatten Muskelzellen zeigen, dass Leptin (dosisabhängig) die Proliferation und Migration von glatten Muskelzellen fördert, was ein kritisches Ereignis in der vaskulären Wundheilung darstellt [145-147]. Die Rolle des Leptin-Rezeptors auf Endothelzellen für die vaskuläre Wundheilung und Neointimabildung ist noch unklar. *In vitro* Untersuchungen zeigten, dass Leptin die Akkumulation reaktiver Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) fördert und zu einer vermehrten Expression des an der Rekrutierung von Monozyten/ Makrophagen beteiligten Zytokins MCP-1 (*monocyte chemoattachment protein-1*) führt [148, 149]. Auch in einer klinischen Studie fand sich eine signifikante Assoziation zwischen einer Hyperleptinämie und einer systemischen niedriggradigen Inflammation bei übergewichtigen Probanden [117], aber auch in gesunden Probanden konnte eine unabhängige Assoziation zwischen Leptin und den CRP-Spiegeln aufgezeigt werden [150]. So könnten der chronisch oxidative Stress im Endothel und eine inflammatorische Umgebung bei einer Hyperleptinämie zur Aktivierung und Progression atherogener Prozesse beitragen. Andererseits hat Leptin auch mögliche positive Effekte auf das Endothel. So vermittelte Leptin *in vitro* und *in vivo* die Angiogenese und Neovaskularisierung [151-153]. Die Wiederherstellung der vaskulären Integrität und die Freisetzung von hemmenden Faktoren auf die Proliferation und Migration glatter Muskelzellen stellen wichtige Mechanismen in der Begrenzung der Restenose nach vaskulärer Verletzung dar. In diesem Zusammenhang konnten Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe zeigen, dass die intravenöse Gabe fluoreszenz-markierter humaner endothelialer Vorläuferzellen (*endothelial progenitor cells*; EPCs), nach vorheriger Stimulation mit physiologischen Leptin-Konzentrationen in der Maus, die Rekrutierung der EPCs in frische Thromben der *Arteria Carotis* nach vaskulärer Verletzung fördert. Dies ging auch mit einer vermehrten Re-Endothelialisierung und reduzierten Neointimabildung einher [154]. Auf der anderen Seite wiesen von übergewichtigen Probanden isolierte EPCs *in vitro* reduzierte adhäsive, migratorische und angiogene Eigenschaften auf. Diese beeinträchtigte Responsivität konnte nach Gewichtsabnahme wiederhergestellt werden [152, 155]. Des Weiteren fördert Leptin sowohl *in vitro* als auch *ex vivo* in isolierten Aortenringen der Ratte die Freisetzung des vasorelaxierenden NO über eine vermehrte eNOS-Phosphorylierung [156], während Übergewicht im Mausmodell mit einer für eine endotheliale Dysfunktion charakteristischen reduzierten NO-Bioverfügbarkeit assoziiert ist [157]. Andererseits konnte *in vitro* eine Leptin-vermittelte Induktion des Vasokonstriktors Endothelin-1 (ET-1) unter Beteiligung des Transkriptionsfaktors AP-1 (Aktivator-Protein-1) gezeigt werden [158]. Auch in einer klinischen Studie konnte gezeigt werden, dass Leptin die ET-1 und NO-Aktivität in der Zirkulation schlanker Probanden fördert, hyperleptinämische Patienten mit metabolischem Syndrom jedoch eine Resistenz gegenüber den Leptin-Effekten aufwiesen. So bewahrt Leptin unter physiologischen Bedingungen das physiologische Gleichgewicht

zwischen den gegensätzlichen ET-1- und NO-vermittelten Effekten und ist somit am Erhalt der vaskulären Homöostase beteiligt, während diese unter pathophysiologischen Bedingungen wie Übergewicht und dem metabolischen Syndrom beeinträchtigt ist. Die fehlenden vaskulären Effekte gegenüber Leptin bei einer chronischen Hyperleptinämie könnten einen möglichen Marker für eine endotheliale Dysfunktion darstellen [159].

1.4.2 Rolle von Leptin für die vaskuläre Wundheilung

Mehrere Untersuchungen im Mausmodell haben gezeigt, dass systemisch und lokal erhöhte Leptinspiegel die Neointimabildung nach vaskulärer Gefäßverletzung fördern [96, 136, 143, 147] sowie proatherogene Wirkungen in atherosklerotischen Apolipoprotein E-defizienten Mäusen haben [160]. So konnten Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe im Mausmodell zeigen, dass Leptin (tägliche intraperitoneale Injektion über drei Wochen) die Neointimabildung in C57BL/6J Wildtyp Mäusen fördert. Die zusätzliche Gabe einer Hochfettdiät verstärkte sowohl in der Kontroll- als auch in der Leptin-Gruppe die Neointimabildung. Des Weiteren waren Leptin-defiziente *ob/ob*-Mäuse sowohl unter Normalfutter als auch unter einer Hochfettdiät vor der Entwicklung einer Neointima-Hyperplasie geschützt, während die tägliche Leptin-Injektion diese signifikant verstärkte. Im Gegensatz dazu waren LepR-defiziente *db/db*-Mäuse mit und ohne Verabreichung von Leptin trotz Übergewicht und weiteren mit Übergewicht assoziierten metabolischen Störungen vor der Bildung einer Neointima-Hyperplasie geschützt. Diese Befunde in *db/db*-Mäusen bestätigen eine spezifische LepR-vermittelte Wirkung von Leptin auf die vaskuläre Wundheilung [96]. Darüber hinaus lieferte ein weiteres Mausmodell der eigenen Arbeitsgruppe auch Hinweise auf lokale Leptin-Effekte. So resultierte die perivaskuläre adenoviral-vermittelte Überexpression von Leptin in einer signifikant erhöhten Neointimabildung unabhängig von Übergewicht und erhöhten zirkulierenden Leptinspiegeln [143].

Hinweise auf eine Beteiligung von Leptin an der vaskulären Wundheilung und Pathogenese der Atherosklerose liefern auch klinische Untersuchungen. So wiesen Plaques (Endatherektomie Präparate der *Arteria Carotis* mit hochgradiger Gefäßstenose) symptomatischer Patienten (mit vorangegangener transitorischer ischämischer Attacke oder Schlaganfall) im Vergleich zu asymptomatischen Patienten eine signifikant erhöhte Expression des Leptin-Rezeptors auf, welche mit einer Akkumulation inflammatorischer Makrophagen korrelierte [161]. Darüber hinaus war die vermehrte lokale Expression von Leptin in Makrophagen und glatten Muskelzellen in atherosklerotischen Plaques der *Arteria Carotis* mit der Progression einer instabilen Läsion assoziiert, unabhängig von den systemischen Leptinspiegeln und dem BMI [162].

1.5 Fragestellung und Ziel der Arbeit

Übergewicht ist assoziiert mit erhöhten zirkulierenden Spiegeln des Adipokins Leptin, das vor allem bei der Regulation der Nahrungsaufnahme und der Energiehomöostase über Leptin-Rezeptor-vermittelte Signalwege in hypothalamischen Neuronen innerhalb des zentralen Nervensystems eine wichtige Rolle spielt. Darüber hinaus wird der Leptin-Rezeptor auch auf zahlreichen peripheren Zellen exprimiert, darunter auch auf vaskulären Zellen wie Endothelzellen und glatten Muskelzellen. *In vitro* Untersuchungen konnten zeigen, dass Leptin sowohl Effekte auf die Endothelzell-Funktion vermittelt als auch die Proliferation und Migration von glatten Muskelzellen fördert. *In vivo* konnte im Mausmodell gezeigt werden, dass Leptin die Neointimabildung nach vaskulärer Gefäßverletzung fördert, wohingegen Leptin-defiziente *ob/ob*-Mäuse oder Leptin-Rezeptor-defiziente *db/db*-Mäuse vor einer Neointima-Hyperplasie geschützt waren. In klinischen Studien wiesen Endatherektomie Präparate der *Arteria Carotis* mit hochgradiger Gefäßstenose symptomatischer Patienten eine signifikant erhöhte Leptin-Rezeptor-Expression auf, und die vermehrte lokale Leptin-Expression in atherosklerotischen Plaques der *Arteria Carotis* war unabhängig von den systemischen Leptinspiegeln mit der Progression einer instabilen Läsion assoziiert. Über welche Zellen die proatherogenen Effekte von Leptin primär vermittelt werden, ist jedoch unklar. Für das gleichzeitige Auftreten von Übergewicht und erhöhten zirkulierenden Leptinspiegeln wird eine hypothalamische Resistenz gegenüber den gewichtsreduzierenden Effekten des Hormons als Ursache für diesen widersprüchlichen Befund verantwortlich gemacht. Während die sogenannte „zentrale Leptin-Resistenz“ bereits gut untersucht ist, ist noch unklar, inwiefern auch eine Zell-spezifische Leptin-Resistenz auf peripheren Zellen existiert. Vor diesem Hintergrund war es das Ziel der vorliegenden Arbeit, die unterschiedliche Rolle des Endothelzell- und glatten Muskelzell-vermittelten Leptin-Rezeptor-Signalwegs auf die vaskuläre Wundheilung zu untersuchen und abzugrenzen, inwieweit die gefäßschädigenden Effekte bei Übergewicht aufgrund der Hyperleptinämie oder einer vaskulären Resistenz gegenüber den protektiven Effekten von Leptin vermittelt werden. Zur Klärung dieser Fragestellungen wurden die folgenden *in vivo*, *ex vivo* und *in vitro* Untersuchungen durchgeführt:

- Mit Hilfe von Mausmodellen mit (Tamoxifen) induzierbarer Endothelzell- und glatte Muskelzell-spezifischer Deletion des Leptin-Rezeptors (LepR) wurden die Zell-spezifischen Wirkungen auf die Neointimabildung, Gefäßstenose, Media und Gesamtgefäßgröße drei Wochen nach vaskulärer Verletzung der *Arteria Carotis* unter Verwendung des Eisen(III)-chlorid-Modells morphometrisch quantifiziert.

- Zur Untersuchung der Rolle von Übergewicht und einer systemischen Hyperleptinämie auf den vaskulären Umbauprozess erhielt ein Teil der Mäuse eine Hochfettdiät vier Wochen präoperativ bis zur Gewebeentnahme drei Wochen postoperativ.
- Die erfolgreiche Rekombination und Effizienz der Deletion des Leptin-Rezeptors wurde mittels Genotypisierung, Immunfluoreszenz und mRNA-Analyse qualitativ und quantitativ nachgewiesen sowie die fehlende Leptin-Rezeptor-vermittelte Signaltransduktion in primären murinen pulmonalen Endothelzellen (mPECs) Endothelzell-spezifischer Leptin-Rezeptor-defizienter (End.LepR-KO) Mäuse auch auf funktioneller Ebene bestätigt.
- Zur Untersuchung möglicher metabolischer Auswirkungen der spezifischen LepR-Deletion auf Endothelzellen und glatte Muskelzellen unter Normalgewicht und nach Induzierung von Übergewicht wurden das Körpergewicht (bei OP und Gewebeentnahme) und das Gewicht des viszeralen Fettgewebes aufgezeichnet. Die Glukose-, Cholesterin- und Triglyzerid-Spiegel sowie das Vorliegen einer Hyperleptinämie und die zirkulierenden Spiegel von freiem ungebundenem Leptin wurden im Serum zum Zeitpunkt der Gewebeentnahme bestimmt.
- Zur Klärung der morphometrischen Befunde der Endothelzell-spezifischen Leptin-Rezeptor-Deletion nach vaskulärer Gefäßverletzung wurde die Zellularität und Zusammensetzung (proliferierende Zellen, glatte Muskelzellen, inflammatorische Zellen) der vaskulären Läsion immunhistologisch näher untersucht.
- Das Vorliegen einer möglichen endothelialen Leptin-Resistenz bei Übergewicht wurde in mPECs normal- und übergewichtiger Mäuse ohne und nach Leptin-Stimulation untersucht, wobei die STAT3-Phosphorylierung und die Expression gegenregulatorischer Moleküle (SOCS3, PTP1B) als *Readout* diente.
- Zur Klärung möglicher zugrundeliegender Mechanismen wurden funktionelle Untersuchungen (Migrations- und Proliferations-Analyse von mPECs und primären aortalen glatten Muskelzellen) sowie Expressions-Analysen möglicher parakriner Mediatoren (glatter Muskelzell-Mitogene) in mPECs von normalgewichtigen End.LepR-WT und End.LepR-KO bzw. übergewichtigen End.LepR-WT Mäusen durchgeführt.
- Potentielle parakrine Kandidaten wurden in Zellkulturüberständen von mPECs, welche von End.LepR-WT und -KO Mäusen isoliert wurden, sowie in unverletzten Carotisarterien und vaskulären Läsionen von normalgewichtigen und übergewichtigen End.LepR-WT und -KO Mäusen näher untersucht.

- Zur Verifizierung der Befunde wurden Ko-Inkubations- und Antagonisierungs-Experimente von murinen aortalen glatten Muskelzellen (MOVAS) mit den Zellkulturüberständen LepR-defizienter mPECs durchgeführt.
- Die Untersuchung der potentiellen mechanistischen Zusammenhänge erfolgte in mPECs von LepR-defizienten Mäusen und humanen umbilikalen venösen Endothelzellen (HUVECs).

2. Material

2.1 Geräte

Gerät	Firma
Absaugsystem <i>VACUSAFE</i>	INTEGRA Biosciences AG, Zizers, CH
Autoklav	Webeco GmbH matachana group, Selmsdorf
Blutdruckmesssystem <i>CODA™ Monitor</i> , nicht-invasiv für Mäuse und Ratten	Kent Scientific Corporation, Torrington, CT, USA
Brenner <i>Olympus U-RFL-T</i>	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg
Chemilumineszenz-System <i>Intas ChemiLux Imager CSX-1400M</i>	Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen
Eismaschine <i>AF 100</i>	Scotsman Ice Systems, Mailand, I
Elektrophorese- und Blotting-Apparatur <i>Mini-PROTEAN® Tetra Cell and Mini Trans-Blot® Module</i> (Tank, Deckel mit Anschluss, Elektrophorese-Glasplattenhalter, Blotting-Gelkassettenhalter mit Kassetten, Schwämme, Kühlelement)	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA
Elektrophorese System <i>Sub-Cell® GT</i> (mit Gelgießvorrichtung, Gelschalen, Wasserwaage rund, 20-Well Kämme)	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA
Feinwaage <i>MC1 Analytic AC 210 S</i>	Sartorius, Göttingen
Folienschweißgerät	Carl Roth® GmbH + Co, Karlsruhe
Gelgieß-Apparatur <i>Mini-PROTEAN® Tetra Cell</i> (Gelgießstand, Glasplattenhalter, Dichtung, Glasplatten mit 1,0 mm Spacer, Glasplatten kurz, 10-Well Kämme)	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA
Homogenisierer <i>MICCRA D-1</i> mit Dispergierwerkzeug für Kleinmengen	MICCRA GmbH, Müllheim
Infrarotlampe	Beurer GmbH, Ulm
Inkubator <i>New Brunswick™ Galaxy® 170 S</i>	Eppendorf AG, Hamburg
Kaltlichtquelle <i>KL 1500 compact</i> (Gewebeentnahme)	Schott AG, Mainz
Kaltlichtquelle <i>High lighter 3100</i> (Maus-OP)	Olympus Europe, Hamburg
Kamera <i>MicroPublisher 5.0 RTV</i>	QImaging, Surrey, BC, CA
Kamera <i>Moticam 5</i>	Motic Deutschland GmbH, Wetzlar
Konfokalmikroskop <i>Zeiss LSM 710</i>	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena
Kryostat <i>Leica CM3050 S</i>	Leica Biosystems GmbH, Wetzlar
Kühl-und Gefrierschränke	Liebherr-International AG, Bulle, CH
Lupenlampe varioLEDflex	Fine Science Tools®, Heidelberg
Magnetheizrührer <i>VMS - C7</i>	VWR international, Radnor, PA, USA

Magnetrührer <i>IKA® C-Mag MS 7</i>	IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Magnetrührer <i>VS - C4</i>	VWR international, Radnor, PA, USA
Mikroskop <i>Motic AE31</i> (mikroskop. Kontr.)	Motic Deutschland GmbH, Wetzlar
Mikroskop <i>Motic BA210E</i> (Zellkultur)	Motic Deutschland GmbH, Wetzlar
Mikroskop <i>Olympus BH2</i> (mikroskop. Kontr.)	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg
Mikroskop <i>Olympus BX51</i> (Histologie)	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg
Mikrotom <i>Leica RM2245</i>	Leica Biosystems GmbH, Wetzlar
Mikrowelle (Histologie)	Sharp K.K., Osaka, Japan
Mikrowelle (Agarosegele)	Severin Elektrogeräte GmbH, Sundern
Monochromator für Mikrotiterplatten <i>Infinite® 200 PRO NanoQuant</i>	Tecan Group Ltd., Männedorf, CH
Multi-Rotator <i>PTR-35</i>	Grant Instruments, Cambridgeshire, UK
Paraffinausgießstation <i>Leica EG 1150 H</i> mit Kühlplatte <i>EG 1150 C</i>	Leica Biosystems GmbH, Wetzlar
pH-Meter <i>pH 1000 L</i>	VWR international, Radnor, PA, USA
Photometer <i>BioPhotometer®</i>	Eppendorf AG, Hamburg
Real-Time PCR System <i>StepOnePlus™</i>	AppliedBiosystems® by Llife Technologies™, Carlsberg, Kalifornien, USA
Schwenktisch (<i>Duomax 1030; Polymax 1040; Titramax 1000</i>)	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach
Stereomikroskop <i>SZ40</i> (Maus-OP)	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg
Stereomikroskop <i>VisiScope® SZB 350 OH</i> (Gewebeentnahme)	VWR international, Radnor, PA, USA
Sterilwerkbank Heraeus <i>HeraSafe KS 15</i>	Thermo Electron LED GmbH (Thermo Fisher Scientific Inc.), Langenselbold
Stickstofftank <i>Locator JR</i>	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
Streckbadkombination	MEDAX GmbH & Co.KG, Neumünster
Stromquelle <i>PowerPac™ Power Supply</i> - <i>Basic</i> (Elektrophorese) - <i>HC High-Current</i> (Western Blot-Transfer)	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA
Thermoblock <i>ThermoStat plus</i>	Eppendorf AG, Hamburg
Thermocycler <i>Mastercycler® nexus gradient</i>	Eppendorf AG, Hamburg
Thermomixer <i>ThermoMixer C</i>	Eppendorf AG, Hamburg
Trockenschrank <i>DRY-Line®</i>	VWR international, Radnor, PA, USA
Ultratiefkühlschrank <i>New Brunswick™</i> <i>Innova® U725-G</i>	Eppendorf AG, Hamburg
UV-Geldokumentationskammer	Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen
Vortexmischer <i>Vortex-Genie® 2</i>	Scientific Industries, Inc., New York, USA
Waage <i>MC1 Laboratory LC 2200 P</i>	Sartorius, Göttingen

Wärmeschrank <i>Heratherm</i> [®]	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Wärmeplatte (Maus-OP)	Vogel GmbH & Co KG, Fernwald
Wärmeplatte <i>Hot Plate 062</i> mit Regler (Gewebeentnahme)	Labotect GmbH Labor-Technik-Göttingen, Rosdorf
Wasseraufbereitungsanlage <i>PURELAB Ultra</i>	Elga LabWater by Veolia Water Technologies, Celle
Wasserbad	GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel
Zentrifuge <i>5424 R</i>	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge mit Ausschwingrotor <i>5810 R</i>	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge <i>FastGene Mini</i>	Nippon Genetics Europe GmbH, Düren
Zentrifuge <i>miniSpin</i>	Eppendorf, Hamburg

2.2 Software

Programm	Firma
AlphaEaseFC 4.0	Alpha Innotech, San Leandro, CA, USA
GraphPad Prism 6.03	GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA
Image-Pro Plus 7.0	Media Cybernetics, Inc., Rockville, MD, USA
ImageJ 1.46r	Wayne Rasband
Intas GDS Version 3.34	Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen
Magellan [™] -Data Analysis Software 7.1 SP1	Tecan Group Ltd., Männedorf, CH
StepOne Software v.2.3	AppliedBiosystems [®] by Life Technologies [™] , Carlsberg, CA, USA

2.3 Zubehör und Hilfsmittel

Artikel	Firma
Abwurfbehälter <i>Sharpsafe</i> [®]	P.J. Dahlhausen & Co. GmbH, Köln
Bechergläser <i>DURAN</i> [®] (600 ml; 250 ml; 100 ml)	DURAN Produktions GmbH & Co. KG, Mainz
Behälter für Reagenzentnahme mit Mehrkanalsystemen	Eppendorf AG, Hamburg
Chemikalienlöffel, doppelseitig	Carl Roth [®] GmbH + Co, Karlsruhe
Dispenser <i>Eppendorf Varispenser</i> [®]	Eppendorf AG, Hamburg
Dopplerschall-Kopf <i>Transonic</i> [®] <i>Flowprobe</i>	Transonic Systems Inc., Ithaca, NY, USA
Einzelständer für 50 ml-Zentrifugenröhrchen	Carl Roth [®] GmbH + Co, Karlsruhe
Eiswannen <i>Magic Touch 2</i> [™]	Bel-Art Products, Wayne, NJ, USA

Färbeeinsatz mit Drahtbügel	VWR international, Radnor, PA, USA
Färbeglasküvetten mit Deckel	VWR international, Radnor, PA, USA
Färbekästen nach Hellendahl mit Deckel	VWR international, Radnor, PA, USA
Federschere, Vannas-Tübingen (8,5 cm; gerade; Art.Nr. 15003-08)	Fine Science Tools [®] , Heidelberg
Gläser mit Schraubdeckel (20 ml)	VWR international, Radnor, PA, USA
Haltehebel (aus Korkpinn und Büroklammer)	Schreibwarenbedarf
Hitze- und Kälteschutz	VWR international, Radnor, PA, USA
ImmEdge Hydrophobic Barrier PAP Pen	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
Inkubationsschalen für Immunhistologie	Rosti Mepal (Mepal BV), Lochem, NL
Inkubationsschalen für Western Blot, MINI (16 x 115 mm), MIDI (90 x 90 mm)	Carl Roth [®] GmbH + Co, Karlsruhe
Kanister mit Ablasshahn <i>Nalgene</i> [®]	VWR international, Radnor, PA, USA
Kryo-Einfriergefäß für Zellen <i>Nalgene</i> [®]	VWR international, Radnor, PA, USA
Kühlakku für PCR-Gefäße <i>PCR-Cooler</i>	Eppendorf AG, Hamburg
Laborflaschen <i>DURAN</i> [®] mit PP-Schraub- kappe (1000 ml; 500 ml; 250 ml; 100 ml)	DURAN Produktions GmbH & Co. KG, Mainz
Laborflasche, Braunglas, vierkant	Carl Roth [®] GmbH + Co, Karlsruhe
Magnetührstäbchen und -Entferner	VWR international, Radnor, PA, USA
Messzylinder <i>Kartell</i> [®] (2000 ml; 1000 ml; 500 ml; 100 ml)	VWR international, Radnor, PA, USA
Mikrotomklingen <i>Leica DB80 LS</i>	Leica Biosystems GmbH, Nussloch
Mikrovolumen-Messzelle <i>Eppendorf</i> <i>μCuvette</i> [®] G1.0	Eppendorf AG, Hamburg
Mikrowellenbehälter mit Deckel <i>Clip Pac</i> [®]	Picnic Plast Industrial Co.,Ltd., Bangkok, TH
Multikanal(12-Kanal)-Pipette <i>Eppendorf</i> <i>Research</i> [®] <i>plus</i> (30 - 300 μl)	Eppendorf AG, Hamburg
Multipipette [®] <i>Eppendorf M4</i>	Eppendorf AG, Hamburg
Nadelhalter, Mayo-Hegar (16 cm; gerade)	Megro, Wesel
Objektträger-Boxen	Heathrow Scientific, Vernon Hills, IL, USA
Objektträger-Mappen	VWR international, Radnor, PA, USA
Pinzette (10 cm, gezahnt); gerade (11150-10); gebogen (11151-10)	Fine Science Tools [®] , Heidelberg
Pinzetten, fein <i>Dumont #5/45</i> (11251-35)	Fine Science Tools [®] , Heidelberg
Pipette <i>Eppendorf Reference</i> [®] 2 (0,1 - 2,5 μl)	Eppendorf AG, Hamburg
Pipetten <i>Eppendorf Research</i> [®] <i>plus</i> (100 - 1000 μl; 10 - 100 μl; 0,5 - 10 μl)	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettenbüchse für Pasteurpipetten	GLW Storing Systems GmbH, Würzburg
Pipettierhilfe <i>Eppendorf Easypet</i> [®] 3	Eppendorf AG, Hamburg

Racks für Falcons (50 ml; 15 ml)	VWR international, Radnor, PA, USA
Racks für Reaktionsgefäße	VWR international, Radnor, PA, USA
Schere (8,5 cm; gerade, spitz; 14084-08)	Fine Science Tools®, Heidelberg
Spatel	Carl Roth® GmbH + Co, Karlsruhe
Stoppuhr	Hanhart GmbH, Gütenbach
Stoppuhr	TFA Dostmann GmbH & Co. KG, Wertheim
Spritzflasche <i>Nalgene</i> ®	VWR international, Radnor, PA, USA
Sprühflasche <i>BÜRKLE LaboPlast</i> ®	VWR international, Radnor, PA, USA
Thermometer	Ludwig Schneider GmbH & Co. KG, Wertheim
Trichter	VWR international, Radnor, PA, USA
Zählhilfe	Baumer IVO GmbH & Co. KG, Villingen-Schwenningen
Zählkammer Neubauer	LO - Laboroptik Ltd, Lancing, UK
Zylinderglas <i>DURAN</i> ® mit Knopfdeckel (1000 ml, Höhe 120 mm, Ø 120 mm)	DURAN Produktions GmbH & Co. KG, Mainz

2.4 Verbrauchsmaterialien

Artikel	Firma
Adhäsive qPCR Folie	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Aluminiumfolie Universal	VWR international, Radnor, PA, USA
Chirurgisches Nahtmaterial <i>Ethilon 6-0 Polyamid</i> (697H)	Ethicon, division of Johnson & Johnson Medical Limited, Livingston, SCO
Deckgläser (24 x 60 mm, #1)	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig
Deckgläser, rund, Borosilikatglas (Durchmesser 13 mm, #1)	VWR international, Radnor, PA, USA
Einbettkassetten, weiß <i>Bio-Net</i>	Engelbrecht Medizin- und Labortechnik GmbH, Edermünde
Entsorgungsbeutel, Polypropylen	Carl Roth® GmbH + Co, Karlsruhe
Filterpapier (MN 615 ¼; Ø 150 mm)	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren
Filterpapier <i>Whatman</i> ® No.1	Whatman® by GE Healthcare, Little Chalfont, UK
Fixierklebeband <i>TimeMed</i> ® <i>Labeling Systems</i>	VWR international, Radnor, PA, USA
Folienhalbschlauch	Carl Roth® GmbH + Co, Karlsruhe
Gefrierbehälter <i>Nalgene</i> ™	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Gel Blotting Paper <i>Whatman</i> ™ Grade GB005	GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK
Handschuhe <i>Supreno</i> ® Nitril	Microflex Corporation, Reno, RV, USA

Handschuhe <i>Vasco</i> [®] Nitril	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Handschuhe <i>Sempercare</i> [®] Latex	Semperit AG, Wien, A
Insulinspritzen <i>Omnican</i> [®] U-40 Insulin (30G x 1/2")	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Kanülen <i>Microlance</i> [™] 3 (20G x 1½" – Nr.1 / 0,9 x 40 mm)	BD (Becton, Dickinson and Company), NJ, USA
Klarsichtfolie, glasklar <i>herlitz</i>	Pelikan AG, Berlin
Klebepunkte, farbig, für 1,5 ml Röhrchen <i>VWR Cryo-Pro</i> [®] Labels	VWR international, Radnor, PA, USA
Kompressen <i>MaiMed</i> [®]	MaiMed GmbH, Neuenkirchen
Korkplatten (zugeschnitten ca. 8 x 10 cm)	Baumarkt
Kosmetiktücher	WEPA Professional GmbH, Arnsberg
Kryoeinbettformen <i>Tissue-Tek</i> [®] <i>Cryomold</i> [®] (10 x 10 x 5 mm)	Sakura Finetek Europe B.V., Alphen am Rhein, Niederlande
Kryoröhrchen <i>CryoTube</i> [™] Vials	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Medizinisches Kunstseidenpflaster (2,5 cm x 9,1 m)	3M [™] Durapore [™] , St. Paul, MN, USA
Mikrotiterplatte mit Deckel, transparent <i>Nunc</i> [™] <i>MicroWell</i> [™] F 96-Well	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Mikrotiterplatte <i>MicroAmp</i> [®] Fast Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode (0,1 ml)	AppliedBiosystems [®] by Life Technologies [™] , Carlsberg, CA, USA
Multipettenspitzen <i>Combitips advanced</i> [®] (5 ml)	Eppendorf AG, Hamburg
Nitrocellulose Blotting Membran Amersham [™] Protran [™] 0,45 µm NC	GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK
Objektträger <i>Superfrost Ultra Plus</i> [®] (J4800AMNZ)	Thermo Fisher Scientific Gerhard Menzel B.V. & Co. KG, Braunschweig
Paraffin <i>Surgipath</i> [®] <i>Paraplast</i> [®]	Leica Biosystems GmbH, Wetzlar
Parafilm [®]	Bemis Flexible Packaging, Neenah, WI, USA
Pasteurpipetten ohne Wattestopfen, steril (Kalksoda-Klarglas, Gesamtlänge 230 mm)	Carl Roth [®] GmbH + Co, Karlsruhe
Pasteurpipetten (Glas, 150 mm)	VWR international, Radnor, PA, USA
Perfusionsbesteck mit Flügeln <i>BD Valu-Set</i> [™] , (blau)	BD (Becton, Dickinson and Company), NJ, USA
Pipettenspitzen <i>TipOne</i> [®] (1000 µl <i>Blue Graduated</i> ; 200 µl <i>Yellow</i> ; 10 µl <i>XL Graduated</i>)	Starlab International GmbH, Hamburg
Pipettenspitzen mit Filter <i>TipOne</i> [®] (steril) (1000 µl; 300 µl <i>Graduated</i> ; 100 µl <i>Bevelled</i> ; 10/20 µl <i>XL Graduated</i>)	Starlab International GmbH, Hamburg
Pipettenspitzen mit Filter, Gel-Load	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Prozeßwischtücher <i>Kimtech</i>	Kimberly-Clark Corporation, Dallas, TX, USA

Reaktionsgefäße <i>Eppendorf Safe-Lock Tubes</i> farblos (5 ml; 2 ml; 1,5 ml; 0,5 ml)	Eppendorf AG, Hamburg
Reaktionsgefäße <i>PCR Soft Tubes</i> (0,2 ml; farblich gemischt)	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
Reaktionsgefäße PCR 8er-Strips (0,2 ml)	Brand GmbH + CO KG, Wertheim
Serologische Pipetten <i>CELLSTAR</i> [®] (10 ml; 25 ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Serologische Pipetten <i>CELLSTAR</i> [®] , steril, einzeln verpackt (10 ml; 25 ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Skalpell Nr. 11, Einweg, steril	VWR international, Radnor, PA, USA
Spritze <i>Discardit II</i> (5 ml)	BD (Becton, Dickinson and Company), New Jersey, USA
Spritzen <i>Omnifix</i> [®] -F (1 ml; 5 ml; 10 ml; 20 ml)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Spritzenfilter, 25 mm; 0,2 µm SFCA <i>Nalgene</i> [™]	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Stempel (von Injekt [®] , 2 ml)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Sterilisations-Klebeband (Dampf, Heißluft)	Carl Roth [®] GmbH + Co, Karlsruhe
Transferpipetten 5,8 ml (15,5 cm; 14,7 cm)	VWR international, Radnor, PA, USA
Transferpipetten (3,5 ml; 1 ml)	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Tücher, fusselfrei <i>VWR</i> [®] <i>Light-Duty Tissue Wipers</i>	VWR international, Radnor, PA, USA
Verschlusskappen mit Farbkodierung <i>Nunc</i> [™] <i>CryoTube</i> [™]	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Wägeschalen, Einweg <i>Rotilabo</i> [®] (330 ml)	Carl Roth [®] GmbH + Co, Karlsruhe
Wägeschiffchen, Einweg (5 ml; 25 ml; 100 ml)	VWR international, Radnor, PA, USA
Wattestäbchen (15 cm)	medical care & serve industry [®] , Willich
Zellkammer-Objektträger, 4-Well <i>Nunc</i> [™] <i>Chamber Lab-Tek</i> [®] <i>II Slide</i> [™]	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Zellkulturflasche, 25 cm ² <i>Nunc</i> [™] <i>EasYFlask</i> [™] <i>Nuclon</i> [™] <i>Delta Surface</i>	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Zellkulturschale (PS, 100/20 mm, steril)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zellkulturschale, 6-Well <i>Nunc</i> [™] - <i>Nuclon</i> [™] <i>Delta Surface</i>	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Zellschaber, 28 cm Grifflänge, steril	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zellsieb, 70 µm <i>Falcon</i> [®]	Corning Inc., Corning, NY, USA
Zellstoff Zickzack Handtücher	Basisbedarf Universitätsmedizin Göttingen / Mainz
Zentrifugenröhrchen, konisch (15 ml; 50 ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen

2.5 Chemikalien und Reagenzien

Chemikalie / Reagenz	Firma
AB (Antibody) Diluent	Dako North America, Inc., Carpinteria, CA, USA
Aceton, reinst	Carl Roth® GmbH + Co, Karlsruhe
Acrylamide Mix 30% <i>Rotiphorese® Gel 30</i>	Carl Roth® GmbH + Co, Karlsruhe
Agarose, Broad Range	Carl Roth® GmbH + Co, Karlsruhe
Albumin, Fraktion V - pH 5,2 (für die Proteinanalyse) - endotoxin-geprüft, <i>CELLPURE®</i>	Carl Roth® GmbH + Co, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat, für die Molekularbiologie	AppliChem GmbH, Darmstadt
Augensalbe <i>Bepanthen®</i>	Bayer AG, Leverkusen
Chloroform	Carl Roth® GmbH + Co, Karlsruhe
Citronensäure Monohydrat	Sigma-Aldrich® GmbH, Steinheim
D(+)-Saccharose	Carl Roth® GmbH + Co, Karlsruhe
DirectPCR® Lysis Reagent Tail (mouse); Cell	Peqlab by VWR Life Science Competence Center, Erlangen
Dimethylsulfoxid (für die Zellkultur)	AppliChem GmbH, Darmstadt
EDTA-Dinatriumsalz-Dihydrat, zur Analyse	AppliChem GmbH, Darmstadt
EDTA-Lösung, 0,5 M (100x)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
EDTA-Lösung, 0,5 M, pH 8,0 (für die Molekularbiologie)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Einbettmedium <i>Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound</i>	Sakura Finetek Europe B.V., Alphen am Rhein, NL
Eindeckmittel <i>Entellan®</i>	Merck KGaA, Darmstadt
Eindeckmittel <i>Fluorescence Mounting Medium</i>	Dako North America, Inc., Carpinteria, CA, USA
Eindeckmittel <i>Immu-Mount™</i>	Thermo Fisher Scientific™ Shandon™, Waltham, MA, USA
Eisen(III)-chloride-Hexahydrate	Sigma-Aldrich® GmbH, Steinheim
Ethanol absolut, für die Molekularbiologie	AppliChem GmbH, Darmstadt
Ethanol, ≥ 99,5%, reinst	Carl Roth® GmbH + Co, Karlsruhe
Ethanol vergällt ≥ 99,8%, mit ca. 1% MEK	Carl Roth® GmbH + Co, Karlsruhe
Ethanol vergällt 96%, mit ca. 1% MEK	Carl Roth® GmbH + Co, Karlsruhe
Ethanol vergällt 70%, mit ca. 1% MEK	Carl Roth® GmbH + Co, Karlsruhe
Gelatine-Lösung, Typ B, 2% in H ₂ O, für die Zellkultur, steril	Sigma-Aldrich® GmbH, Steinheim
Glycin ≥99%, Blotting-Grade	Carl Roth® GmbH + Co, Karlsruhe

Hämatoxylin	Sigma-Aldrich® GmbH, Steinheim
Hämatoxylin Gill Nr.3	Sigma-Aldrich® GmbH, Steinheim
Immersionsöl <i>IMMOL-F30CC</i>	Olympus, Tokio, Japan
Iod	Sigma-Aldrich® GmbH, Steinheim
Isopropanol (2-Propanol)	Carl Roth® GmbH + Co, Karlsruhe
Kaliumiodid	Sigma-Aldrich® GmbH, Steinheim
Lämmli-Puffer (4x)	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA
2-Mercaptoethanol	Carl Roth® GmbH + Co, Karlsruhe
Methanol	Carl Roth® GmbH + Co, Karlsruhe
Methanol ≥99,9 %, Blotting-Grade	Carl Roth® GmbH + Co, Karlsruhe
Milchpulver, Blotting-Grade, fettarm	Carl Roth® GmbH + Co, Karlsruhe
Natriumchlorid	Carl Roth® GmbH + Co, Karlsruhe
Natriumchlorid-Lösung, 5 M, für die Molekularbiologie	AppliChem GmbH, Darmstadt
Natriumchloridlösung 0,9%	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Natriumthiosulfat-Pentahydrat	Merck KGaA, Darmstadt
Natronlauge 40%, reinst	Carl Roth® GmbH + Co, Karlsruhe
Natronlauge 2 mol/l	AppliChem GmbH, Darmstadt
Normal Goat Serum	Abcam®, Cambridge, UK
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich® GmbH, Steinheim
Phosphate Buffered Saline (PBS) pH 7.4 (10x)	Gibco® by Life Technologies™, Carlsberg, CA, USA
Ponceau S-Lösung	AppliChem GmbH, Darmstadt
Roti®-Block (10x Konzentrat)	Carl Roth® GmbH + Co, Karlsruhe
RNAse AWAY	Molecular BioProducts, Inc., San Diego, CA, USA
Salzsäure 20%	AppliChem GmbH, Darmstadt
Salzsäure Maßlösung (1 M)	AppliChem GmbH, Darmstadt
SDS-Lösung 10%, für die Molekularbiologie	AppliChem GmbH, Darmstadt
Schnelldesinfektion <i>Terralin® liquid</i>	Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt
TAE Puffer <i>Rotiphorese®</i> (50x)	Carl Roth® GmbH + Co, Karlsruhe
TEMED ≥99%, p.a., für die Elektrophorese	Carl Roth® GmbH + Co, Karlsruhe
TRI Reagent® Solution	Ambion® by Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
TRIS ≥99,9%, Blotting-Grade	Carl Roth® GmbH + Co, Karlsruhe
TRIS Hydrochlorid	Carl Roth® GmbH + Co, Karlsruhe
Tris/Glycine/SDS Elektrophorese Puffer (10x)	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA

Triton®-X100	Carl Roth® GmbH + Co, Karlsruhe
Tween® 20	AppliChem GmbH, Darmstadt
Van Gieson-Lösung	Carl Roth® GmbH + Co, Karlsruhe
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂) 30%	Carl Roth® GmbH + Co, Karlsruhe
Xylol (Isomere)	Carl Roth® GmbH & Co, Karlsruhe
Zinkformalin Konzentrat <i>Zinc Formal-FIXX™ Concentrate</i>	Thermo Fisher Scientific™ Shandon™, Waltham, MA, USA

2.6 ELISA und Kits

ELISA	Firma
Mouse soluble Leptin Receptor-ELISA (sLEPR) (E03S0266)	BlueGene Biotech., Shanghai, China
<i>Quantikine®</i> ELISA Immunoassay - Endothelin-1 (DET-100) - Mouse/Rat Leptin (MOB00)	R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA
6-keto Prostaglandin F _{1α} (PGF _{1α}) ELISA Kit (ADI-900-004)	Enzo Life Sciences (ELS) AG, Lausen, CH

Kit	Firma
CellTiter 96® AQ _{ueous} One Solution Cell Proliferation Assay	Promega Corporation, Fitchburg, WI, USA
<u>Chemilumineszenz-(ECL)-HRP-Substrat</u> <i>SuperSignal™ West</i> - <i>Pico Chemiluminescent Substrate</i> - <i>Femto Maximum Sensitivity Substrate</i>	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
<u>DNA-Isolation:</u> Genomic DNA from tissue <i>NeucleoSpin® Tissue XS Kit</i>	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren
Griess Reagent System	Promega Corporation, Fitchburg, WI, USA
<u>Immunhistochemie (IHC):</u> - VECTASTAIN® <i>Elite®</i> ABC Kit (PK-6100) - AEC Peroxidase Substrate Kit (SK-4200) - DAB Peroxidase Substrate Kit (SK-4100)	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
<u>Proteinbestimmung:</u> BCA Protein Assay Kit <i>Pierce™</i>	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
<u>Quantitative kolorimetrische Bestimmungen:</u> <i>EnzyChrom™</i> - Cholesterol Assay Kit (ECCH-100) - Glucose Assay Kit (EBGL-100) - Triglyceride Assay Kit (ETGA-200)	BioAssay Systems, Hayward, CA, USA

2.7 Enzyme, Inhibitoren und Hormone

Artikel	Firma
<u>Enzyme:</u>	
- Accutase <i>StemPro</i> [®] <i>Accutase</i> [®] <i>Cell Dissociation Reagent</i>	Gibco [®] by Life Technologies [™] , Carlsberg, CA, USA
- 2,5% Trypsin (10x), no phenol red	
- Trypsin-EDTA (0,25%), phenol red	
- Proteinase K-Lösung <i>peqGOLD</i> [20 mg/ml]	Peqlab by VWR Life Science Competence Center, Erlangen
- Collagenase A (LS004154)	Worthington Biochemical Corp., Lakewood, NJ, USA
- Collagenase Typ II (CLSS-2)	
<u>Inhibitoren:</u>	
- AEBSF (4-(2-Aminoethyl) benzensulfonylfluorid)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
- Pepstatin A	
- Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail (100X) <i>Halt</i>	
Endothelin-Rezeptor (ET _{A/B})-Antagonist (PD 145065)	Calbiochem [®] , Merk Millipore, Darmstadt
PPAR _γ -Antagonist (T0070907)	Sigma-Aldrich [®] GmbH, Steinheim
Recombinant Mouse Leptin (498-OB)	R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA

2.8 Marker und Farbstoffe

Artikel	Firma
<u>Marker:</u>	
- DNA-Ladder (100 bp) 500 µg/ml (N3231L)	New England Biolabs (NEB) Inc., Ipswich, MA, USA
- Protein-Marker <i>Precision Plus Protein</i> [™] <i>Dual Color Standards</i> (#1610374)	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA
<u>Farbstoffe:</u>	
- DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol Dihydrochlorid)	Carl Roth [®] GmbH + Co, Karlsruhe
- DRAQ5 [™] (1,5-bis([2-(Dimethylamino)ethyl] amino)-4,8-Dihydroxyanthracene-9,10-dione); Far-Red Fluorescent Live-Cell Permeant DNA Dye; 5mM)	eBioscience, Inc., San Diego, CA, USA
- Midori Green Advance	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
<u>Lectin:</u>	
- Texas Red [®] labeled <i>Lycopersicon Esculentum</i> (Tomato) Lectin (LEL, TL) (TL-1176)	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA

2.9 PCR-Reagenzien (PCR, RT-PCR und qPCR)

Reagenz	Firma
DNA Polymerase <i>Go Taq[®] G2 Flexi</i> (5 U/μl) mit 5X Green <i>GoTaq[®] Flexi</i> Buffer und 25 mM MgCl ₂ (Kit; M7806)	Promega Corporation, Fitchburg, WI, USA
Genotypisierungs-Primer (Sequenzen siehe Abschnitt 2.10)	Eurofins MWG Operon ECommerce – Eurofins Genomics, Ebersberg
MgCl ₂ (25 mM; A3511)	Promega Corporation, Fitchburg, WI, USA
M-MLV Reverse Transkriptase mit M-MLV Reverse Transcriptase 5X Reaction Buffer (M1701)	Promega Corporation, Fitchburg, WI, USA
PCR Nucleotide Mix (10 mM dNTPs; C1145)	Promega Corporation, Fitchburg, WI, USA
Random Hexamer Primer (C1181)	Promega Corporation, Fitchburg, WI, USA
Recombinant RNasin [®] Ribonuclease Inhibitor (RNAse inhibitor; 40 U/μl; N2515)	Promega Corporation, Fitchburg, WI, USA
RT-Primer und qPCR-Primer (Sequenzen siehe Abschnitt 2.10)	Eurofins MWG Operon ECommerce – Eurofins Genomics, Ebersberg
SsoAdvanced [™] Universal SYBR [®] Green Supermix (172-5274)	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA
Wasser, nuklease-freies, DEPC-behandelt, steril und autoklaviert	Carl Roth [®] GmbH + Co, Karlsruhe

2.10 Primer

Genotypisierung

		Sequenz 5' - 3'
Tie2.CreER^{T2}	<i>Tie2.Cre1</i>	CGA GTG ATG AGG TTC GCA AG
	<i>Tie2.Cre2</i>	TGA GTG AAC GAA CCT GGT CG
SMMHC-CreER^{T2}	<i>SMWT1</i>	TGA CCC CAT CTC TTC ACT CC
	<i>SMWT2</i>	AAC TCC ACG ACC ACC TCA TC
	<i>phCREAS</i>	AGT CCC TCA CAT CCT CAG GTT
LepR^{fllox}	<i>LepR^{fllox1}</i>	GTC ACC TAG GTT AAT GTA TTC
	<i>LepR^{fllox2}</i>	TCT AGC CCT CCA GCA CTG GAC
LepR^Δ	<i>LepR^{fllox1}</i>	GTC ACC TAG GTT AAT GTA TTC
	<i>LepR^Δ</i>	GCA ATT CAT ATC AAA ACG CC

RT-PCR Primer (murin)*

Bezeichnung	Gen	Sequenz 5' - 3'	Produkt (bp)
Actin, beta	<i>Actb</i>	<i>for</i> – TGG AAT CCT GTG GCA TCC ATG AAA C <i>rev</i> – TAA AAC GCA GCT CAG TAA CAG TCC G	349
Calponin 1	<i>Cnn1</i>	<i>for</i> – CCA GCA TGG CCA AGA CAA AAG <i>rev</i> – GGA TCA TAG AGG TGA CGC CG	190
CD31	<i>Cd31</i>	<i>for</i> – GTC ATG GCC ATG GTC GAG TA <i>rev</i> – CTC CTC GGC GAT CTT GCT GAA	261
LepR_{short}	<i>LepR a</i>	<i>for</i> – ACA CTG TTA ATT TCA CAC CAG AG <i>rev</i> – AGT CAT TCA AAC CAT TAG TTT AGG	237
LepR_{long}	<i>LepR b</i>	<i>for</i> – GTG TGA GCA TCT CTC CTG GAG <i>rev</i> – ACC ACA CCA GAC CCT GAA AG	533
Sm-MHC	<i>Myh11</i>	<i>for</i> – CCA CCA GGA GAG GAA ACG AG <i>rev</i> – TTT CCC TGA CAT GGT GTC CAA TC	169
Sm22	<i>Tagln</i>	<i>for</i> – GTG AGC CAA GCA GAC TTC CAT <i>rev</i> – TGT TGA GGC AGA GAA GGC TTG	182

qPCR Primer (murin)*

Bezeichnung	Gen	Sequenz 5' - 3'	Produkt (bp)
18S ribosomal RNA	<i>Rn18S</i>	<i>for</i> – CGA AAG CAT TTG CCA AGA AT <i>rev</i> – GAG GTT TCC CGT GTT GAG TC	271
Actin, beta	<i>Actb</i>	<i>for</i> – GCA GGA GTA CGA TGA GTC CG <i>rev</i> – ACG CAG CTC AGT AAC AGT CC	74
Calponin 1	<i>Cnn1</i>	<i>for</i> – CCA GCA TGG CCA AGA CAA AAG <i>rev</i> – GGA TCA TAG AGG TGA CGC CG	190
CD31	<i>Cd31</i>	<i>for</i> – GCG CAG GAC CAC GTG TTA GT <i>rev</i> – CCT GCA ATT TGA ATC CGG AC	64
COX-1	<i>Ptgs1</i>	<i>for</i> – CTG GGA GTC CTT CTC CAA TGT G <i>rev</i> – TGG TAA AGC CAG GAC CCA TCT	251
COX-2	<i>Ptgs2</i>	<i>for</i> – AAG ACT TGC CAG GCT GAA CT <i>rev</i> – CTT CTG CAG TCC AGG TTC AA	150
Cyclin D1	<i>CCnd1</i>	<i>for</i> – GTT CGT GGC CTC TAA GAT GAA GGA <i>rev</i> – CAC TTG AGC TTG TTC ACC AGA AGC	129
eNOS	<i>Nos3</i>	<i>for</i> – TGA AGA TCT CTG CCT CAC TCA TG <i>rev</i> – AGT CTC AGA GCC ATA CCA GAA TGG TT	78
ET-1 (Endothelin-1)	<i>Edn1</i>	<i>for</i> – AGA AGTT GAC GCA CAA CCG A <i>rev</i> – AGA CAG GCT AGG GAA CAC CT	228
FGF2	<i>Fgf2</i>	<i>for</i> – AGC GGC TCT ACT GCA AGA AC <i>rev</i> – GCC GTC CAT CTT CCT TCA TA	183

ICAM2	<i>Icam2</i>	<i>for</i> – TAT GAG CCG ATG CAG GAC AAC <i>rev</i> – GTG CTG GCC AAA GAT AAA GCA TAG	108
iNOS	<i>Nos2</i>	<i>for</i> – GAG CCA CAG TCC TCT TTG CTA <i>rev</i> – TGT CAC CAC CAG CAG TAG TTG	158
Lepr_{short}	<i>Lepr a</i>	<i>for</i> – GAA GTC TCT CAT GAC CAC TAC AGA TGA <i>rev</i> – TTG TTT CCC TCC ATC AAA ATG TAA	98
Lepr_{long}	<i>Lepr b</i>	<i>for</i> – GCA TGC AGA ATC AGT GAT ATT TGG <i>rev</i> – CAA GCT GTA TCG ACA CTG ATT TCT TC	81
PDGF-A	<i>Pdgfa</i>	<i>for</i> – TGT AAC ACC AGC AGC GTC AA <i>rev</i> – TCT CAC CTC ACA TCT GTC TCC T	197
PPARγ	<i>Pparg</i>	<i>for</i> – CAA GAA TAC CAA AGT GCG ATC AA <i>rev</i> – GAG CTG GGT CTT TTC AGA ATA ATA	69
TGFβ	<i>Tgfb1</i>	<i>for</i> – GGT TCA TGT CAT GGA TGG TGC <i>rev</i> – TGA CGT CAC TGG AGT TGT ACG G	170
VEGF	<i>Vegf</i>	<i>for</i> – ACT TGT GTT GGG AGG AGG ATG TC <i>rev</i> – AAT GGG TTT GTC GTG TTT CTG G	171

* Die Spezifität der Primer wurde mit Hilfe von *Primer-BLAST* überprüft
(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>)

2.11 Antikörper

Primär-Antikörper

Name	Wirt	Methode	Art.-Nr. (Klon)	Firma
beta-Actin (ACTB)	Mou mAb	WB (HUVECs)	ab8226 (mAbcam 8226)	Abcam [®] , Cambridge, UK
beta-Actin (ACTB)	Rab mAb	WB (mPECs)	04-1116 (EP1123Y)	Merck Millipore (Merck KGaA), Darmstadt
CD31 (PECAM-1)	Rat mAb	IHC, ICC	DIA-310 (SZ31)	Dianova GmbH, Hamburg
CD31 (PECAM-1)	Rat mAb	IF, ICC	sc-18916	SantaCruz Biotechnology Inc., Dallas, Texas, USA
CD45 (PTPRC)	Rat mAb	IHC	553076 (30-F11)	BD Pharmingen [™] (Becton, Dickinson and Company), Franklin Lakes, NJ, USA
c-jun (JUN)	Rab mAb	ICC	60A8	Cell Signaling Technology [®] , Cambridge, UK
COX1 (PTGS1)	Rab mAb	IF	ab109025(EPR5866)	Abcam [®] , Cambridge, UK
COX2 (PTGS2)	Rab mAb	IF	ab179800(EPR12012)	Abcam [®] , Cambridge, UK
Endothelin 1 (EDN1)	Rab pAb	IF, WB	PA3-067	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
eNOS (NOS3)	Rab pAb	IF	ab66127	Abcam [®] , Cambridge, UK
F4/80 (ADGRE1)	Rat mAb	IHC	MCA497GA (Cl:A3-1)	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA

GAPDH	Mou mAb	WB	#5G4 (Mab 6C5)	HyTest Ltd, Turku, Finland
ICAM2	Rat mAb	IF	#1925-01 3C4 (mIC2/4)	SouthernBiotech, Birmingham, AL, USA
iNOS (NOS2)	Rab pAb	IF	ab15323	Abcam®, Cambridge, UK
Leptin (LEP)	Goat pAb	IF	AF498	R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA
Leptin-Rezeptor (LEPR)	Rab pAb	IF, WB	ab5593	Abcam®, Cambridge, UK
PCNA	Rab mAb	IHC	ab92552 (EPR3821)	Abcam®, Cambridge, UK
phospho-STAT3 (Ser727)	Rab pAb	WB	#9134	Cell Signaling Technology®, Cambridge, UK
phospho-STAT3 (Tyr705)	Rab mAb	WB	#9145	Cell Signaling Technology®, Cambridge, UK
PTEN	Rab mAb	WB	#9188	Cell Signaling Technology®, Cambridge, UK
PTP1B (PTPN1)	Rab mAb	WB	ab52650 (EP1837Y)	Abcam®, Cambridge, UK
Smooth Muscle α-Aktin (ACTA2)	Mou mAb	IHC	A 2547 (1A4)	Sigma-Aldrich® GmbH, Steinheim
STAT3	Rab mAb	WB	#4904	Cell Signaling Technology®, Cambridge, UK
SOCS3	Rab pAb	WB	#2932	Cell Signaling Technology®, Cambridge, UK
VE-Cadherin (Cdh5)	Rab pAb	ICC	ab33168	Abcam®, Cambridge, UK

Abkürzungen: Rab, rabbit; mAb, monoklonaler Antikörper; pAb, polyklonaler Antikörper; ICC, Immunzytometrie; IF, Immunfluoreszenz; IHC, Immunhistochemie; WB, Western Blot.

Sekundär-Antikörper

Antikörper	Firma
Immunhistochemie (IHC):	
- Biotin-xx goat-anti-rabbit IgG (B2770)	Molecular Probes® by Life Technologies™, Eugene, OR, USA
- Biotin-xx goat-anti-rat IgG (A10517)	
- Biotin-xx goat-anti-mouse IgG (B2763)	
Immunfluoreszenz (IF / ICC):	
- Alexa Fluor® 555 donkey anti-rat IgG (H+L) (ab150154)	Abcam®, Cambridge, UK
- FITC donkey anti-rat 488 (Novex A18746)	
- MFP488 goat anti-rabbit IgG (H+L) (MFP-1008)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
- MFP555 goat anti-rabbit IgG (H+L) (MFP-A2428)	MoBiTec GmbH, Göttingen
- MFP555 donkey anti-goat IgG (H+L) (MFP-A2432)	MoBiTec GmbH, Göttingen
Western Blot (WB):	
- Amersham ECL Mouse IgG, HRP-linked (NA931)	GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK
- Amersham ECL Rabbit IgG, HRP-linked (NA934)	

Magnetische Zellseparation

MicroBeads	Firma
- Zellseparator <i>QuadroMACS</i> TM	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
- LS Columns (130-042-401)	
- CD 31 MicroBeads, mouse (130-097-418)	

2.12 Zelllinien und Zellkulturmedien

Zelllinien	Firma
HUVEC (<i>Human umbilical vein endothelial cells</i>)	PromoCell GmbH, Heidelberg
MOVAS (MOVAS-1) (ATCC [®] CRL-2797 TM) <i>Murine aortic smooth muscle cells</i>	American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA

Zellkulturmedien, Puffer und Zusätze	Firma
DMEM, <i>high glucose, with L-glutamine</i> (ATCC [®] 30-2002)	American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA
DMEM, <i>high glucose, GlutaMAX</i> TM <i>Supplement, pyruvate</i> (31966-021)	Gibco [®] by Life Technologies TM , Carlsberg, CA, USA
DMEM/F-12, <i>GlutaMax</i> TM <i>Supplement</i> (31331-028)	Gibco [®] by Life Technologies TM , Carlsberg, CA, USA
Endothelial Cell Growth Medium Kit (C-22110)	PromoCell GmbH, Heidelberg
Endothelial Cell Growth Medium MV 2 Kit (C-22121)	PromoCell GmbH, Heidelberg
Fetal Bovine Serum, qualified, E.U. approved, South America Origin (10270-106)	Gibco [®] by Life Technologies TM , Carlsberg, CA, USA
G418-BC, 30.000 U/ml in WFI, steril (Aminoglykosid-Antibiotikum zur Selektion)	Biochrom GmbH, Berlin
Hank's Balanced Salt Solution (HBSS), no calcium, no magnesium, no phenol red (1x)	Gibco [®] by Life Technologies TM , Carlsberg, CA, USA
L-Ascorbinsäure, für die Zellkultur (A4403)	Sigma-Aldrich [®] GmbH, Steinheim
Pen/Strep (10.000 Units/ml Penicillin 10.000 µg/ml Streptomycin)	Gibco [®] by Life Technologies TM , Carlsberg, CA, USA
Phosphate Buffered Saline (PBS) pH 7.4 (1x)	Gibco [®] by Life Technologies TM , Carlsberg, CA, USA

2.13 Versuchstiere, Versuchstierhaltung und Futtermittel

Mauslinie	
Tie2.CreER ^{T2}	Prof. Bernd Arnold (DKFZ, Heidelberg) / European Mouse Mutant Archive (EMMA)
SMMHC-CreER ^{T2}	Prof. Stefan Offermanns (Max-Plank-Institut für Herz- und Lungenforschung, Bad Nauheim)
LepR _{flox/flox} (B6.129P2-Lep ^{tm1Rck} /J)	Prof. Jeffrey Friedman (Howard Hughes Medical Institute, Rockefeller University, NY, USA)
C57BL/6JRj	Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle, F
Haltungsfutter und Diäten	Firma
Alleinfuttermittel für die Haltung von Mäusen R/M-H <u>ZTE Göttingen</u> : 10 mm Pellets (V1534-0) <u>TARC Mainz</u> : Extrudat (V1536)	Ssniff® Spezialdiäten GmbH, Soest
Hochfettdiät mit 45% kcal% Fett (D12451)	Research Diets, New Brunswick, USA
Spezialfutter mit 400 mg Tamoxifen-Citrat / kg Futter (TD55125)	Harlan Laboratories, Inc., Indianapolis, IN, USA
Käfig und Zubehör	Firma
<u>ZTE Göttingen</u> : Einzelbelüftete IVC-Käfige Typ II Long (<i>Sealsafe NEXT - IVC Blue Line</i>) mit Trinkflasche	Tecniplast Deutschland GmbH, Hohenpeißenberg
<u>TARC Mainz</u> : Käfig Typ 2 (Laufbodenfläche 360 cm ² ; Höhe 14 cm; innenliegender Gitterdeckel mit herausnehmbarem Trennblech; Filterhaube; Trinkflasche)	ZOONLAB GmbH, Castrop-Rauxel
Einstreu und Nistmaterial	Standardmaterial Versuchstiereinrichtung

2.14 Anästhesie

Anästhetikum	Firma
Isotone Natriumchloridlösung 0,9% (steril, für Injektionen)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Ketamin 10% (Injektionslösung) (als Ketaminhydrochlorid; 1 ml Injektionslösung entsprechen 100 mg Ketamin)	Medistar Arzneimittelvertrieb, Ascheberg
Xylazin 2% (Injektionslösung) (als Xylazinhydrochlorid; 1 ml Injektionslösung entsprechen 20 mg Xylazin)	CP-Pharma Handelsgesellschaft mbH, Burgdorf
Isofluran <i>Forene</i> ® 100% (V/V) Inhalationsnarkotikum	AbbVie Deutschland GmbH & Co. KG, Ludwigshafen

2.15 Zusammensetzung und Herstellung der Lösungen

Begriffserläuterung: Bei der Verwendung von ddH₂O handelte es sich um Reinstwasser, welches über die Wasseraufbereitungsanlage *PURELAB Ultra* aufbereitet wurde.

Maus-Operation		
10%ige Eisenchlorid-Lösung (an jedem OP-Tag frisch angesetzt)	Eisen(III)-chloride-Hexahydrate ddH ₂ O	1 g auf 10 ml
Fixierung zur Paraffineinbettung		
Zinkformalin-Gebrauchslösung	Zinkformalin Konzentrat ddH ₂ O	200 ml 800 ml
Fixierung zur Gefriereinbettung		
4%ige Paraformaldehyd (PFA)-Lösung	Paraformaldehyd PBS (1x)	4 g auf 100 ml
15%ige Saccharose-Lösung	D(+)-Saccharose PBS (1x)	15 g auf 100 ml
30%ige Saccharose-Lösung	D(+)-Saccharose PBS (1x)	30 g auf 100 ml
Verhoeff's Elastica-Färbung		
10%ige alkoholische Hämatoxylin-Lösung	Hämatoxylin Ethanol vergällt ≥ 99,8%	10 g auf 1000 ml
10%ige Eisenchlorid-Lösung	Eisen(III)-chloride-Hexahydrate ddH ₂ O	100 g auf 1000 ml
Verhoeff's Iod-Lösung	Iod Kaliumiodid ddH ₂ O	2 g 4 g auf 100 ml
Verhoeff's Elastica-Gebrauchslösung	10%ige alkohol. Hämatoxylin-Lsg. Ethanol vergällt ≥ 99,8% 10%ige Eisenchlorid-Lösung Verhoeff's Iod-Lösung	50 ml 50 ml 50 ml 50 ml
2%ige Eisenchlorid-Differenzierungs-Lösung	Eisen(III)-chloride-Hexahydrate ddH ₂ O	20 g auf 1000 ml
5%ige Natriumthiosulfat-Pentahydrat-Lösung	Natriumthiosulfat-Pentahydrat ddH ₂ O	50 g auf 1000 ml

Immunhistochemie (IHC) / Immunfluoreszenz (IF) / Immunzytochemie (ICC)		
Phosphate Buffered Saline (PBS) pH 7,4 (1x)	PBS pH 7,4 (10x)	100 ml
	ddH ₂ O	900 ml
3%ige H₂O₂-Lösung in Methanol	Methanol	450 ml
	Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂) 30%	50 ml
50%iger Ethanol	Ethanol vergällt ≥ 99,8%	500 ml
	ddH ₂ O	500 ml
0,2%iger Triton-X100-Puffer	PBS pH 7,4 (1x)	499 ml
	Triton-X100	1 ml
0,05%iger Triton-X100-Puffer	Triton-X100	250 µl
	PBS pH 7,4 (1x)	auf 500 ml
0,1 M Citratpuffer, pH 6,0 (10x) (Stammlösung)	Citronensäure Monohydrat	21,01 g
	ddH ₂ O	auf 1000 ml
	<i>pH auf 6,0 eingestellt</i>	
0,01 M Citratpuffer, pH 6,0 (1x) (Gebrauchslösung)	0,1 M Citratpuffer, pH 6,0 (10x)	100 ml
	ddH ₂ O	900 ml
0,1 M Tris/ 0,01 M EDTA, pH 9,0 (10x) (Stammlösung)	TRIS ≥99,9 %, Blotting-Grade	12,1 g
	EDTA-Dinatriumsalz-Dihydrat	3,72 g
	ddH ₂ O	auf 1000 ml
	<i>pH auf 9,0 eingestellt</i>	
0,01 M Tris/ 0,001 M EDTA, pH 9,0 (1x) (Gebrauchslösung)	0,1 M Tris/ 0,01 M EDTA, pH 9,0 (10x)	100 ml
	ddH ₂ O	900 ml
10%iges Normal Goat Serum in PBS (1x)	PBS pH 7,4 (1x)	4500 µl
	Normal Goat Serum	500 µl
5%iges Normal Goat Serum in PBS (1x)	PBS pH 7,4 (1x)	4750 µl
	Normal Goat Serum	250 µl
Blockierungs-Puffer I (1%iges BSA mit 0,1%igem Triton-X100 in PBS (1x))	Albumin, Fraktion V, pH 5,2 (für die Proteinanalyse)	1 g
	10%iger Triton-X100-Puffer	1 ml
	PBS pH 7,4 (1x)	auf 100 ml
Blockierungs-Puffer II (5%iges Normal Goat Serum mit 0,3%igem Triton-X100 in PBS (1x))	PBS pH 7,4 (1x)	4600 µl
	Normal Goat Serum	250 µl
	10%iger Triton-X100-Puffer	150 µl
1%iges BSA in PBS (1x)	Albumin, Fraktion V, pH 5,2 (für die Proteinanalyse)	1g
	PBS pH 7,4 (1x)	auf 100 ml
DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol) (5 mg/ml Stammlösung)	DAPI	25 mg
	ddH ₂ O (steril)	5 ml
DAPI Gebrauchslösung (Stammlösung 1:5000 verdünnt)	PBS pH 7,4 (1x)	2500 µl
	DAPI (5 mg/ml)	0,5 µl

Genotypisierung		
Lyse-Reagenz (pro Reaktionsansatz für 0,5 cm Mausschwanz-Biopsie)	DirectPCR® Lysis Reagent Tail (mouse)	200 µl
	Proteinase K-Lösung <i>peqGOLD</i> [20 mg/ml]	2 µl (0,2 mg/ml)
Lyse-Reagenz (pro Reaktionsansatz für 0,2 – 0,3 cm Mausschwanz-Biopsie)	DirectPCR® Lysis Reagent Tail (mouse)	150 µl
	Proteinase K-Lösung <i>peqGOLD</i> [20 mg/ml]	1,5 µl (0,2 mg/ml)
Lyse-Reagenz (für Zellen pro 6-Well)	DirectPCR® Lysis Reagent Cell	140 µl
	Proteinase K-Lösung <i>peqGOLD</i> [20 mg/ml]	1,4 µl (0,2 mg/ml)
RNA-Isolation		
75%iger Ethanol	Ethanol absolut, für die Molekularbiologie	30 ml
	Wasser, nuklease-freies, DEPC-behandelt, steril und autoklaviert	10 ml
Gelelektrophorese (horizontal)		
TAE Puffer (1x) (Gebrauchslösung)	TAE Puffer (50x)	40 ml
	ddH ₂ O	auf 2000 ml
Herstellung von Proteinlysaten aus Zellen		
0,5 M Tris Hydrochlorid (Tris-HCl)-Lösung	TRIS Hydrochlorid	39,4 g
	ddH ₂ O <i>pH auf 7,5 eingestellt</i>	auf 500 ml
Triton-X-Puffer	Triton-X 100	5 ml (1%)
	5 M NaCl	15 ml (150 mM)
	0,5 M Tris-HCl pH 7,5	50 ml (50 mM)
	0,5 M EDTA pH 8,0	50 ml (5 mM)
	ddH ₂ O	auf 500 ml
Triton-X-Lysepuffer	Triton-X-Puffer	4860 µl
	Pepstatin A	40 µl (4 µg/ml)
	AEBSF	50 µl (1 mM)
	Protease / Phosphatase Inhibitor Cocktail (100x)	50 µl (1x)
	0,5 M EDTA-Lösung (100x)	50 µl (5 mM)

Western Blot		
1,0 M Tris pH 6,8 (für Sammelgele)	TRIS ≥99,9 %, Blotting-Grade ddH ₂ O <i>pH auf 6,8 eingestellt</i>	12,1 g auf 100 ml
1,5 M Tris pH 8,8 (für Trenngele)	TRIS ≥99,9 %, Blotting-Grade ddH ₂ O <i>pH auf 8,8 eingestellt</i>	45,5 g auf 250 ml
10%ige Ammoniumpersulfat (APS)-Lösung	APS ddH ₂ O	1 g auf 100 ml
Lämmli-Ladepuffer (4x)	Lämmli-Puffer (4x) 2-Mercaptoethanol	900 µl 100 µl
Tris/Glycine/SDS-Laufpuffer (1x)	Tris/Glycine/SDS Elektrophorese Puffer (10x) ddH ₂ O	100 ml auf 1000 ml
Transferpuffer (10x) (Stammlösung)	TRIS ≥99,9 %, Blotting-Grade Glycin ddH ₂ O	30,3 g (0,25 M) 144 g (1,92 M) auf 1000 ml
Transferpuffer (1x) (Gebrauchslösung)	Transferpuffer (10x) Methanol ≥99,9 %, Blotting-Grade ddH ₂ O	50 ml 100 ml (20%) 350 ml
TBS-Puffer (10x) (Stammlösung)	Tris-HCl NaCl ddH ₂ O	157 g (1 M) 90 g (1,54 M) auf 1000 ml
TBST-Puffer (1x) (Gebrauchslösung)	TBS-Puffer (10x) ddH ₂ O Tween 20	100 ml 900 ml 1 ml (0,1%)
5%ige BSA-Lösung	Albumin, Fraktion V, pH 5,2 (für die Proteinanalyse) TBST (1x)	5 g auf 100 ml
5%ige Milchpulver-Lösung	Milchpulver, Blotting-Grade, fettarm TBST (1x)	5 g auf 100 ml
Roti-Block (1x) (Gebrauchslösung)	Roti-Block (10x Konzentrat) ddH ₂ O	10 ml 90 ml
0,2 M Natronlauge	Natronlauge 2 mol/l ddH ₂ O	10 ml 90 ml

Isolation primärer muriner pulmonaler Endothelzellen (mPECs) mit CD 31 MircoBeads

PBS (1x) mit 1% Pen/Strep	PBS pH 7,4 (1x)	49,5 ml
	Pen/Strep (100 Units/ml Penicillin; 100 µg/ml Streptomycin)	0,5 ml
Lyse-Puffer	Collagenase A	45 mg (1,5 mg/ml)
	PBS (1x)	30 ml
	<i>steril filtriert (über 0,2 µm Spritzenfilter)</i>	
5%ige BSA-Lösung	Albumin, Fraktion V, endotoxin-geprüft, CELLPURE [®]	2,5 g
	dddH ₂ O	auf 50 ml
	<i>steril filtriert (über 0,2 µm Spritzenfilter)</i>	
MACS-Puffer	PBS pH 7,4 (1x)	448 ml
	5% BSA-Lösung (<i>steril filtriert</i>)	50 ml (0,5%)
	0,5 M EDTA-Lösung pH 8,0 (<i>steril filtriert</i>)	2 ml (2 mM)

Isolation primärer muriner glatter Muskelzellen (mSMCs) aus der Aorta

Lyse-Puffer	Collagenase Typ II	50 mg (0,5 mg/ml)
	Hanks balanced salt solution (HBSS)	100 ml
	2,5% Trypsin (10x)	400 µl (0,1%)

Serum-Inaktivierung und Beschichtung

Fetal Bovine Serum (FBS)	30 min bei 56°C inaktiviert	
0,2%ige Gelatine-Lösung (Plattenbeschichtung für mPECs)	2%ige Gelatine-Lösung, Typ B, in H ₂ O, für die Zellkultur, steril	1 ml
	ddH ₂ O (<i>autoklaviert</i>)	9 ml

Zellkulturmedien und Zusätze

mPEC-Isolations-Medium	DMEM (31966-021)
	+ 20% FBS
	+ 1% Pen/Strep (100 Units/ml Penicillin; 100 µg/ml Streptomycin)
mPEC-Kulturbedium	Endothelial Cell Growth Medium MV 2 Kit (C-22121)
	beinhaltet: Endothelial Cell Basal Medium MV2
	+ Endothelial Cell Growth Medium MV 2 SupplementMix
mPEC-Kulturmedium (für die ersten 24 Stunden nach Isolation)	Endothelial Cell Growth Medium MV 2 Kit (C-22121)
	+ 1% Pen/Strep (100 Units/ml Penicillin; 100 µg/ml Streptomycin)
mSMC-Kulturmedium	DMEM/F12 (31331-028)
	+ 10% FBS (aktiv)
	+ 1% Pen/Strep (100 Units/ml Penicillin; 100 µg/ml Streptomycin)
	+ 100 µM L-Ascorbinsäure (140 mM Stammlösung = 25 mg/ml d.h. 360 µl/ 500 ml Medium)

Reduziertes mSMC-Kulturmedium	DMEM/F12 (31331-028) + 0,5% FBS (aktiv) + 1% Pen/Strep (100 Units/ml Penicillin; 100 µg/ml Streptomycin) + 100 µM L-Ascorbinsäure (140 mM Stammlösung = 25 mg/ml d.h. 360 µl/ 500 ml Medium)
MOVAS-Einfriermedium	DMEM (ATCC® 30-2002) + 10% FBS + 0,2 mg/ml G418-BC (Stammlösung enthält 30.000 U/ml = 60 mg/ml d.h. 1667 µl/ 500 ml Medium) + 5% DMSO
MOVAS-Medium	DMEM (ATCC® 30-2002) + 10% FBS + 0,2 mg/ml G418-BC (Stammlösung enthält 30.000 U/ml = 60 mg/ml d.h. 1667 µl/ 500 ml Medium)
Reduziertes MOVAS-Medium	DMEM (ATCC® 30-2002) + 0,5% FBS + 0,2 mg/ml G418-BC (Stammlösung enthält 30.000 U/ml = 60 mg/ml d.h. 1667 µl/ 500 ml Medium)
HUVEC-Kulturmedium	Endothelial Cell Growth Medium Kit (C-22110) beinhaltet: Endothelial Cell Basal Medium + Endothelial Cell Growth Medium SupplementMix

3. Methoden

3.1 Tierexperimentelle Untersuchungen

3.1.1 Genehmigung der tierexperimentellen Untersuchungen

Die Versuchstierhaltung und die tierexperimentellen Untersuchungen wurden nach §8 des Tierschutzgesetzes vom Niedersächsischen Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit genehmigt (Az. 33.9-42502-04-10/0153). Nach dem Wechsel der Arbeitsgruppe an die Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz wurde die Fortführung der tierexperimentellen Untersuchungen vom Landesuntersuchungsamt Rheinland-Pfalz genehmigt (Az. 23 177-07/G 13-1-081). Die Versuchstierhaltung und die Versuchsdurchführung erfolgten gemäß nationalen Bestimmungen.

3.1.2 Versuchstiere und Versuchstierhaltung

Während des Zucht- und Versuchszeitraums wurden die Mäuse in der *Zentralen Tierexperimentellen Einrichtung* (ZTE) der Universitätsmedizin Göttingen konventionell unter kontrollierten Beleuchtungs- und Luftverhältnissen in einzelbelüfteten IVC-Käfigen (Typ II Long) gehalten. Ein künstliches Beleuchtungsintervall mit einem 12 h / 12 h Tag-Nacht-Rhythmus wurde eingehalten. Die Raumtemperatur betrug $22 \pm 2^\circ\text{C}$ bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von $60 \pm 10\%$. Die Fortsetzung der Zucht und Versuchsdurchführung erfolgte in der Experimentaltierhaltung des *Translational Animal Research Center* (TARC) der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz. Die Mäuse wurden in einer konventionellen Barrierehaltung unter kontrollierten Beleuchtungs- und Luftverhältnissen in Typ 2 Käfigen mit Filterhaube und einer Laufbodenfläche von 360 cm^2 gehalten. Ein künstliches Beleuchtungsintervall mit einem 12 h / 12 h Tag-Nacht-Rhythmus wurde eingehalten (Hellphase von 6.00 Uhr bis 18.00 Uhr). Die Lichtintensität lag bei 200 Lux und erreichte bei Arbeiten kurzfristig bis 400 Lux. Die Raumtemperatur betrug $22 \pm 2^\circ\text{C}$ bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von $60 \pm 10\%$.

Die Durchführung der tierexperimentellen Gefäßverletzung unter Anwendung des Eisen(III)-chlorid-Modells nach Konstantinides *et al.* [137] erfolgte für diese Arbeit ausschließlich in Göttingen, während die weiteren Experimente zur Klärung möglicher mechanistischer Zusammenhänge in Mainz fortgesetzt wurden.

Für die tierexperimentelle Gefäßverletzung wurden ausschließlich männliche Wurfgeschwister verwendet. Zu Versuchsbeginn waren die Mäuse zwischen fünf und sechs Wochen alt und hatten im Mittel ein Körpergewicht von $16,9 \pm 0,4 \text{ g}$. Lediglich für die

Isolation primärer muriner pulmonaler Endothelzellen (mPECs) wurden sowohl männliche als auch weibliche Wurfgeschwister verwendet.

3.1.3 Haltungsfutter und Diäten

Die Mäuse erhielten während des gesamten Zucht- und Versuchszeitraums Trinkwasser und die im Folgenden beschriebenen Futtermittel *ad libitum*. Als Basisfutter erhielten alle Tiere das R/M-H-Standardfutter (Alleinfuttermittel für die Haltung von Mäusen), welches im weiteren Verlauf der Arbeit als NC (*Normal Chow*) abgekürzt wird. Ein Teil der Mäuse erhielt zur Induzierung von Übergewicht und einer systemischen Hyperleptinämie eine Hochfettdiät (*High Fat Diet*, abgekürzt als HFD) mit einem Gesamtfettanteil von 45% bezogen auf den Gesamtkaloriengehalt. Im Vergleich dazu lag der Gesamtfettanteil des NC-Futters bei nur 9% bezogen auf den Gesamtkaloriengehalt. Eine ausreichende Energieversorgung wurde durch einen im Vergleich zum HFD-Futter höheren Protein- und Kohlenhydratanteil gewährleistet. Ein Überblick der Nährstoffverteilung ist in Tabelle 3-1 zusammengefasst.

Tabelle 3-1: Nährstoffverteilung der Grundnährstoffe der verwendeten Futtermittel*

	NC [kcal%]	HFD [kcal%]
Protein	33	20
Kohlenhydrate	58	35
Fett	9	45
Energiegehalt (kcal/g)	3,9	4,7

* Die Angaben wurden anhand der jeweiligen Datenblätter der Hersteller zusammengefasst.

Zur Induzierung Zell-spezifischer Knockouts erhielten die fünf bis sechs Wochen alten Mäuse Spezialfutter mit 400 mg Tamoxifen-Citrat / kg Futter über einen Zeitraum von sechs Wochen. Laut Herstellerangaben erreicht man damit eine tägliche Tamoxifen-Aufnahme von ca. 40 mg / kg KG (ausgehend von einem Körpergewicht von 20-25 g und einer täglichen Futteraufnahme von 3-4 g).

3.1.4 Generierung von Zell-spezifischen Leptin-Rezeptor (LepR)-defizienten Mäusen

Cre-loxP-Rekombinationssystem

In Abbildung 3-1 ist das allgemeine Schema zur Generierung von Zell-spezifischen Knockout (KO) Mäusen unter Verwendung des Cre-loxP Rekombinationssystems dargestellt. Dabei wird vor und hinter die DNA-Sequenz, welche für das Gen kodiert, das entfernt werden soll,

eine Erkennungssequenz loxP gesetzt. Diese loxP-flankierte Sequenz wird von der Cre-Rekombinase erkannt und schneidet nach Bindung die entsprechende DNA-Sequenz aus. Um ein Gen spezifisch nur in einem Zelltyp zu entfernen, muss die Cre-Rekombinase unter die Kontrolle eines entsprechenden Zell-spezifischen Promotors gestellt werden. Damit die Aktivierung des Promotors nicht bereits während der Embryonalentwicklung erfolgt, was häufig mit letalen Folgen verbunden ist, wird eine Liganden-aktivierbare Cre-Rekombinase verwendet, bei der die Cre-Rekombinase mit der modifizierten Ligandenbindungsdomäne (LBD) von Östrogenrezeptoren fusioniert wurde (*Cre-Rekombinase-Östrogenrezeptor ER^T Fusionsprotein*). Dabei erfolgt erst nach Bindung des Liganden (*Tamoxifen*, abgekürzt Tam.) die Rekombination.

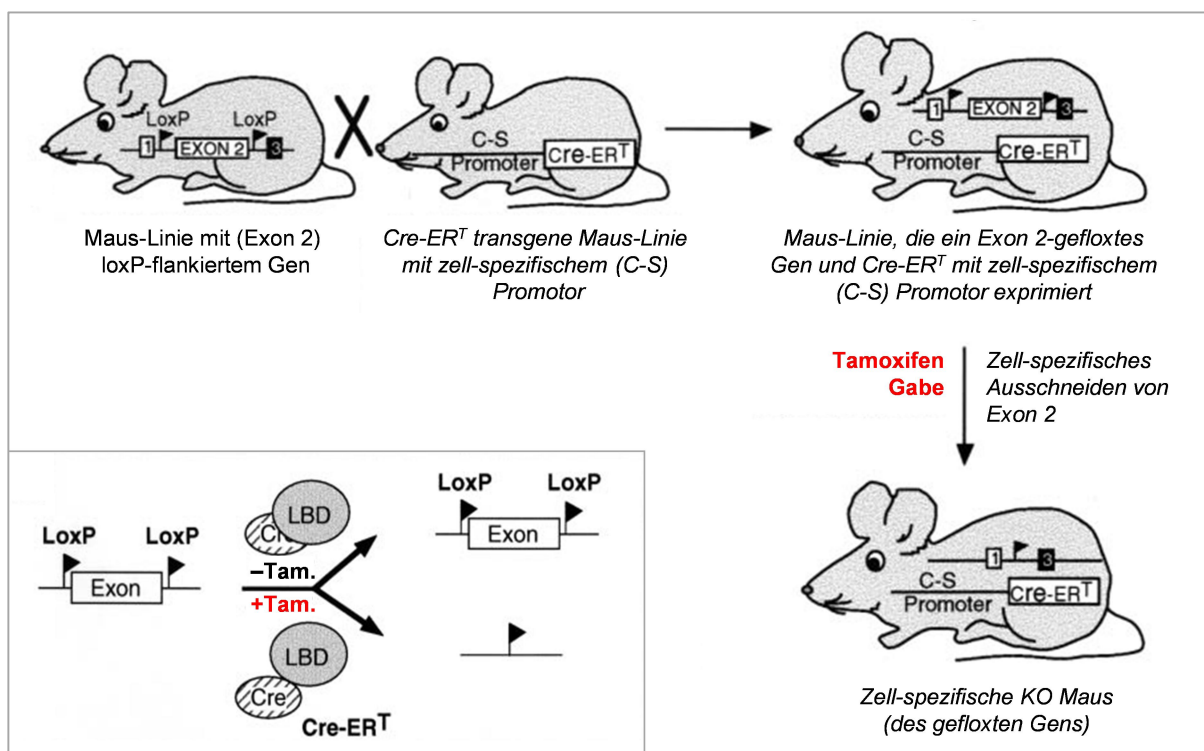


Abbildung 3-1: Allgemeines Schema zur Generierung von Zell-spezifischen Knockout (KO) Mäusen unter Verwendung des Cre-loxP Rekombinationssystems. Unten links ist das Prinzip einer Liganden-aktivierbaren Rekombination gezeigt. Die Abkürzungen sind im vorhergehenden Abschnitt 3.1.4 erläutert (modifiziert nach [163]).

Mauszucht

Die induzierbare Zell-spezifische Leptin-Rezeptor (LepR) Deletion wurde generiert, indem Mäuse mit loxP-flankierten (geflochten; abgekürzt als *flox*) LepR-Allelen [59] mit Mäusen verpaart wurden, die eine Liganden-aktivierbare Cre-Rekombinase exprimieren. Zur Generierung eines Endothelzell-spezifischen LepR-Knockouts wurden Mäuse verwendet, die das Cre-Rekombinase-Östrogenrezeptor (ER^{T2}) Fusionsprotein unter der Kontrolle des endothelialen Rezeptor-Tyrosinkinase (Tie2) Promotors exprimieren [164]. Der glatte

Muskelzell-spezifische LepR-Knockout wurde mit Hilfe von Mäusen generiert, welche die Cre-Rekombinase unter Kontrolle des glatte Muskelzell-Myosin-schwere Kette (SMMHC) Promotors exprimieren [165]. Die jeweiligen Zuchtschemen bis zur Einteilung der Versuchsgruppen der Tie2.CreER^{T2} bzw. SMMHC.CreER^{T2} x LepR_{flox} Linien sind in den Abbildungen 3-2 und 3-3 dargestellt.

Induzierung der Cre-Rekombinase Aktivität

Zur Induzierung der Cre-Rekombinase Aktivität erhielten die Mäuse im Alter von fünf bis sechs Wochen Spezialfutter mit 400 mg Tamoxifen-Citrat / kg Futter über einen Zeitraum von sechs Wochen [164]. Da bei der SMMHC.CreER^{T2}-Linie aufgrund der Y-chromosomalen Vererbung des CreER^{T2} alle männlichen Mäuse CreER^{T2} exprimierten und zuchtbedingt nur sehr wenige Wurfgeschwister dem Genotyp SMMHC.CreER^{T2}(+) x LepR_{WT/WT} angehörten (und somit aufgrund der zur geringen Tierzahl keine statistische Auswertung möglich war), wurden SMMHC.CreER^{T2}(+) x LepR_{flox/WT} bzw. LepR_{flox/flox} ohne Tamoxifen-Futter als Kontrolltiere verwendet.

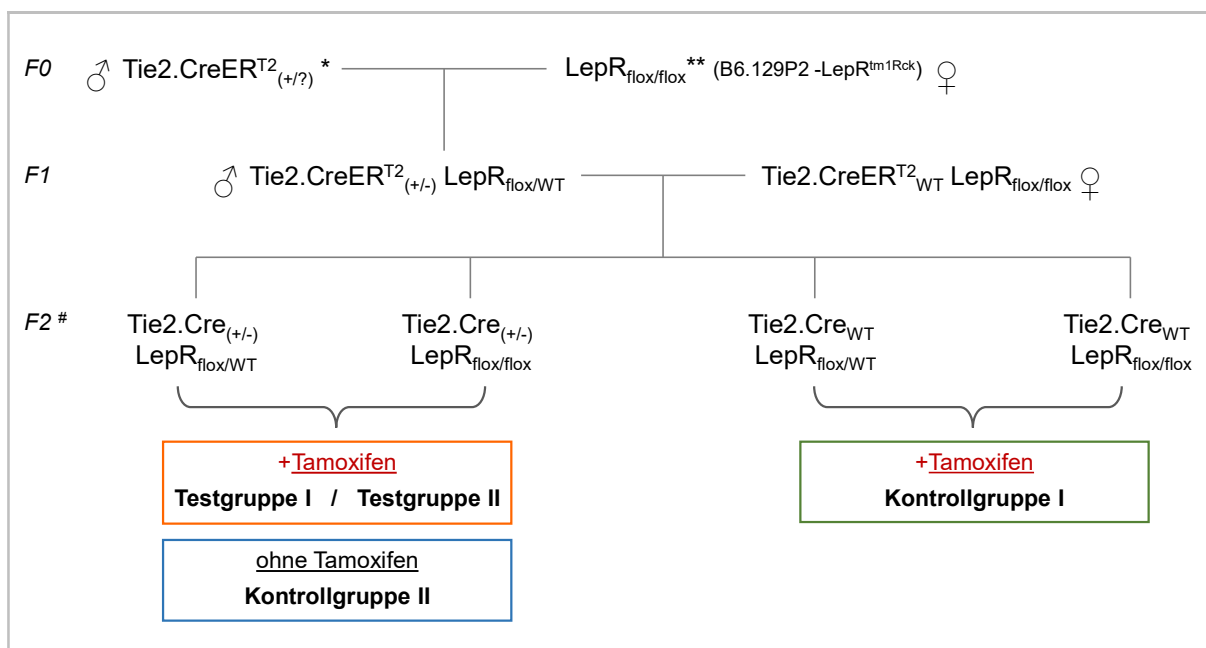
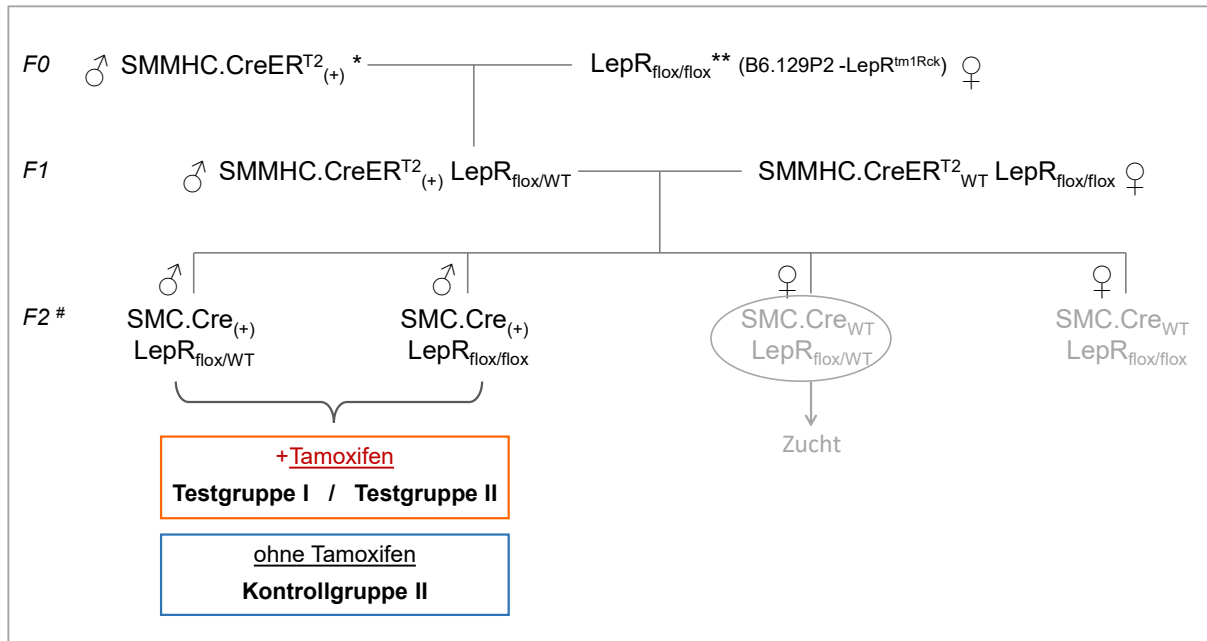


Abbildung 3-2: Zuchtschema zur Generierung von induzierbaren Endothelzell-spezifischen LepR-KO Mäusen und deren Kontrollen. *Zur Verfügung gestellt von Prof. Bernd Arnold (DKFZ, Heidelberg) / European Mouse Mutant Archive (EMMA); **Zur Verfügung gestellt von Prof. Jeffrey Friedman (Howard Hughes Medical Institute, Rockefeller University, New York, USA); #Für die Versuchsgruppen wurden nur männliche Wurfgeschwister verwendet. Zur Vereinfachung wurde in der F2-Generation bei der Bezeichnung der Nachkommen auf das ER^{T2} verzichtet. Beide verwendeten Mauslinien haben einen C57BL/6-Hintergrund.

A



B

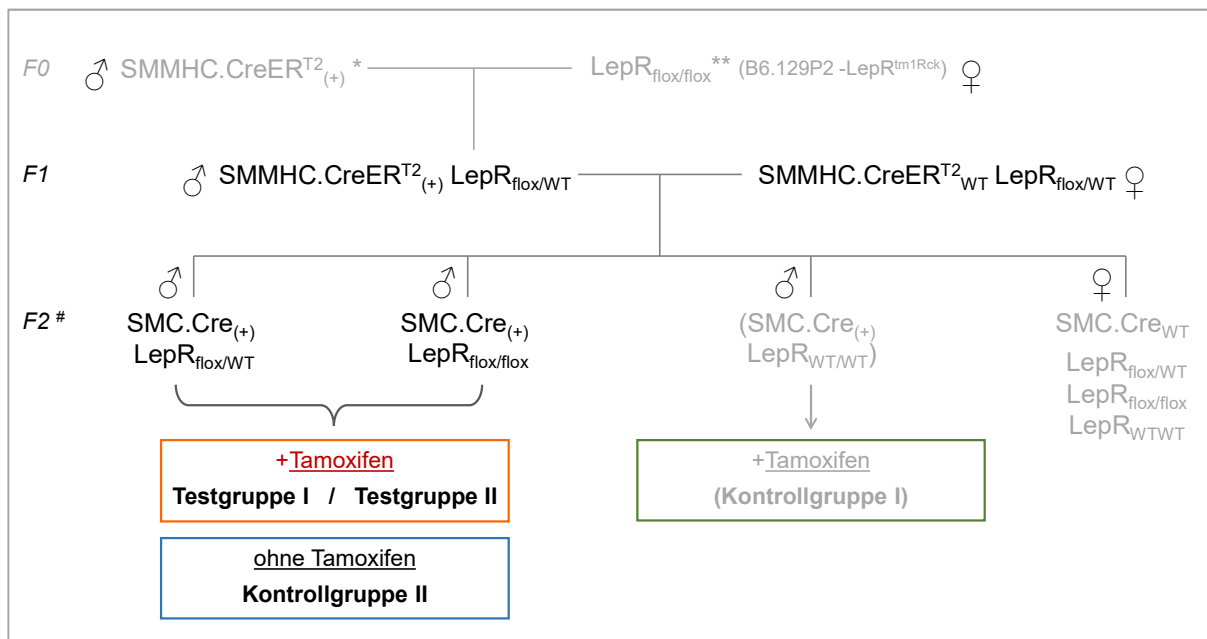


Abbildung 3-3: Zuchtschema zur Generierung von induzierbaren glatten Muskelzell-spezifischen LepR-KO Mäusen und deren Kontrollen. In der Abb. (A) ist das initiale Zuchtschema dargestellt. In Abb. (B) ist das Zuchtschema zur Generierung der Kontrollgruppe I dargestellt. *Zur Verfügung gestellt von Prof. Stefan Offermanns (Max-Planck-Institut für Herz- und Lungenforschung, Bad Nauheim); **Zur Verfügung gestellt von Prof. Jeffrey Friedman (Howard Hughes Medical Institute, Rockefeller University, New York, USA); #Für die Versuchsgruppen wurden nur männliche Wurfgeschwister verwendet. Zur Vereinfachung wurde in der F2-Generation die Bezeichnung $SMMHC.CreER^{T2}$ als $SMC.Cre$ abgekürzt. Beide verwendeten Mauslinien haben einen C57BL/6-Hintergrund.

3.1.5 Genotypisierung

Lyse

Zur Lyse der Mausschwanz-Biopsien wurde das Lyse-Reagenz *DirectPCR[®] Tail (mouse)* komplettiert mit 0,2 mg/ml Proteinase K verwendet (Herstellung siehe Kapitel 2.15). Die Lyse erfolgte im Thermomixer bei 55°C und 550 rpm über Nacht (3-16 h). Nach kompletter Lyse wurden die Reaktionsansätze zur Inaktivierung der Proteinase K ohne Schütteln bei 85°C für 60 min inkubiert. Die gewonnenen genomischen DNA-Lysate (gDNA) konnten direkt in PCR-Reaktionen eingesetzt werden. Zur Lyse von Zellen wurde das Lyse-Reagenz *DirectPCR[®] Cell* verwendet und die Lyse wie bereits beschrieben durchgeführt.

Die gDNA-Isolation aus Carotisarterien wurde mit dem Kit *Genomic DNA from tissue NeucleoSpin[®] Tissue XS* nach Herstellerangaben durchgeführt.

PCR

Es wurden 5 µl gDNA-Lysat von Tie2.CreER^{T2} x LepR_{fllox} bzw. SMMHC-CreER^{T2} x LepR_{fllox} Mäusen pro PCR-Reaktion eingesetzt. Die PCR-Pipettierschema und -Programme zur Genotypisierung von Tie2.CreER^{T2} bzw. SMMHC-CreER^{T2} und LepR_{fllox} sowie zum Nachweis des Rekombination-Produkts LepR^A sind in den Tabellen 3-2 bis 3-7 aufgeführt.

Gelelektrophorese (horizontal)

Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte mit Hilfe des horizontalen Gelelektrophorese-Systems *Sub-Cell[®] GT*. Die Gelgießapparatur wurde aufgebaut und nivelliert. Zur Herstellung eines 1,5%igen Agarose-Gels wurden 1,5 g Agarose in 100 ml 1x TAE-Puffer (Herstellung siehe Kapitel 2.15) in der Mikrowelle aufgeköcht, bis die Lösung klar wurde. Nach dem Auskühlen der Lösung auf ca. 60°C wurden 5 µl des DNA-Farbstoffs Midori Green hinzugegeben, kurz durchmischt und vorsichtig in die UV-durchlässige Gelschale des Gießstandes gegossen, sowie die Kämmen angebracht. Nach dem Auspolymerisieren nach ca. 20-30 min wurde die Gelschale in die mit 1x TAE-Puffer befüllte Elektrophorese-Kammer gelegt, so dass das Gel vollständig mit Puffer bedeckt war. Die Kämmen wurden vorsichtig entfernt und jeweils 20 µl DNA-Marker (100 bp) und Probe aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte für eine Stunde bei 100 V. Zur eindeutigen Auftrennung der Doppelbanden zum Nachweis von SMMHC-CreER^{T2} wurde die Laufzeit der Gelelektrophorese um weitere 15 min verlängert. Die Ergebnisse wurden in einer UV-Dokumentationskammer visualisiert und zur Dokumentation aufgenommen.

Genotypisierungs-Ergebnisse

Die spezifischen Genotypisierungs-Produkte und deren Auswertung sind in Tabelle 3-8 zusammengefasst.

Tabelle 3-2: PCR-Pipettierschema für die Genotypisierung von *Tie2.CreER*^{T2}

Reagenz	Volumen pro Ansatz [μ l]	Finale Konzentration
nuklease-freies Wasser	7,8	-
5x Puffer <i>Green GoTaq[®]Flexi</i>	4	1x
25 mM MgCl ₂	1,6	2,00 mM
10 mM dNTPs	0,4	0,20 mM
10 μ M Primer 1: <i>Tie2.Cre1</i>	0,5	0,25 μ M
10 μ M Primer 2: <i>Tie2.Cre2</i>	0,5	0,25 μ M
5 U/ μ l DNA Polymerase <i>Go Taq[®] G2 Flexi</i>	0,2	0,05 U/ μ l
DNA	5	
Gesamtvolumen	20	

Tabelle 3-3: PCR-Pipettierschema für die Genotypisierung von *SMMHC.CreER*^{T2}

Reagenz	Volumen pro Ansatz [μ l]	Finale Konzentration
nuklease-freies Wasser	5,8	-
5x Puffer <i>Green GoTaq[®]Flexi</i>	4	1x
25 mM MgCl ₂	1,6	2,00 mM
10 mM dNTPs	0,4	0,20 mM
10 μ M Primer 1: <i>SMWT1</i>	1,2	0,60 μ M
10 μ M Primer 2: <i>SMWT2</i>	0,6	0,30 μ M
10 μ M Primer 3: <i>phCREAS</i>	1,2	0,60 μ M
5 U/ μ l DNA Polymerase <i>Go Taq[®] G2 Flexi</i>	0,2	0,05 U/ μ l
DNA	5	
Gesamtvolumen	20	

Tabelle 3-4: PCR-Pipettierschema für die Genotypisierung von *LepR^{fllox}* und zum Nachweis des Rekombination-Produkts *LepR^Δ*

Reagenz	Volumen pro Ansatz [μ l]	Finale Konzentration
nuklease-freies Wasser	4,88	-
5x Puffer <i>Green GoTaq[®]Flexi</i>	4	1x
25 mM MgCl ₂	1,6	2,00 mM
10 mM dNTPs	0,4	0,20 mM
10 μ M Primer 1: <i>LepR^{fllox}1</i>	2	1,00 μ M
10 μ M Primer 2: <i>LepR^{fllox}2</i> / <i>LepR^Δ</i>	2	1,00 μ M
5 U/ μ l DNA Polymerase <i>Go Taq[®] G2 Flexi</i>	0,12	0,03 U/ μ l
DNA	5	
Gesamtvolumen	20	

Tabelle 3-5: PCR-Programm für die Genotypisierung von Tie2.CreER^{T2}

Schritt	Temperatur	Dauer	Anzahl der Zyklen
<i>Aufheizen des Deckels</i>	105°C	durchgehend	-
<i>Initiale Denaturierung</i>	95°C	2 min	-
<i>Denaturierung</i>	95°C	30 s	35 Zyklen
<i>Annealing</i>	58°C	30 s	
<i>Elongation</i>	72°C	90 s	
<i>Finale Elongation</i>	72°C	10 min	-
<i>Kühlung</i>	4°C	halten	-

Tabelle 3-6: PCR-Programm für die Genotypisierung von SMMHC.CreER^{T2}

Schritt	Temperatur	Dauer	Anzahl der Zyklen
<i>Aufheizen des Deckels</i>	105°C	durchgehend	-
<i>Initiale Denaturierung</i>	95°C	5 min	-
<i>Denaturierung</i>	95°C	45 s	30 Zyklen
<i>Annealing</i>	58°C	45 s	
<i>Elongation</i>	72°C	2 min	
<i>Finale Elongation</i>	72°C	10 min	-
<i>Kühlung</i>	4°C	halten	-

Tabelle 3-7: PCR-Programm für die Genotypisierung von LepR^{flox} und LepR^Δ

Schritt	Temperatur	Dauer	Anzahl der Zyklen
<i>Aufheizen des Deckels</i>	105°C	durchgehend	-
<i>Initiale Denaturierung</i>	95°C	3 min	-
<i>Denaturierung</i>	95°C	30 s	35 Zyklen
<i>Annealing</i>	58°C	1 min	
<i>Elongation</i>	72°C	1 min	
<i>Finale Elongation</i>	72°C	10 min	-
<i>Kühlung</i>	4°C	halten	-

Tabelle 3-8: Genotypisierungs-Primer und Ergebnisse

	Primer	Ergebnis	Produkt (bp)
Tie2.CreER^{T2}	Primer 1: <i>Tie2.Cre1</i>	<i>positiv</i>	390
	Primer 2: <i>Tie2.Cre2</i>	<i>Wildtyp</i>	-
SMMHC-CreER^{T2}	Primer 1: <i>SMWT_1</i>	<i>positiv</i>	200 + 225
	Primer 2: <i>SMWT_2</i>	<i>Wildtyp</i>	200
	Primer 3: <i>phCREAS</i>		
LepR^{flox}	Primer 1: <i>LepR^{flox}1</i>	<i>homozygot</i>	275
	Primer 2: <i>LepR^{flox}2</i>	<i>heterozygot</i>	227 + 275
		<i>Wildtyp</i>	227
LepR^Δ	Primer 1: <i>LepR^{flox}1</i>	<i>Rekombination</i>	400
	Primer 3: <i>LepR^Δ</i>	<i>keine Rekombination</i>	-

3.1.6 Versuchsgruppen und Versuchsablauf

Zur Untersuchung der Rolle des Leptin-Rezeptors auf Endothelzellen bzw. glatten Muskelzellen auf die vaskuläre Wundheilung wurden die Tie2.CreER^{T2} x LepR_{flox} bzw. SMMHC.CreER^{T2} x LepR_{flox} Mäuse nach erfolgter Genotypisierung, wie in Tabelle 3-9 zusammengefasst, in verschiedene Versuchsgruppen eingeteilt. Des Weiteren wurden normalgewichtige (mit Normalfutter NC gefütterte Mäuse; Abb. 3-4) mit übergewichtigen Mäusen (nach Fütterung einer Hochfettdiät HFD; Abb. 3-5) verglichen.

Tabelle 3-9: Übersicht der Versuchsgruppen zur Untersuchung der Rolle des Leptin-Rezeptors auf Endothelzellen (End.LepR) und glatten Muskelzellen (SMC.LepR) nach Gefäßverletzung

	End.LepR	SMC.LepR		Abkürzung
Testgruppe I (heterozygot)	Tie2.Cre _(+/-) x LepR _{flox/WT}	SMMHC.Cre ₍₊₎ x LepR _{flox/WT}	Tamoxifen	<i>End.LepR-KO / SMC.LepR-KO</i>
Testgruppe II (homozygot)	Tie2.Cre _(+/-) x LepR _{flox/flox}	SMMHC.Cre ₍₊₎ x LepR _{flox/flox}	Tamoxifen	<i>End.LepR-KO / SMC.LepR-KO</i>
Kontrollgruppe I (Tamoxifen-Effekt)	Tie2.Cre _{WT} x LepR _{flox/WT / flox/flox}	(SMMHC.Cre ₍₊₎ x LepR _{WT/WT})	Tamoxifen	<i>End.LepR-WT / (SMC.LepR-WT)</i>
Kontrollgruppe II (Genotyp-Effekt)	Tie2.Cre _(+/-) x LepR _{flox/WT / flox/flox}	SMMHC.Cre ₍₊₎ x LepR _{flox/WT / flox/flox}	ohne Tamoxifen	<i>End.LepR-WT / SMC.LepR-WT</i>

Die experimentelle Gefäßverletzung an der *Arteria Carotis communis sinister* wurde unter Verwendung des Eisen(III)-chlorid-Modells (im Weiteren als FeCl₃-Modell abgekürzt) nach Konstantinides *et al.* durchgeführt [137]. In der nachfolgenden Abbildung 3-4 ist der zeitliche Versuchsablauf unter Normalgewicht schematisch dargestellt.

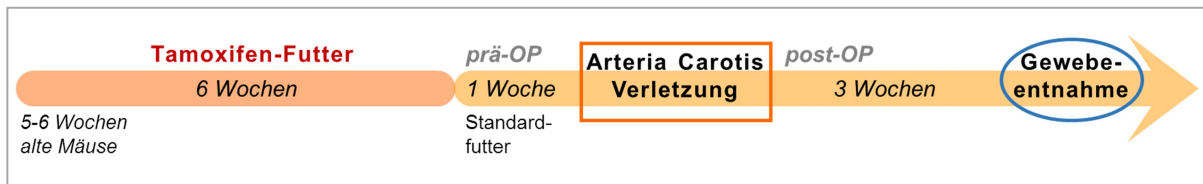


Abbildung 3-4: Zeitlicher Versuchsablauf unter Normalgewicht.

Ein Teil der Mäuse erhielt zur Induktion von Übergewicht und einer systemischen Hyperleptinämie über einen Zeitraum von insgesamt sieben Wochen eine Hochfettdiät mit 45% Fett bezogen auf den Gesamtkaloriengehalt. Die Hochfettdiät begann vier Wochen vor Durchführung der FeCl₃-OP und wurde bis zur Gewebsentnahme drei Wochen nach Gefäßverletzung fortgesetzt (Abb. 3-5).

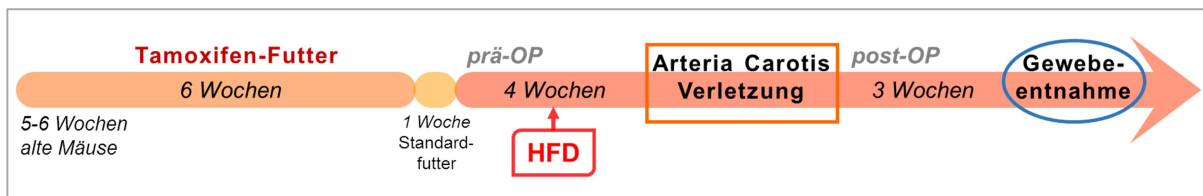


Abbildung 3-5: Zeitlicher Versuchsablauf bei Induktion von Übergewicht durch eine Hochfettdiät (HFD).

Da sich heterozygote und homozygote Mäuse beider Linien bezüglich der Neointimabildung (End.KO: $8.602 \pm 1.079 \mu\text{m}^2$ in LepR_{flox/WT} vs. $7.934 \pm 774 \mu\text{m}^2$ in LepR_{flox/flox}; $p=0,63$ bzw. SMC.KO: $3.848 \pm 686 \mu\text{m}^2$ in LepR_{flox/WT} vs. $4.966 \pm 1.473 \mu\text{m}^2$ in LepR_{flox/flox}; $p=0,44$) und Lumenstenose (End.KO: $20,8 \pm 2,4\%$ in LepR_{flox/WT} vs. $20,4 \pm 1,7\%$ in LepR_{flox/flox}; $p=0,89$ bzw. SMC.KO: $11,8 \pm 2,3\%$ in LepR_{flox/WT} vs. $12,5 \pm 3,5\%$ in LepR_{flox/flox}; $p=0,87$) nach Gefäßverletzung nicht signifikant unterschieden, wurden die Daten der Testgruppe I (heterozygote Mäuse) und II (homozygote Mäuse) in der Präsentation der Ergebnisse in Kapitel 4 zusammengefasst. Auch die Läsionen von End.WT Mäusen der Kontrollgruppe I (Tamoxifen-Effekt) und der Kontrollgruppe II (Genotyp-Effekt) unterschieden sich nicht und wurden ebenfalls zusammengefasst (Neointima: $3.558 [2.147-5.626] \mu\text{m}^2$ in Kontrollgruppe I vs. $3.763 [2.761-4.586] \mu\text{m}^2$ in Kontrollgruppe II; $p=0,65$ bzw. Lumenstenose: $9,4 [4,2-16,2]\%$ in Kontrollgruppe I vs. $10,8 [7,4-14,9]\%$ in Kontrollgruppe II; $p=0,26$) *.

Wie in Abschnitt 3.1.4 bereits begründet, wurden linien- und zuchtbedingt SMMHC.Cre₍₊₎ x LepR_{flox/WT} bzw. LepR_{flox/flox} Mäuse ohne Tamoxifen als Kontrollgruppe verwendet (entsprechen der Kontrollgruppe II), so dass die Untersuchung der Läsionen der Kontrollgruppe I nicht möglich war.

* Die Ergebnisse in diesem Abschnitt sind dargestellt als Mittelwert \pm SEM bzw. als Median mit Interquartilsabstand (Methodik der statistischen Auswertung siehe Abschnitt 3.7).

3.1.7 Experimentelle Gefäßverletzung unter Anwendung des FeCl₃-Modells

Anästhesie

Zur Anästhesie wurde eine 40 IE-Insulinspritze (mit einem 1 ml-Gesamtvolumen; 1 IE entsprechen 25 µl) mit 20 IE einer isotonen 0,9%igen Natriumchloridlösung, 10 IE einer 2%igen Xylazin-Injektionslösung und 10 IE einer 10%igen Ketamin-Injektionslösung befüllt. Nach Bestimmung des Körpergewichts, wurde den männlichen Mäusen 1 IE pro 6 g Körpergewicht intraperitoneal injiziert, um eine einstündige Narkose zu erreichen. Nach Applikation der Narkose wurde die Maus zum Einschlafen in einen mit Papiertüchern ausgelegten Käfig gelegt. Nach vollständiger Relaxierung wurde die Maus aus dem Käfig genommen und die Narkosetiefe mit Hilfe des Zwischenzehenreflexes, d.h. durch Kneifen des Hinterlaufs überprüft. Eine ausreichende Narkosetiefe wurde durch Ausbleiben des Reflexes bestätigt. Die Narkose wurde durch regelmäßige Prüfung der Atemfrequenz (ca. 60 Atemzüge / min) überwacht. Im seltenen Fall eines vorzeitigen Erwachens wurde die Narkose durch eine Inhalationsnarkose mit Isofluran für einige Minuten verlängert. Dazu wurde der Maus unter Überwachung der Atemfrequenz kurzzeitig ein 15 ml-Zentrifugenröhrchen vor die Nase gehalten, das eine mit Isofluran beträufelte Kompresse enthielt. Falls dies für eine ausreichende Narkosetiefe nicht ausreichte, wurden 1-2 IE der Narkose-Lösung intraperitoneal nachgespritzt.

Operation

Zwei Korkplatten wurden mittig auf die Wärmeplatte gelegt und im Abstand von 3-4 cm fixiert. Nachdem die Augen der narkotisierten Maus zum Schutz vor Austrocknung mit *Bepanthen*[®] Augensalbe bedeckt wurden, wurde diese in Rückenlage zwischen die beiden Korkplatten auf die Wärmeplatte (37°C) gelegt, so dass die *Incisura jugularis* auf Höhe der Oberkante der Korkplatten lag. Die Maus wurde an den Extremitäten unter Verwendung von medizinischem Kunstseidenpflaster an den Korkplatten fixiert. Der Unterkiefer wurde mit einem dünnen Klebebandstreifen so fixiert, dass er leicht überstreckt war, jedoch nicht zu stark unter Spannung stand. Der dünne Klebebandstreifen wurde an jeder Seite nochmals mit medizinischem Kunstseidenpflaster fixiert, um ein Ablösen während der OP zu vermeiden. Der operative Eingriff erfolgte unter mikroskopischer Durchsicht bei 15-facher Vergrößerung.

Nachdem das Operationsgebiet großzügig mit 70%igen Ethanol gereinigt und das Fell zur Seite gestrichen wurde, wurde mit der gebogenen Pinzette die Haut oberhalb der *Incisura jugularis* leicht angehoben und mit der Schere ein 1-1,5 cm langer, in Richtung kranial verlaufender Hautschnitt gesetzt. Anschließend wurde das Operationsgebiet mit den groben Pinzetten freigelegt, indem die Verbindung zwischen den beiden *Glandulae submandibulares* getrennt und diese zur Seite geschoben wurden. Um eine gute Ausleuchtung und einen

ausreichenden Zugang zur *Arteria Carotis communis sinister* (in der weiteren Beschreibung als *A. Carotis* abgekürzt) zu gewährleisten, wurde das Operationsgebiet mit den beiden Haltehebeln offen gehalten. Um zur linken *A. Carotis* zu gelangen und diese frei zu präparieren, wurden mit den feinen Pinzetten die einzelnen Faszien sowie die verbindenden Faszien der parallel zur *A. Carotis* verlaufenden *Vena jugularis* durchtrennt. Auch die Faszien zwischen dem dorsal zur *A. Carotis* liegenden *Nervus vagus* wurden durchtrennt, indem mit der Pinzettenspitze gegen die Faszie gedrückt und die Pinzette dabei vorsichtig geöffnet wurde. Dieser Vorgang wurde mehrfach wiederholt, um die *A. Carotis* von der Carotisbifurkation bis hin zum Dreieck zwischen dem *Musculus sternocleidomastoideus* und der Trachea von den Faszien zu lösen. Nach Entfernen der Adventitia im Bereich des *Trigonum caroticum*, wurde die *A. Carotis* mit Hilfe der feinen Pinzetten zur besseren Darstellung unterfädelt. Anschließend wurde die *A. Carotis* mit Hilfe eines Dopplerschall-Kopfes „aufgegabelt“ und leicht aus ihrer physiologischen Lage gehoben. Dabei musste darauf geachtet werden, dass die *A. Carotis* nicht zu stark gespannt und der Blutfluss nicht beeinträchtigt wurde. Der Dopplerschall-Kopf wurde so platziert, dass kaudal ausreichend Platz für das Filterpapier vorhanden war (Abb. 3-6 A). Nach richtiger Platzierung der *A. Carotis* wurde das zuvor mit einer 10%igen Eisenchlorid-Lösung (Herstellung siehe Kapitel 2.15) getränkte Filterpapier (0,5 x 1 mm) mit Hilfe der feinen Pinzetten kaudal des Dopplerschall-Kopfes gelegt und in die richtige Position parallel zur *A. Carotis* gebracht, so dass kein Kontakt zum umliegenden Gewebe bestand (Abb. 3-6 B). Nach exakt drei Minuten wurde das Filterpapier vorsichtig mit der Pinzette an einer Ecke gegriffen und mit dem Filterpapier nochmals lateral zur Auflagefläche an der *A. Carotis* entlanggestrichen, bevor es komplett entfernt und verworfen wurde. Anschließend wurde die *A. Carotis* mit Hilfe einer Transferpipette mit PBS umspült. Während einer Beobachtungszeit von ca. 10 min wurden nach einigen Minuten an der Läsionsstelle ein gelblicher Thrombus sowie eine Minderperfusion hinter der Läsion sichtbar. Dann wurden der Dopplerschall-Kopf, die Fäden und die Haltehebel vorsichtig entfernt (Abb. 3-6 C).

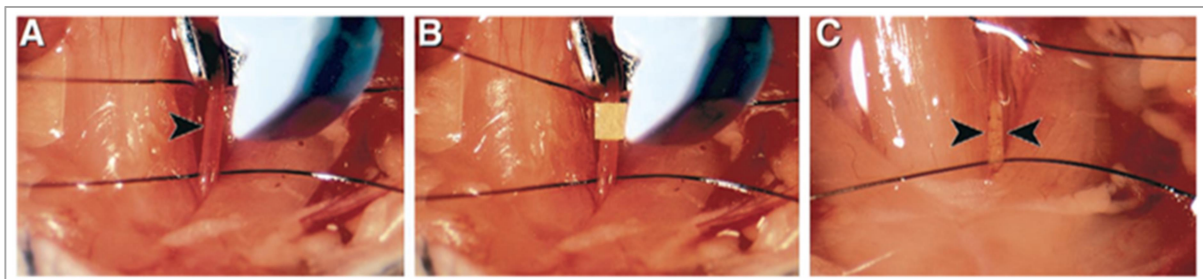


Abbildung 3-6: Mausmodell der FeCl_3 -induzierten Gefäßverletzung der *Arteria carotis communis sinister* (nach [137]).

Zum Schluss wurden, nachdem das PBS wieder aufgesaugt wurde, die beiden *Glandulae submandibulares* wieder über das *Trigonum caroticum* gelegt und die Operationswunde über eine Hautnaht mit fünf bis sechs Einzelknopfnähten (*Ethilon 6-0 Polyamid*) verschlossen. Zum Aufwachen wurde die Maus in einen leeren, mit Papiertüchern ausgelegten Käfig gelegt und mit einem Papiertuch bedeckt. Um die Auskühlung zu vermeiden, wurde der Käfig während der Aufwachphase mit einer Infrarotlampe bestrahlt. Die verwendeten Instrumente und der OP-Tisch wurden nach jeder erfolgten OP mit 70%igem Ethanol gereinigt.

Blutentnahme und Entnahme der Arteria Carotis

Die Erfassung des Körpergewichts, Anästhesie und Fixierung der Maus sowie die Präparation, um an das Operationsgebiet zu gelangen, wurden analog zur Vorgehensweise bei der OP durchgeführt. Aufgrund der Verwachsungen durch die OP wurde bei der Freipräparation nochmals besonders auf den Verlauf der Blutgefäße und des *Nervus vagus* geachtet. Um Verletzungen zu vermeiden und zur Bewahrung der Stabilität der *A. Carotis* wurde diese im Gegensatz zur OP nur grob freipräpariert und noch etwas umliegendes Bindegewebe um die *A. Carotis* herum belassen. Anschließend wurde zur Blutentnahme das Herz mit Hilfe einer 1 ml-Spritze mit gelber Kanüle punktiert. Nach einem großzügigen Hautschnitt über dem Thorax wurde die Haut aufgeklappt und der Thorax geöffnet. Unterhalb des Herzens wurde die Aorta und die *Vena cava* durchtrennt, um den venösen Rückstrom zum Herzen zu unterbrechen. Die Perfusion der *A. Carotis* erfolgte mit Hilfe von Perfusionsbesteck und einer 5 ml-Spritze, indem der linke Herzventrikel punktiert und zwei bis drei Milliliter Zinkformalin (Herstellung der Gebrauchslösung siehe Kapitel 2.15) langsam durch den Kreislauf gespritzt wurden. Die erfolgreiche Perfusion wurde unter dem Mikroskop anhand der Weißfärbung der *A. Carotis* überprüft. Zur Vorfizierung wurden anschließend von außen einige Tropfen Zinkformalin auf die *A. Carotis* getropft und nach ca. einer Minute der Rest wieder entfernt. Im Anschluss wurde unter mikroskopischer Kontrolle die *A. Carotis* auf Höhe der Bifurkation mit einer feinen Pinzette fixiert und etwas oberhalb mit einer Federschere durchtrennt. Die Fixierung wurde beibehalten und die *A. Carotis* etwa ein bis zwei Millimeter unterhalb der Läsion ebenfalls durchtrennt. Der entnommene Abschnitt wurde in einen mit Zinkformalin-Gebrauchslösung befüllten Glasbecher mit Schraubdeckel überführt und nach einer vierstündigen Fixierung bei Raumtemperatur (RT) bis zur Paraffin-Einbettung in 70%igen Ethanol transferiert. Außerdem wurde das viszerale Fettgewebe (VAT) entnommen und dessen Gewicht erfasst.

3.1.8 Serum-Gewinnung und -Analyse

Direkt nach der Blutentnahme wurde das Blut in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und für mindestens 30 min, jedoch nicht länger als 60 min, aufrecht bei RT koaguliert. Das koagulierte Blut wurde für 10 min bei 3.000 rpm zentrifugiert und das gewonnene Serum in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Die Lagerung bis zur weiteren Analyse erfolgte bei -80°C. Die Bestimmungen von Glukose, Cholesterin und Triglyzeriden im Serum erfolgten mittels Enzym-basierter Assay Kits. Die quantitativen kolorimetrischen Bestimmungen wurden gemäß Datenblatt des Herstellers durchgeführt. Zur Serum-Bestimmung von Leptin und dessen löslicher Rezeptor wurden entsprechende *Enzyme-linked Immunosorbent Assays* (ELISAs) verwendet, die nach Herstellerangaben durchgeführt wurden. Der „Freie Leptin Index“ FLI (*free leptin index*) beschreibt das Verhältnis von zirkulierendem Leptin zum löslichen Leptin-Rezeptor (*soluble LepR*, *sLepR*) [80].

3.1.9 Blutdruckmessung

Der mittlere systolische (*systolic blood pressure*, SBP) und diastolische (*diastolic blood pressure*, DPB) Blutdruck wurde nicht-invasiv nach der „Tail Cuff“-Methode unter Verwendung des Blutdruckmesssystems *CODA™ Monitor* in der Schwanzarterie der unnarkotisierten wachen Maus gemäß der Bedienungsanleitung des Herstellers bestimmt. Pro Maus wurden mindestens drei Messungen durchgeführt. Der mittlere arterielle Blutdruck (*mean arterial pressure*, MAP) wurde anhand der folgenden Formel berechnet:

$$MAP = [SBP + (2 \times DBP)] / 3$$

Die Blutdruckmessungen wurden von Dr. rer. nat. [REDACTED] [REDACTED] an der Universitätsmedizin Göttingen durchgeführt.

3.2 Histologische Untersuchung der Gefäßverletzung

3.2.1 Paraffineinbettung und Anfertigung von Paraffinschnitten

Die Paraffineinbettung der bereits in Zinkformalin fixierten und in 70%igen Ethanol transferierten Carotisarterien wurde manuell in Einbettkassetten, wie in Tabelle 3-10 beschrieben, durchgeführt. Nach Beenden des Einbettvorgangs wurden die mit Paraffin durchtränkten Carotisarterien in einer Paraffinausgießstation zu Paraffinblöcken ausgegossen. Wie in Abbildung 3-7 schematisch gezeigt, wurden über den gesamten Läsionsbereich 5 µm dicke Serienschnitte mit einem 50 µm-Intervall angefertigt.

Tabelle 3-10: Manuelle Paraffineinbettung

Schritt	Gefäß	Medium	Dauer
<i>Entwässern</i>	1	70% Ethanol	5 min
	2	80% Ethanol	5 min
	3	80% Ethanol	30 min
	4	96% Ethanol	60 min
	5 + 6	100% Ethanol	jeweils 15 min
	7	100% Ethanol	30 min
<i>Intermedium</i>	8 + 9	Chloroform	jeweils 60 min
<i>Einbetten</i>	10	Paraffin	15 min
	11 + 12	Paraffin	jeweils 30 min

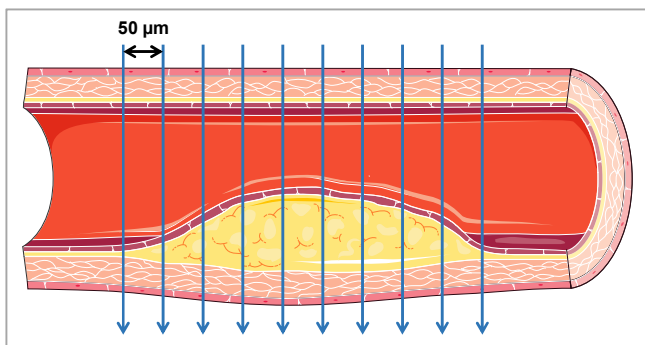


Abbildung 3-7: Schematische Darstellung der Anfertigung von Serienschnitten mit einem 50 µm-Intervall im Läsionsbereich 21 Tage nach Gefäßverletzung unter Anwendung des FeCl₃-Modells. (Die Abbildung wurde unter Verwendung der -Powerpoint image bank- von Servier Medical Art zusammengestellt.)

3.2.2 Morphometrische Quantifizierung der Neointimabildung

Verhoeff's Elastica-Färbung

Zur morphometrischen Quantifizierung der Neointimabildung wurden die *elastischen Laminae* der Gefäßwand mit Hilfe der Verhoeff's Elastica-Färbung angefärbt (siehe Tab. 3-11). Hierfür wurde jeder zweite Serienschnitt verwendet, so dass der Neointima-Verlauf in einem Intervall von 100 µm gleichmäßig über die gesamte Läsion dargestellt werden konnte.

Die Färbelösungen wurden wie in Kapitel 2.15 beschrieben angesetzt. Die Verhoeff's Elastica-Gebrauchslösung wurde immer frisch kurz vor Verwendung angesetzt. Die Xylol- und die auf- bzw. absteigenden Ethanol-Reihen sowie die Van Gieson-Lösung (Roth) konnten für mehrere Färbedurchgänge wiederverwendet werden, während die 2%ige Eisenchlorid-Lösung und die 5%ige Natriumthiosulfat-Pentahydrat-Lösung nach jedem Durchgang erneuert wurden. Innerhalb eines Färbedurchgangs wurden bei nicht ausreichender Differenzierung der einzelnen *elastischen Laminae* die Objektträger erneut für etwa 20 s in die 2%ige Eisenchlorid-Lösung und anschließend für 1 min in die 5%ige Natriumthiosulfat-Pentahydrat-Lösung getaucht (die Lösungen wurden dabei wiederverwendet).

Tabelle 3-11: Verhoeff's Elastica-Färbung von paraffinfixierten Carotisarterien

Schritt	Medium	Dauer
Entparaffinieren	Xylol	jeweils 5 min
Wässern	<u>Absteigende Ethanolreihe:</u> 100% Ethanol (2-mal); 96% Ethanol (2-mal) 70% Ethanol; 50% Ethanol	jeweils 2 min
Färbung	Verhoeff's Elastica-Gebrauchslösung	15 min
Waschen	fließendes Leitungswasser (lauwarm)	20 min
	ddH ₂ O	5 min
Differenzierung (unter mikroskopischer Kontrolle)	2%ige Eisenchlorid-Lösung	ca. 2 min 30 s
	5%ige Natriumthiosulfat-Pentahydrat-Lösung	1 min
Waschen	Leitungswasser (lauwarm)	5 min
	ddH ₂ O	5 min
Gegenfärbung	Van Gieson-Lösung	< 1 min (ca. 50-55 s)
Entwässern	<u>Aufsteigende Ethanolreihe:</u> 96% Ethanol (2-mal), 100% Ethanol (2-mal)	jeweils 2 min
Fixierung	Xylol	jeweils 2 min
Eindecken	Eindeckmittel <i>Entellan</i> und Deckgläschen	trocknen (über Nacht)

Morphometrische Auswertung der Verhoeff's Elastica Färbung

Mit einem Olympus BX51-Mikroskop unter Verwendung der Software *Image-Pro® Plus* wurden in 100-facher Vergrößerung Bilder von jedem Serienschnitt angefertigt. Für die morphometrische Auswertung wurden nur die Bereiche mit sichtbarer Gefäßverletzung (erkennbar an der Aufhebung der Wellenform der *Laminae elasticae* aufgrund des verletzungsbedingten Verlusts glatter Muskelzellen in der Media) verwendet. Mit Hilfe der *Image Pro® Plus*-Software wurde zunächst die *Membrana elastica interna* umrandet und als PG1 bezeichnet. Als PG2 wurde die innere Begrenzung des Gefäßlumens bezeichnet, die

auf der unverletzten Seite entlang der *Membrana elastica interna* und auf der verletzten Seite entlang des *Neointimalumens* verlief. Die dritte Markierung PG3 ergab sich aus der Umrandung der *Membrana elastica externa*. Zur Berechnung der unterschiedlichen Parameter wurden die Flächen und Längen dieser drei Messwerte in eine Excel-Vorlage transferiert. In der Abbildung 3-8 ist beispielhaft die Auswertung eines Serienschnittes gezeigt und in Tabelle 3-12 sind die ermittelten Parameter zusammengefasst. Pro Arterie wurde der Mittelwert aller Serienschnitte (100 µm Intervall) mit sichtbarer Läsion berechnet.

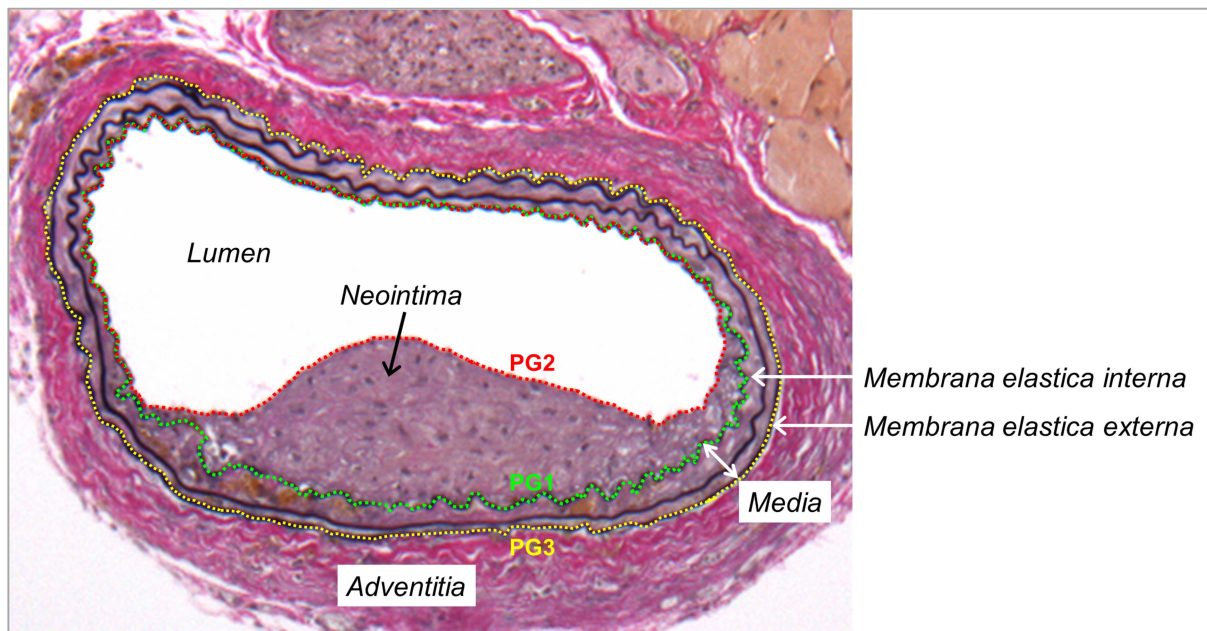


Abbildung 3-8: Darstellung der morphometrischen Auswertung.

Tabelle 3-12: Zusammenfassung und Berechnung der morphometrischen Parameter

Parameter (Einheit)	Berechnung
Neointima (µm ²)	Fläche PG1 – Fläche PG2
Lumenstenose (%)	100 – (Fläche PG2 / Fläche PG1) x 100
Media (µm ²)	Fläche PG3 – Fläche PG1
Intima-Media-Verhältnis	Neointima / Media
Gefäßgröße (µm ²)	Fläche PG3
Membrana elastica externa Länge (µm)	Länge PG3

3.3 Immunhistologische Untersuchungen

3.3.1 Immunhistochemie (IHC)

Allgemeines immunhistochemisches Färbeprotokoll von Paraffinschnitten

Die Herstellung der verwendeten Lösungen ist in Kapitel 2.15 beschrieben. Die Paraffinschnitte wurden dreimal für jeweils 5 min in Xylol entparaffiniert und zweimal für jeweils 2 min in 100%igen Ethanol getaucht. Die Blockierung der endogenen Peroxidase erfolgte abgedunkelt für 10 min in einer 3%igen H₂O₂-Lösung in Methanol. Anschließend wurden die Paraffinschnitte in einer absteigenden Ethanolreihe (zweimal in 96%igem Ethanol sowie je einmal in 70%igem und 50%igem Ethanol) für jeweils 2 min entwässert und in ddH₂O für 5 min gewaschen. Optional folgte je nach verwendetem Antikörper ein Permeabilisierungsschritt für 10 min bei 37°C in 0,05%igem Triton-X100-Puffer. Die Epitope wurden demaskiert, indem die Objektträger je nach verwendetem Antikörper in 500 ml 1x Citratpuffer (0,01 M Gebrauchslösung, pH 6,0) für 6 min bzw. 0,01 M Tris/ 0,001 M EDTA-Puffer (1x Gebrauchslösung, pH 9,0) für 11 min bei 800 Watt in der Mikrowelle erhitzt wurden. Nach Abkühlung des Puffers nach ca. 20 min wurde mit Hilfe des *PAP Pens* eine hydrophobe Barriere um die Carotisarterien herum gezogen, um ein Auslaufen der Antikörper-Lösung während der Inkubationszeit zu verhindern. Zum Blockieren unspezifischer Bindungsstellen wurden die Carotisarterien mit jeweils einem Tropfen 5%igem bzw. 10%igem Normalserum der Spezies des Wirtes des Sekundär-Antikörpers (hier: *Normal Goat Serum*) vollständig benetzt und für 30 min inkubiert. Nachdem die Blockierungs-Lösung durch vorsichtiges seitliches Klopfen des Objektträgers auf eine Papierunterlage entfernt wurde, wurden jeweils 25 µl Antikörper-Verdünnung (Primär-Antikörper) pro Carotisarterie aufgetragen und über Nacht bei 4°C in einer, um das Austrocknen zu vermeiden, mit feuchten Tüchern ausgelegten verschlossenen Schale inkubiert. Als Negativkontrolle wurde pro Objektträger auf jeweils eine Carotisarterie lediglich das Verdünnungsmedium des Primär-Antikörpers (1x PBS bzw. AB-Diluent) aufgetragen. Am nächsten Tag wurden die Schnitte dreimal für jeweils 5 min in 1x PBS gewaschen und der Sekundär-Antikörper in einer 1:1000 Verdünnung in 1x PBS für 60 min bei RT inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit 1x PBS wurde der Sekundär-Antikörper unter Verwendung des ABC-Kits mit Avidin/Biotin-gekoppelter Peroxidase nach Herstellerangaben gekoppelt. Nach einer 30-minütigen Inkubationszeit bei RT und dreimaligem Waschen in 1x PBS, folgte die Inkubation mit einem in ddH₂O frisch angesetzten Peroxidase Substrat-Chromogen-Komplex. Hierfür wurde das AEC-Kit mit dem Chromogen *3-Amino-9-ethylcarbazole* bzw. das DAB-Kit mit dem Chromogen *3,3'-Diaminobenzidine* gemäß Herstellerangaben verwendet. Die enzymatische Umsetzung wurde anhand der Farbentwicklung über einen Zeitraum von

maximal 30 min mikroskopisch beobachtet und zum Abstoppen der Reaktion für 5 min in ddH₂O gewaschen. Zur Gegenfärbung wurden die Objektträger drei bis fünf Mal in Hämatoxylin Gill Nr.3 getaucht und unter fließendem Leitungswasser „gebläut“ und gespült bis das Wasser klar wurde. Bei der Verwendung des Chromogens AEC wurden die Objektträger nach einem zweiminütigem Waschschrift in ddH₂O blasenfrei mit dem Eindeckmittel *Immu-MountTM* eingedeckt und über Nacht getrocknet. Bei Verwendung des Chromogens DAB wurden die Objektträger nach einem 5-minütigem Waschschrift in ddH₂O in einer aufsteigenden Ethanolreihe für jeweils 2 min entwässert (je zweimal in 96% Ethanol und 100% Ethanol) und über Xylol (5 min) mit dem Eindeckmittel *Entellan* eingedeckt.

Spezifische Färbebedingungen zum immunhistochemischen Nachweis

In Tabelle 3-13 sind die spezifischen Färbebedingungen zum immunhistochemischen Nachweis des Proliferations-Markers PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*), des glatten Muskelzell-Markers SMA (*smooth muscle α -actin*) und des Endothel-Markers CD31 (*cluster of differentiation 31*) dargestellt. Inflammatorische Zellen wurden unter Verwendung von Antikörpern gegen CD45 (*cluster of differentiation 45*), zum Nachweis hämatopoetischer Zellen, und F4/80 (ein Zelloberflächen-Glykoprotein) zum Nachweis von Gewebsmakrophagen, visualisiert.

Tabelle 3-13: Spezifische Färbebedingungen der verwendeten Antikörper für die Immunhistochemie (IHC)

Primär-Antikörper	Verdünnung in Medium	Permeabilisierung	Blockierung	Sekundär-Antikörper	Chromogen
Rat anti-mouse CD31	1:20 in AB-Diluent	0,05% Triton-X100	5% Normal <u>Goat</u> Serum	Biotin-xx <u>goat</u> -anti- <i>rat</i> IgG	AEC
Rat anti-mouse CD45	1:100 in 1x PBS	-	10% Normal <u>Goat</u> Serum	Biotin-xx <u>goat</u> -anti- <i>rat</i> IgG	DAB
Rat anti-mouse F4/80	1:200 in 1x PBS	-	5% Normal <u>Goat</u> Serum	Biotin-xx <u>goat</u> -anti- <i>rat</i> IgG	DAB
Rabbit anti-mouse PCNA	1:400 in 1x PBS	-	10% Normal <u>Goat</u> Serum	Biotin-xx <u>goat</u> -anti- <i>rabbit</i> IgG	DAB
Mouse anti-mouse SMA	1:800 in 1x PBS	-	10% Normal <u>Goat</u> Serum	Biotin-xx <u>goat</u> -anti- <i>mouse</i> IgG	AEC

3.3.2 Immunfluoreszenz (IF)

Gefriereinbettung und Anfertigung von Gefrierschnitten

Für histologische Untersuchungen der Gefäßstruktur unter Basalbedingungen mittels Immunfluoreszenz wurde von nicht operierten Mäusen die unverletzte *Arteria Carotis* wie im Abschnitt 3.1.7 beschrieben entnommen. Zur Gefriereinbettung wurden die Mäuse mit einer am Tag der Entnahme frisch angesetzten 4%igen PFA-Lösung (Herstellung siehe Kapitel 2.15) perfundiert und der entnommene Abschnitt für 2 h auf dem Schwenktisch bei RT fixiert. Nach dreimaligem Waschen in 1x PBS folgte eine weitere Fixierung der Carotisarterien für jeweils 24 h bei 4°C, zuerst in einer 15%igen und dann in einer 30%igen Saccharose-Lösung (Herstellung siehe Kapitel 2.15). Anschließend wurden die Carotisarterien in *Tissue-Tek*[®] *O.C.T.*[™] *Compound* eingebettet. Bis zur Anfertigung von Gefrierschnitten wurden die Kryoblöcke bei -80°C und die 8 µm-dicken Querschnitte wurden bis zur Färbung bei -20°C gelagert.

Allgemeines Färbeprotokoll für die Immunfluoreszenz auf Gefrierschnitten

Nach dem Auftauen der Gefrierschnitte für ca. 5 min wurden diese für 5 min in 1x PBS gewässert und für 10 min bei -20°C in Aceton fixiert und anschließend für weitere 5 min unter dem Abzug getrocknet, gefolgt von einem erneuten Wässern für 5 min in 1x PBS. Die Carotisarterien wurden für 10 min bei 37°C in einem 0,05% bzw. 0,2%igem Triton-X100-Puffer (Herstellung siehe Kapitel 2.15) permeabilisiert und anschließend dreimal für jeweils 5 min in 1x PBS gewaschen. Vor dem Auftragen des Primär-Antikörpers (25 µl pro Carotisarterie) wurden die Carotisarterien mit Hilfe des *PAP Pen* eingezirkelt. Pro Objektträger wurde jeweils eine Negativkontrolle mitgeführt, indem statt des Primär-Antikörpers lediglich dessen Verdünnungsmedium (1x PBS) aufgetragen wurde. Die Inkubation des Primär-Antikörpers erfolgte in einer feuchten Kammer bei 4°C über Nacht. Am darauf folgenden Tag wurden die Objektträger nach dreimaligem Waschen in 1x PBS für jeweils 5 min mit dem Sekundär-Antikörper zusammen mit dem DNA-Farbstoff DAPI (*4',6-Diamidino-2-phenylindol Dihydrochlorid*) zur Zellkernmarkierung für 60 min bei RT inkubiert. Hierfür wurde zunächst DAPI 1:5000 in 1x PBS verdünnt. In dieser Lösung wurde dann eine 1:500 Verdünnung des Sekundär-Antikörpers angesetzt. Anschließend wurden die Objektträger erneut für jeweils 5 min in 1x PBS gewaschen und für 2 min in ddH₂O gespült, bevor diese mit dem Eindeckmittel *Fluorescence Mounting Medium* eingedeckt wurden. Die Objektträger wurden lichtgeschützt getrocknet und bei 4°C gelagert.

Spezifische Färbebedingungen zum Nachweis mittels Immunfluoreszenz

In Tabelle 3-14 sind die spezifischen Immunfluoreszenz-Färbebedingungen zusammengefasst. Der immunhistologische Nachweis einer reduzierten Expression des Leptin-Rezeptors (LepR) auf Endothel- bzw. glatten Muskelzellen wurde auf Gefrierschnitten unverletzter Carotisarterien durchgeführt. Zur weiteren Untersuchung möglicher Auswirkungen der LepR-Defizienz bzw. HFD-Fütterung wurden Immunfluoreszenz-Färbungen zum Nachweis des vom Endothel produzierten Peptidhormon Endothelin-1 (ET-1), des Hormons Leptin und des Endothel-Markers CD31 durchgeführt. Des Weiteren wurden die endotheliale (eNOS) und induzierbare (iNOS) NO-Synthase sowie die Cyclooxygenasen 1 und 2 (COX-1 und COX-2) mittels Immunfluoreszenz nachgewiesen.

Der Nachweis von ET-1 auf Paraffinschnitten wurde bis einschließlich der Inkubation über Nacht wie im Allgemeinen immunhistochemischen Färbeprotokoll von Paraffinschnitten (Abschnitt 3.3.1) beschrieben durchgeführt. Am darauf folgenden Tag wurde die Färbung nach dem allgemeinen Färbeprotokoll für die Immunfluoreszenz auf Gefrierschnitten (Abschnitt 3.3.2) fortgesetzt.

Zum Nachweis von eNOS wurde kein Permeabilisierungs-Schritt durchgeführt. Zur Reduzierung des Hintergrundes erfolgte bei der Verwendung der Antikörper gegen eNOS und ICAM-2 direkt nach dem Einzirkeln der Carotisarterien und vor der Inkubation mit dem Primär-Antikörper ein Blockierungs-Schritt (Herstellung der Blockierungs-Puffer I und II siehe Kapitel 2.15) für 60 min bei RT.

Die Markierung des Endothels erfolgte mit Hilfe des *Texas Red[®] labeled Lycopersicon Esculentum (Tomato) Lectins* (LEL). Dabei handelt es sich um ein Lectin aus der Tomate mit einer einzigen stabilen Glykoprotein-Untereinheit, welches an Glykophorin und Tamm-Horsfall Glykoprotein bindet und zur Markierung des Endothels bei Nagetieren verwendet wird. Der erste Tag der LEL-Färbung wurde ebenfalls bis einschließlich der Inkubation über Nacht analog zum allgemeinen immunhistochemischen Färbeprotokoll von Paraffinschnitten (Abschnitt 3.3.1) mit Permeabilisierungs-Schritt in 0,05%igem Triton-X100-Puffer durchgeführt, wobei LEL 1:200 in 1x PBS verdünnt wurde. Der zweite Tag der Färbung entsprach dem allgemeinen Färbeprotokoll für die Immunfluoreszenz auf Gefrierschnitten (Abschnitt 3.3.2) mit dem Unterschied, dass aufgrund der direkten Kopplung des LEL mit dem Fluorochrome *Texas Red[®]* die Verwendung eines Fluoreszenzmarkierten Sekundär-Antikörpers entfiel und lediglich mit DAPI inkubiert wurde.

Tabelle 3-14: Spezifische Färbebedingungen der verwendeten Antikörper für die Immunfluoreszenz (IF)

Primär-Antikörper	Verdünnung in Medium	Permeabilisierung	Blockierung	Sekundär-Antikörper
Rat anti-mouse CD31	1:50 in 1x PBS	0,05% Triton-X100-Puffer	-	Alexa Fluor® 555 donkey anti-rat IgG
Rabbit anti-mouse COX-1	1:100 in 1x PBS	0,05% Triton-X100-Puffer	-	MFP555 goat anti-rabbit IgG
Rabbit anti-mouse COX-2	1:50 in 1x PBS	0,05% Triton-X100-Puffer	-	MFP555 goat anti-rabbit IgG
Rabbit anti-mouse eNOS	1:50 in 1x PBS	-	Blockierungs-Puffer II	MFP555 goat anti-rabbit IgG
Rabbit anti-mouse ET-1	1:50* / 1: 500** in 1x PBS	0,05% Triton-X100-Puffer	-	MFP555 goat anti-rabbit IgG
Rat anti-mouse ICAM2	1:100 in 1x PBS	0,2% Triton-X100-Puffer	Blockierungs-Puffer I	Alexa Fluor® 555 donkey anti-rat IgG
Rabbit anti-mouse iNOS	1:50 in 1x PBS	0,05% Triton-X100-Puffer	-	MFP555 goat anti-rabbit IgG
Rabbit anti-mouse LepR	1:50 in 1x PBS	0,05% Triton-X100-Puffer	-	MFP555 goat anti-rabbit IgG
Goat anti-mouse Leptin	1:10 in 1x PBS	0,05% Triton-X100-Puffer	-	MFP555 donkey anti-goat IgG

* Verdünnung bei der Anwendung auf Gefrierschnitten

** Verdünnung bei der Anwendung auf Paraffinschnitten

3.3.3 Aufnahme und morphometrische Auswertung der immunhistologischen Färbungen

Mit dem *Olympus BX51*-Mikroskop wurden Bilder in 200-facher, 400-facher und 1000-facher Vergrößerung aufgenommen. Die immunhistochemischen Färbungen (IHC) wurden im Hellfeld bei Durchlichtbeleuchtung aufgenommen. Die Aufnahmen der Immunfluoreszenzfärbungen (IF) erfolgten unter Aufsicht-Fluoreszenz-Anregung (mit einer Quecksilberdampflampe bei geschlossenem Durchlicht) mit Filtern für DAPI und Cy3. Dabei lag das Absorptions- und Emissions-Maximum des sich an doppelsträngige DNA anlagernden Farbstoffs DAPI, welcher zum Anfärben der Zellkerne verwendet wird, bei 358 nm bzw. 461 nm (blau). Das Absorptions- bzw. Emissions-Maximum des an den Fluoreszenzfarbstoff *MFP555* gekoppelten Sekundär-Antikörpers lag bei 560 nm und 585 nm (rot) und eignete sich somit entsprechend für die Verwendung des Cy3-Filters. Das Anregungs- und Emissions-Maximum des verwendeten *Texas Red*® markierten Lectins (LEL) lag bei 595 nm und 615 nm, so dass dieses unter Verwendung des Cy3-Filters aufgenommen werden konnte.

Die morphometrische Auswertung erfolgte unter Verwendung der Software *Image-Pro® Plus*. Die PCNA-Quantifizierung wurde als Anzahl PNCA-positiver Zellen pro Neointima bzw. Media dargestellt. Die SMA-positive Fläche wurde ermittelt und der prozentuale Anteil bezogen auf die Neointima berechnet. Im Bereich der Neointima bzw. des Endothels wurde der prozentuale Anteil der CD31-positiven bzw. ET-1-positiven Fläche ermittelt. Des Weiteren wurde die ET-1-positive Fläche im Bereich der Media ermittelt und der prozentuale Anteil bezogen auf die gesamte Media berechnet. Die Quantifizierung inflammatorischer Zellen erfolgte anhand der CD45- und F4/80-positiven Fläche pro Neointima bzw. Media.

3.3.4 Immunzytochemie und konfokale Mikroskopie

Für die immunzytochemischen Untersuchungen wurden murine primäre pulmonale Endothelzellen (mPECs) isoliert aus den Lungen von End.LepR-WT und -KO Mäusen (Isolation und Kultivierung siehe Abschnitt 3.4.1) und humane umbilikale venöse Endothelzellen (HUVECs; Kultivierung siehe Abschnitt 3.4.3) in 6-Well Zellkulturschalen auf mit 0,2%iger Gelatine beschichteten Borosilikat-Deckgläsern (Durchmesser 13 mm) im Inkubator bei 37°C und 5% CO₂ in dem entsprechenden mPEC- bzw. HUVEC-Medium (Zusammensetzung der Medien siehe Kapitel 2.15) kultiviert. Bei Erreichen einer Konfluenz von ca. 80-90% wurden die mPECs mit 10 ng/ml murinem rekombinantem Leptin stimuliert, während die HUVECs mit 1, 10 und 25 µM des PPAR γ -Antagonisten T0070907 bzw. der entsprechenden DMSO-Kontrolle inkubiert wurden. Nach einer einstündigen Inkubationszeit wurden die Zellen für 10 min bei -20°C mit Aceton fixiert und anschließend dreimal mit 1x PBS gewaschen. Die Deckgläser wurden aus den 6-Well Zellkulturschalen entnommen und die Zellen in 0,2%igem Triton-X 100-Puffer (Herstellung siehe Kapitel 1.15) für 5 min bei RT permeabilisiert. Nach einem viermaligen Waschschrift in 1x PBS wurden unspezifische Antigen-Bindungsstellen in 1%igem BSA (in 1x PBS; Herstellung siehe Kapitel 2.15) für 7 min bei RT blockiert. Zur Doppel-Immunfluoreszenzfärbung wurden die mPECs mit Primär-Antikörpern gegen *c-jun* (eine Untereinheit des Transkriptionsfaktors AP-1) und des Endothelzell-Markers CD31 für 60 min inkubiert, während die HUVECs allein mit dem Anti-*c-jun*-Antikörper ebenfalls für 60 min inkubiert wurden (es wurden ca. 100 µl Antikörper-Verdünnung pro Deckglas verwendet, so dass die gesamte Oberfläche bedeckt war). Nach einem viermaligen Waschschrift in 1x PBS wurden die Zellen für 30 min bei RT mit FITC488-oder MFP555-konjugierten Sekundär-Antikörpern (1:500 in 1x PBS verdünnt) und dem DNA-Farbstoff DRAQ5TM (1:1000 in 1x PBS verdünnt; Anregungswellenlänge von 647 nm) inkubiert. Nach viermaligem Waschen mit 1x PBS wurden die Deckgläser mit dem Eindeckmittel *Fluorescence Mounting Medium* auf Objektträgern eingedeckt, lichtgeschützt getrocknet und bei 4°C gelagert. Die Aufnahmen der gefärbten Zellen wurden am Zeiss *LSM 710*

Konfokalmikroskop von Dr. phil. [REDACTED] durchgeführt. Zur Quantifizierung wurde der prozentuale Anteil *c-jun*-positiver Zellkerne bezogen auf die gesamten Zellkerne pro Aufnahme berechnet. Die spezifischen Färbebedingungen der für die Immunzytometrie verwendeten Antikörper sind in der nachfolgenden Tabelle 3-15 zusammengefasst.

Tabelle 3-15: Spezifische Färbebedingungen der verwendeten Antikörper für die Immunzytometrie (ICC)

Primär-Antikörper	Verdünnung in Medium	Permeabilisierung	Blockierung	Sekundär-Antikörper
<i>Rat anti-mouse CD31</i> (DIA-310)	1:100 in 1x PBS	0,2% Triton-X100-Puffer	1% BSA in 1x PBS	FITC donkey anti- <i>rat</i> 488
<i>Rabbit anti-mouse/ anti-human c-jun</i>	1:100 in 1x PBS	0,2% Triton-X100-Puffer	1% BSA in 1x PBS	MFP555 goat anti- <i>rabbit</i> IgG

3.4 *Ex vivo* und *in vitro* Untersuchungen

Bei der Isolation von Primärzellen wurde in der methodischen Beschreibung angemerkt, ab welchem Schritt unter sterilen Bedingungen gearbeitet wurde. Alle anderen Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen in der Sterilwerkbank Heraeus *HeraSafe KS 15* durchgeführt. Die Kultivierung sowohl der primären Zellen als auch der verwendeten Zelllinien erfolgte in einem dafür geeigneten Inkubator bei 37°C und 5% CO₂.

3.4.1 Isolation und Kultivierung CD31-positiver Endothelzellen aus der Maus-Lunge unter Verwendung von MicroBeads

Zellisolation

Die benötigten Lösungen und Medien für die Zellisolation primärer pulmonaler Endothelzellen (mPECs) wurden wie in Kapitel 2.15 beschrieben angesetzt. Der Lyse-Puffer mit der Collagenase A wurde immer frisch am Tag der Isolation angesetzt. Zwei 25 cm²-Zellkulturflaschen wurden mit einer 0,2%igen Gelatine-Lösung beschichtet. Hierfür wurde der Boden der Zellkulturflasche mit 2 ml 0,2%iger Gelatine-Lösung vollständig bedeckt und für 30 min bei 37°C im Inkubator bei 5% CO₂ inkubiert. Anschließend wurde die Gelatine-Lösung abgesaugt und einmal mit 5 ml 1x PBS gewaschen, so dass der Flaschenboden nur mit einem dünnen Film beschichtet wurde. Pro Flasche wurden 5 ml mPEC-Kulturmedium supplementiert mit 1% Pen/Strep vorgelegt und in den Inkubator gestellt, bis die isolierten Zellen in Kultur genommen wurden.

Die Maus wurde zunächst unter Beobachtung in einem verschließbaren Zylinderglas durch die Inhalation von Isofluran tief betäubt, um eine zervikale Dislokation zur Tötung durchzuführen. Nachdem die Maus großzügig mit 70%igem Ethanol gereinigt wurde, wurde der Thorax mit der Schere geöffnet. Die Lunge wurde vorsichtig mit der Pinzette und der Schere freipräpariert und komplett entnommen. Unmittelbar nach Entnahme wurden die Lungen in 10 cm-Zellkulturschalen mit jeweils 25 ml 1x PBS mit 1% Pen/Strep transferiert und auf Eis gelagert. Pro Isolation wurden jeweils drei Lungen pro Versuchsgruppe verwendet. Ab diesem Schritt wurde unter sterilen Bedingungen in der Sterilwerkbank weitergearbeitet. Die Lungen wurden durch Schwenken in 1x PBS (mit 1% Pen/Strep) gespült und anschließend auf den trockenen Deckel der Petrischale gelegt. Die Restflüssigkeit wurde mit Hilfe einer 1000 µl-Pipette abgesaugt. Das Gewebe wurde mit einem Skalpell zerkleinert, bis nur noch sehr kleine Gewebestücke von 1-2 mm sichtbar waren und in ein mit 15 ml Lyse-Puffer befülltes 50 ml-Zentrifugenröhrchen transferiert. Bevor die Inkubation im Wasserbad für 30 min bei 37°C erfolgte, wurde das Gewebe für ca. 1 min auf höchster Stufe gevortext. Dieser Vorgang wurde während der Inkubation alle

10 min wiederholt. Um eine Einzelzellsuspension zu erhalten, wurde der Lyse-Puffer mit dem zerkleinerten Gewebe vorsichtig über ein 70 µm Zellsieb in ein frisches 50 ml-Zentrifugenröhrchen gegossen. Mit Hilfe eines Stempels wurden die noch auf dem Zellsieb verbliebenen Gewebestückchen zur weiteren Zelldissoziation vorsichtig mit wenig Druck durch das Sieb gedrückt, bis nur noch ein weißes Fibrin-Reste enthaltendes Homogenat zu sehen war, welches nicht durch das Sieb gedrückt werden durfte. Während dieses Vorgangs wurde das Sieb ungefähr viermal mit jeweils 1 ml Isolations-Medium gespült. Danach wurden zur vollständigen Inaktivierung der Collagenase A 10 ml Isolations-Medium hinzugegeben. Nach der Zentrifugation bei 400 x g für 10 min bei 4°C (diese Einstellung wurde für alle weiteren Zentrifugationsschritte verwendet), wurde die Lösung abgesaugt und das Zellpellet in 1 ml Isolations-Medium aufgenommen. Um eine möglichst effektive Einzelzellsuspension zu gewährleisten, wurde die Zellsuspension erneut über ein frisches 70 µm Zellsieb gegossen (ohne Verwendung des Stempels), in ein 50 ml-Zentrifugenröhrchen aufgenommen und das Zellsieb mit 1-2 ml Isolations-Medium gespült. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurde das Isolations-Medium abgesaugt und das Zellpellet in MACS-Puffer resuspendiert und gleichmäßig auf zwei 50 ml-Zentrifugenröhrchen verteilt (mit 350 µl MACS-Puffer pro Zentrifugenröhrchen).

Magnetische Zellseparation (MACS, Magnetic Activated Cell Sorting)

Pro Zentrifugenröhrchen wurden 40 µl CD31-Antikörper-gekoppelte MicroBeads hinzugegeben, kurz geschwenkt und für 15 min auf Eis inkubiert. In der Zwischenzeit wurde der Zellseparator *QuadroMACS™* mit vier Säulchen (*LS Columns*) innerhalb eines Magnetfeldes, wie in Abbildung 3-9 A schematisch dargestellt, aufgebaut und die Säulchen einmal mit MACS-Puffer gespült. Um ungebundene MicroBeads herauszuwaschen, wurden nach Beenden der Inkubation 4 ml MACS-Puffer pro Zentrifugenröhrchen hinzugegeben und erneut zentrifugiert. Danach wurde der MACS-Puffer abgesaugt und das Zellpellet in 1 ml MACS-Puffer resuspendiert. Die Zellen wurden mittig auf das Säulchen aufgetragen und nach 2-3 min Durchlaufzeit dreimal mit jeweils 3 ml MACS-Puffer gespült. Die LS-Säulchen ermöglichen eine positive Selektion, d.h. die mit CD31-MicroBeads markierten Zellen verbleiben aufgrund deren magnetischer Anziehung im Säulchen, während die Negativfraktion herausgespült wird. Nach erfolgter Separation wurden die Säulchen nacheinander aus dem Magneten entfernt und mit Hilfe des Stempels in ein 50 ml-Zentrifugenröhrchen eluiert (Abb. 3-9 B). Dabei wurden die zuvor aufgeteilten Zellen der gleichen Versuchsgruppe wieder vereinigt. Nach einem Zentrifugationsschritt wurde der MACS-Puffer abgesaugt und das Zellpellet in 500 µl mPEC-Kulturmedium supplementiert mit 1% Pen/Strep resuspendiert und in eine bereits vorbereitete 25 cm²-Zellkulturschale aufgenommen. Nach einer mikroskopischen Prüfung wurden die Zellen im Inkubator bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert.

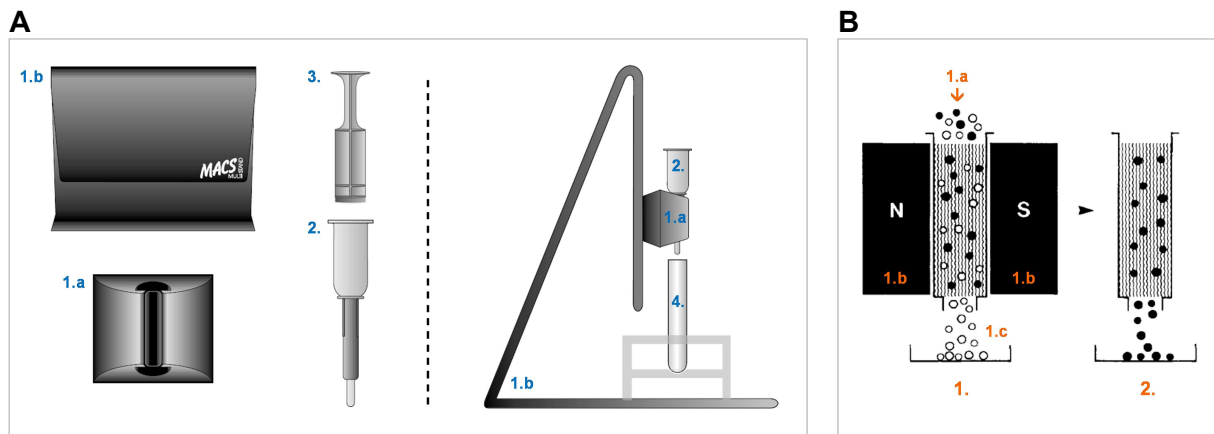


Abbildung 3-9: (A) Schematische Darstellung des Aufbaus der MACS-Apparatur (*Magnetic Activated Cell Sorting*) zur magnetischen Zellseparation: 1.a MACS-Separator, 1.b Ständer für den MACS-Separator, 2. LS-Säulchen, 3. Stempel, 4. Auffanggefäß (Abbildung modifiziert nach Datenblatt des Herstellers Miltenyi Biotec). (B) Prinzip der Zellseparation unter Verwendung von MicroBeads: (1) Zellseparation, 1.a Zellsuspension, 1.b Magnet generiert zusammen mit der speziellen Säulchen-Matrix aus Stahlwolle ein starkes Magnetfeld, 1.c Negativfraktion, (2) Eluieren der mit MicroBeads (an Magnetpartikel gekoppelte Antikörper) markierten Zellen nach dem Entfernen des Säulchens aus dem Magnetfeld (modifiziert nach [166]).

Kultivierung der mPECs

Das Medium wurde 24 h nach Zellisolation komplett ausgetauscht und mit 5 ml mPEC-Kulturmedium ohne Pen/Strep ersetzt. Danach wurde alle zwei Tage die Hälfte des Mediums gewechselt und dabei das verbrauchte (konditionierte) Medium für Experimente aliquotiert und bei -20°C gelagert. Nach 5-7 Tagen nachdem die Zellen in Kultur genommen worden waren, waren diese nahezu konfluent und konnten entweder direkt zur Gewinnung von RNA (siehe Abschnitt 3.5) oder nach vorheriger Stimulation mit 10 ng/ml rekombinatem murinen Leptin bzw. 1x PBS für 15 min im Inkubator zur Gewinnung von Protein verwendet werden (siehe Abschnitt 3.6). Eine repräsentative Hellfeldaufnahme der mPECs (Passage 0) in Kultur ist in der nachfolgenden Abbildung 3-10 gezeigt.

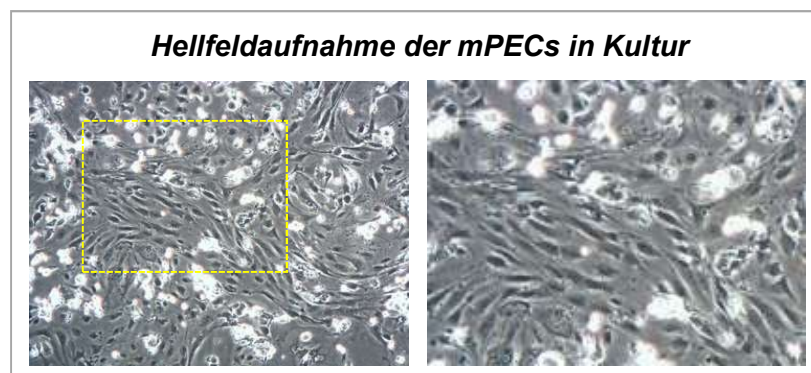


Abbildung 3-10: Repräsentative Hellfeldaufnahme primärer muriner pulmonaler Endothelzellen (mPECs) in Kultur. Abgebildet sind Zellen der Passage 0 (linkes Bild: 100-fache Vergrößerung; rechtes Bild: manuelle Detailvergrößerung).

Immunzytochemischer Nachweis von Endothelzell-Markern

Zum Nachweis der Endothelzell-Marker CD31 und VE-Cadherin wurden 20 µl der isolierten Zellsuspension auf mit 0,2%iger Gelatine beschichteten 4-Well Zellkammer-Objektträger (Chamber Slides) kultiviert. Vor Entfernen der Kammern wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit 1x PBS gewaschen, gefolgt von einer Fixierung der Objektträger für 5 min bei -20°C in Aceton. Nach viermaligem Waschen in 1x PBS folgte die Permeabilisierung in 0,2%igem Triton-X100 (Herstellung siehe Kapitel 2.15) für 5 min. Anschließend wurde erneut viermal in 1x PBS gewaschen und danach für 7 min in 1%igem BSA (Herstellung siehe Kapitel 2.15) inkubiert. Die Inkubation mit dem 1:100 in 1x PBS verdünnten Primär-Antikörper gegen CD31 (rat anti-*mouse*; sc-18916) bzw. VE-Cadherin (rabbit anti-*mouse*) erfolgte für eine Stunde bei RT gefolgt von vier Waschschrritten in 1x PBS. Der jeweilige in 1x PBS 1:500 verdünnte FITC-markierte Sekundär-Antikörper (donkey anti-*rat* bzw. goat anti-*rabbit*) wurde zusammen mit dem 1:1000 verdünnten DNA-Farbstoff DAPI zur Zellkernfärbung für 30 min bei RT inkubiert. Zum Schluss wurden die Objektträger erneut viermal in 1x PBS gewaschen und mit dem Eindeckmittel *Fluorescence Mounting Medium* eingedeckt. Die Objektträger wurden lichtgeschützt getrocknet und bei 4°C gelagert. Repräsentative Bilder sind in der nachfolgenden Abbildung 3-11 dargestellt.

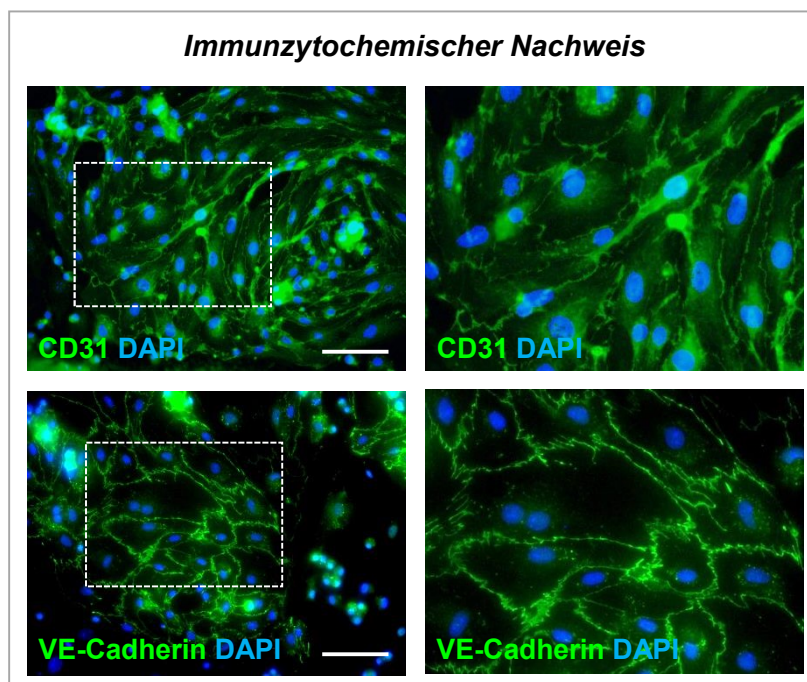


Abbildung 3-11: Repräsentativer immunzytochemischer Nachweis der Endothelzell-Marker CD31 und VE-Cadherin auf primären murinen pulmonalen Endothelzellen (mPECs). Bilder linke Seite: 400-fache Vergrößerung. Die Maßbalken repräsentieren 100 µm. Bilder rechte Seite: manuelle Detailvergrößerung.

3.4.2 Isolation und Kultivierung primärer glatter Muskelzellen (mSMCs) aus der Aorta von normalgewichtigen und übergewichtigen Mäusen

Zellisolation

Die benötigten Lösungen und Medien für die Zellisolation wurden wie in Kapitel 2.15 beschrieben angesetzt. Nach vorheriger tiefer Betäubung der Maus mit Isofluran-Inhalation erfolgte die Tötung mittels zervikaler Dislokation. Die Maus wurde zunächst großzügig mit 70%igem Ethanol gereinigt, der Thorax mit der Schere geöffnet und der thorakale Bereich der Aorta vorsichtig mit Hilfe von feinen Pinzetten und der Schere freipräpariert und entnommen. Pro Isolation wurden jeweils drei Aorten von mit Normalfutter gefütterten normalgewichtigen und von mit einer Hochfettdiät gefütterten übergewichtigen C57BL/6 Mäusen verwendet. Die entnommenen Aorten wurden bis zur weiteren Präparation in sterilem 1x PBS auf Eis gelagert. In einer mit etwas 1x PBS befüllten 10 cm-Zellkulturschale und unter Verwendung einer Lupenlampe (2,5-fache Vergrößerung) wurde die Aorta zunächst mit einer feinen Pinzetten fixiert, während mit der anderen stumpf an der Aorta entlang geschabt wurde, um das restliche Blut vorsichtig auszustreichen. Anschließend wurde die Adventitia entfernt und die Aorta in ca. 2 mm breite Ringe geschnitten. Die nächsten Schritte wurden unter sterilen Bedingungen in der Sterilwerkbank durchgeführt. Zum Verdau wurden die gepoolten Aorten-Ringe einer Versuchsgruppe in ein mit 10 ml Lyse-Puffer gefülltes 15 ml-Zentrifugenröhrchen transferiert und in einem Wärmeschrank unter gelegentlichem Schwenken für 10 min bei 37°C inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt bei 200 x g für 5 min bei RT wurde der Lyse-Puffer abgesaugt und die Inkubation mit frischem Lyse-Puffer wiederholt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurde der Lyse-Puffer erneut abgesaugt und die Aorten-Ringe in 3 ml mSMC-Kulturmedium aufgenommen und wie in Abbildung 3-12 A (*Bild links oben*) gezeigt mittig in eine 10 cm-Zellkulturschale platziert. Damit die Adhäsion der Aorten-Stücke am Boden der Zellkulturschale erfolgen kann, wurde die Menge an Medium so angepasst, dass die Aorten-Stücke nicht komplett mit Medium bedeckt waren, sondern noch ein wenig herausragten. Hierfür musste gegebenenfalls noch etwas Medium abgenommen werden. Nach einer Inkubationszeit von 48 h im Inkubator bei 37°C und 5% CO₂ waren die Aorten-Ringe adhärent und ein kompletter Mediumwechsel konnte durchgeführt werden, welcher alle zwei bis drei Tage erfolgte. Hierbei musste vorsichtig gearbeitet werden, damit die adhären Aorten-Ringe nicht wieder heruntergespült wurden. Einige Tage nach Isolation konnten erste aus den Aorten-Ringen herauswachsende Zellen beobachtet werden. Nach ca. einer Woche wurden die Aorten-Ringe entfernt und die mSMCs unter Verwendung von 8 ml mSMC-Medium weiterkultiviert, bis diese nach ca. 14 Tagen subkultiviert werden konnten. Repräsentative Hellfeldaufnahmen verschiedener Passagen der mSMCs in Kultur sind in Abbildung 3-12 gezeigt.

Kultivierung der mSMCs

Zur Subkultivierung wurden die mSMCs mit 1,5 ml des Dissoziationsenzym Accutase StemPro® pro 10 cm-Zellkulturschale für 3 min im Inkubator inkubiert, nach mikroskopischer Prüfung der erfolgreichen Dissoziation mit 3,5 ml mSMC-Medium von der Platte gespült und im Verhältnis von 1:2 bis 1:3 subkultiviert. Für Experimente wurden die Passagen 3-7 verwendet.

Nachweis von glatten Muskelzell-Markern

Mittels RT-PCR konnte in den kultivierten mSMCs die Expression der (kontraktilen) glatten Muskelzell-Marker Calponin, Sm-MHC und Sm22 nachgewiesen werden (Abb. 3-12 B).

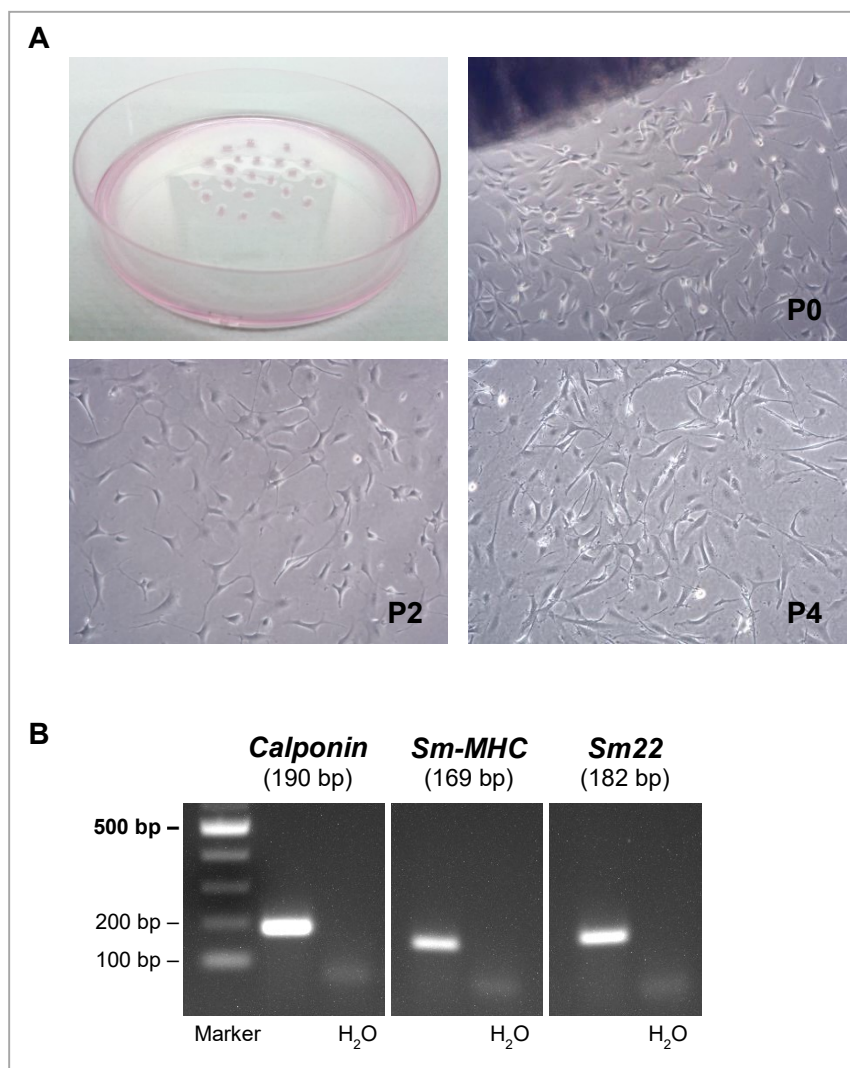


Abbildung 3-12: Isolation und Kultivierung von primären murinen glatten Muskelzellen (mSMCs). (A) Bild oben links: Die Aorten-Ringe wurden mittig in einer 10 cm-Zellkulturschale platziert und die Menge des Mediums so angepasst, dass diese noch etwas herausragen, damit die Adhäsion erfolgen konnte. Bild oben rechts: Aus den ca. 2 mm breiten Aorten-Ringen herauswachsende mSMCs der Passage P0. Bilder untere Reihe: mSMCs der Passagen P2 und P4 nach Subkultivierung (Bild oben rechts und untere Reihe 100-fache Vergrößerung). (B) RT-PCR Analyse zum repräsentativen Nachweis von Markern für (kontraktile) glatte Muskelzellen.

3.4.3 Kultivierung der verwendeten Zelllinien

Kryokonservierung und Auftauen der murinen glatten Muskelzell-Linie MOVAS

Die Kryokonservierung der murinen aortalen glatten Muskelzell-Linie MOVAS (*Murine aortic smooth muscle cells*) erfolgte in 1 ml MOVAS-Medium supplementiert mit 5% DMSO (Zusammensetzung des MOVAS-Einfriermediums siehe Kapitel 2.15). Zum Einfrieren wurden die Kryoröhrchen mit den Zellen zunächst in einem Kryo-Einfriergefäß bei -80°C für ca. 24 h gelagert, welches einen kontinuierlichen Temperaturabfall von -1°C / min gewährleistete, bevor diese in flüssigen Stickstoff transferiert wurden. Zum Auftauen der Zellen wurde das Kryoröhrchen im 37°C Wasserbad langsam aufgetaut und in eine 10 cm-Zellkulturschale (mit 58 cm² Wachstumsfläche), in der 10 ml MOVAS-Medium vorgelegt und für 30 min im Inkubator erwärmt wurde, aufgenommen. Aufgrund der Zelltoxizität wurde das DMSO-enhaltene Medium nach spätestens 24 h komplett mit frischem MOVAS-Medium ohne DMSO ersetzt.

Kultivierung der MOVAS-Zelllinie

Alle zwei bis drei Tage erfolgte ein kompletter Wechsel des MOVAS-Mediums (Zusammensetzung des Mediums siehe Kapitel 2.15) und bei Erreichen einer Konfluenz von 80-90% wurden die Zellen subkultiviert. Hierfür wurden die Zellen nach vorherigem Waschen mit 1x PBS unter Verwendung von 1,5 ml des Dissoziationsenzym Accutase *StemPro*[®] pro 10 cm-Zellkulturschale für 3 min im Inkubator gelöst. Nach mikroskopischer Kontrolle der erfolgreichen Dissoziation wurden die Zellen mit 3,5 ml MOVAS-Medium von der Platte gespült, in einem 50 ml-Zentrifugenröhrchen gesammelt und im Verhältnis von 1:5 bis 1:8 subkultiviert.

Kultivierung der humanen umbilikalen venösen endothelialen Zelllinie HUVEC

Die Kultivierung der HUVEC-Zelllinie erfolgte in mit 0,2%iger Gelatine beschichteten 10 cm-Zellkulturschalen. Das HUVEC-Medium (Zusammensetzung des Mediums siehe Kapitel 2.15) wurde alle zwei bis drei Tage komplett gewechselt und bei Erreichen einer Konfluenz von 80-90% wurden die Zellen subkultiviert. Hierfür wurden die Zellen mit 0,5 ml Dissoziationsreagenz Trypsin-EDTA (0,25%) pro 10 cm-Zellkulturschale bei RT unter ständiger mikroskopischer Kontrolle gelöst, anschließend die Trypsin-Wirkung mit 9,5 ml HUVEC-Medium inaktiviert und im Verhältnis von 1:4 bis 1:5 subkultiviert.

3.4.4 Untersuchung der Zellkulturüberstände der mPECs von End.LepR-KO und End.LepR-WT Mäusen

Um eventuelle Zellreste zu entfernen, wurden die Zellkulturüberstände (konditioniertes Medium, KdM) der mPECs, die aus den Lungen von End.LepR-WT und -KO Mäusen isoliert wurden, nach dem Auftauen direkt vor Verwendung für 2 min bei 3.000 rpm zentrifugiert. Der Gehalt von Endothelin-1 (ET-1) und Prostacyclin (PGI₂) im konditionierten Medium wurde unter Verwendung entsprechender ELISAs bestimmt, die nach Herstellerangaben durchgeführt wurden. Die Quantifizierung von PGI₂ erfolgte indirekt über die Bestimmung des ersten Hydrolyse-Produkts 6-keto Prostaglandin F_{1α} (6-keto-PGF_{1α}). Die Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO) wurde indirekt über die Bestimmung des ersten stabilen und nicht flüchtigen Produkts Nitrit (NO₂⁻) mit Hilfe des *Griess Reagent* nach Herstellerangaben ermittelt.

3.4.5 Untersuchung der Zellproliferation, des Migrationsverhaltens und parakriner Effekte

Bestimmung der Zellzahl

Zur Vorbereitung der Zellkulturexperimente wurden die Zellen, wie in den letzten Abschnitten bereits beschrieben, von der Platte gelöst und 10 µl der Zellsuspension zur Bestimmung der Zellzahl in die Neubauer-Zählkammer aufgetragen. Vier Großquadrate wurden ausgezählt und der Mittelwert mit 10.000 multipliziert, um die Zellzahl pro ml zu erhalten.

Proliferation

Das Proliferationsverhalten von mSMCs isoliert aus den Aorten von normalgewichtigen und übergewichtigen Mäusen wurde unter Verwendung des Proliferations-Assays *Cell Titer 96® AQ_{ueous} One Solution* untersucht, welcher auf der kolorimetrischen Bestimmung der Zellviabilität beruht. Das Prinzip der verwendeten Methode beruht auf der Reduktion der gelben Komponente MTS Tetrazolium zu dem violetten im Zellkulturmedium löslichen Formazan, dessen Absorption bei 490 nm gemessen werden kann. Es wird angenommen, dass die Reduktion des MTS Tetrazolium durch die Protonen-übertragenden Koenzyme NADPH (Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat) und NADH (Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid) erfolgt, welche von Dehydrogenasen metabolisch aktiver Zellen gebildet werden. Vor Durchführung des Assays wurden 3,2 x 10³ Zellen pro Well einer 96-Well Zellkulturplatte ausgesät und für 24 h in reduziertem mSMC-Medium inkubiert, um ein Wachstumsstopp zu induzieren. Am darauffolgenden Tag wurde das Medium gegen frisches rekombinantes murines Leptin (10 und 100 ng/ml) enthaltendes reduziertes Medium ausgetauscht, während die Kontrollzellen allein reduziertes Medium erhielten. Nach einer

Inkubationszeit von 24 h wurden 20 µl MTS Reagenz pro Well hinzugegeben, für 3 h im Inkubator (37°C und 5% CO₂) inkubiert und die Absorption bei 490 nm gemessen.

Scratch-Wundheilungs-Assay

Zur Untersuchung des Migrationsverhaltens wurden MOVAS bzw. mSMCs von schlanken und übergewichtigen Mäusen in 6-Well Zellkulturplatten mit einer Zellzahl von 2×10^5 pro Well ausgesät. Nach 24 h erfolgte mit Hilfe einer 200 µl Pipettenspitze der „Scratch“ des konfluenten Zellmonolayers, indem am Boden der 6-Well Platte gerade und zügig entlanggeschabt wurde (den gesamten Durchmesser durchquerend). Das Medium wurde abgesaugt und einmal mit 1x PBS gewaschen, um Zellreste zu entfernen. Anschließend wurden die jeweiligen Zellen mit 250 µl konditioniertem Medium der isolierten und kultivierten mPECs von End.LeR-WT vs. -KO Mäusen bzw. 10 oder 100 ng/ml Leptin in jeweils 3 ml reduziertes MOVAS- bzw. mSMC-Medium (Zusammensetzung der Medien siehe Kapitel 2.15) pro Well inkubiert. Die Kontrollzellen wurden lediglich mit reduziertem Medium inkubiert. Von jedem Versuchsansatz wurden Duplikate, d.h. zwei 6-Wells pro Behandlung angesetzt. Mit dem Mikroskop *Motic BA210E* und der Kamera *Moticam 5* wurden die Zeitpunkte 0 h, 9 h, 18 h und 24 h (MOVAS alle Zeitpunkte, mSMCs 0 h und 24 h) dokumentiert, indem pro Well jeweils drei bis fünf Aufnahmen pro „Scratch“ gemacht wurden. Bezüglich der MOVAS erfolgte die Auswertung der zellfreien „Scratch“-Fläche als prozentuale Änderung im Vergleich zu 0 h mit der Software *ImageJ 1.46*, während die absolute Zellzahl migrierender mSMCs bestimmt wurde.

Parakrine Effekte

Zur Untersuchung möglicher parakriner Effekte wurden 1×10^5 MOVAS pro Well einer 6-Well Zellkulturplatte ausgesät und nach 16-18 h mit konditioniertem Medium der isolierten und kultivierten mPECs von End.LeR-WT und -KO Mäusen inkubiert. Hierfür wurde das MOVAS-Medium abgesaugt und mit jeweils 3 ml reduziertem MOVAS-Medium ersetzt (Zusammensetzung des Mediums siehe Kapitel 2.15). Pro Well wurden 250 µl konditioniertes Medium hinzugegeben, während die Kontrollzellen allein reduziertem Medium erhielten. Ein Teil der MOVAS wurde zusätzlich mit dem nicht-selektiven Endothelin-Rezeptor (ET_{A/B})-Antagonisten (PD145065), 30 min bevor das konditionierte Medium hinzugegeben wurde, inkubiert. Nach ca. 10 h wurden die Zellen, wie in Abschnitt 3.5 beschrieben, homogenisiert und zur späteren RNA-Isolation bei -80°C gelagert.

3.5 Untersuchungen der RNA-Expression

3.5.1 RNA-Isolation aus Zellen und Gewebe

Das zur RNA-Isolation verwendete *TRI Reagent*[®] *Solution* basiert auf der einstufigen Säure-Guanidinthiocyanat-Phenol-Chloroform-Extraktion nach Chomczynski und Sacchi [167, 168].

Homogenisierung der Zellen

Das Zellkulturmedium wurde komplett abgesaugt und die Zellen einmal mit 1x PBS gewaschen. Pro Well einer 6-Well-Platte wurden 200 µl und pro 25 cm²-Zellkulturflasche wurden 400 µl sowie pro 10 cm-Zellkulturschale 1000 µl *TRI Reagent*[®] *Solution* eingesetzt. Nachdem die entsprechende Menge *TRI Reagent*[®] *Solution* auf die Zellen gegeben wurde, wurden diese mit einem Zellschaber von der Platte geschabt und mit der 1000 µl-Pipette durch mehrfaches auf- und abpipettieren homogenisiert. Die Homogenate wurden in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt, unmittelbar auf Eis gestellt und bis zur RNA-Isolation bei -80°C gelagert.

Homogenisierung der Aorten

Jeweils drei Aorten (bei -80°C in 2,0 ml Reaktionsgefäßen gelagerte Aorten) wurden im gefrorenen Zustand (ohne vorherigem Auftauen) in 300 µL *TRI Reagent*[®] *Solution* aufgenommen und mit Hilfe des Homogenisierers *MICCRA D-1* (mit Dispergierwerkzeug für Kleinstmengen) bei Stufe 1-2 homogenisiert. Um eine vollständige Homogenisierung zu gewährleisten und das zu starke Erwärmen der Probe zu vermeiden, wurde der Homogenisierungsschritt 2-3 mal wiederholt und die Probe zwischen den Schritten für einige Minuten auf Eis gekühlt. Zum Entfernen möglicher Gewebereste wurde das Dispergierwerkzeug nach jeder Probe zunächst mit Natronlauge (2 mol/l) und anschließend dreimal mit ddH₂O gespült. Um mögliche ungelöste Zellreste zu entfernen, wurden die Proben bei 12.000 x g für 10 min bei 4°C zentrifugiert und der Überstand in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß transferiert.

RNA-Extraktion

Vor der RNA-Extraktion wurden Zellhomogenate nach dem Auftauen nach ca. 5-10 min für weitere 5 min bei RT inkubiert, während die RNA-Extraktion der Aortenhomogenate unmittelbar nach der Homogenisierung erfolgte. Zu den Zell- bzw. Aortenhomogenaten wurden pro eingesetzten 1000 µl *TRI Reagent*[®] *Solution* 200 µl Chloroform zugegeben (Anpassung je nach Ausgangsmenge), das Reaktionsgefäß kräftig geschüttelt und für 15 min bei RT inkubiert. Nach der Inkubationszeit konnte bereits eine beginnende Phasentrennung beobachtet werden. Zur vollständigen Phasentrennung wurden die Proben bei 12.000 x g für

15 min bei 4°C zentrifugiert. Die obere farblose wässrige mit RNA angereicherte Phase wurde abgenommen und in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die verbleibenden beiden Phasen mit der unteren organischen Protein enthaltenden Phase und der DNA enthaltenden Interphase wurden verworfen.

RNA-Fällung

Zur Fällung der RNA wurde pro eingesetzten 1000 µl *TRI Reagent*[®] *Solution* 500 µl Isopropanol (Anpassung je nach Ausgangsmenge) zur wässrigen Phase gegeben, für 5-10 s bei mittlerer Geschwindigkeit gevortext und für 10 min bei RT inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt bei 12.000 x g für 8 min bei 4°C wurde der Überstand abgekippt und das Pellet mit 75%igem Ethanol gewaschen. Zum Waschen wurde die gleiche Menge an 75%igem Ethanol verwendet wie die ursprünglich eingesetzte Menge an *TRI Reagent*[®] *Solution*. Um wieder ein festes Pellet zu erhalten, wurde die Probe erneut bei 12.000 x g für 8 min bei 4°C zentrifugiert. Der Ethanol wurde vorsichtig abpipettiert und das Pellet wurde für 5-10 min an der Luft getrocknet, durfte jedoch nicht komplett austrocknen.

Lösen der RNA

Das RNA-Pellet wurde je nach Größe des Pellets in 12 bzw. 22 µl nuklease-freiem Wasser resuspendiert und während der Bestimmung der RNA-Konzentration auf Eis gestellt. Die Lagerung der RNA erfolgte bei -80°C.

3.5.2 Bestimmung der RNA-Konzentration und Reinheit

Die Konzentration der isolierten RNA wurde unter Verwendung von 2 µl unverdünnter Probe mit der Mikrovolumen-Messzelle *µCuvette*[®] *G1.0* und dem Photometer *BioPhotometer*[®] bei 260 nm entsprechend der Herstellerangaben bestimmt. Der sehr kurze Lichtweg (die Höhe der gebildeten Flüssigkeitssäule entspricht einem Lichtweg von 1 mm) ermöglicht die Bestimmung hochkonzentrierter Proben, sodass eine Probenverdünnung nicht notwendig war. Vor der Messung der Proben wurde ein Abgleich mit nuklease-freiem Wasser (*Blank-Lösung*) durchgeführt. Die Bestimmung der Reinheit erfolgte durch die zusätzliche Messung der Absorption bei 280 nm (Absorptionsmaximum von Proteinen). Eine reine Probe ohne Kontamination mit Proteinen weist einen Quotienten aus OD₂₆₀ nm und OD₂₈₀ nm von 2 auf.

3.5.3 Umschreibung in cDNA

Die Umschreibung der mRNA (*messenger RNA*) in die komplementäre cDNA (*complementary DNA*) erfolgte mit Hilfe der RNA-abhängigen DNA-Polymerase *M-MLV Reverse Transkriptase*. Hierzu wurde 1 µg RNA in die im Folgenden beschriebene Reaktion eingesetzt (siehe Tab. 3-16) und die cDNA im Thermocycler *Mastercycler*[®] für 20 min bei 42°C, gefolgt von 5 min bei 99°C und 5 min bei 5°C synthetisiert (mit anschließender Kühlung bei 4°C).

Tabelle 3-16: Pipettierschema der cDNA-Umschreibung

Reagenz	Volumen pro Ansatz [µl]	Finale Konzentration
25 mM MgCl ₂	4	5 mM
5x Reaktionspuffer M-MLV RT	4	1x
10 mM dNTPs (jeweils)	0,4	jeweils 200 µM
500 µg/ml Random Hexamer Primer	0,2	5 mg/ml
40 U/µl RNase Inhibitor	1	2 U/µl
200 U/µl M-MLV Reverse Transkriptase (RT)	0,8	8 U/µl
1 µg RNA (in nuklease-freiem Wasser)	9,6	1 µg
Gesamtvolumen	20	

3.5.4 Semi-quantitative RT-PCR

Zur semi-quantitativen Untersuchung wurde die mit Hilfe der Reversen Transkriptase (RT) umgeschriebene cDNA in der anschließenden Polymerase-Kettenreaktion (*Polymerase chain reaction*, PCR) im Thermocycler *Mastercycler*[®] unter Verwendung spezifischer Primer amplifiziert. Das allgemeine Pipettierschema und die allgemeinen sowie spezifischen PCR-Bedingungen zur cDNA-Amplifizierung sind in den nachfolgenden Tabellen 3-17 bis 3-19 zusammengefasst. Die verwendeten Primer-Sequenzen sind im Kapitel 2.10 aufgelistet. Das Zytoskelettfilament β -Aktin (*Actb*) wurde als konstitutiv exprimiertes, nicht-reguliertes Referenzgen (*housekeeping gene*) verwendet.

Die PCR-Produkte wurden wie in Abschnitt 3.1.5 beschrieben unter Verwendung eines 1,5%igen Agarosegels mittels einer horizontalen Gelelektrophorese aufgetrennt und in einer UV-Geldokumentationskammer detektiert. Die semi-quantitative densitometrische Analyse (Farbdichtemessung, *Integrated Density Value IDV*) der Banden erfolgte mit Hilfe der Software *AlphaEaseFC 4.0*. Die erhaltenen Werte wurden gegen den entsprechenden β -Aktin-Wert derselben Probe normalisiert.

Tabelle 3-17: Allgemeines Pipettierschema zur cDNA-Amplifizierung

Reagenz	Volumen pro Ansatz [μ l]	Finale Konzentration
nuklease-freies Wasser	30,75	-
25 mM MgCl ₂	2	1 mM
5x Puffer <i>Green GoTaq[®] Flexi</i>	10	1x
5 U/ μ l DNA Polymerase <i>Go Taq[®] G2 Flexi</i>	0,25	0,025 U/ μ l
10 μ M Primer_for	1	0,2 μ M
10 μ M Primer_rev	1	0,2 μ M
cDNA	5 μ l	
Gesamtvolumen	50	

Tabelle 3-18: Allgemeine PCR-Bedingungen zur cDNA-Amplifizierung

Schritt	Temperatur	Dauer	Anzahl der Zyklen
<i>Aufheizen des Deckels</i>	105°C	durchgehend	-
<i>Initiale Denaturierung</i>	95°C	3 min	-
Denaturierung	95°C	30 s - 1 min*	35 Zyklen
Annealing	55 - 60°C*	15 s - 1 min*	
Elongation	72°C	30 s - 1 min*	
<i>Finale Elongation</i>	72°C	10 min	-
<i>Kühlung</i>	4°C	halten	-

*spezifische PCR-Bedingungen je nach verwendetem Primer

Tabelle 3-19: Spezifische PCR-Bedingungen der verwendeten Primer zur cDNA-Amplifizierung

Primer	Denaturierung	Annealing	Elongation
Actb	30 s	30 s bei 60°C	30 s
CD31	35 s	45 s bei 60°C	45 s
LepR_{short} / LepR_{long}	1 min	1 min bei 55°C	1 min
Calponin, Sm-MHC, Sm22	30 s	15 s bei 55°C	30 s

3.5.5 Real-time quantitative PCR

Die real-time quantitative PCR (*quantitative Echtzeit PCR*), im Weiteren als qPCR abgekürzt, wurde mit dem Real-Time PCR System *StepOnePlus™* unter Verwendung der Software *StepOne v.2.3* durchgeführt. Das allgemeine Pipettierschema und die qPCR-Bedingungen sind in den nachfolgenden Tabellen 3-20 und 3-21 aufgeführt. Von jeder cDNA-Probe wurden für jeden Primer jeweils Duplikate gemessen. Außerdem wurde für jeden verwendeten Primer eine (nuklease-freie) Wasser-Kontrolle als Duplikat mitgeführt.

Tabelle 3-20: Allgemeines qPCR-Pipettierschema

Reagenz	Volumen pro Ansatz [µl]	Finale Konzentration
SYBR Green <i>SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix (2x)</i>	10	1x
nuklease-freies Wasser	6,5	-
2,5 µM Primer_for	0,5	0,1 µM
2,5 µM Primer_rev	0,5	0,1 µM
cDNA	2,5 µl	
Gesamtvolumen	20	

Tabelle 3-21: qPCR-Bedingungen

Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklen / Temp.
<i>Aufheizen des Deckels</i>	105°C	durchgehend	-
<i>initiale Denaturierung</i>	95°C	10 min	-
<i>Denaturierung</i>	95°C	15 s	40 Zyklen
<i>Annealing / Elongation / Lesen der Platte</i>	60°C	1 min	
<i>Schmelzkurven-Analyse</i>	95°C	15 s	-
	60°C	1 min	Temperaturanstieg schrittweise um 0,3°C
	95°C	15 s	

Verwendet wurde der im *SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix* enthaltene Fluoreszenzfarbstoff *SYBR Green*, welcher an doppelsträngige DNA bindet und bei Anregung ein Fluoreszenzsignal emittiert (Abb. 3-13 A). Das Fluoreszenzsignal, welches nach jedem Zyklus detektiert wird, nimmt von Zyklus zu Zyklus proportional zur Menge der amplifizierten cDNA zu. Zur Darstellung der Amplifizierungskurve (Abb. 3-13 B) wird die Zykluszahl der PCR (x-Achse) gegen das Fluoreszenzsignal (y-Achse) aufgetragen. Als Basislinie (*baseline*) oder Hintergrundfluoreszenz werden die Zyklen bezeichnet, in denen sich das Fluoreszenzsignal noch unter der Detektionsschwelle befindet, d.h. die amplifizierte

cDNA-Menge ist noch zu gering. Je nach Ausgangskopien sind ab einer bestimmten Zykluszahl die Bedingungen optimal, so dass es zu einem exponentiellen Anstieg kommt. Im Verlauf der Zyklen steigt die Produktmenge stark an, die Substrate werden verbraucht, die Aktivität der Polymerase lässt nach und es kommt zu vermehrten Produktfragment- und Primer-Hybridisierung (Plateaubildung am Ende des exponentiellen Anstiegs). Der zur Quantifizierung verwendete Ct-Wert (*threshold cycle*) wird definiert als die Zykluszahl, bei der der Schwellenwert erstmals überschritten wird, d.h. das Fluoreszenzsignal steigt über die Hintergrund-Fluoreszenz hinaus an und die Kurve befindet sich am Anfang des exponentiellen Verlaufs.

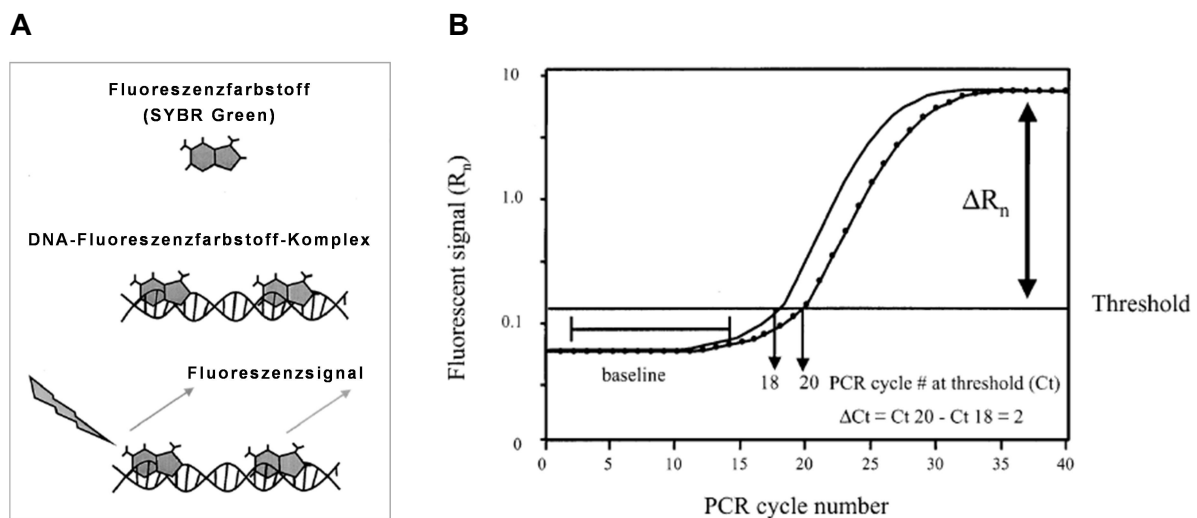


Abbildung 3-13: (A) Prinzip der qPCR und (B) Beispiel einer Amplifizierungskurve. Um zwei Proben miteinander zu vergleichen, werden deren Ct-Werte voneinander abgezogen, so dass man wie in diesem Beispiel gezeigt einen Unterschied von zwei Zyklen zwischen den beiden Proben erhält. Aufgrund des exponentiellen Verlaufs der PCR erhält man durch Einsetzen des ΔCt -Wertes in $2^{-\Delta Ct}$ eine lineare Form bzw. einen 4-fachen Anstieg (modifiziert nach [169]).

Relative Quantifizierung nach der $\Delta\Delta Ct$ -Methode

Die relative Quantifizierung von Unterschieden in der mRNA-Expression erfolgte nach der $\Delta\Delta Ct$ -Methode [170]. Dabei wurde zunächst das Zielgen mit einem nicht-regulierten Referenzgen (*housekeeping gene*) als interne Kontrolle normalisiert (ΔCt). Als Referenzgen wurde die ribosomale Untereinheit 18S (*Rn18S*) bzw. das Zytoskelettfilament β -Aktin (*Actb*) verwendet. Zur Berechnung der relativen Expressionsunterschiede wurden die jeweiligen normalisierten Ct-Werte voneinander abgezogen ($\Delta\Delta Ct$) und in die Formel $2^{-\Delta\Delta Ct}$ eingesetzt.

$$\Delta Ct = Ct_{\text{Zielgen}} - Ct_{\text{Referenzgen}}$$

$$\Delta\Delta Ct = Ct_{\text{Versuchsgruppe}} - Ct_{\text{Kontrollgruppe}}$$

Berechnung der n-fachen Expression (Versuchsgruppe vs. Kontrollgruppe): $2^{-\Delta\Delta Ct}$

Schmelzkurven-Analyse

Zur Überprüfung der Primer-Spezifität wurde nach erfolgter cDNA-Amplifizierung eine Schmelzkurven-Analyse durchgeführt (Abb. 3-14). Dabei handelt es sich um eine rein qualitative Bewertung der PCR-Amplifikate, bei der man sich zunutze macht, dass die doppelsträngige DNA von spezifischen PCR-Produkten einen höheren Schmelzpunkt aufweist als unspezifische Produkte oder Primerdimere. Durch schrittweise Erhöhung der Temperatur im Reaktionsgefäß um $0,3^{\circ}\text{C}$ von 60°C auf 95°C wurde die doppelsträngige DNA in Einzelstränge aufgetrennt. Der bei diesem Vorgang freigesetzte Fluoreszenzfarbstoff resultiert in einer Abnahme der Fluoreszenz, welche einen charakteristischen Peak aufweist. Dabei weist jedes PCR-Produkt eine spezifische Schmelztemperatur (T_m) auf.

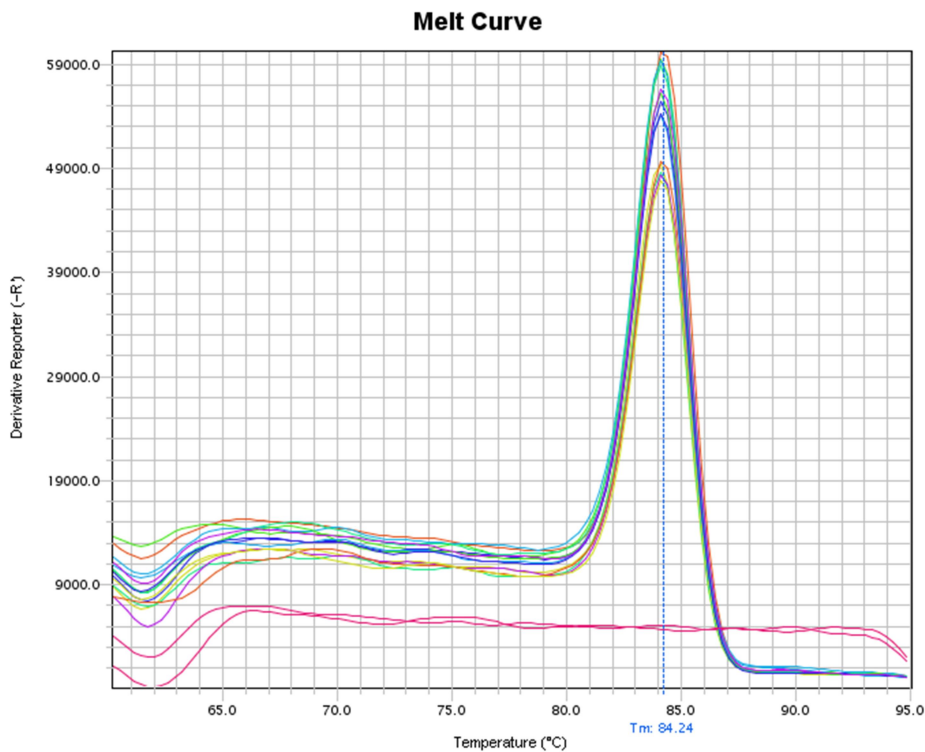


Abbildung 3-14: Beispiel einer Schmelzkurven-Analyse (*Melt Curve* von der Software *StepOne* v.2.3 anhand der detektierten Werte erstellt). Zur Darstellung der Schmelzkurve wurde die Temperatur (x-Achse) gegen den abgeleiteten Wert des Fluoreszenzsignals (y-Achse) aufgetragen. Spezifische PCR-Produkte wiesen einen charakteristischen Schmelzkurvenverlauf bzw. eine charakteristische Schmelztemperatur (T_m) auf, welche in der (nuklease-freien) Wasser-Kontrolle (pink) nicht aufgezeichnet werden konnte.

3.6 Western Blot

3.6.1 Herstellung von Proteinlysaten aus Zellen

Zur Proteinisolation wurden die Zellen mit 1x PBS gewaschen und die gesamte Zellkulturflasche vorsichtig auf flüssigen Stickstoff schockgefroren und bis zur Herstellung von Proteinlysaten bei -80°C gelagert. Die Zellen wurden in ihrer Zellkulturflasche auf Eis aufgetaut, bis auf dem Flaschenboden ein „Schimmer“ zu sehen war. Dies ist ein Hinweis, dass der Flaschenboden die richtige Temperatur erreicht hat, da zu niedrige Temperaturen die im Lysepuffer enthaltenen Protease- und Phosphatase-Inhibitoren zerstören würden. Pro 25 cm²-Zellkulturflasche bzw. 10 cm-Zellkulturschale wurden 130 μl bzw. 300 μl des frisch mit Protease- und Phosphatase-Inhibitoren versetzten gekühlten Triton-X-Lysepuffers (Herstellung siehe Kapitel 2.15) auf die Zellen gegeben und diese mit dem Zellschaber von der Platte geschabt. Die Zellhomogenate wurden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und für 60 min auf Eis unter gelegentlichem Vortexen inkubiert. Um ungelöste Zellreste zu entfernen, wurde die Probe anschließend bei 10.000 x g für 10 min bei 4°C zentrifugiert und der Überstand in frische Reaktionsgefäße überführt. Die Proteinlysate wurden bei -80°C gelagert.

3.6.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration der Proteinlysate wurde mit dem *BCA Protein Assay Kit Pierce*TM bestimmt. Die Methode nach Smith *et al.* [171] basiert auf der Verwendung von Bicinchoninsäure (*bicinchoninic acid*, BCA) zur quantitativen kolorimetrischen Bestimmung von Proteinen. Dabei werden in alkalischer Lösung zweiwertige Kupferionen (Cu^{2+}) durch die Komplexierung mit den Peptidbindungen (Stickstoff-Atomen) von Proteinen zu einwertigen Kupferionen (Cu^{1+}) reduziert, welche mit Bicinchoninsäure einen violetten Komplex mit einem Absorptionsmaximum von 562 nm bilden (Abb. 3-15).

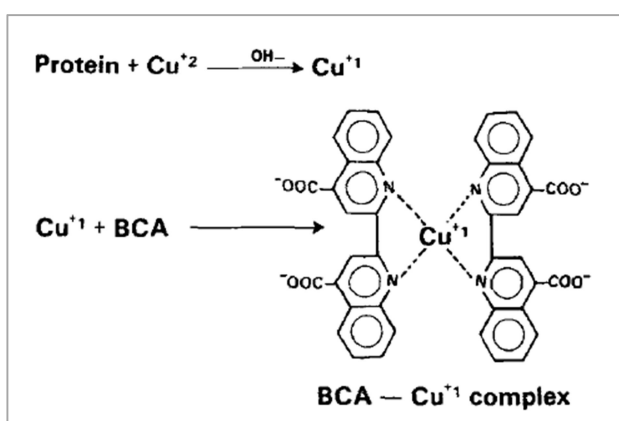


Abbildung 3-15: Prinzip der quantitativen colorimetrischen Proteinbestimmung mit Bicinchoninsäure (*bicinchoninic acid*, BCA) nach Smith *et al.* [171].

Durchführung

Zur Generierung einer Protein-Standardkurve wurde ausgehend von einer 2000 µg/ml BSA (*Bovine Serum Albumin*; Rinderalbumin) Stammlösung eine Standardreihe nach dem in der Tabelle 3-22 dargestellten Verdünnungsschema pipettiert, welche bei -20°C gelagert werden konnte.

Tabelle 3-22: Pipettierschema zur Generierung einer Protein-Standardkurve

Standard-Nr.	Proteinkonzentration [µg/ml]	ddH ₂ O	Standard
STD 10	2000	-	-
STD 9	1000	500 µl	+ 500 µl von STD 10
STD 8	500	500 µl	+ 500 µl von STD 9
STD 7	250	500 µl	+ 500 µl von STD 8
STD 6	125	500 µl	+ 500 µl von STD 7
STD 5	62,5	500 µl	+ 500 µl von STD 6
STD 4	31,2	500 µl	+ 500 µl von STD 5
STD 3	15,6	500 µl	+ 500 µl von STD 4
STD 2	7,8	500 µl	+ 500 µl von STD 3
STD 1	3,9	500 µl	+ 500 µl von STD 2
Leerwert	0	500 µl	-

Reagenz A und B wurden im Verhältnis 50:1 angesetzt und 200 µl pro Well in eine 96-Well Mikrotiterplatte vorgelegt. Dann wurden 25 µl der in ddH₂O 1:10 verdünnten Proben (Doppelbestimmung) sowie 25 µl des jeweiligen Standards hinzugegeben und abgedeckt für 30 min bei 37°C inkubiert. Die photometrische Bestimmung erfolgte bei 526 nm. Zur Generierung einer Protein-Standardkurve wurden die bekannten Proteinkonzentrationen der Standardreihe gegen die gemessene optische Dichte (OD) aufgetragen. Nach Abzug des Leerwertes von allen gemessenen Werten konnten mit Hilfe der Geradengleichung die Proteinkonzentrationen der Proben unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors ermittelt werden.

3.6.3 Gelelektrophorese und Transfer

Herstellung der Gele

Die mit 70%igem Ethanol gereinigten Platten wurden in die Gelgießapparatur eingespannt. Die Zusammensetzung der Gele ist in der Tabelle 3-23 aufgeführt. Zuerst wurde das 8%ige Trenngel, dessen Porengröße zur Auftrennung von Proteinen mit einem Molekulargewicht

von 25 bis 200 kDA geeignet ist gegossen und zur Beseitigung von Blasen mit Isopropanol überschichtet. Lediglich für die Proteinauftrennung von Endothelin-1 wurde ein 10%iges Trenngel verwendet, welches sich für ein Molekulargewicht von 15 bis 100 kDA eignet. Das Auspolymerisieren erfolgte für ca. 20 min bei RT. Nach dem Abgießen des Isopropanols wurde mit ddH₂O gespült und Flüssigkeitsreste mit einem Filterpapier getrocknet. Das Trenngel wurde mit dem 5%igen Sammelgel überschichtet und der Kamm luftblasenfrei angebracht. Zum Auspolymerisieren wurde das Gel erneut für 20 min bei RT stehen gelassen, die Glasplatten aus der Gelgießapparatur entnommen und in mit ddH₂O befeuchtete Papiertücher in einer Klarsichtfolie zum Schutz vor dem Austrocknen über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt.

Tabelle 3-23: Pipettierschema zur Herstellung der Gele

Reagenz	Trenngel [ml]		5%iges Sammelgel [ml]
	8%ig	10%ig	
ddH ₂ O	6,9	5,9	2,1
30%iger Acrylamid Mix	4,0	5,0	0,5
1,5 M Tris pH 8.8	3,8	3,8	-
1,0 M Tris pH 6.8	-	-	0,38
10%ige SDS-Lösung	0,15	0,15	0,03
10%ige APS-Lösung	0,15	0,15	0,03
TEMED	0,009	0,006	0,003

Probenvorbereitung

Die Proben wurden anhand der bestimmten Proteinkonzentration auf eine einheitliche Konzentration von 25 µg Gesamtprotein eingestellt und mit ddH₂O auf ein Probenvolumen von 22,5 µl gebracht. Der 4x Lämmli-Puffer wurde wie in Kapitel 2.15 beschrieben mit dem reduzierenden Reagenz 2-Mercaptoethanol versetzt. Zu jeder Probe wurde 4x Lämmli-Ladepuffer (je 7,5 µl) hinzugegeben, so dass dieser im Gesamtvolumen von 30 µl 1x konzentriert war. Zur Denaturierung und Reduzierung der Proteine wurden die Proben im Thermoblock *ThermoStat plus* für 5 min bei 99°C erhitzt und unmittelbar danach auf Eis gestellt. Bei diesem Schritt wurde die Tertiär- und Sekundärstruktur der Proteine durch Aufheben von Wasserstoffbrückenbindungen sowie Aufbrechen von Disulfidbrücken aufgelöst. Dabei kommt es zur Entfaltung des Proteins, während die Aminosäuresequenz (Primärstruktur) erhalten bleibt.

Gelelektrophorese

Die Module der Elektrophorese-Apparatur *Mini-PROTEAN® Tetra Cell* wurden entsprechend der Herstellerangaben aufgebaut und die innere Kammer zwischen den Glasplatten bis zum Überlaufen sowie ca. $\frac{1}{4}$ des Pufferreservoirs mit 1x Tris/Glycine/SDS-Laufpuffer (Herstellung siehe Kapitel 2.15) befüllt. Nachdem die Kämme vorsichtig herausgezogen und die Taschen mit 1x Laufpuffer gespült wurden, folgte ein Vorlauf ohne Proben für ca. 15 min bei 80 V. Anschließend wurden Proteinmarker und Proben aufgetragen und die Elektrophorese-Apparatur wie vom Hersteller angegeben an die Stromquelle angeschlossen. Die Elektrophorese durch das Sammelgel erfolgte für ca. 15 min bei 80 V und wurde dann auf 100 V erhöht. Da die Eigenladung der Proteine durch das anionische Detergenz SDS (*sodium dodecyl sulfat*, Natriumdodecylsulfat) überdeckt wurde und somit eine gleichmäßig negative Ladung aufweist, erfolgt die Trennung der Proteine nach deren relativer Größe, d.h. deren Kettenlänge (proportional zum Molekulargewicht), in Richtung Anode (positiv geladener Pol). Anhand der Auftrennung des Proteinmarkers und der blauen Lauffront konnte der Fortschritt der Elektrophorese überprüft und vor Erreichen des unteren Randes der Glasplatten nach 90-120 min gestoppt werden, um ein Auslaufen der Proteine zu verhindern.

Transfer

Der Transfer der mittels Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran erfolgte mit der Blotting-Apparatur *Mini Trans-Blot®*. Das Elektrophoresemuster der aufgetrennten Proteinbanden bleibt dabei bestehen. Es wurde eine Nitrocellulose-Membran mit einer Porengröße von 0,45 μm verwendet, welche für Proteine mit einem Molekulargewicht von größer als 15 kDA geeignet ist. Zunächst wurde die Nitrocellulose-Membran (zugeschnitten auf ca. 7 x 8,5 cm) für 5-10 min in ddH₂O übertragen und anschließend für weitere 15 min in 1x Transferpuffer (Herstellung siehe Kapitel 2.15) überführt. Zum Durchfeuchten wurden Schwämme und Filterpapiere ebenfalls für ca. 10 min in 1x Transferpuffer gelegt und auf den Schwenktisch gestellt. Nach Entfernen des Sammelgels wurden auch die Gele zum Waschen in 1x Transferpuffer überführt. Der Aufbau der Transferkassette erfolgte luftblasenfrei wie in Abbildung 3-16 schematisch dargestellt. Die Module der Blotting-Apparatur wurden gemäß Herstellerangaben aufgebaut, bis zur Markierung mit 1x Transferpuffer befüllt und an die Stromquelle angeschlossen. Der Transfer erfolgte für eine Stunde bei 100 V. Zum Schutz vor Überhitzung wurde die Apparatur durch ein im Tank integriertes Kühlelement sowie unter ständigem Rühren (auf einem Magnetrührer) während des Transfers gekühlt. Die Proteine wandern im senkrecht zur Transferkassette gerichteten elektrischen Feld aus dem Gel zur positiv geladenen Anode in Richtung Nitrocellulose-Membran und binden dort an die Membrantextur (Abb. 3-16). Im Transferpuffer enthaltener Methanol erhöhte die Bindungseffizienz der Proteine an die Nitrocellulose-Membran. Nach

dem Transfer wurde die Membran zur Überprüfung einer gleichmäßigen Protein-Beladung mit Ponceau S angefärbt und mit ddH₂O wieder entfärbt. Die Marker-Banden wurden markiert und die Membran gegebenenfalls mit Hilfe der Marker-Banden bei einem bestimmten Molekulargewicht geschnitten, um diese mit unterschiedlichen Antikörpern inkubieren zu können

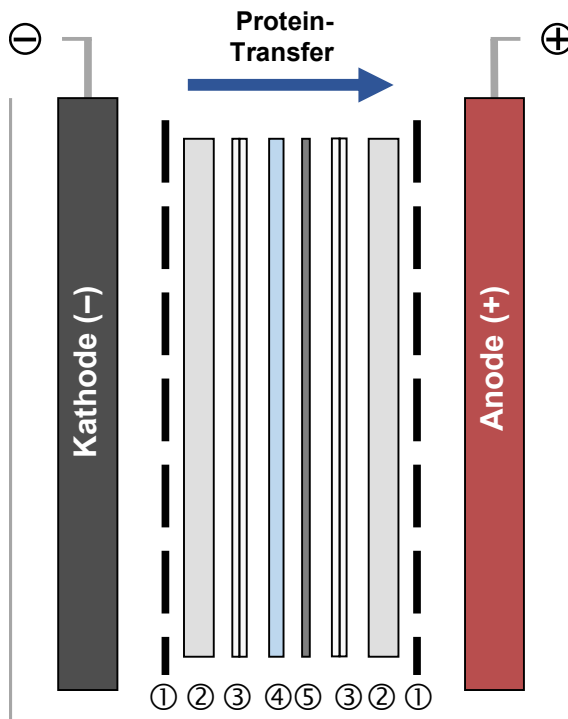


Abbildung 3-16: Schematischer Aufbau einer Tank-Blot-Apparatur und Richtung des Protein-transfers. Die Transferkassette wurde wie folgt aufgebaut: (1) zusammenklappbare / durchlöchernte Kunststoffkassette; (2) Schwamm; (3) zwei Filter; (4) Gel; (5) Nitrocellulose-Membran.

3.6.4 Immundetektion und Quantifizierung der Proteinbanden

Allgemeines Protokoll zur Immundetektion des Western Blots

Die Herstellung der zur Immundetektion verwendeten Blockierungslösungen und Puffer sind in Kapitel 2.15 beschrieben. Zum Blockieren unspezifischer Bindungsstellen wurde die Membran für 45-60 min je nach Antikörper in 5%iger BSA- oder Milchpulver-Lösung geschwenkt und anschließend einmal für 5 min in TBST gewaschen. Die Primär-Antikörper Verdünnung wurde in 5%iger BSA- oder Milchpulverlösung bzw. 1x Roti-Block angesetzt und zusammen mit der Membran bzw. den zugeschnittenen Membranstreifen in Folien eingeschweißt und über Nacht bei 4°C auf einem Schwenktisch inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde die Membran dreimal für jeweils 10 min in 1x TBST bei RT gewaschen, um unspezifisch gebundenen Antikörper zu entfernen. Der an Meerrettich-Peroxidase (*horseradish peroxidase*, HRP) gekoppelte Sekundär-Antikörper, der gegen die Spezies des Primär-Antikörpers gerichtet ist, wurde 1:7500 in dem entsprechend verwendeten Blockierungsmedium verdünnt und für 90 min bei RT in Schalen inkubiert. Anschließend

wurden die Membranen für jeweils 10 min zunächst zweimal in 1x TBST und dann einmal in 1x TBS ohne Zugabe von Tween 20 gewaschen, da dieses die spätere Detektion stören kann. Die Detektion der Proteinbanden erfolgte unter Verwendung des *Enhanced Chemilumineszenz (ECL) HRP-Substrats SuperSignal™ West (Pico bzw. Femto)*. Dabei katalysiert die Meerrettich-Peroxidase in Anwesenheit von H_2O_2 die Umsetzung des Substrats Luminol in seine oxidierte Form, dessen Chemilumineszenz detektiert werden kann. Hierfür wurden die beiden Komponenten (*Luminol Enhancer Solution* und *Peroxide Buffer*) des oben genannten Kits im Verhältnis 1:1 gemischt und pro Membran 2 ml aufgetragen, gefolgt von einer Inkubation für 5 min im Dunkeln. Anschließend wurde die Membran in Klarsichtfolie eingelegt und eventuelle Luftblasen und überschüssige Lösung wurden ausgestrichen. Die Detektion und Dokumentation erfolgte mit Hilfe des Chemilumineszenz-Systems *Intas ChemiLux Imager CSX-1400M* mit der Software *Intas GDS Version 3.34* bei einer Expositionszeit von bis zu 30 min.

Zur Detektion von phosphoryliertem Protein im Vergleich zum Gesamt-Protein oder für Proteine mit einem ähnlichen Molekulargewicht wurden, um den vorherigen Antikörper zu entfernen, die Membranen bzw. Membranstreifen für 8 min mit 0,2 M NaOH behandelt (mit jeweils einem Waschschrift vor und nach der Behandlung für 4 min in ddH₂O), bevor erneut blockiert wurde.

Spezifische Bedingungen zur Immundetektion des Western Blots

In Tabelle 3-24 sind die spezifischen Bedingungen zur Immundetektion der verwendeten Antikörper zusammengefasst. In mPECs wurden ohne und nach Inkubation mit murinem rekombinanten Leptin (10 ng/ml für 15 min) sowohl Proteine des Leptin-Rezeptor-Signalwegs, wie die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors STAT3 (*signal transducer and activator of transcription 3*) an Tyrosin 705 (p-STAT3 Tyr 705) und Serin 272 (p-STAT3 Ser 272), als auch negative Regulatoren wie PTEN (*phosphatase and tensin homolog*), PTP1B (*protein-tyrosine phosphatase 1B*) und SOCS3 (*suppressor of cytokine signaling 3*) untersucht. Des Weiteren wurde in der humanen Endothelzell-Linie HUVEC die Proteinexpression von Endothelin-1 (ET-1) nach Inkubation mit einem PPAR γ -Antagonisten (1, 10, 25 μ M für 24 h) bzw. der entsprechenden DMSO-Kontrolle. Als nicht-reguliertes Referenzprotein (*housekeeping protein*) wurde β -Aktin (ACTB) bzw. GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) verwendet.

Quantifizierung der Proteinbanden

Die Proteinbanden wurden unter Anwendung der Software *AlphaEaseFC 4.0* densitometrisch analysiert (Farbdichtemessung, *Integrated Density Value IDV*). Zur Normalisierung wurde β -Actin bzw. GAPDH verwendet.

Tabelle 3-24: Spezifische Bedingungen der verwendeten Primär-Antikörper zur Immundetektion des Western Blots

Primär-Antikörper	Verdünnung in Medium	Blockierung	Sekundär-Antikörper	Molekulargewicht	ECL
<i>Mouse</i> anti-human β-Actin (HUVECs)	1:500 in 5%iger BSA-Lsg.	5%ige BSA-Lsg.	ECL <i>Mouse</i> IgG, HRP-linked	43 kDa	<i>Femto</i>
<i>Rabbit</i> anti-mouse β-Actin (mPECs)	1:500 in 5%iger BSA-Lsg.	5%ige Milchpulver-Lsg.	ECL <i>Rabbit</i> IgG, HRP-linked	43 kDa	<i>Femto</i>
<i>Rabbit</i> anti-human ET-1 (HUVECs)	1:2500 in 5%iger BSA-Lsg.	5%ige BSA-Lsg.	ECL <i>Rabbit</i> IgG, HRP-linked	24,4 kDa	<i>Femto</i>
<i>Mouse</i> anti-mouse GAPDH (mPECs)	1: 10 000 in 1x Roti-Block	5%ige Milchpulver-Lsg.	ECL <i>Mouse</i> IgG, HRP-linked	37 kDa	<i>Pico</i>
<i>Rabbit</i> anti-mouse Leptin-Rezeptor (mPECs)	1:2000 in 5%iger Milchpulver-Lsg.	5%ige Milchpulver-Lsg.	ECL <i>Rabbit</i> IgG, HRP-linked	100 + 140 kDa	<i>Femto</i>
<i>Rabbit</i> anti-mouse PTEN (mPECs)	1:1000 in 5%iger BSA-Lsg.	5%ige BSA-Lsg.	ECL <i>Rabbit</i> IgG, HRP-linked	54 kDa	<i>Pico</i>
<i>Rabbit</i> anti-mouse PTP1B (mPECs)	1:10 000 in 5%iger BSA-Lsg.	5%ige BSA-Lsg.	ECL <i>Rabbit</i> IgG, HRP-linked	50 kDa	<i>Femto</i>
<i>Rabbit</i> anti-mouse phospho-Stat3 (Tyr705) (mPECs)	1:2000 in 5%iger BSA-Lsg.	5%ige Milchpulver-Lsg.	ECL <i>Rabbit</i> IgG, HRP-linked	79 + 86 kDa	<i>Femto</i>
<i>Rabbit</i> anti-mouse phospho-Stat3 (Ser727) (mPECs)	1:1000 in 5%iger BSA-Lsg.	5%ige Milchpulver-Lsg.	ECL <i>Rabbit</i> IgG, HRP-linked	86 kDa	<i>Femto</i>
<i>Rabbit</i> anti-mouse Stat3 (mPECs)	1:2000 in 5%iger Milchpulver-Lsg.	5%ige Milchpulver-Lsg.	ECL <i>Rabbit</i> IgG, HRP-linked	79 + 86 kDa	<i>Femto</i>
<i>Rabbit</i> anti-mouse SOCS3 (mPECs)	1:1000 in 5%iger BSA-Lsg.	5%ige BSA-Lsg.	ECL <i>Rabbit</i> IgG, HRP-linked	26 kDa	<i>Femto</i>

3.7 Statistik

Sämtliche statistischen Auswertungen und die graphischen Darstellungen wurden mit der Software *GraphPad Prism* (Version 6.03) durchgeführt. Die Prüfung auf Normalverteilung erfolgte mit dem *D'Agostino & Pearson* Omnibus-Test (bei einem Stichprobenumfang von $n \geq 8$), während bei einem geringeren Stichprobenumfang der *Shapiro-Wilk*-Test (bei $n=6-7$) bzw. der *Kolmogorov-Smirnov*-Test mit Korrektur nach *Lilliefors* (bei $n=5$) verwendet wurde. Normalverteilte Daten wurden als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (*standard error of mean*, SEM) dargestellt und die Signifikanz mit parametrischen Tests geprüft, welche das Vorliegen einer Normalverteilung voraussetzen. Der Vergleich von zwei unabhängigen Stichproben erfolgte mit dem *Zweistichproben-t-Test* (*Student's t-Test*) für ungepaarte Stichproben. Die Berechnung der Signifikanzen von mehr als zwei Stichproben wurde mit einer einfaktoriellen bzw. zweifaktoriellen Varianzanalyse (einfaktorielle oder zweifaktorielle *ANOVA*) durchgeführt. War der Unterschied beim *ANOVA*-Test signifikant, wurde ein *Post-Hoc-Test* angeschlossen, bei dem die Mittelwerte der einzelnen Messgruppen mit Hilfe des *Bonferroni*-Tests miteinander verglichen wurden. Die Daten nicht normalverteilter Messgruppen wurden als Median mit Interquartilsabstand dargestellt und nicht-parametrische Tests zur Prüfung der Signifikanz verwendet. Dabei wurde für den Vergleich von zwei Gruppen der *Mann-Whitney*-Test verwendet, während der Vergleich von mehr als zwei Gruppen mit dem *Kruskal-Wallis*-Test und anschließendem *Dunn's* *Post-Hoc-Test* erfolgte. P-Werte (Signifikanzwerte) von $<0,05$ wurden als statistisch signifikant angenommen.

4. Ergebnisse

4.1 Genotypisierung und Nachweis der erfolgreichen Rekombination in Endothelzell- und glatten Muskelzell-spezifischen Leptin-Rezeptor Knockout Mäusen

Zur Untersuchung der Bedeutung des Leptin-Rezeptor-Signalwegs auf die vaskuläre Wundheilung, wurden Mäuse mit Tamoxifen-induzierbarer Endothel- und glatter Muskelzell-spezifischer Leptin-Rezeptor (LepR)-Deletion generiert. Zur Genotypisierung wurde die genomische DNA von End.LepR-WT und -KO bzw. von SMC.LepR-WT und -KO Mäusen mittels Primern, welche das erste kodierende Exon von LepR flankieren, in PCR-Reaktionen amplifiziert. Die Lokalisation der verwendeten $LepR^{lox}$ und $LepR^{\Delta}$ Primer ist in der Abbildung 4-1 schematisch dargestellt. Nach Zell-spezifischer Cre-Rekombinase Aktivierung durch Tamoxifen, wird Exon 1 (gelb) ausgeschnitten, so dass nur noch eine loxP Seite verbleibt und somit ein $LepR^{\Delta}$ Allel generiert wird. Das neu entstandene 390 bp Rekombinations-Produkt kann von Primer 1 ($LepR^{lox1}$) und 3 ($LepR^{\Delta}$) spezifisch amplifiziert werden, während diese bei $LepR^{lox}$ und $LepR^{WT}$ zu weit voneinander entfernt sind, um zu einer Amplifizierung zu führen. Die Amplifizierung der $LepR^{lox}$ und $LepR^{WT}$ Allele erfolgt mit den Primern 1 ($LepR^{lox1}$) und 2 ($LepR^{lox2}$). Aufgrund der fehlenden loxP Sequenz des $LepR^{WT}$ Allels entsteht ein kleineres Produkt von 227 bp [59].

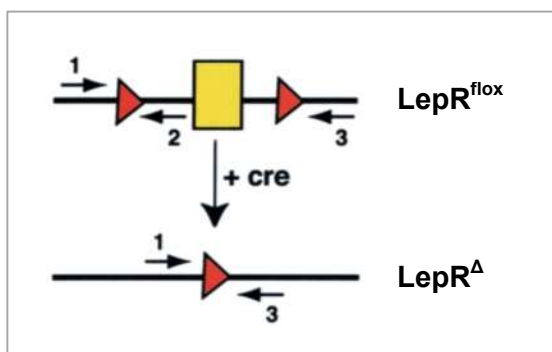


Abbildung 4-1: Schematische Darstellung der Lokalisation der $LepR^{lox}$ und $LepR^{\Delta}$ Primer. Primer 1: $LepR^{lox1}$, Primer 2: $LepR^{lox2}$; Primer 3: $LepR^{\Delta}$ (modifiziert nach [59]).

Bestätigt wurde die erfolgreiche LepR Gen-Exzision mittels PCR-Analysen der gDNA von Mausschwanz-Biopsien von End.LepR-WT und -KO (Abb. 4-2 A) bzw. von SMC.LepR-WT und -KO (Abb. 4-2 B) Mäusen. Die Tamoxifen-induzierte Cre-vermittelte LepR-Deletion konnte spezifisch nur in CreER^{T2} exprimierenden sowohl homozygoten $LepR_{lox/lox}$ als auch heterozygoten $LepR_{lox/WT}$ Mäusen nach Tamoxifen-Gabe nachgewiesen werden, d.h. ein gefloxtes Allel ist ausreichend, um eine LepR-KO Maus zu generieren.

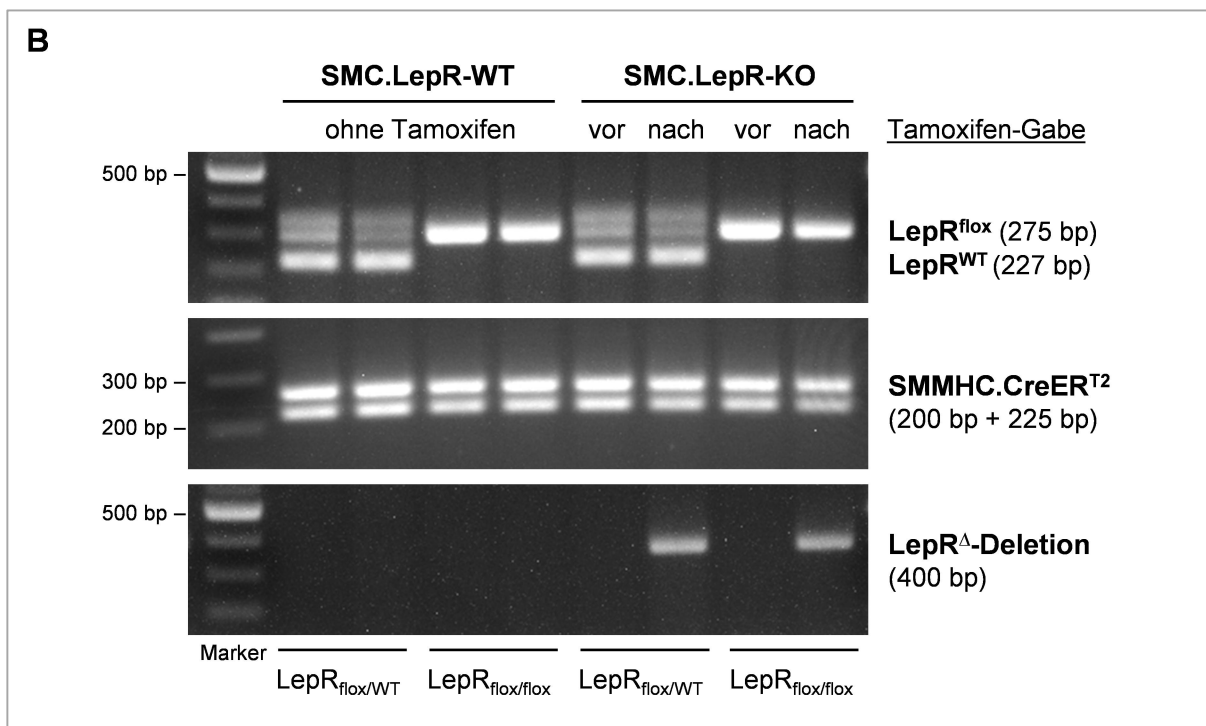
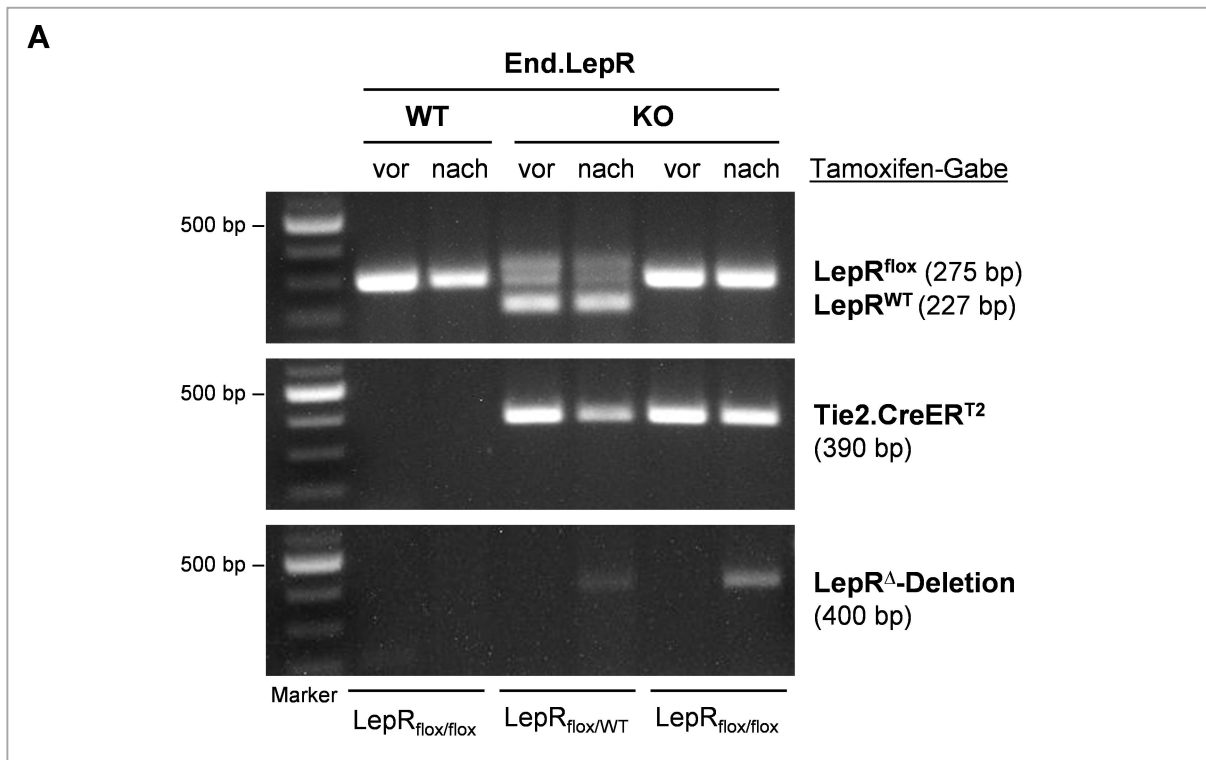


Abbildung 4-2: Repräsentative Genotypisierung und Nachweis der erfolgreichen LepR^Δ Rekombination in End.LepR-KO und SMC.LepR-KO Mäusen nach Tamoxifen-Gabe. PCR-Analysen genomischer DNA (gDNA) von Mausschwanz-Biopsien.

4.2 Nachweis und Effizienz der Endothelzell- und glatten Muskelzell-spezifischen Leptin-Rezeptor-Deletion

Zum Nachweis der erfolgreichen Endothelzell-spezifischen LepR-Deletion wurde die erfolgreiche Rekombination auch in murinen primären Endothelzellen (mPECs), die aus den Lungen von End.LepR-WT und -KO Mäusen isoliert wurden, nachgewiesen (Abb. 4-3 A). Des Weiteren konnte auch *in vivo* in unverletzten Carotisarterien eine reduzierte LepR-Expression im Endothel von End.LepR-KO Mäusen mittels Immunfluoreszenz nachgewiesen werden (Abb. 4-3 B). Die Effizienz der endothelialen LepR-Deletion wurde in mPECs von End.LepR-WT und -KO Mäusen sowohl auf mRNA- als auch auf Protein-Ebene überprüft. Die RT-PCR- und Western Blot-Analysen der LepR-Effizienz ergaben eine signifikante, jedoch nicht vollständige, endotheliale Reduktion der LepR mRNA- und Protein-Expression in End.LepR-KO Mäusen (Abb. 4-3 C-F). Im Mittel wurde auf mRNA-Ebene eine 0,45-fache Reduktion ($0,55 \pm 0,08$ verbleibende LepR mRNA-Expression in End.LepR-KO vs. -WT; $p < 0,001$; Abb. 4-5 C und D) und auf Proteinebene eine 0,76-fache Reduktion ($0,24 \pm 0,05$ verbleibende LepR Proteinexpression in End.LepR-KO vs. -WT; $p < 0,0001$; Abb. 4-5 E und F) erreicht.

Der Nachweis der erfolgreichen Rekombination und Visualisierung der spezifischen LepR-Deletion in glatten Muskelzellen erfolgte mittels PCR-Analyse (Abb. 4-4 A) bzw. Immunfluoreszenz (Abb. 4-4 B) an isolierten unverletzten Carotisarterien von SMC.LepR-WT und -KO Mäusen. Zur Bestimmung der Effizienz der glatten Muskelzell-spezifischen Deletion wurden jeweils drei Aorten von SMC.LepR-WT und -KO Mäusen isoliert und gepoolt. Die Bestimmung der LepR mRNA-Expression mittels quantitativer real-time PCR (qPCR) ergab eine 0,80-fache Reduktion (bzw. 0,20 verbleibende LepR mRNA-Expression) in SMC.LepR-KO im Vergleich zu den SMC.LepR-WT Mäusen (Abb. 4-4 C).

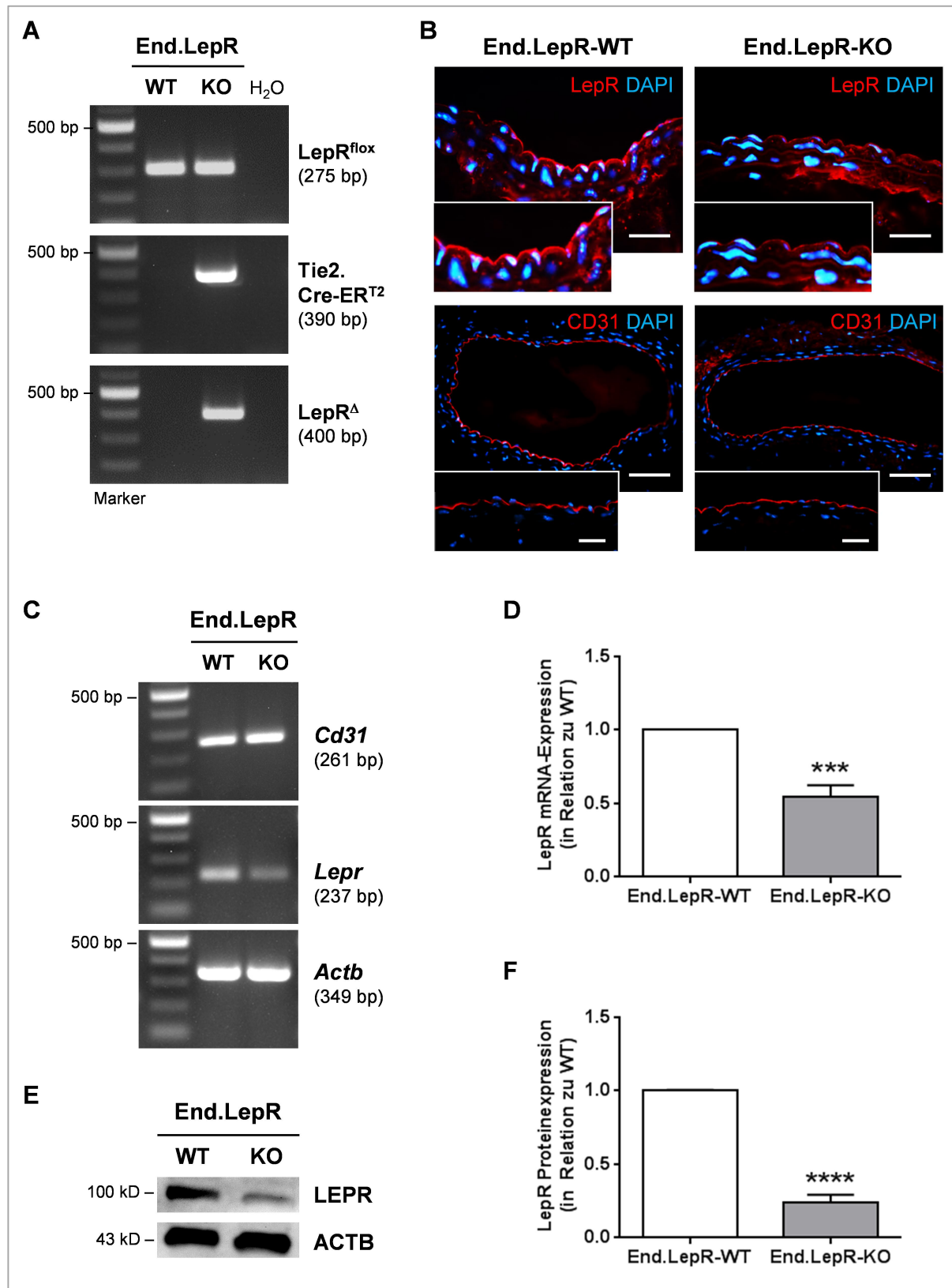


Abbildung 4-3: Repräsentativer Nachweis und Effizienz der erfolgreichen Endothelzell-spezifischen Leptin-Rezeptor (LepR)-Deletion. (A) PCR-Analyse genomischer DNA (gDNA) muriner primärer Endothelzellen (mPECs) isoliert aus den Lungen von End.LepR-WT und -KO Mäusen. (B) Repräsentativer Nachweis von LepR (oben: *große Bilder* 1000-fache Vergrößerung; *kleine Bilder* manuelle Detailvergrößerung) und CD31 (unten: *große Bilder* 400-fache und *kleine Bilder* 1000-fache Vergrößerung) mittels Immunfluoreszenz auf unverletzten Carotiden. Die Maßbalken repräsentieren 25 µm (obere Reihe und kleine Bilder untere Reihe) und 50 µm (untere Reihe).

(C-F) Pro mPEC-Isolation wurden die Lungen von jeweils n=3 Mäusen pro Genotyp und Isolation verwendet. (C) Repräsentative RT-PCR Banden. Bestätigt wurde der endotheliale Phänotyp durch die Bestimmung der CD31 mRNA-Expression. (D) Semiquantitative RT-PCR-Analyse der LepR mRNA-Expression. Die relative mRNA-Expression (in Relation zu End.LepR-WT gleich eins gesetzt) ist dargestellt als Mittelwert \pm SEM (n=5). ***p<0,001 vs. End.LepR-WT. (E) Repräsentative Western Blot-Banden. (F) Densitometrische Quantifizierung der LepR Proteinexpression. Die relative Proteinexpression (in Relation zu End.LepR-WT gleich eins gesetzt) ist dargestellt als Mittelwert \pm SEM (n=4). ****p<0,001 vs. End.LepR-WT.

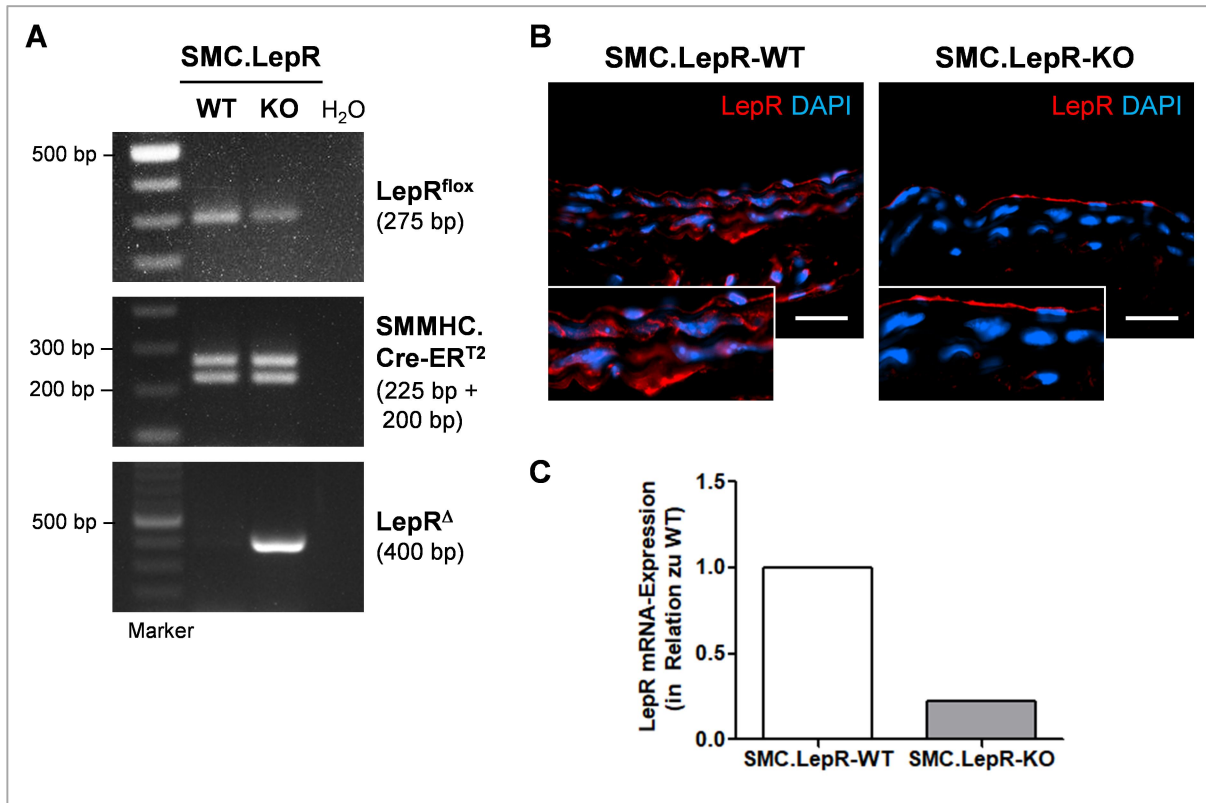


Abbildung 4-4: Repräsentativer Nachweis und Effizienz der erfolgreichen glatten Muskelzell-spezifischen Leptin-Rezeptor (LepR)-Deletion. (A) PCR-Analyse genomischer DNA (gDNA) isoliert aus unverletzten Carotisarterien von SMC-LepR-WT und -KO Mäusen. (B) Repräsentativer Nachweis von LepR (oben; *große Bilder* 1000-fache Vergrößerung; *kleine Bilder* manuelle Detailvergrößerung) mittels Immunfluoreszenz auf unverletzten Carotisarterien. Die Maßbalken repräsentieren 25 μ m. (C) Quantitative Analyse der relativen LepR mRNA-Expression (in Relation zu End.LepR-WT gleich eins gesetzt) mittels qPCR. Aorten von jeweils n=3 Mäusen pro Genotyp wurden isoliert und gepoolt.

4.3 Untersuchung von Körpergewicht, metabolischen Parametern und zirkulierenden Leptinspiegeln

Zur Untersuchung der Auswirkungen der Zell-spezifischen LepR-Deletion unter Normalgewicht und nach Induzierung von Übergewicht, wurden das Körpergewicht sowie das Gewicht des viszeralen Fettgewebes (VAT, *visceral adipose tissue*) bestimmt. Des Weiteren wurden metabolische Parameter wie Glukose und Lipide sowie die zirkulierenden Leptinspiegel, der lösliche Leptin-Rezeptor (sLepR, *soluble LepR*) und der sich daraus ergebende „Freie Leptin Index“ (FLI, *free leptin index*) im Serum untersucht, welches zum Zeitpunkt der Gewebeentnahme gewonnen wurde. Die erhobenen Daten in den einzelnen Versuchsgruppen der LepR-Deletion in Endothelzellen (End.LepR) bzw. glatten Muskelzellen (SMC.LepR) sind in den Tabellen 4-1 bis 4-4 zusammengefasst.

4.3.1 Auswirkungen der Leptin-Rezeptor-Deletion in Endothelzellen

In den mit Normalfutter (NC, *normal chow*) gefütterten Mäusen hatte die LepR-Reduktion auf Endothelzellen keinen Einfluss auf das Körpergewicht, die postoperative Gewichtszunahme oder auf das VAT-Gewicht und auch nicht auf die Glukose-, Gesamtcholesterin- und Triglyzeridspiegel im Serum. Auch die zirkulierenden Spiegel von Leptin und dem sLepR waren ähnlich und folglich unterschied sich der FLI nicht. Zur Induzierung von Übergewicht und einer systemischen Hyperleptinämie erhielten die Mäuse über einen Zeitraum von sieben Wochen eine Hochfettdiät (HFD, *high fat diet*), welche vier Wochen präoperativ begonnen und bis zur Gewebeentnahme drei Wochen postoperativ fortgesetzt wurde. Zum Zeitpunkt der OP resultierte die vierwöchige Fütterung einer HFD in einem signifikant erhöhten Körpergewicht sowohl in den End.LepR-WT ($p < 0,001$) als auch in den End.LepR-KO ($p < 0,001$) Mäusen im Vergleich zu den mit NC gefütterten Mäusen des gleichen Genotyps. Die LepR-Reduktion auf Endothelzellen hatte auch bei übergewichtigen Mäusen keinen Einfluss auf das OP-Gewicht. In Übereinstimmung mit der Gewichtszunahme unter einer HFD, war auch das VAT-Gewicht der übergewichtigen End.LepR-WT ($p < 0,05$) und -KO ($p < 0,001$) Mäuse im Vergleich zu den mit NC gefütterten Mäusen des gleichen Genotyps signifikant erhöht. Interessanterweise war das VAT-Gewicht in der End.LepR-KO+HFD Gruppe weiter ausgeprägt, jedoch statistisch nicht signifikant (820 [355-1228] vs. 495 [360-750] mg in End.LepR-WT+HFD; $p = 0,99$). Zum Zeitpunkt der Gewebeentnahme konnte in allen Versuchsgruppen eine Gewichtszunahme (bezogen auf das OP-Gewicht) verzeichnet werden, wobei diese in der End.LepR-WT+HFD Gruppe im Vergleich zu allen anderen Gruppen signifikant geringer war ($p < 0,001$ vs. End.LepR-WT+NC; $p < 0,01$ vs. End.LepR-KO+HFD). Diese im Mittel geringere postoperative Gewichtszunahme der End.LepR-

WT+HFD Gruppe bei gleichem Ausgangsgewicht zum Zeitpunkt der OP gegenüber der End.LepR-KO+HFD Gruppe, wäre eine mögliche Erklärung für das niedrigere VAT-Gewicht. Die Glukose- und Cholesterinspiegel waren in den HFD-gefütterten End.LepR-WT ($p < 0,001$) und -KO ($p < 0,001$) Mäusen im Vergleich zu den normalgefütterten Mäusen desselben Genotyps signifikant erhöht, unterschieden sich innerhalb der beiden HFD-Gruppen jedoch nicht. Die HFD-Fütterung hatte keinen Einfluss auf die Triglyzeridspiegel im Serum, weder in den End.LepR-WT noch in den -KO Mäusen. Neben Übergewicht führte die Fütterung einer HFD auch zu einer Hyperleptinämie. Obwohl die Serum-Leptinspiegel in der End.LepR-WT+HFD Gruppe im Vergleich zu den normalgewichtigen End.LepR-WT+NC Mäusen statistisch nicht signifikant erhöht waren, konnte im Mittel eine Verdopplung verzeichnet werden ($3,1 \pm 0,4$ ng/ml in End.LepR-WT+NC vs. $6,4 \pm 1,9$ ng/ml in End.LepR-WT+HFD; $p = 0,62$). Aufgrund der signifikant erhöhten sLepR-Spiegel ($p < 0,05$) wiesen diese jedoch einen signifikant geringeren FLI auf ($p < 0,05$), ein Marker für die zirkulierenden Spiegel von freiem und tatsächlich aktivem Leptin. Interessanterweise waren die Serum-Leptinspiegel in den übergewichtigen End.LepR-KO Mäusen sogar noch weiter erhöht ($p < 0,05$ vs. End-LepR-WT+HFD), wobei diese im Gegensatz zu den übergewichtigen End.LepR-WT Mäusen keine erhöhten sLepR-Spiegel aufwiesen, was wiederum in einem erhöhten FLI resultierte ($p < 0,05$ vs. End-LepR-WT+HFD).

Tabelle 4-1: Körpergewicht und VAT-Gewicht normalgewichtiger und übergewichtiger End.LepR-WT und -KO Mäuse

	End.LepR- WT	End.LepR- KO	End.LepR- WT	End.LepR- KO
n	18	19	14	12
Tamoxifen	ja / nein	ja	ja / nein	ja
Diät	NC	NC	HFD	HFD
Körpergewicht bei OP [g]	$24,2 \pm 0,5$	$23,5 \pm 0,4$	$28,2 \pm 0,6$ ***	$27,7 \pm 0,8$ ***
Gewichtszunahme postoperativ [g]	$3,1 \pm 0,3$	$2,9 \pm 0,3$	$0,5 \pm 0,2$ ***	$2,4 \pm 0,5$ ##
Körpergewicht bei Gewebeentnahme [g]	$27,4 \pm 0,4$	$26,5 \pm 0,5$	$28,7 \pm 0,6$	$30,1 \pm 0,7$ ***
VAT-Gewicht [mg]	274 [236-311] (n= 11)	218 [192-258] (n=14)	495 [360-750] * (n=12)	820 [355-1228] *** (n=12)

Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert \pm SEM. Das Gewicht des viszeralen Fettgewebes (VAT) ist dargestellt als Median mit Interquartilsabstand. * $p < 0,05$ und $p^{***} < 0,001$ vs. Mäuse desselben Genotyps, die Normalfutter (NC) erhielten. ## $p < 0,01$ vs. End.LepR-WT Mäusen, die eine Hochfett-diät (HFD) erhielten.

Tabelle 4-2: Metabolische Parameter und zirkulierende Leptinspiegel normalgewichtiger und übergewichtiger End.LepR-WT und -KO Mäuse im Serum zum Zeitpunkt der Gewebeentnahme

	End.LepR- WT	End.LepR- KO	End.LepR- WT	End.LepR- KO
Serum-Glukose [mg/dL]	216 ± 16 (n=4)	215 ± 23 (n=5)	381 ± 9 *** (n=9)	380 ± 12 *** (n=10)
Serum- Cholesterin [mg/dL]	69 ± 5 (n=9)	64 ± 3 (n=13)	104 ± 9 *** (n=9)	122 ± 6 *** (n=9)
Serum-Triglyzeride [mg/dL]	132 ± 12 (n=16)	115 ± 7 (n=15)	119 ± 19 (n=13)	93 ± 11 (n=11)
Serum-Leptin [ng/mL]	3,1 ± 0,4 (n=16)	2,4 ± 0,3 (n=16)	6,4 ± 1,9 (n=16)	15,4 ± 4,5 ***# (n=11)
Serum-sLepR [ng/mL]	1,8 ± 0,1 (n=10)	1,8 ± 0,1 (n=10)	2,2 ± 0,1 * (n=13)	1,9 ± 0,1 (n=8)
FLI	5,1 ± 0,5 (n=10)	4,6 ± 0,3 (n=10)	2,0 ± 0,3 * (n=13)	8,8 ± 2,6 # (n=8)

Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert ± SEM. *p<0,05 und p***<0,001 vs. Mäuse desselben Genotyps, die Normalfutter (NC) erhielten; #p<0,05 vs. End.LepR-WT Mäusen, die eine Hochfett-diät (HFD) erhielten. *Abkürzungen:* sLepR, löslicher Leptin-Rezeptor (*soluble LepR*); FLI, „Freier Leptin Index“ (*free leptin index*).

4.3.2 Auswirkungen der Leptin-Rezeptor-Deletion in glatten Muskelzellen

Wie in Kapitel 3.1.4 begründet, mussten SMMHC.CreER^{T2(+)} x LepR_{flox/WT} bzw. LepR_{flox/flox} ohne Tamoxifen-Futter als Kontrolltiere verwendet werden. Die beiden SMC.LepR-KO Gruppen, die Tamoxifen-Futter über einen Zeitraum von sechs Wochen erhielten, wiesen zum Zeitpunkt der OP ein signifikant geringeres Körpergewicht im Vergleich zu den SMC.LepR-WT Kontrollen auf, was höchstwahrscheinlich mit der Tamoxifen-Gabe zusammenhängt. Dafür spricht auch, dass postoperativ eine signifikant stärkere Gewichtszunahme in den beiden SMC.LepR-KO Gruppen mit Tamoxifen im Vergleich zu den jeweiligen WT-Kontrollen ohne Tamoxifen verzeichnet werden konnte (p<0,01 vs. SMC.LepR-WT+NC; p<0,01 vs. SMC-LepR-WT+HFD). Folglich reduzierte sich der Gewichtsunterschied in den mit und ohne Tamoxifen gefütterten Mäusen beider Diäten von 3,2 g bei OP auf 1,6 g in den beiden NC-Gruppen (p<0,05) und auf 1,0 g in den beiden HFD-Gruppen (p=0,99) und war somit postoperativ weniger stark ausgeprägt. Diese Befunde verdeutlichen, dass sich das Körpergewicht nach Umstellung von Tamoxifen-Futter auf NC- bzw. HFD-Futter erst nach einigen Wochen allmählich dem der Mäuse angleicht, die kein Tamoxifen erhielten.

Die LepR-Reduktion auf glatten Muskelzellen hatte in den mit NC gefütterten Mäusen weder Einfluss auf das VAT-Gewicht noch die Glukose-, Gesamtcholesterin- und Triglyzeridspiegel

im Serum. Auch bezüglich der zirkulierenden Leptinspiegel, sLepR-Spiegel und folglich des FLI konnte kein Unterschied festgestellt werden. Insgesamt resultierte die HFD in einem signifikant erhöhten Körpergewicht bei OP und postoperativ sowohl in den SMC.LepR-WT ($p < 0,001$ bei OP; $p < 0,05$ bei Gewebeentnahme) als auch in den SMC.LepR-KO ($p < 0,001$ bei OP; $p < 0,001$ bei Gewebeentnahme) Mäusen gegenüber den mit NC gefütterten Mäusen des gleichen Genotyps. Die HFD führte in gleichem Ausmaß zu viszeraler Adipositas und Hyperleptinämie sowohl in SMC.LepR-WT und -KO Mäusen. Diese wiesen ein signifikant erhöhtes VAT-Gewicht ($p < 0,001$), erhöhte Spiegel an zirkulierendem Leptin ($p < 0,01$) sowie des sLepR ($p < 0,05$ in SMC.LepR-WT+HFD vs. -WT+NC; $p < 0,001$ in SMC.LepR-KO+HFD vs. -KO+NC) und folglich einen erhöhten FLI ($p < 0,05$) im Vergleich zu den jeweiligen mit NC gefütterten Kontrollen auf. Die Glukosespiegel im Serum waren in beiden HFD-Gruppen gleichermaßen signifikant erhöht im Vergleich zu den jeweiligen mit NC gefütterten Kontrollen ($p < 0,001$), während keine signifikanten Unterschiede bezüglich des Serum-Gesamtcholesterins und der Serum-Triglyzeride festgestellt werden konnten.

Tabelle 4-3: Körpergewicht und VAT-Gewicht normalgewichtiger und übergewichtiger SMC.LepR-WT und -KO Mäuse

	SMC.LepR-WT	SMC.LepR-KO	SMC.LepR-WT	SMC.LepR-KO
n	19	26	12	16
Tamoxifen	nein	ja	nein	ja
Diät	NC	NC	HFD	HFD
Körpergewicht bei OP [g]	26,8 ± 0,4	23,6 ± 0,3 ^{###}	29,3 ± 0,6 ^{***}	26,1 ± 0,6 ^{***##}
Gewichtszunahme postoperativ [g]	1,5 ± 0,2	2,8 ± 0,3 ^{##}	0,7 ± 0,3	2,4 ± 0,3 ^{##}
Körpergewicht bei Gewebeentnahme [g]	28,0 ± 0,3	26,4 ± 0,3 [#]	30,0 ± 0,7 [*]	29,0 ± 0,6 ^{***}
VAT-Gewicht [mg]	275 ± 27 (n=10)	247 ± 31 (n=13)	1005 ± 129 ^{***} (n=12)	897 ± 75 ^{***} (n=16)

Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert ± SEM. * $p < 0,05$ und $p^{***} < 0,001$ vs. Mäuse desselben Genotyps, die Normalfutter (NC) erhielten; [#] $p < 0,05$, ^{##} $p < 0,01$ und ^{###} $p < 0,001$ vs. SMC.LepR-WT Mäuse derselben Diät.

Tabelle 4-4: Metabolische Parameter und zirkulierende Leptinspiegel normalgewichtiger und übergewichtiger SMC.LepR-WT und -KO Mäuse im Serum zum Zeitpunkt der Gewebeentnahme

	SMC.LepR- WT	SMC.LepR- KO	SMC.LepR- WT	SMC.LepR- KO
Serum-Glukose [mg/dL]	259 ± 23 (n=5)	255 ± 15 (n=5)	380 ± 13 *** (n=4)	392 ± 7 *** (n=8)
Serum-Cholesterin [mg/dL]	66 ± 3 (n=9)	69 ± 4 (n=8)	80 ± 10 (n=5)	78 ± 1 (n=8)
Serum-Triglyzeride [mg/dL]	129 ± 11 (n=17)	130 ± 7 (n=17)	118 ± 15 (n=10)	162 ± 15 (n=14)
Serum-Leptin [ng/mL]	2,1 ± 0,4 (n=18)	2,2 ± 0,4 (n=18)	10,6 ± 2,6 ** (n=14)	10,6 ± 2,2 ** (n=18)
Serum-sLepR [ng/mL]	2,1 ± 0,1 (n=10)	2,1 ± 0,1 (n=10)	2,4 ± 0,1 * (n=11)	2,5 ± 0,1 *** (n=10)
FLI (<i>free leptin index</i>)	1,1 ± 0,2 (n=10)	1,1 ± 0,1 (n=10)	3,6 ± 1,1 * (n=11)	4,3 ± 0,7 * (n=10)

Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert ± SEM. *p<0,05, **p<0,01 und p***<0,001 vs. Mäuse desselben Genotyps, die Normalfutter (NC) erhielten. *Abkürzungen*: sLepR, löslicher Leptin-Rezeptor (*soluble LepR*); FLI, „Freier Leptin Index“ (*free leptin index*).

4.4 Morphometrische Untersuchung der Gefäßverletzung

4.4.1 Auswirkungen der endothelialen Deletion des Leptin-Rezeptors auf die Neointimabildung

Die Rolle des endothelialen Leptin-Signalwegs auf die vaskuläre Wundheilung wurde unter Verwendung des FeCl₃-Modells zur Induzierung einer Gefäßverletzung in normalgewichtigen und übergewichtigen End.LepR-WT und -KO Mäusen untersucht. Drei Wochen nach Gefäßverletzung wurden Serienschnitte der vaskulären Läsionen mit Hilfe der Verhoeff's Elastica-Färbung untersucht (repräsentative Bilder siehe Abb. 4-5 A). Die morphometrischen Analysen ergaben, dass die LepR-Reduktion auf Endothelzellen in mit NC gefütterten normalgewichtigen Mäusen mit einer signifikant erhöhten Neointima-Fläche assoziiert war (8.288 ± 662 vs. $3.622 \pm 419 \mu\text{m}^2$ in End.LepR-WT+NC; $p < 0,0001$; Abb. 4-5 B). Folglich konnte in den End.LepR-KO Mäusen auch eine signifikant erhöhte Intima-Media-Ratio ($0,33 [0,24-0,36]$ vs. $0,15 [0,09-0,18]$ in End.LepR-WT+NC; $p < 0,0001$; Abb. 4-5 C) sowie eine signifikant erhöhte Lumenstenose ($20,6 \pm 1,5$ vs. $9,9 \pm 1,6\%$ in End.LepR-WT+NC; $p < 0,0001$; Abb. 4-5 D) bestätigt werden. In mit einer HFD gefütterten übergewichtigen End.LepR-WT Mäusen konnten im Vergleich zu den normalgewichtigen End.LepR-WT Mäusen ähnliche Auswirkungen auf die Neointima (12.706 ± 2.368 vs. $3.622 \pm 419 \mu\text{m}^2$; $p < 0,001$; Abb. 4-5 B), Intima-Media-Ratio ($0,39 [0,14-0,70]$ vs. $0,15 [0,09-0,18]$; $p < 0,01$; Abb. 4-5 C) und Lumenstenose ($20,0 \pm 3,0$ vs. $9,9 \pm 1,6\%$; $p < 0,05$; Abb. 4-5 D) beobachtet werden, welche sich nicht signifikant von den normalgewichtigen End.LepR-KO Mäusen unterschieden. Die HFD-Fütterung in den End.LepR-KO Mäusen resultierte in einem weiteren signifikanten Anstieg der Neointima-Fläche im Vergleich zu den normalgewichtigen End.LepR-KO und übergewichtigen End.LepR-WT Mäusen (20.280 ± 2.720 vs. $8.288 \pm 662 \mu\text{m}^2$ in End.LepR-KO+NC; $p < 0,0001$ bzw. vs. $12.706 \pm 2.368 \mu\text{m}^2$ in End.LepR-WT+HFD; $p < 0,05$; Abb. 4-5 B). Auch die Intima-Media-Ratio ($0,78 \pm 0,12$ vs. $0,33 [0,24-0,36]$ in End.LepR-KO+NC bzw. vs. $0,39 [0,14-0,70]$ in End.LepR-WT+HFD; beides $p < 0,05$; Abb. 4-6 C) und Lumenstenose ($30,8 \pm 4,1$ vs. $20,6 \pm 1,5\%$ in End.LepR-KO+NC bzw. vs. $20,0 \pm 3,0\%$ in End.LepR-WT+HFD; beides $p < 0,05$, Abb. 4-5 D) waren in der End.LepR-KO+HFD Gruppe stärker ausgeprägt gegenüber der End.LepR-KO+NC und End.LepR-WT+HFD Gruppe. Andererseits hatte die LepR-Deletion in beiden Diäten keinen Einfluss auf die Media-Fläche (Abb. 4-5 E) und Gesamtgefäßfläche (Abb. 4-5 F). Jedoch führte die HFD-Fütterung in End.LepR-WT Mäusen zu einer signifikant vergrößerten Media-Fläche (33.140 ± 2.344 vs. $23.900 \pm 932 \mu\text{m}^2$ vs. End.LepR-WT+NC; $p < 0,01$), während bezüglich der Media-Fläche in den übergewichtigen End.LepR-KO keine signifikanten Unterschiede verzeichnet werden konnten. Des Weiteren führte die HFD-Fütterung per se sowohl in der End.LepR-WT Gruppe (93.306 ± 7.458 vs. $66.019 \pm 4.277 \mu\text{m}^2$ in End.LepR-WT+NC;

$p < 0,001$) als auch in der End.LepR-KO Gruppe (92.945 ± 4.177 vs. $66.811 \pm 2.433 \mu\text{m}^2$ in End.LepR-KO+NC; $p < 0,01$) zu einer signifikant vergrößerten Gefäßfläche (Abb.4-5 F).

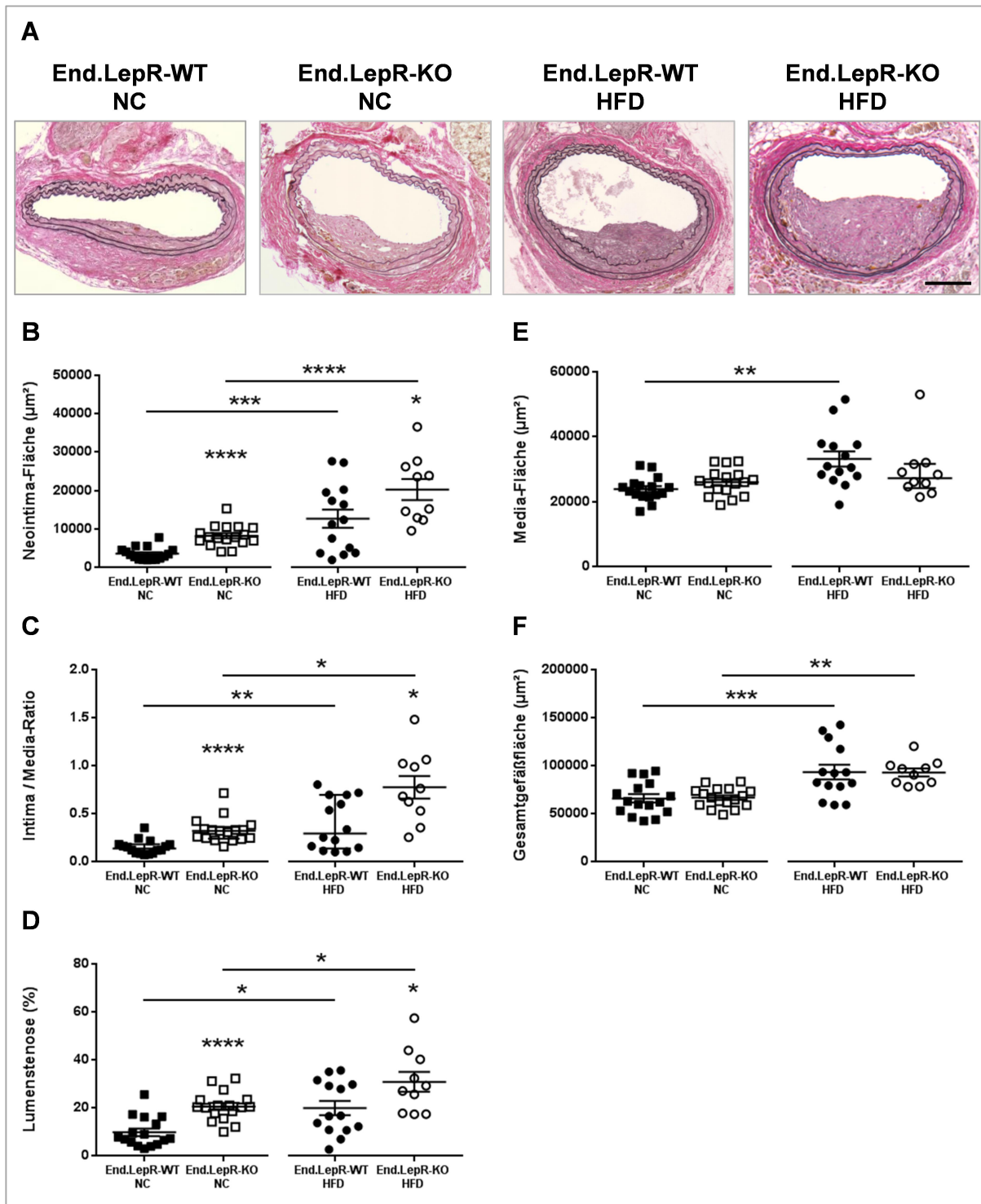


Abbildung 4-5: Morphometrische Analyse der Neointimabildung in normalgewichtigen und übergewichtigen End.LepR-WT und -KO Mäusen. (A) Repräsentative Bilder der Verhoeff's Elastica-Färbung Paraffin-fixierter Serienschritte der vaskulären Läsionen (100-fache Vergrößerung). Der Maßbalken repräsentiert $100 \mu\text{m}$. Morphometrische Analyse der Neointima-Fläche (B), Intima-Media-Ratio (C), Lumenstenose (D), Media-Fläche (E) und Gesamtgefäßfläche (F). Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert \pm SEM bzw. als Median mit Interquartilsabstand. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ und **** $p < 0,0001$ vs. End.LepR-WT derselben Diät oder vs. Mäuse desselben Genotyps, die Normalfutter (NC) erhielten. *Abkürzungen:* HFD, Hochfett diät.

4.4.2 Auswirkungen der glatten Muskelzell-spezifischen Deletion des Leptin-Rezeptors auf die Neointimabildung

Zur Differenzierung der Zell-spezifischen Effekte des Leptin-Signalwegs auf die vaskuläre Wundheilung, wurden die Läsionen nach chemischer Gefäßverletzung mit FeCl_3 auch in Mäusen mit einer glatten Muskelzell-spezifischen LepR-Deletion morphometrisch untersucht. In Abbildung 4-6 A sind repräsentative Bilder der jeweiligen Versuchsgruppen gezeigt. Im Gegensatz zur endothelialen LepR-Deletion resultierte die Deletion auf glatten Muskelzellen in mit NC gefütterten normalgewichtigen Mäusen in einer signifikant vergrößerten Media-Fläche (35.094 ± 1.566 vs. $28.126 \pm 1.107 \mu\text{m}^2$ in SMC.LepR-WT+NC; $p < 0,01$; Abb. 4-6 E). Diese in SMC.LepR.KO+NC Mäusen beobachtete Media-Hyperplasie war auch unter einer HFD in ähnlichem Ausmaß in SMC.LepR-WT ($34.743 \pm 1.869 \mu\text{m}^2$) und SMC.LepR-KO Mäusen ($33.929 \pm 1.824 \mu\text{m}^2$) vorhanden, wobei das Fehlen des Leptin-Rezeptors unter HFD-Bedingungen in keiner weiteren Vergrößerung der Media-Fläche gegenüber den übergewichtigen SMC.LepR-WT resultierte. Bezüglich der Neointima-Fläche, Intima-Media-Ratio und Lumenstenose konnten in den normalgewichtigen SMC.LepR-KO Mäusen keine Unterschiede gegenüber den SMC.LepR-WT+NC Mäusen gefunden werden (Abb. 4-6 B, C, D). Die HFD-Fütterung führte unabhängig vom Genotyp sowohl in SMC.LepR-WT als auch -KO Mäusen zu einer signifikant erhöhten Neointima-Fläche ($12.317 \pm 2.829 \mu\text{m}^2$ in SMC.LepR-WT+HFD vs. $4.253 \pm 607 \mu\text{m}^2$ in SMC.LepR-WT+NC; $p < 0,05$ bzw. $10.766 [3.992-14.263] \mu\text{m}^2$ in SMC.LepR-KO+HFD vs. $4.235 [1.775-5.800] \mu\text{m}^2$ in SMC.LepR-KO+NC; $p < 0,01$; Abb. 4-6 B) und Intima-Media-Ratio ($0,33 \pm 0,07$ in SMC.LepR-WT+HFD vs. $0,16 \pm 0,02$ in SMC.LepR-WT+NC; $p < 0,05$ bzw. $0,34 [0,14-0,37]$ in SMC.LepR-KO+HFD vs. $0,12 [0,06-0,17]$ in SMC.LepR-KO+NC; $p < 0,01$; Abb. 4-6 C). Trotz der signifikant erhöhten Neointima-Fläche waren bezüglich der Lumenstenose die Unterschiede in den beiden HFD-Gruppen im Vergleich zu den jeweiligen normalgewichtigen Kontrollen desselben Genotyps nicht signifikant. Die übergewichtigen SMC.LepR-WT wiesen eine signifikant erhöhte Gesamtgefäßfläche auf (100.453 ± 7.497 vs. $68.511 \pm 4.254 \mu\text{m}^2$ in SMC.LepR-WT+NC; $p < 0,001$), was aufgrund des Gefäß-Remodelings nach außen die fehlende Signifikanz bezüglich der Lumenstenose erklären könnte. In übergewichtigen SMC.LepR-KO Mäusen konnte trotz der Media-Hyperplasie keine signifikante Zunahme der Gesamtgefäßfläche im Vergleich zu den normalgewichtigen SMC.LepR-KO Kontrollen beobachtet werden.

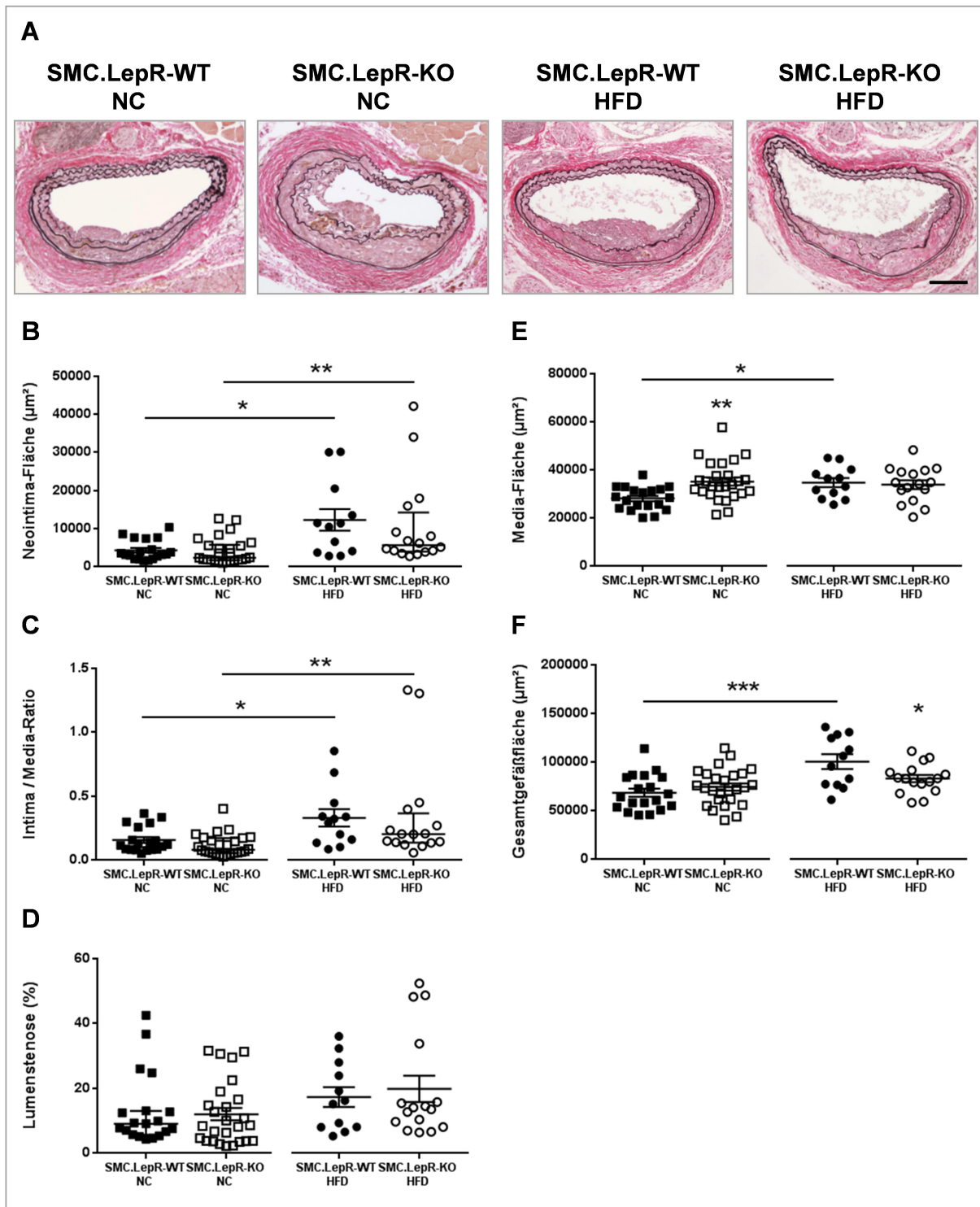


Abbildung 4-6: Morphometrische Analyse der Neointimabildung in normalgewichtigen und übergewichtigen SMC.LepR-WT und -KO Mäusen. (A) Repräsentative Bilder der Verhoeff's Elastica-Färbung Paraffin-fixierter Serienschritte der vaskulären Läsionen (100-fache Vergrößerung). Der Maßbalken repräsentiert 100 μm . Morphometrische Analyse der Neointima-Fläche (B), Intima-Media-Ratio (C), Lumenstenose (D), Media-Fläche (E) und Gesamtgefäßfläche (F). Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert \pm SEM bzw. als Median mit Interquartilsabstand. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$ vs. SMC.LepR-WT derselben Diät oder vs. Mäuse desselben Genotyps, die Normalfutter (NC) erhielten. *Abkürzungen:* HFD, Hochfettdiät.

4.5 Untersuchung der Zellularität und Zusammensetzung der vaskulären Läsionen Endothelzell-spezifischer Leptin-Rezeptor-Knockout Mäuse

Da die Neointimabildung mit einer vermehrten Proliferation und Migration von glatten Muskelzellen aus der Media in die Intima assoziiert ist, wurde die Zellularität sowie die Expression des glatten Muskelzell-Markers SMA (*Smooth muscle α -actin*) und des Proliferations-Markers PCNA (*Proliferating cell nuclear antigen*) innerhalb der Neointima untersucht. Repräsentative Bilder der immunhistologischen Färbungen sind in den Abbildungen 4-7 A und 4-8 A gezeigt.

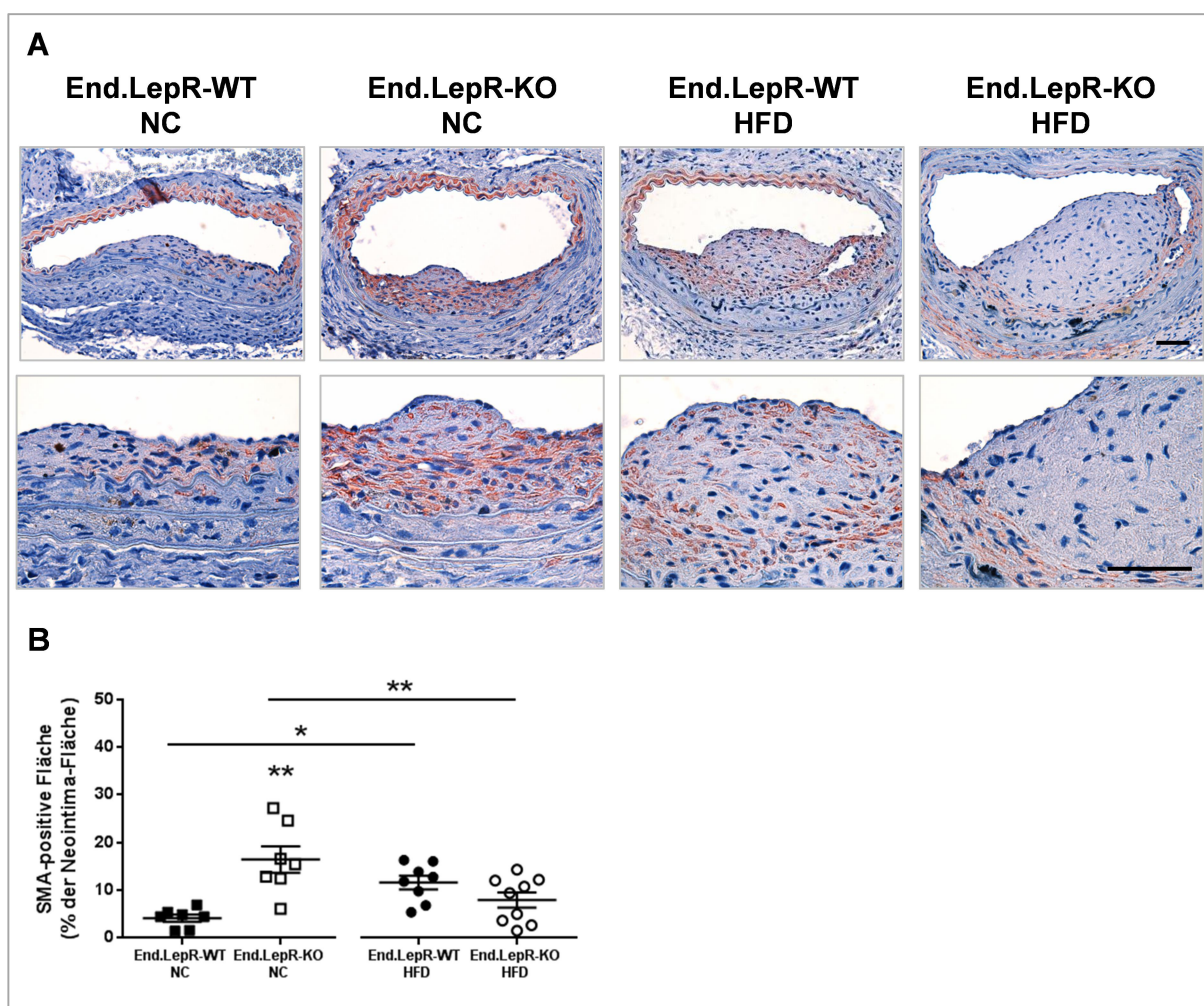


Abbildung 4-7: Visualisierung SMA-positiver glatter Muskelzellen in den vaskulären Läsionen normalgewichtiger und übergewichtiger End.LepR-WT und -KO Mäuse. (A) Repräsentative Bilder der immunhistologischen SMA (*Smooth muscle α -actin*)-Färbung (oben: 400-fache Vergrößerung; unten: 1000-fache Vergrößerung). Die Maßbalken repräsentieren 50 μ m. **(B)** Quantitativer Nachweis der SMA-positiven Fläche in der Neointima. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert \pm SEM. * $p < 0,05$ und ** $p < 0,01$ vs. End.LepR-WT derselben Diät oder vs. Mäuse desselben Genotyps, die Normalfutter (NC) erhielten. *Abkürzungen:* HFD, Hochfett-diät.

Dabei bestätigte die Quantifizierung der SMA-Färbung (siehe Abb. 4-7 B) eine signifikant erhöhte SMA-positive Fläche in der Neointima von normalgewichtigen End.LepR-KO ($16,5 \pm 2,8$ vs. $4,2 \pm 0,8\%$; $p < 0,01$) und übergewichtigen End.LepR-WT ($11,6 \pm 1,4$ vs. $4,2 \pm 0,8\%$; $p < 0,05$) Mäusen gegenüber den normalgewichtigen End.LepR-WT Kontrolltieren. Dagegen wiesen die übergewichtigen End.LepR-KO Mäuse eine signifikant geringere SMA-positive Fläche im Vergleich zu den normalgewichtigen End.LepR-KO Mäusen auf ($8,0 \pm 1,6$ vs. $16,5 \pm 2,8\%$; $p < 0,01$).

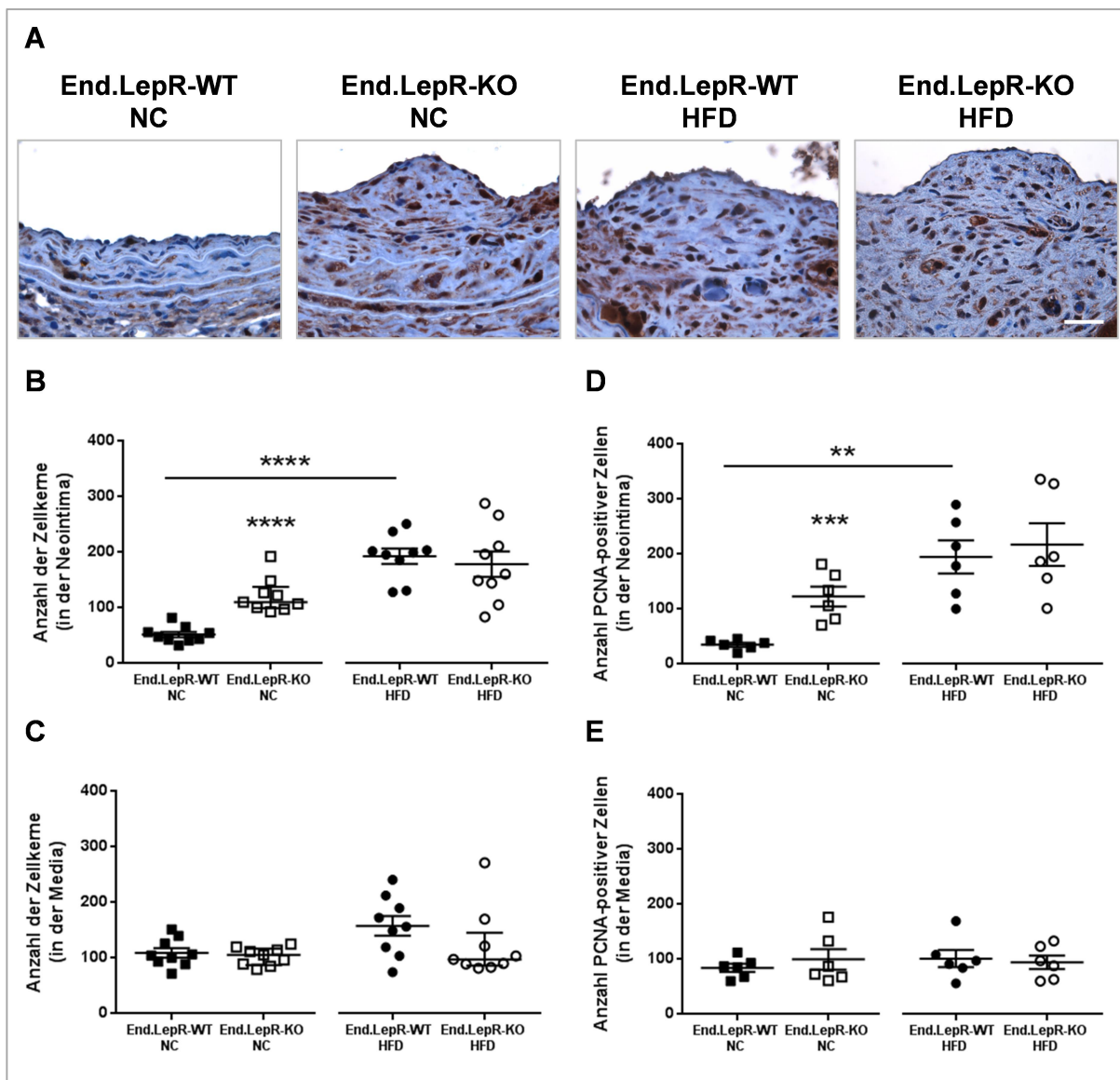


Abbildung 4-8: Untersuchung der Zellularität und Zellproliferation der vaskulären Läsion in normalgewichtigen und übergewichtigen End.LepR-WT und -KO Mäusen. (A) Repräsentative Bilder der immunhistologischen PCNA-Färbung (1000-fache Vergrößerung). Der Maßbalken repräsentiert 25 μ m. Manuelle Auszählung der Zellkerne in der Neointima **(B)** und Media **(C)** Hämatoxylin-gefärbter Schnitte. Immunhistologische PCNA-Färbung zum Nachweis proliferierender Zellen in der Neointima **(D)** und der Media **(E)**. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert \pm SEM bzw. bei nicht normalverteilten Messgruppen als Median mit Interquartilsabstand. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ und **** $p < 0,0001$ vs. End.LepR-WT derselben Diät oder vs. Mäuse desselben Genotyps, die Normalfutter (NC) erhielten. *Abkürzungen:* HFD, Hochfett-diät.

Die nähere Untersuchung der Zellulärität ergab eine signifikante Zunahme der Zellkerne in der Neointima von mit NC gefütterten End.LepR-KO Mäusen im Vergleich zu den normalgewichtigen End.LepR-WT Kontrollen ($121,7 [99,0-137,3]$ vs. $51,9 \pm 5,0$; $p < 0,0001$; Abb. 4-8 B). Entsprechend war auch die Anzahl proliferierender Zellen signifikant erhöht ($122,5 \pm 17,9$ in End.LepR-KO+NC vs. $35,2 \pm 3,8$ in End.LepR-WT+NC; $p < 0,001$; Abb. 4-8 D). Die Fütterung einer Hochfettdiät (HFD) führte in den Läsionen von End.LepR-WT Mäusen ebenfalls zu einer signifikant erhöhten Zellularität ($192,1 \pm 13,7$ vs. $51,9 \pm 5,0$ in End.LepR-WT+NC; $p < 0,0001$; Abb. 4-8 B) und Anzahl proliferierender Zellen ($194,3 \pm 29,9$ vs. $35,2 \pm 3,8$ in End.LepR-WT+NC; $p < 0,01$; Abb. 4-8 D). Eine ähnlich erhöhte Zellularität ($177,9 \pm 22,9$ vs. $121,7 [99,0-137,3]$ in End.LepR-KO+NC; $p = 0,61$; Abb. 4-8 B) und Anzahl PCNA-positiver Zellen ($216,7 \pm 38,6$ vs. $122,5 \pm 17,9$ in End.LepR-KO+NC; $p = 0,07$; Abb. 4-8 D) konnte auch in den Läsionen der mit HFD gefütterten End.LepR-KO Mäusen nachgewiesen werden, wobei diese Unterschiede im Vergleich zu den normalgewichtigen End.LepR-KO Mäusen statistisch nicht signifikant waren. In der Media konnten bezüglich der Zellularität und Zellproliferation keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden (Abb. 4-8 C und E).

4.6 Detektion und Quantifizierung inflammatorischer Zellen in den vaskulären Läsionen Endothelzell-spezifischer Leptin-Rezeptor Knockout Mäusen

Die immunhistologischen Untersuchungen inflammatorischer Zellen innerhalb der vaskulären Läsionen (repräsentative Bilder siehe Abb. 4-9 A) ergaben in beiden mit einer HFD-gefütterten Gruppen eine signifikant erhöhte Infiltration CD45-positiver hämatopoetischer Zellen sowohl innerhalb der Neointima ($247,8 \pm 52,4 \mu\text{m}^2$ in End.LepR-WT+HFD vs. $92,3 \pm 29,9 \mu\text{m}^2$ in End.LepR-WT+NC; $p < 0,05$ bzw. $259,4 \pm 30,8 \mu\text{m}^2$ in End.LepR-KO+HFD vs. $106,8 \pm 28,1 \mu\text{m}^2$ in End.LepR-KO+NC; $p < 0,05$; Abb. 4-9 B) als auch innerhalb der Media ($370,9 \pm 84,0 \mu\text{m}^2$ in End.LepR-WT+HFD vs. $141,3 \pm 31,7 \mu\text{m}^2$ in End.LepR-WT+NC; $p < 0,01$ bzw. $414,5 \pm 52,8 \mu\text{m}^2$ in End.LepR-KO+HFD vs. $119,0 \pm 25,0 \mu\text{m}^2$ in End.LepR-KO+NC; $p < 0,01$; Abb. 4-9 C), während keine signifikanten Unterschiede zwischen End.LepR-WT und -KO Mäusen, weder in der NC noch in der HFD Gruppe verzeichnet werden konnten. Des Weiteren war die Fütterung einer HFD mit einer ebenfalls vom Genotyp unabhängigen signifikant erhöhten Infiltration F4/80-positiver Gewebsmakrophagen in der Neointima ($318,2 \pm 60,3$ in End.LepR-WT+HFD vs. $121,7 \pm 19,9 \mu\text{m}^2$ in End.LepR-WT+NC; $p < 0,05$ bzw. $365,8 \pm 55,0$ in End.LepR-KO+HFD vs. $123,3 \pm 23,9 \mu\text{m}^2$ in End.LepR-KO+NC; $p < 0,01$; Abb. 4-9 D) und der Media ($265,5 \pm 62,4 \mu\text{m}^2$ in End.LepR-WT+HFD vs. $112,8 \pm 20,2 \mu\text{m}^2$ in End.LepR-WT+NC; $p < 0,05$ bzw. $296,1 \pm 65,4 \mu\text{m}^2$ in End.LepR-KO+HFD vs. $129,8 \pm 19,8 \mu\text{m}^2$ in End.LepR-KO+NC; $p < 0,05$; Abb. 4-9 E) assoziiert.

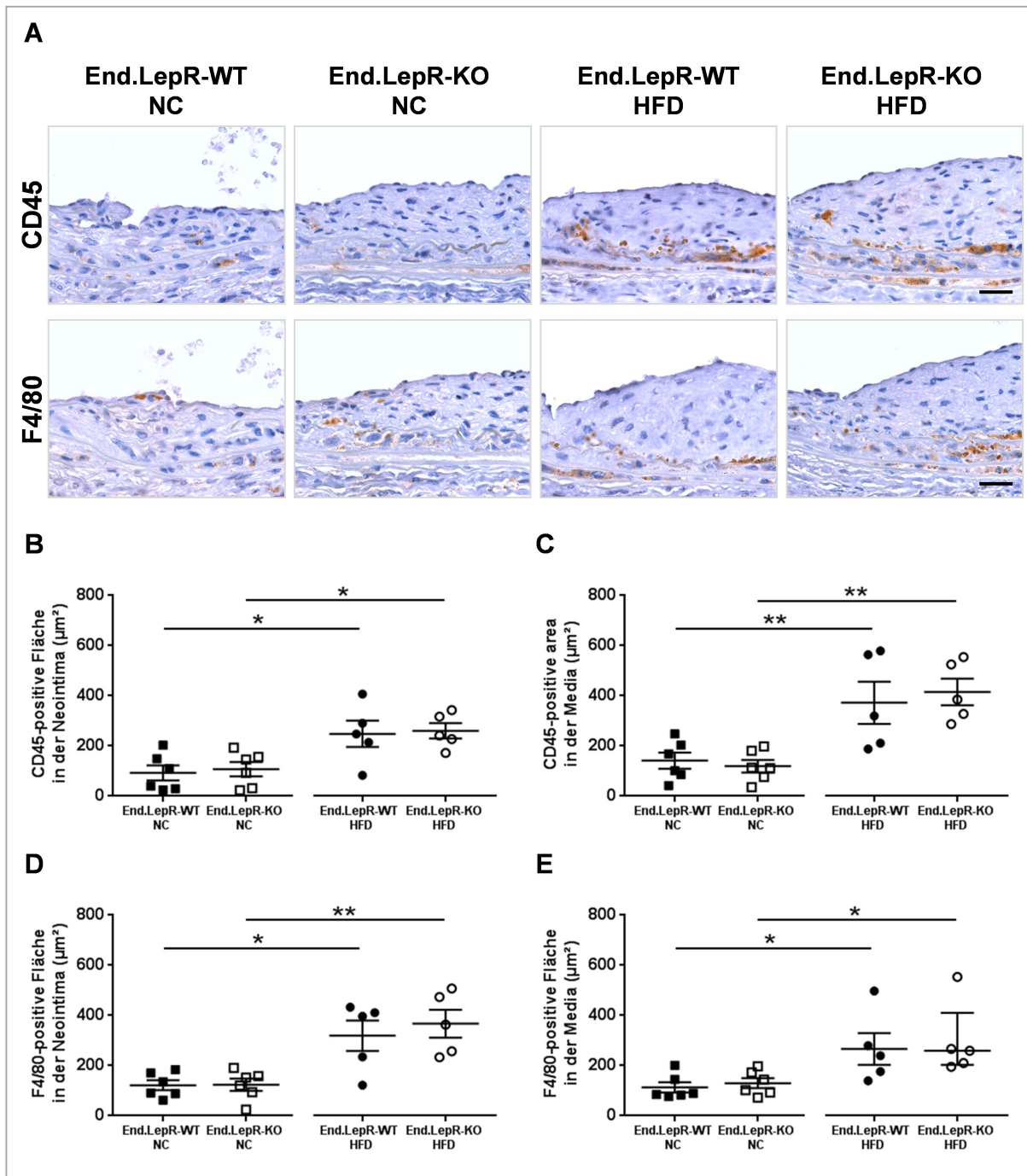


Abbildung 4-9: Immunhistologische Detektion und Quantifizierung inflammatorischer Zellen innerhalb der vaskulären Läsionen von normalgewichtigen und übergewichtigen End.LepR-WT und -KO Mäusen. (A) Repräsentative Bilder CD45-immunpositiver hämatopoetischer Zellen und F4/80-positiver Gewebsmakrophagen (1000-fache Vergrößerung). Die Maßbalken repräsentieren 25 µm. Quantitativer Nachweis der CD45-positiven Fläche in der Neointima (B) und der Media (C) sowie der F4/80-positiven Fläche in der Neointima (D) und der Media (E). Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert ± SEM. * $p < 0,05$ und ** $p < 0,01$ vs. End.LepR-WT derselben Diät oder vs. Mäuse desselben Genotyps, die Normalfutter (NC) erhielten. *Abkürzungen:* HFD, Hochfettdiät.

4.7 Untersuchung der endothelialen Leptin-Signaltransduktion

Die morphologischen Ähnlichkeiten des vaskulären Umbauprozesses, dem sog. vaskulären *Remodeling*, drei Wochen nach chemischer Gefäßverletzung mit FeCl₃ in übergewichtigen End.LepR-WT und normalgewichtigen End.LepR-KO suggerieren, dass die vermehrte Neointimabildung in Mäusen mit HFD-induziertem Übergewicht möglicherweise die Folge einer gestörten endothelialen Leptin-Signaltransduktion sein könnte. Um dies weiter zu untersuchen, wurden mPECs aus den Lungen von mit NC gefütterten normalgewichtigen End.LepR-WT und -KO Mäusen bzw. von mit einer HFD gefütterten übergewichtigen Mäusen isoliert und die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors STAT3 (*signal transducer and activator of transcription 3*), als Surrogatmarker für die Aktivierung des Leptin-Signalwegs [172], nach Stimulation mit rekombinatem murinen Leptin (10 ng/mL für 15 min) untersucht. Des Weiteren wurde die Proteinexpression von SOCS3 (*suppressor of cytokine signaling 3*), ein Surrogatmarker der Leptin-induzierten STAT3-Aktivierung [172] sowie der Phosphatasen PTP1B (*protein-tyrosine phosphatase 1B*) und PTEN (*phosphatase and tensin homolog*), welche als mögliche Mediatoren der Leptin-Resistenz gelten [173], untersucht.

4.7.1 Reduzierte endotheliale Leptin-Signaltransduktion in Leptin-Rezeptor-defizienten Mäusen

Zur Bestätigung der reduzierten endothelialen Leptin-Signaltransduktion in End.LepR-KO Mäusen konnte eine signifikant erhöhte relative Proteinexpression (in Relation zur Kontrolle definiert als End.LepR-WT unstimuliert) von phosphoryliertem STAT3 nach Leptin-Stimulation in mPECs isoliert von End.LepR-WT Mäusen an dessen Tyrosin (p-Stat3_{Tyr705}: 1,32-fach ± 0,13 vs. Kontrolle; p<0,05; Abb. 4-10 B) und Serin (p-STAT3_{Ser727}: 1,46-fach ± 0,22 vs. Kontrolle; p<0,05; Abb. 4-10 C), jedoch nicht in denen von End.LepR-KO nachgewiesen werden (repräsentative Western Blot-Banden sind in Abb. 4-10 A gezeigt).

Die basale Proteinexpression von SOCS3 (0,37-fach ± 0,07 vs. WT; p<0,001; Abb. 4-10 E), PTP1B (0,48-fach ± 0,12 vs. WT; p<0,01; Abb. 4-6 F) und PTEN (0,55-fach ± 0,16 vs. WT; p<0,05; Abb. 4-10 G) in mPECs isoliert von End.LepR-KO Mäusen war im Vergleich zu mPECs von End.LepR-WT Mäusen signifikant reduziert (repräsentative Western Blot-Banden sind in Abb. 4-10 D gezeigt).

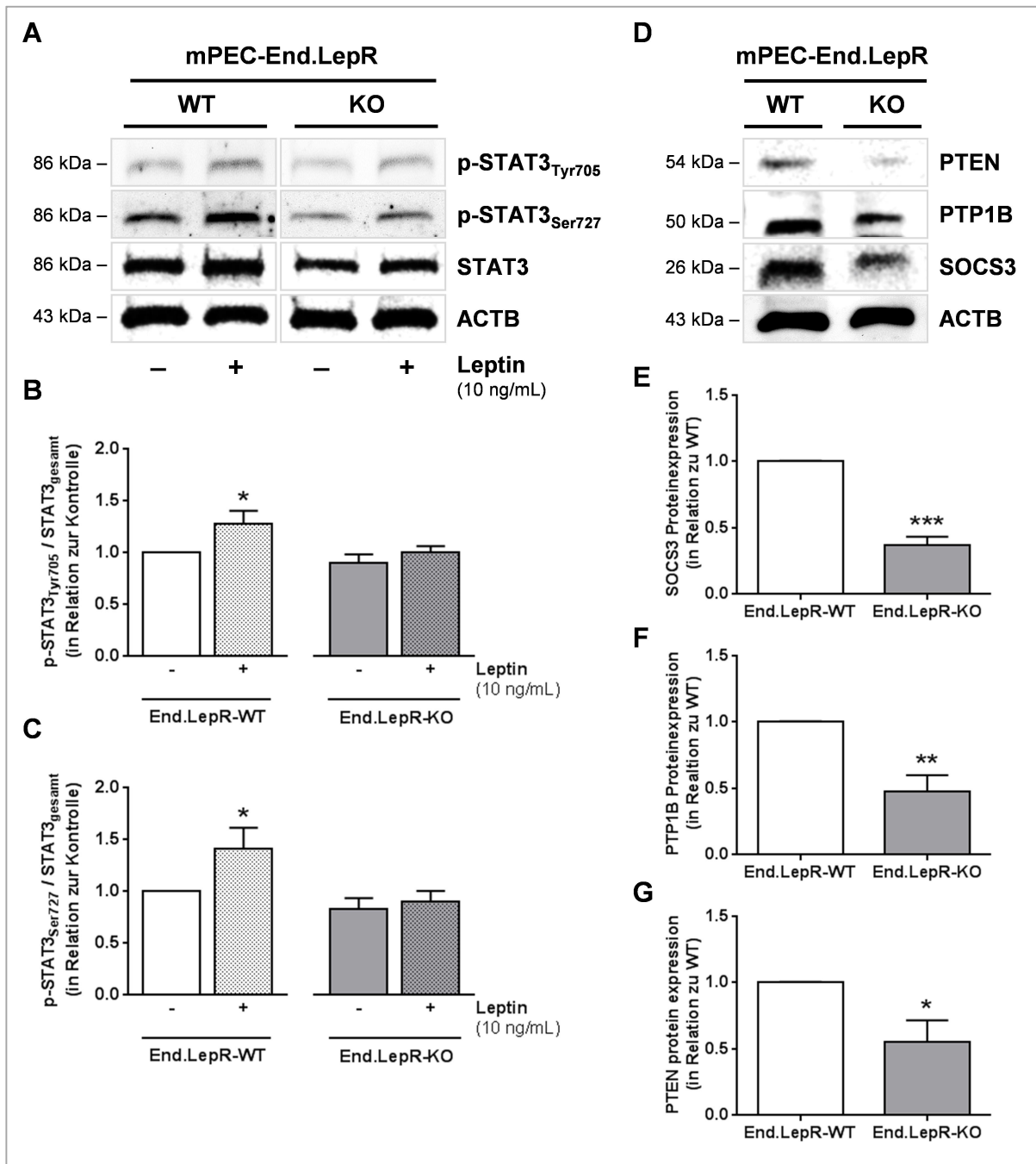


Abbildung 4-10: Endotheliale Leptin-Signaltransduktion in primären murinen Endothelzellen (mPECs) von End.LepR-WT und -KO Mäusen. (A-G) Pro Isolation wurden die Lungen von jeweils n=3 Mäusen pro Genotyp verwendet. Densitometrische Quantifizierung der STAT3-Phosphorylierung an Tyrosin (Tyr)-705 (B) und an Serin (Ser)-727 (C) nach Stimulation mit rekombinantem murinen Leptin (10 ng/mL für 15 min). Die relative Proteinexpression (in Relation zur Kontrolle definiert als End.LepR-WT unstimuliert gleich eins gesetzt) ist dargestellt als Mittelwert \pm SEM (n=6-10). *p<0,05 vs. Kontrolle. Repräsentative Proteinbanden sind in (A) gezeigt. Densitometrische Quantifizierung der Proteinexpression von SOCS3 (E), PTP1B (F) und PTEN (G). Die relative Proteinexpression (in Relation zu End.LepR-WT gleich eins gesetzt) ist dargestellt als Mittelwert \pm SEM (n=4). *p<0,05, **p<0,01 und ***p<0,001 vs. End.LepR-WT. Repräsentative Proteinbanden sind in (D) gezeigt.

4.7.2 Endotheliale Leptin-Resistenz in übergewichtigen Mäusen

Basal konnte mittels RT-PCR Analyse eine signifikant erhöhte mRNA-Expression des Leptin-Rezeptors in mPECs von übergewichtigen und hyperleptinämischen End.LepR-WT Mäusen gezeigt werden (3,51-fach \pm 0,81 vs. End.LepR-WT; $p < 0,05$; Abb. 4-11 A und B). Weiterhin konnte auch auf Proteinebene (Abb. 4-11 C und D) eine signifikant erhöhte relative LepR-Proteinexpression (in Relation zur Kontrolle definiert als End.LepR.WT+NC unstimuliert) in mPECs von übergewichtigen Mäusen (1,13-fach \pm 0,01 vs. Kontrolle; $p < 0,05$) und von normalgewichtigen Mäusen nach Leptin-Stimulation (1,36-fach \pm 0,14 vs. WT; $p < 0,05$) bestätigt werden. Demgegenüber wiesen mPECs von übergewichtigen End.LepR-WT Mäusen keinen signifikanten Anstieg der LepR-Expression nach Leptin-Stimulation gegenüber den unstimulierten mPECs von End.LepR-WT+HFD Mäusen auf und diese war im Vergleich zu den normalgewichtigen End.LepR-WT nach Leptin-Stimulation signifikant reduziert (0,95-fach \pm 0,15 in stimulierten End.LepR-WT+HFD vs. Kontrolle gegenüber 1,36-fach \pm 0,14 in stimulierten LepR-WT+NC vs. Kontrolle; $p < 0,05$).

In normalgewichtigen End.LepR-WT Mäusen konnte eine Leptin-induzierte STAT3-Aktivierung nachgewiesen werden (p-Stat3_{Tyr705}: 1,49-fach \pm 0,14 vs. Kontrolle; $p < 0,01$; Abb. 4-12 B und p-STAT3_{Ser727}: 1,65-fach \pm 0,27 vs. Kontrolle; $p < 0,05$; Abb. 4-12 C) sowie eine signifikant erhöhte relative Proteinexpression der negativen Regulatoren des Leptin-Signalwegs PTP1B (1,21-fach \pm 0,10 vs. Kontrolle; $p < 0,05$; Abb. 4-12 E) und PTEN (1,53 \pm 0,16 vs. Kontrolle; $p < 0,01$; Abb. 4-12 F). Die basale relative Proteinexpression von phosphoryliertem STAT3 (p-Stat3_{Tyr705}: 1,55-fach \pm 0,22 vs. Kontrolle; $p < 0,05$; Abb. 4-12 B und p-STAT3_{Ser727}: 1,93-fach \pm 0,34 vs. Kontrolle; $p < 0,05$; Abb. 4-12 C), PTP1B (1,39 \pm 0,16 vs. Kontrolle; $p < 0,05$; Abb. 4-12 E) und PTEN (1,80 \pm 0,15 vs. Kontrolle; $p < 0,001$; Abb. 4-12 F) waren in mPECs von übergewichtigen End.LepR-WT Mäusen gegenüber den normalgewichtigen End.LepR-WT+NC Kontrollen passend zu einer chronisch aktivierten Leptin-Signaltransduktion signifikant erhöht. Im Gegensatz zu den normalgewichtigen Mäusen war bei den übergewichtigen Mäusen als Antwort auf die exogene Leptin-Stimulation keine STAT3-Aktivierung nachweisbar, was auf die Entwicklung einer Leptin-Resistenz bei Übergewicht hinweist. Insgesamt waren bezüglich der SOCS3-Proteinexpression in keiner Versuchsgruppe signifikante Unterschiede zu verzeichnen (Abb. 4-12 D). Repräsentative Western Blot-Banden der Leptin-Signaltransduktionsanalysen sind in Abbildung 4-12 A gezeigt.

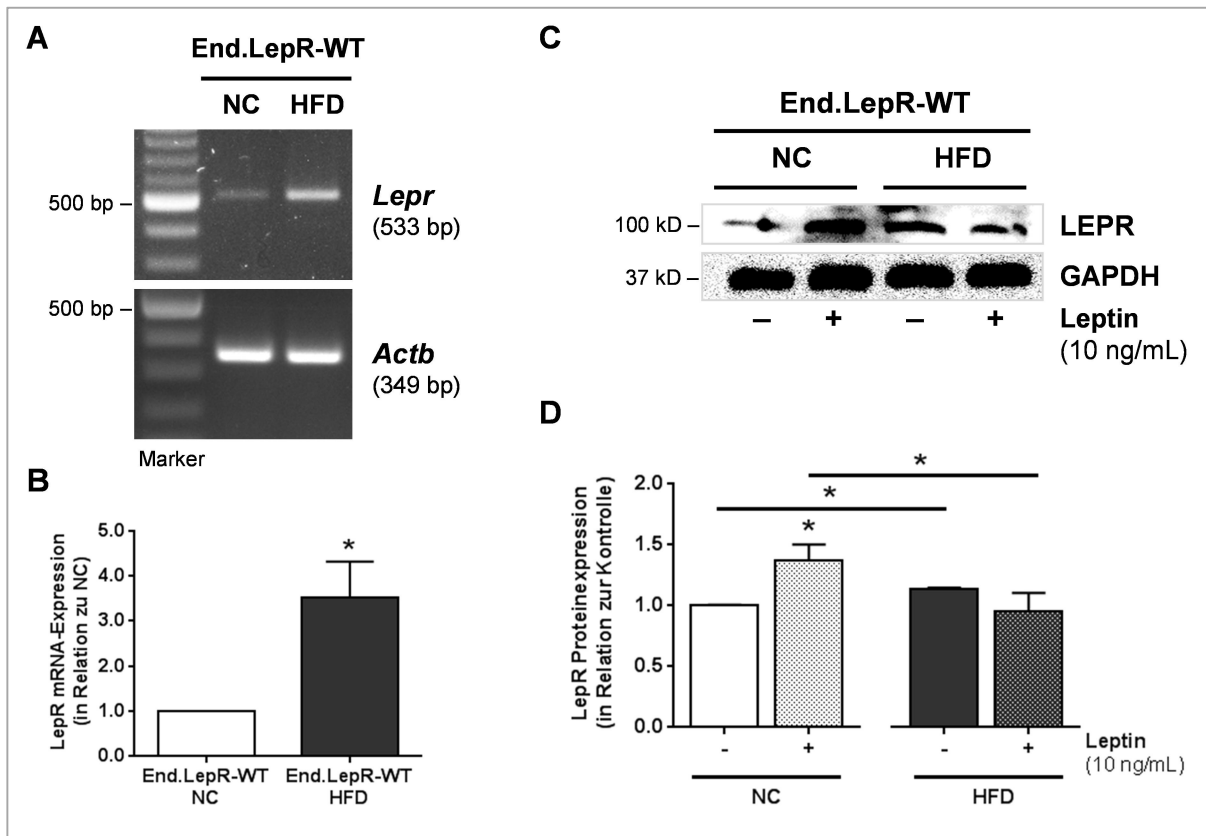


Abbildung 4-11: Endotheliale Expression des Leptin-Rezeptors auf mRNA- und Proteinebene in primären murinen Endothelzellen (mPECs) von normalgewichtigen und übergewichtigen End.LepR-WT Mäusen. (A-D) Pro Isolation wurden die Lungen von jeweils n=3 Mäusen pro Versuchsgruppe verwendet. **(A)** Repräsentative RT-PCR Banden. **(B)** Semiquantitative RT-PCR-Analyse der *LepR* mRNA-Expression. Die relative mRNA-Expression (in Relation zu End.LepR-WT gleich eins gesetzt) ist dargestellt als Mittelwert \pm SEM (n=4). *p<0,05 vs. End.LepR-WT. **(C)** Repräsentative Proteinbanden. **(D)** Densitometrische Quantifizierung der *LepR*-Proteinexpression nach Stimulation mit rekombinatem murinen Leptin (10 ng/mL für 15 min). Die relative Proteinexpression (in Relation zur Kontrolle definiert als End.LepR-WT+NC gleich eins gesetzt) ist dargestellt als Mittelwert \pm SEM (n=4-5). *p<0,05 vs. Kontrolle.

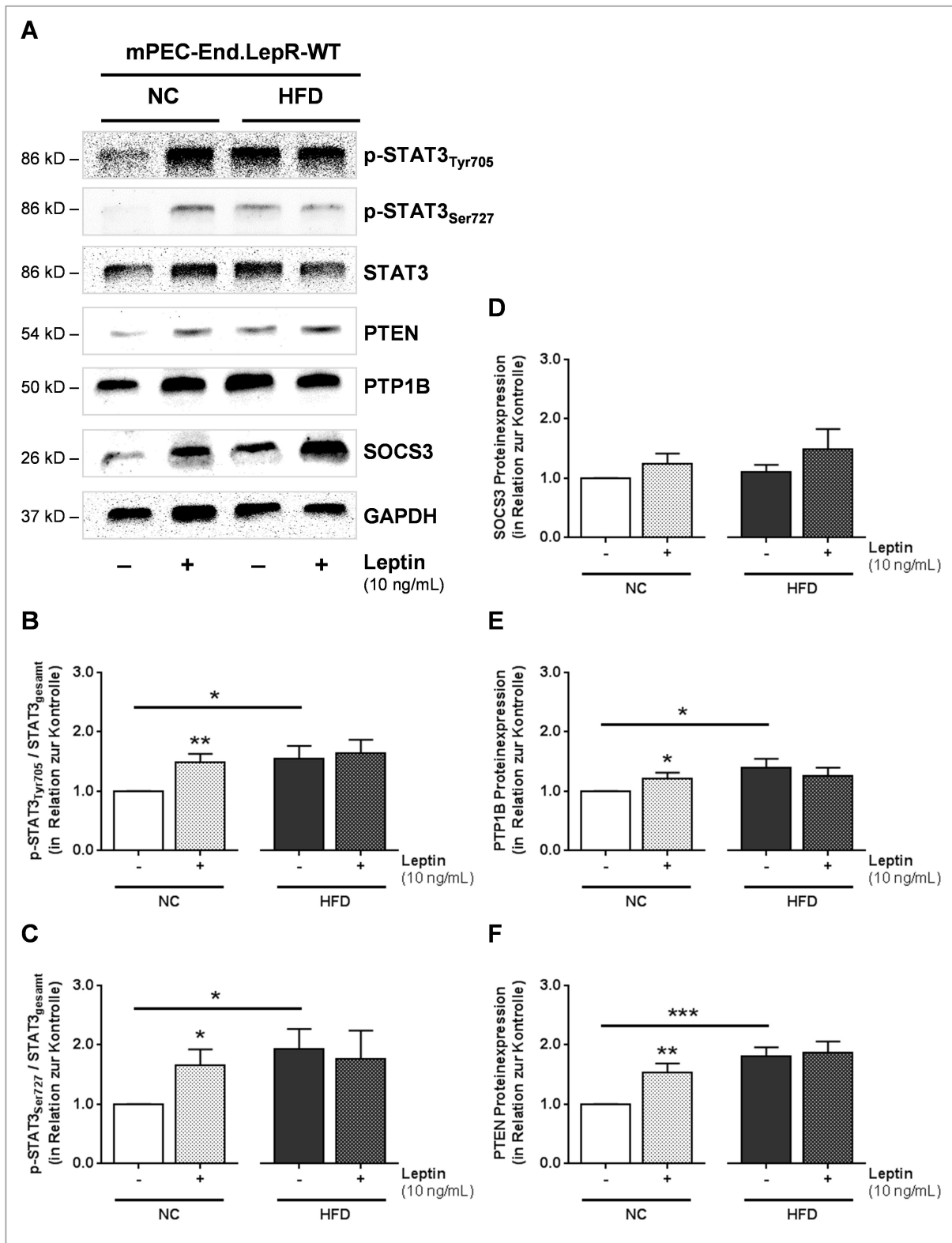


Abbildung 4-12: Endotheliale Leptin-Signaltransduktion in primären murinen Endothelzellen (mPECs) von normalgewichtigen und übergewichtigen End.LepR-WT Mäusen. (A-F) Pro Isolation wurden die Lungen von jeweils n=3 Mäusen pro Versuchsgruppe verwendet. Repräsentative Proteinbanden sind in (A) gezeigt. Densitometrische Quantifizierung der STAT3-Phosphorylierung an Tyrosin (Tyr)-705 (B) und an Serin (Ser)-727 (C) sowie SOCS3 (D), PTP1B (E) und PTEN (F) nach Stimulation mit rekombinanten murinen Leptin (10 ng/mL für 15 min). Die relative Proteinexpression (in Relation zur Kontrolle definiert als End.LepR-WT+NC unstimuliert gleich eins gesetzt) ist dargestellt als Mittelwert \pm SEM (n=7-10). *p<0,05 vs. Kontrolle, **p<0,01 und ***p<0,001 vs. Kontrolle.

4.8 Funktionelle *in vitro* Untersuchungen

4.8.1 Parakrine Effekte primärer Leptin-Rezeptor-defizienter Endothelzellen auf die Proliferation und Migration von glatten Muskelzellen

Da das Endothel über parakrine Faktoren eine wichtige Rolle in der regulatorischen Kontrolle glatter Muskelzellen spielt, wurden murine aortale glatte Muskelzellen (MOVAS, *Murine aortic smooth muscle cells*) mit Zellkulturüberständen (konditioniertes Medium, im Weiteren als KdM abgekürzt) von mPECs, welche aus den Lungen von End.LepR-WT und -KO Mäusen isoliert wurden, ko-inkubiert. Die Zellproliferation der ko-inkubierten MOVAS wurde anhand der mRNA-Expression des Zellzyklusproteins Cyclin D1 untersucht (Abb. 4-13 A) und das Migrationsverhalten mit Hilfe des Scratch-Wundheilungs-Assays über einen Zeitraum von 24 h dokumentiert und quantifiziert (Abb. 4-13 B und C).

MOVAS, die mit dem KdM der mPECs von End.LepR-KO Mäusen inkubiert wurden, wiesen eine signifikant erhöhte mRNA-Expression von Cyclin D1 auf im Vergleich zu den mit KdM von End.LepR-WT Mäusen inkubierten Zellen (3,40-fach \pm 0,30 vs. 2,35-fach \pm 0,20 in MOVAS + KdM mPEC End.LepR-WT; $p < 0,05$; Abb. 4-13 A), was auf eine verminderte Fähigkeit zur Regulation der Zellproliferation des mPEC-KdM von End.LepR-KO Mäusen hinweist.

Andererseits hatte nach Scratch-Induzierung das mPEC-KdM von End.LepR-WT und -KO Mäusen einen vergleichbaren stimulatorischen Effekt auf das Migrationsverhalten der MOVAS. Die zellfreie „Scratch“-Fläche unterschied sich nach 9 h nicht gegenüber der Kontrolle, während nach 18 h und 24 h der stimulatorische Effekt des KdMs *per se* gezeigt werden konnte, unabhängig vom Genotyp der mPECs (nach 24 h: 41% in MOVAS + KdM End.LepR-WT und 44% in MOVAS + KdM End.LepR-KO vs. 56% in der Kontrolle; beide $p < 0,01$ vs. Kontrolle; Abb. 4-13 B). Repräsentative Bilder nach 0 h und 24 h sind in Abbildung 4-13 C dargestellt.

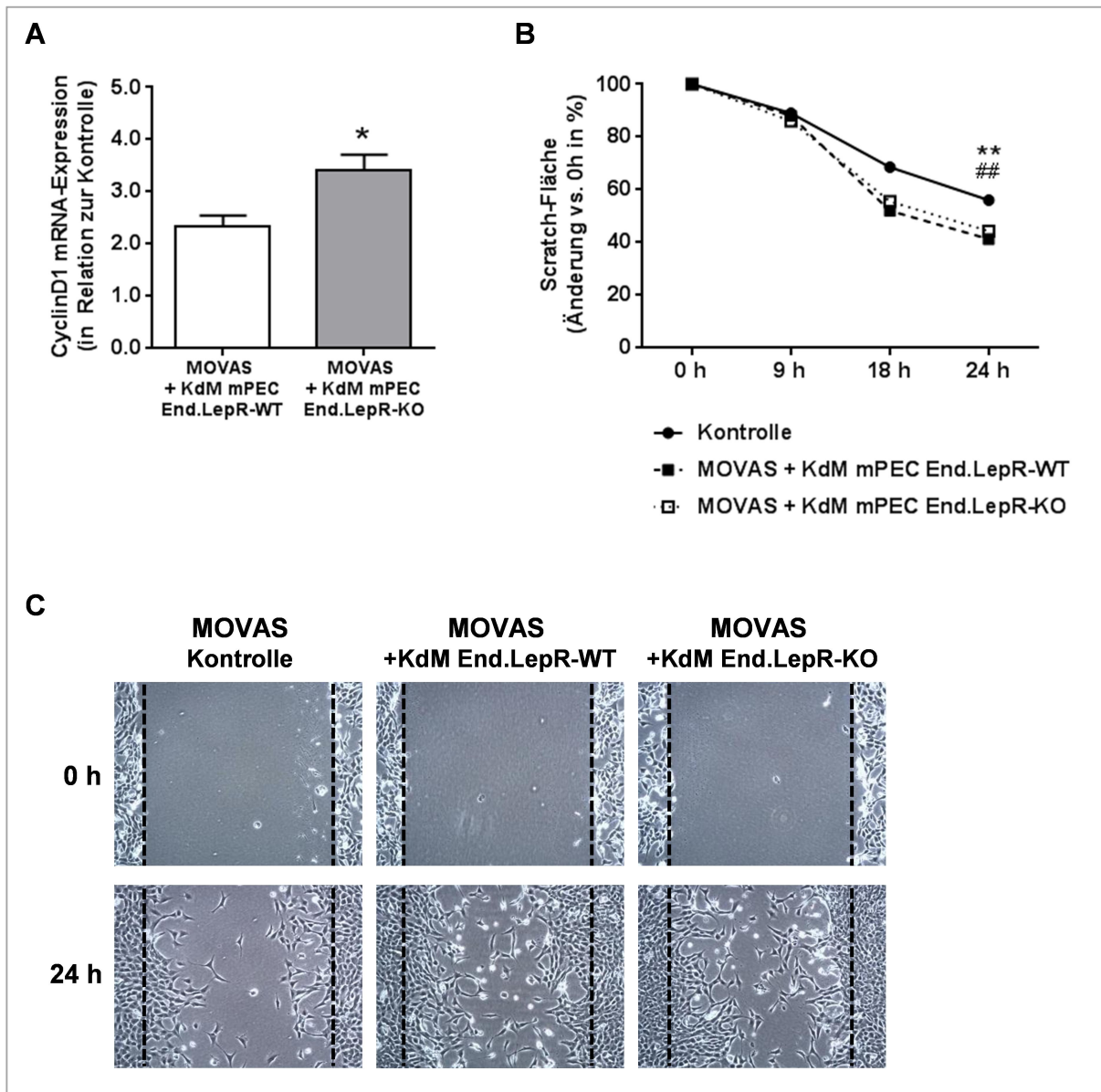


Abbildung 4-13: Parakrine Effekte primärer Leptin-Rezeptor-defizienter Endothelzellen auf die Proliferation und das Migrationsverhalten von glatten Muskelzellen. Murine aortale glatte Muskelzellen (MOVAS) wurden mit den Zellkulturüberständen (konditioniertes Medium, KdM) von primären murinen Endothelzellen (mPECs) isoliert aus den Lungen von End.LepR-WT und -KO Mäusen (jeweils n=3 Mäuse pro Genotyp und Isolation) ko-inkubiert. Als Kontrolle wurden MOVAS lediglich mit Kulturmedium inkubiert. **(A)** Untersuchung der Cyclin D1 mRNA-Expression mittels qPCR. Die relative mRNA-Expression (in Relation zur Kontrolle gleich eins gesetzt) ist dargestellt als Mittelwert \pm SEM (n=3-4). *p<0,05 vs. End.LepR-WT. **(B)** Migrationsverhalten 9 h, 18 h und 24 h nach „Scratch“-Induzierung im Vergleich zu 0 h (gleich 100% gesetzt). Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert von drei unabhängigen Experimenten. **p<0,01 vs. End.LepR-WT und ##p<0,01 vs. End.LepR-KO. Repräsentative Bilder des *in vitro* Scratch-Wundheilungs-Assays nach 0 h und 24 h sind in **(C)** gezeigt (100-fache Vergrößerung).

4.8.2 Auswirkungen von Übergewicht auf die Zellproliferation und das Migrationsverhalten primärer glatter Muskelzellen

Die nach vaskulärer Verletzung beobachtete Hyperplasie der Media bei einer LepR-Reduktion in glatten Muskelzellen (SMCs), die gleichermaßen in übergewichtigen Kontrollmäusen beobachtet wurde, weist auf eine mögliche Leptin-Resistenz auch in den glatten Muskelzellen hin. Zur weiteren Untersuchung dieser Annahme wurden primäre glatte Muskelzellen aus den Aorten von mit NC gefütterten normalgewichtigen Mäusen und mit einer HFD gefütterten übergewichtigen Mäusen isoliert und deren Proliferationsverhalten unter Verwendung des MTS-Zellproliferations-Assays (Abb. 4-14 A) sowie deren Migrationsverhalten mit Hilfe des Scratch-Wundheilungs-Assays (Abb. 4-14 B und C) untersucht.

Nach Stimulation mit 10 ng/mL rekombinatem murinem Leptin für 24 h reagierten die SMCs von normalgewichtigen Mäusen mit einer signifikant erhöhten Zellproliferation im Vergleich zu den unstimulierten Zellen (OD von $0,538 \pm 0,009$ vs. $0,510 \pm 0,007$; $p < 0,05$; Abb. 4-14 A), wohingegen nach Stimulation mit 100 ng/mL Leptin keine signifikanten Effekte verzeichnet werden konnten. Im Gegensatz dazu reagierten die SMCs von übergewichtigen Mäusen auf keine der beiden Leptin-Konzentrationen, sondern wiesen bereits eine erhöhte basale Zellproliferation auf verglichen mit den SMCs der normalgewichtigen Mäuse derselben Behandlung (OD unstimuliert: $0,621 \pm 0,020$ vs. $0,510 \pm 0,007$; $p < 0,001$ bzw. OD 10 ng/mL Leptin: $0,618 \pm 0,020$ vs. $0,539 \pm 0,009$; $p < 0,01$ bzw. OD 100 ng/mL Leptin: $0,585 \pm 0,019$ vs. $0,522 \pm 0,009$; $p < 0,05$; Abb. 4-14 A).

Ein ähnlicher Effekt der fehlenden Reaktion von übergewichtigen SMCs nach Leptin-Stimulation war auch mit dem Scratch-Wundheilungs-Assay zu beobachten. Nach Stimulation der normalgewichtigen SMCs mit 10 ng/mL Leptin war die Anzahl migrierter Zellen nach 24 h signifikant erhöht im Vergleich zu unstimulierten SMCs (63 ± 4 vs. 47 ± 3 ; $p < 0,01$; Abb. 4-14 B und C), während die Stimulation mit 100 ng/mL Leptin keine signifikanten Effekte zeigten. Auch hinsichtlich der Zellmigration konnte in den übergewichtigen SMCs eine bereits basal signifikant erhöhte Anzahl migrierter Zellen gegenüber den normalgewichtigen SMCs derselben Behandlungsgruppe beobachtet und keine Reaktion auf die Leptin-Stimulation verzeichnet werden (unstimuliert: 103 ± 8 vs. 47 ± 3 ; $p < 0,001$ bzw. 10 ng/mL Leptin: 95 ± 5 vs. 63 ± 4 ; $p < 0,001$ bzw. 99 ± 6 vs. 55 ± 4 ; $p < 0,001$; Abb. 4-14 B und C). Repräsentative Aufnahmen sind in Abbildung 4-14 C gezeigt.

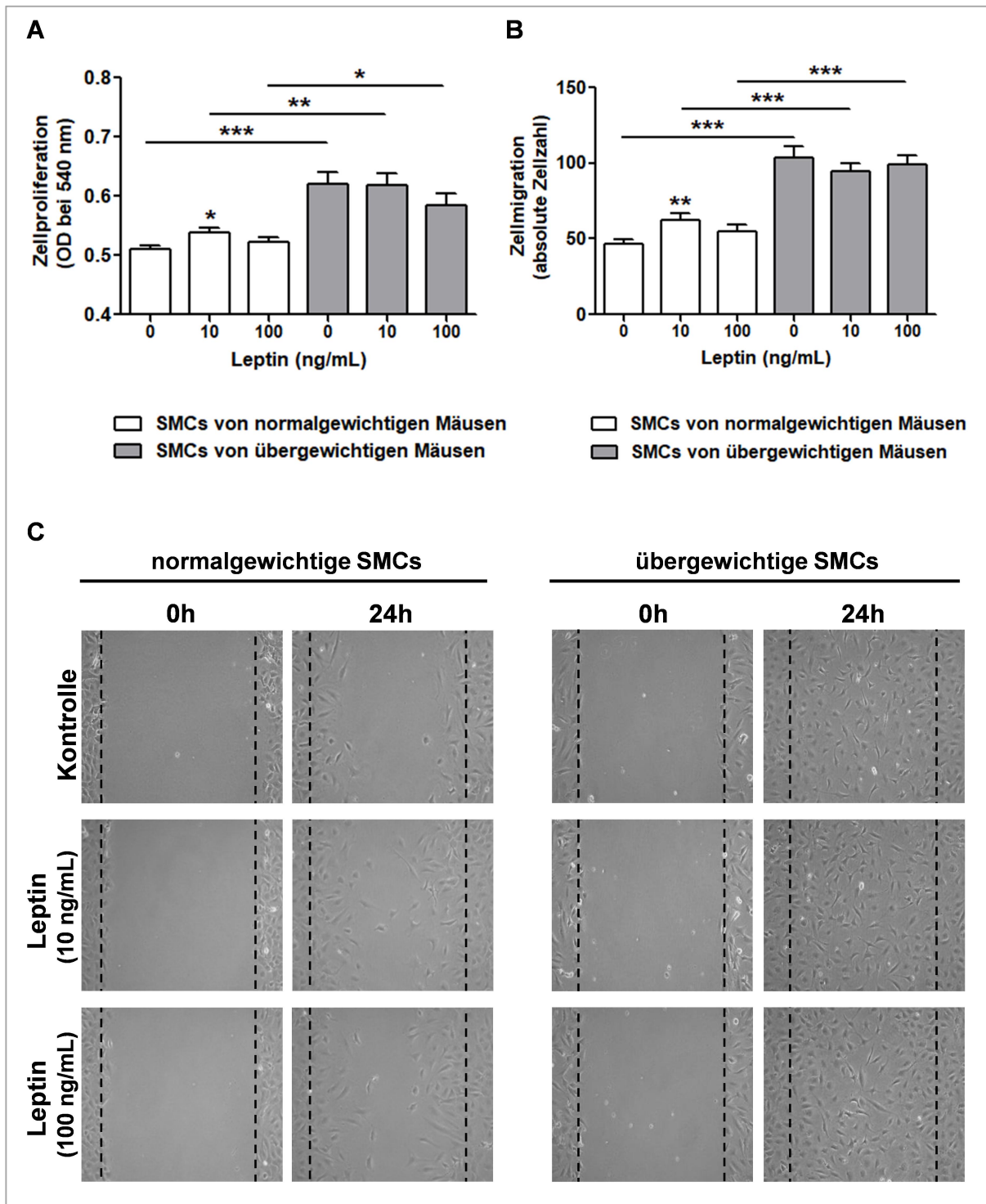


Abbildung 4-14: Untersuchung der Auswirkungen von Übergewicht auf die Zellproliferation und Migration primärer glatter Muskelzellen, basal und nach Leptin-Stimulation. Primäre glatte Muskelzellen (SMCs) wurden aus den Aorten von normalgewichtigen und mit einer Hochfettdiät gefütterten übergewichtigen Mäusen isoliert (jeweils n=3 Mäuse pro Isolation und Gruppe). Unter Verwendung des MTS-Zellproliferations-Assays (**A**) und des Scratch-Wundheilungs-Assays (**B**) wurden die basale Zellproliferation (**A**) und das Migrationsverhalten (**B**) in unstimulierten SMCs sowie nach Stimulation mit rekombinantem murinen Leptin für 24 h (10 und 100 ng/mL) untersucht. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$ vs. unstimuliert bzw. wie angegeben. Repräsentative Bilder des Scratch-Wundheilungs-Assays nach 0 h und 24 h sind in (**C**) gezeigt (100-fache Vergrößerung).

4.9 Untersuchungen der Expression von glatten Muskelzell-Mitogenen in Leptin-Rezeptor-defizienten und Leptin-resistenten Endothelzellen

4.9.1 RNA-Expressionsanalyse parakriner Mediatoren in Endothelzellen von Leptin-Rezeptor-defizienten und übergewichtigen Mäusen

Zur RNA-Expressionsanalyse wurden mPECs von mit NC gefütterten normalgewichtigen End.LepR-WT und -KO Mäusen bzw. von mit einer HFD gefütterten übergewichtigen End.LepR-WT Mäusen isoliert. Mittels real-time quantitativer PCR (qPCR) wurde die mRNA-Expression von Mediatoren untersucht, die bekanntermaßen die Proliferation glatter Muskelzellen und die Neointimabildung fördern. Die mRNA-Expressionsmuster der mPECs von End.LepR-KO und übergewichtigen End.LepR-WT+HFD Mäusen im Vergleich zu normalgewichtigen End.LepR-WT Kontrollen sind in Abbildung 4-15 zusammengefasst. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der RT-PCR (Abb. 4-3) konnte auch mittels qPCR-Analyse in mPECs von End.LepR-KO Mäusen im Vergleich zu den End.LepR-WT Kontrollen auf mRNA-Ebene eine signifikant reduzierte Expression der kurzen und langen LepR-Isoform bestätigt werden ($LepR_{short}$: $-39,9 \pm 8,8\%$; $p < 0,001$; $LepR_{long}$: $-45,4 \pm 13,6\%$; $p < 0,01$), wohingegen die mRNA-Expression beider LepR-Isoformen in übergewichtigen End.LepR-WT Mäusen im Mittel erhöht waren ($LepR_{short}$: $+188,4 \pm 120,0\%$; n.s.; $LepR_{long}$: $+155,2 \pm 131,4\%$; n.s.), jedoch aufgrund des hohen Standardfehlers nicht von statistischer Signifikanz. Die mPECs von End.LepR-KO Mäusen wiesen eine signifikant höhere mRNA-Expression von Endothelin-1 (ET-1) auf im Vergleich zu den End.LepR-WT Kontrollen ($+47,7 \pm 16,8\%$; $p < 0,05$). Eine im Mittel signifikant höhere ET-1 mRNA-Expression konnte auch in den mPECs von übergewichtigen End.LepR-WT Mäusen gegenüber den normalgewichtigen Kontrollen beobachtet werden ($+115,0 \pm 63,0\%$; $p < 0,01$). Passend zu *in vitro* Befunden, die eine Inhibition der Expression und Sekretion von ET-1 durch eine PPAR γ -Aktivierung in kultivierten Endothelzellen zeigen konnten [174, 175], war die beobachtete Überexpression von ET-1 mit einer signifikant reduzierten mRNA-Expression von PPAR γ sowohl in LepR-defizienten mPECs isoliert aus End.LepR-KO Mäusen ($-25,0 \pm 9,1\%$; $p < 0,05$) als auch in Leptin-resistenten mPECs übergewichtiger End.LepR-WT+HFD Mäuse ($-38,0 \pm 14,6\%$; $p < 0,05$) assoziiert. Des Weiteren wiesen die signifikant erhöhten mRNA-Expressionen von ICAM2 ($+178,4 \pm 71,5\%$; $p < 0,05$) und COX2 ($+90,5 \pm 52,1\%$; $p < 0,01$) in den mPECs der übergewichtigen End.LepR-WT Mäuse auf eine Endothelaktivierung hin. Demgegenüber war passend zur fehlenden Leptin-Signaltransduktion die VEGF mRNA-Expression in mPECs von End.LepR-KO Mäusen im Vergleich zu den End.LepR-WT Kontrollen signifikant reduziert ($-30,1 \pm 6,9\%$; $p < 0,001$). Bezüglich der mRNA-Expressionen von eNOS, iNOS, COX1, FGF2, PDGF und TGF β fanden sich weder in den LepR-defizienten noch in den übergewichtigen mPECs im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen signifikante Unterschiede.

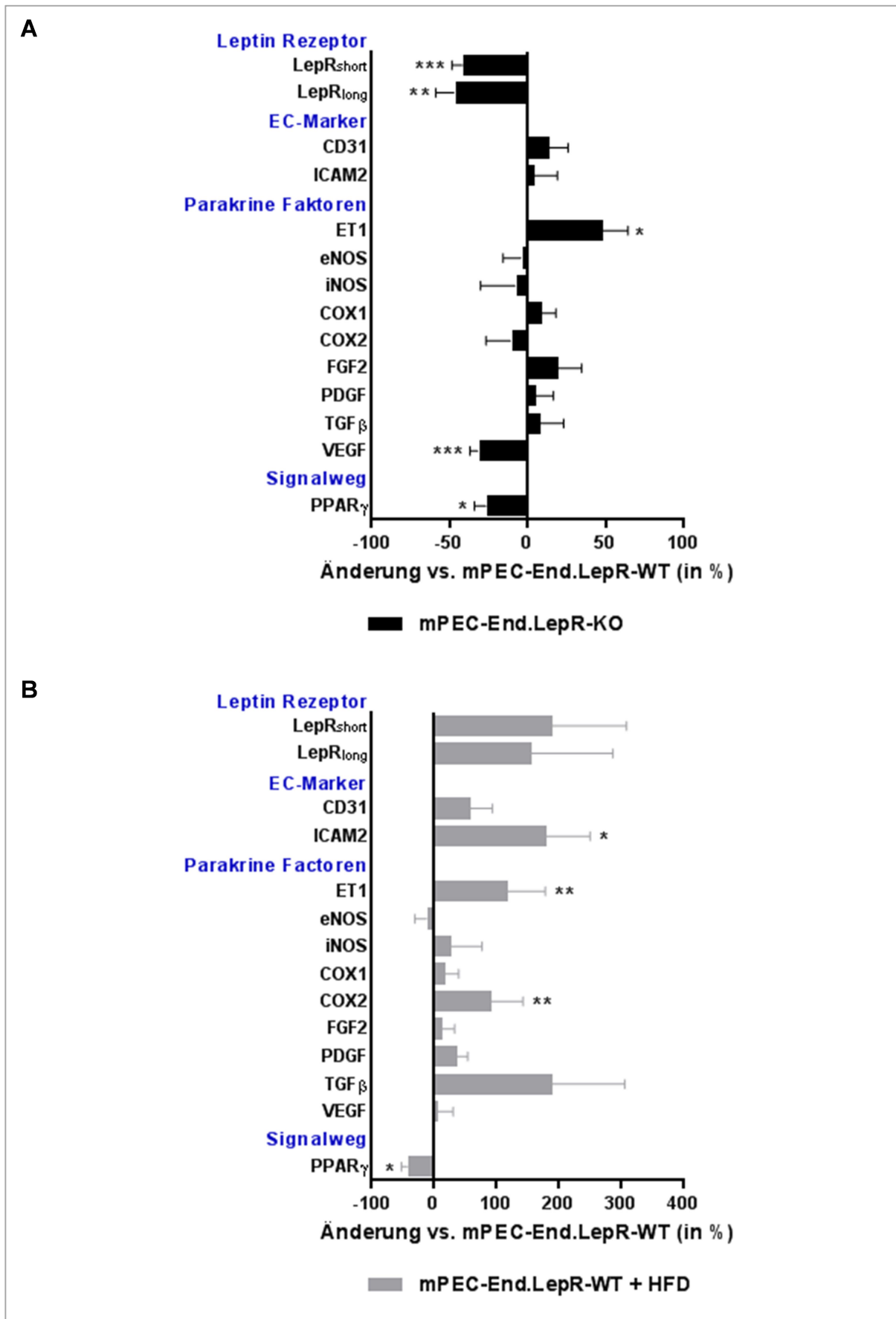


Abbildung 4-15: RNA-Expressionsanalyse parakriner Mediatoren in Leptin-Rezeptor-defizienten und übergewichtigen Mäusen. Die qPCR-Analyse des Leptin-Rezeptors (LepR) und Marker von (aktivierten) Endothelzellen (CD31, ICAM2, eNOS, iNOS, COX1, COX2) oder bekannter Faktoren, die

auf parakrinem Weg auf glatte Muskelzellen wirken (ET-1, FGF2, PDGF, TGF β , VEGF) erfolgte in primären murinen Endothelzellen (mPECs), welche aus den Lungen von normalgewichtigen End.LepR-WT+NC und End.LepR-KO (**A**) sowie übergewichtigen End.LepR-WT+HFD Mäusen (**B**) isoliert wurden (jeweils n=3 Mäuse pro Genotyp und Isolation). Die relative mRNA-Expression (Änderung in % in Relation zur Kontrolle definiert als mPEC.LepR-WT+NC) ist dargestellt als Mittelwert \pm SEM (n=4-6). *p<0,05, **p<0,01 und ***p<0,001 vs. mPEC.LepR-WT+NC. *Abkürzungen:* NC, Normalfutter; HFD, Hochfett-diät; CD31, *cluster of differentiation 31*; ICAM2, *intercellular adhesion molecule 2*; ET-1, Endothelin-1; eNOS, endotheliale NO-Synthase; iNOS, induzierbare NO-Synthase, COX, Cyclooxygenase; FGF2, *fibroblast growth factor 2*; PDGF, *platelet-derived growth factor*; TGF β , *transforming growth factor β* ; VEGF, *vascular endothelial growth factor*; PPAR γ , *peroxisome proliferator-activated receptor γ* .

4.9.2 Analyse parakriner Faktoren in Zellkulturüberständen primärer Leptin-Rezeptor-defizienter Endothelzellen

Zur mPEC-Isolation wurden pro Zellisolation und Genotyp die Lungen von jeweils drei Mäusen verwendet und die relativen Proteinspiegel von ET-1 mittels eines entsprechenden ELISAs in den Zellkulturüberständen (konditioniertes Medium; KdM) der mPECs von End.LepR-KO Mäusen im Vergleich zu den End.LepR-WT Kontrollen derselben Isolation berechnet. In Übereinstimmung mit der signifikant erhöhten ET-1 mRNA-Expression der mPECs von LepR-defizienten und übergewichtigen Mäusen (beides p<0,05 vs. mPEC End.LepR-WT+NC; Abb. 4-16 A), konnte auch im KdM der mPECs von End.LepR-KO Mäusen eine höhere ET-1-Freisetzung gegenüber den End.LepR-WT Kontrollen bestätigt werden (1,53-fach \pm 0,16; p<0,01; Abb. 4-16 B). Darüber hinaus wurden zur Untersuchung der funktionellen Effekte murine aortale glatte Muskelzellen (MOVAS) mit mPEC-KdM von End.LepR-WT und -KO Mäusen inkubiert (in Abb. 4-16 C abgekürzt als EC-KdM LepR-WT bzw. -KO) und die mRNA-Expression des Zellzyklusproteins Cyclin D1 als Proliferations-Marker untersucht. Die MOVAS wiesen im Vergleich zu den lediglich mit Medium inkubierten Kontrollen nach Inkubation mit dem mPEC-KdM von End.LepR-WT Mäusen eine signifikant erhöhte Expression von Cyclin D1 auf (2,1-fach \pm 0,2; p<0,01). Die Inkubation mit dem mPEC-KdM von End.LepR-KO Mäusen resultierte in einem weiteren, sowohl im Vergleich zur Kontrolle als auch End.LepR-WT Gruppe, signifikanten Anstieg der Cyclin D1-Expression (2,8-fach \pm 0,3; p<0,0001 vs. Kontrolle bzw. p<0,05 vs. EC-KdM LepR-WT). Die zusätzliche Behandlung mit dem nicht-selektiven Endothelin-Rezeptor (ET_{A/B})-Antagonisten (PD145065), welcher A- und B-Rezeptoren blockiert, resultierte sowohl in den mit dem mPEC-KdM von End.LepR-WT (1,7-fach \pm 0,2; p=0,09) als auch End.LepR-KO (2,1-fach \pm 0,3; p<0,05) Mäusen inkubierten MOVAS in einem geringeren Anstieg der Cyclin D1-Expression gegenüber der Kontrolle. Auch der beobachtete Effekt des mEPC-KdM der End.LepR-KO Mäuse auf die Proliferation der MOVAS war bei zusätzlicher Inkubation mit dem ET_{A/B}-Antagonisten aufgehoben (mit ET_{A/B}-Antagonist: EC-KdM LepR-WT vs. -KO; p=0,59). Der Vergleich der Effekte des mPEC-KdM von End.LepR-KO Mäusen ohne und mit ET_{A/B}-

Antagonisten auf die Proliferation der MOVAS ergab eine signifikante Reduktion der Cyclin D1-Expression bei $ET_{A/B}$ -Antagonisierung (2,1-fach \pm 0,3 vs. 2,8-fach \pm 0,3 in EC-KdM LepR-KO ohne $ET_{A/B}$ -Antagonist; $p < 0,05$) auf das Niveau des KdM der End.LepR-WT mPECs.

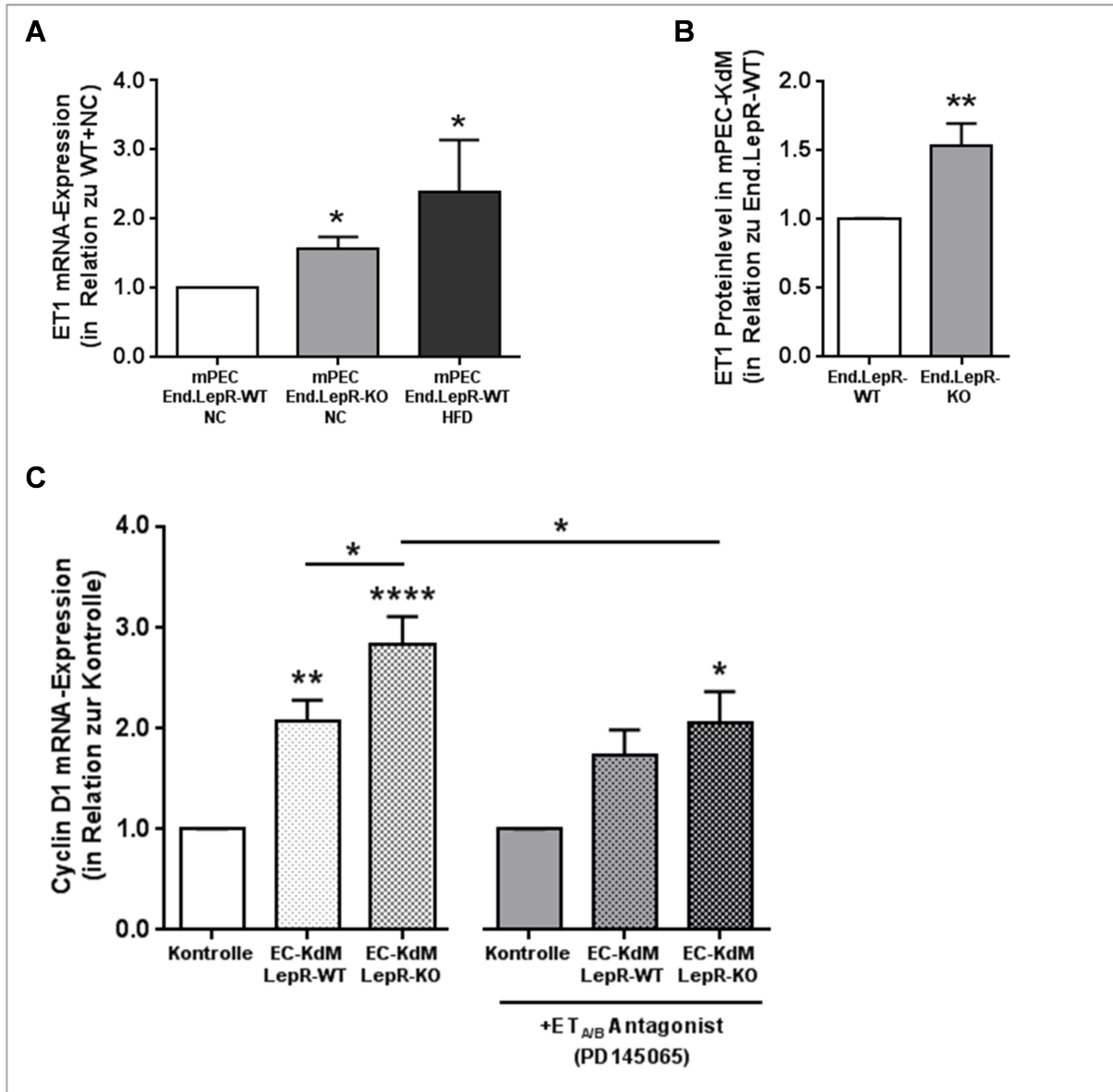


Abbildung 4-16: Auswirkung der endothelialen Leptin-Rezeptor-Defizienz auf Endothelin-1 (ET-1). (A) Untersuchung der ET-1-mRNA-Expression in primären murinen Endothelzellen (mPECs) von normalgewichtigen End.LepR-WT und -KO Mäusen sowie übergewichtigen End.LepR-WT Mäusen. Die relative mRNA-Expression (in Relation zu mPEC.End.LepR-WT+NC gleich eins gesetzt) ist dargestellt als Mittelwert \pm SEM ($n=4-5$ Isolationen mit jeweils $n=3$ Mäusen pro Genotyp). * $p < 0,05$ vs. Kontrolle. (B) ELISA-Bestimmung der ET-1-Proteinexpression in den Zellkulturüberständen (konditioniertes Medium, KdM) der mPECs von End.LepR-WT und -KO Mäusen. Die relativen Proteinspiegel (in Relation zur Kontrolle definiert als mPEC-KdM End.LepR-WT gleich eins gesetzt) sind dargestellt als Mittelwert \pm SEM ($n=7$; KdM von sieben Isolationen mit jeweils $n=3$ Mäusen pro Genotyp). ** $p < 0,001$ vs. Kontrolle. (C) Untersuchung des Effekts der Behandlung von murinen aortalen glatten Muskelzellen (MOVAS) mit dem mPEC-KdM (EC-KdM) von End.LepR-WT und -KO Mäusen auf die Cyclin D1 mRNA-Expression ohne und mit Endothelin-Rezeptor ($ET_{A/B}$)-Antagonist PD145065 im Vergleich zu den allein mit Medium inkubierten Kontrollen. Die relative mRNA-Expression (in Relation zur Kontrolle gleich eins gesetzt) ist dargestellt als Mittelwert \pm SEM ($n=5-8$). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ und **** $p < 0,0001$ vs. Kontrolle bzw. wie angegeben. Abkürzungen: NC, Normalfutter; HFD, Hochfetttdiät.

Außerdem ergaben weitere Analysen des mPEC-KdM von End.LepR-WT und End.LepR-KO Mäusen keinen Unterschied bezüglich des Stickstoffmonoxid-Gehalts (NO; indirekt über die Bestimmung des ersten stabilen und nicht flüchtigen Produkts Nitrit NO_2^-), welcher in beiden Gruppen unterhalb der Detektionsgrenze (des verwendeten *Griess Reagent* von 1,56 μM) lag. Auch die Prostacyclin-Spiegel (PGI_2 ; die Messung erfolgte indirekt über die Bestimmung des ersten Hydrolyse-Produkts 6-keto prostaglandin $\text{F}_{1\alpha}$ unter Verwendung eines entsprechenden ELISAs) unterschieden sich nicht im mPEC-KdM von End.LepR-KO ($7,80 \pm 2,77$ vs. $9,53 \pm 3,01$ ng/mL in CdM-End.LepR-WT; $p=0,35$) und End.LepR-WT+HFD Mäusen ($8,53 \pm 0,73$ vs. $9,58 \pm 1,25$ ng/mL; $P=0,49$).

4.9.3 Untersuchung der Expression von parakrinen Mediatoren und endothelialen Markern in unverletzten Carotisarterien und vaskulären Läsionen von Leptin-Rezeptor-defizienten und übergewichtigen Mäusen

Zur Bestätigung der *in vitro* Befunde in mPECs, wurde die ET-1-Expression auch in unverletzten Carotisarterien und vaskulären Läsionen nachgewiesen. Repräsentative Bilder der ET-1-Immunfluoreszenz-Färbung sind in den Abbildungen 4-17 A und 4-18 A gezeigt. In Übereinstimmung mit der erhöhten mRNA-Expression in mPECs ergab auch die Quantifizierung unverletzter Carotisarterien eine signifikant erhöhte endotheliale ET-1-positive Fläche in End.LepR-KO ($36,9 \pm 4,6$ vs. $24,5 \pm 1,9\%$ in End.LepR-WT+NC; $p<0,05$; Abb. 4-17 B) und übergewichtigen End.LepR-WT Mäusen ($46,6 \pm 3,7$ vs. $24,5 \pm 1,9\%$ in End.LepR-WT+NC; $p<0,001$; Abb. 4-17 B). In der Media wiesen die End.LepR-KO Mäuse ($36,3 \pm 5,1$ vs. $20,2 \pm 2,6\%$ in End.LepR-WT+NC; $p<0,05$; Abb. 4-17 C) und übergewichtigen End.LepR-WT Mäuse ($38,3 \pm 3,7$ vs. $20,2 \pm 2,6\%$ in End.LepR-WT+NC; $p<0,01$; Abb. 4-17 C) ebenfalls eine signifikant erhöhte ET-1-positive Fläche auf.

Die endotheliale ET-1-Expression war in den neointimalen Läsionen der normalgewichtigen End.LepR-KO ($51,7 \pm 5,1$ vs. $30,8 \pm 5,1\%$; $p<0,05$) sowie übergewichtigen End.LepR-WT ($54,4 \pm 3,3$ vs. $30,8 \pm 5,1\%$; $p<0,01$) und End.LepR-KO ($52,7 \pm 2,5$ vs. $30,8 \pm 5,1\%$; $p<0,05$) Mäuse gegenüber den normalgewichtigen End.LepR-WT Kontrollen im gleichen Ausmaß signifikant erhöht (Abb. 4-18 B). Die Quantifizierung der ET-1-positiven Fläche bezogen auf die gesamte Neointima ergab ebenfalls eine erhöhte ET-1-Expression in den normalgewichtigen End.LepR-KO Mäusen im Vergleich zu den normalgewichtigen End.LepR-WT Kontrollen ($23,4 \pm 4,6\%$ vs. $10,6 \pm 1,7$; $p<0,05$). In den übergewichtigen End.LepR-WT und -KO Mäusen war die ET-1-Expression in einem ähnlichen Ausmaß erhöht ($20,5 \pm 1,1\%$ in End.LepR-WT+HFD; $p<0,05$ bzw. $19,3 \pm 3,9$ in End.LepR-KO+HFD; $p<0,075$ vs. $10,6 \pm 1,7$ in End.LepR-WT+NC; Abb. 4-18 C).

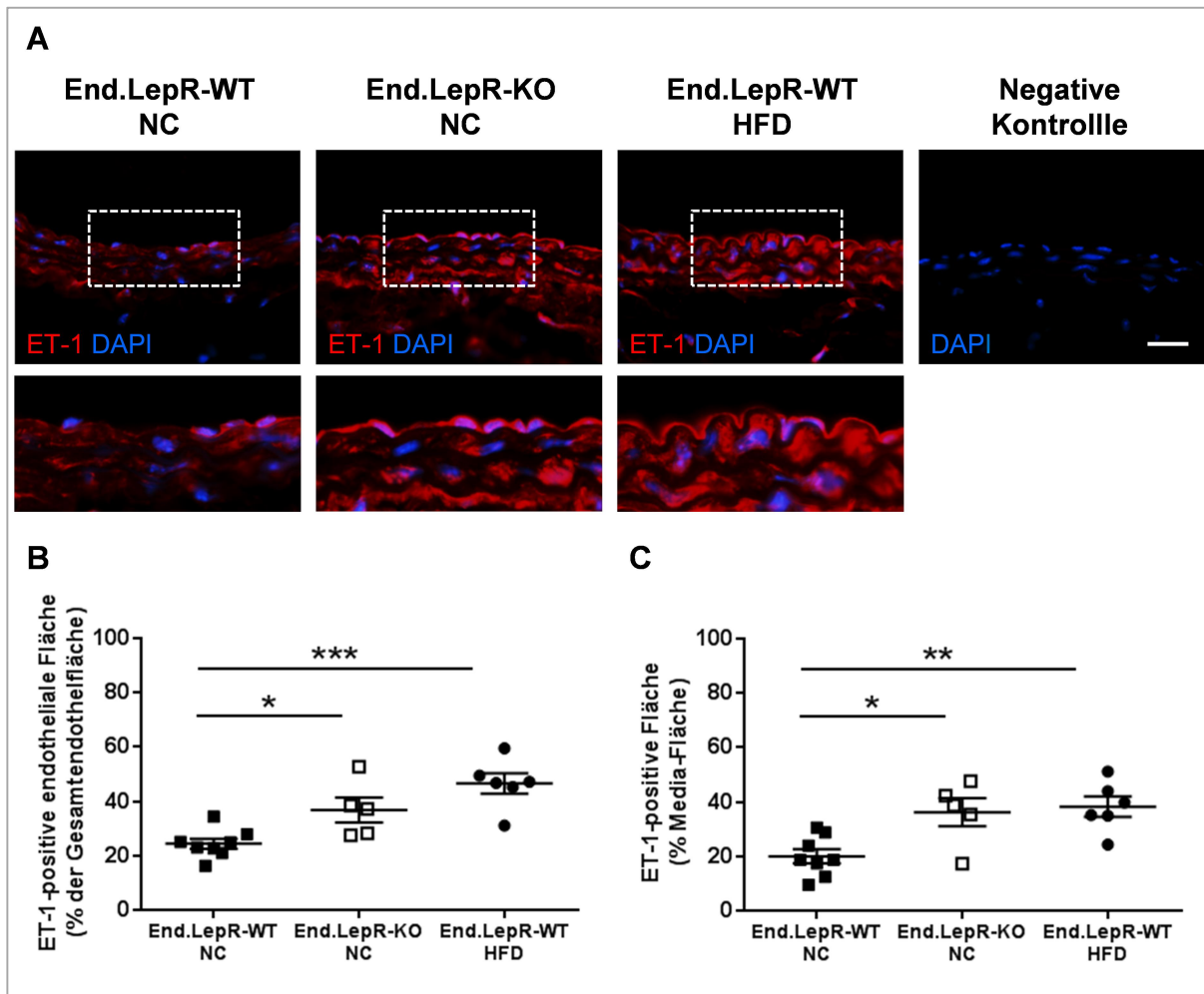


Abbildung 4-17: Endothelin-1 (ET-1)-Expression in unverletzten Carotisarterien von normalgewichtigen End.LepR-WT und LepR-KO Mäusen sowie übergewichtigen End.LepR-WT Mäusen. (A) Repräsentative Bilder der Immunfluoreszenzfärbung (oben: 1000-fache Vergrößerung; unten: manuelle Detailvergrößerung). DAPI wurde zur Zellkernfärbung verwendet. Der Maßbalken repräsentiert 25 μ m. Quantitative Analyse der ET-1-immunpositiven Fläche im Endothel (B) und in der Media (C). Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert \pm SEM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$ vs. End.LepR-WT+NC. Abkürzungen: NC, Normalfutter; HFD, Hochfettdiät.

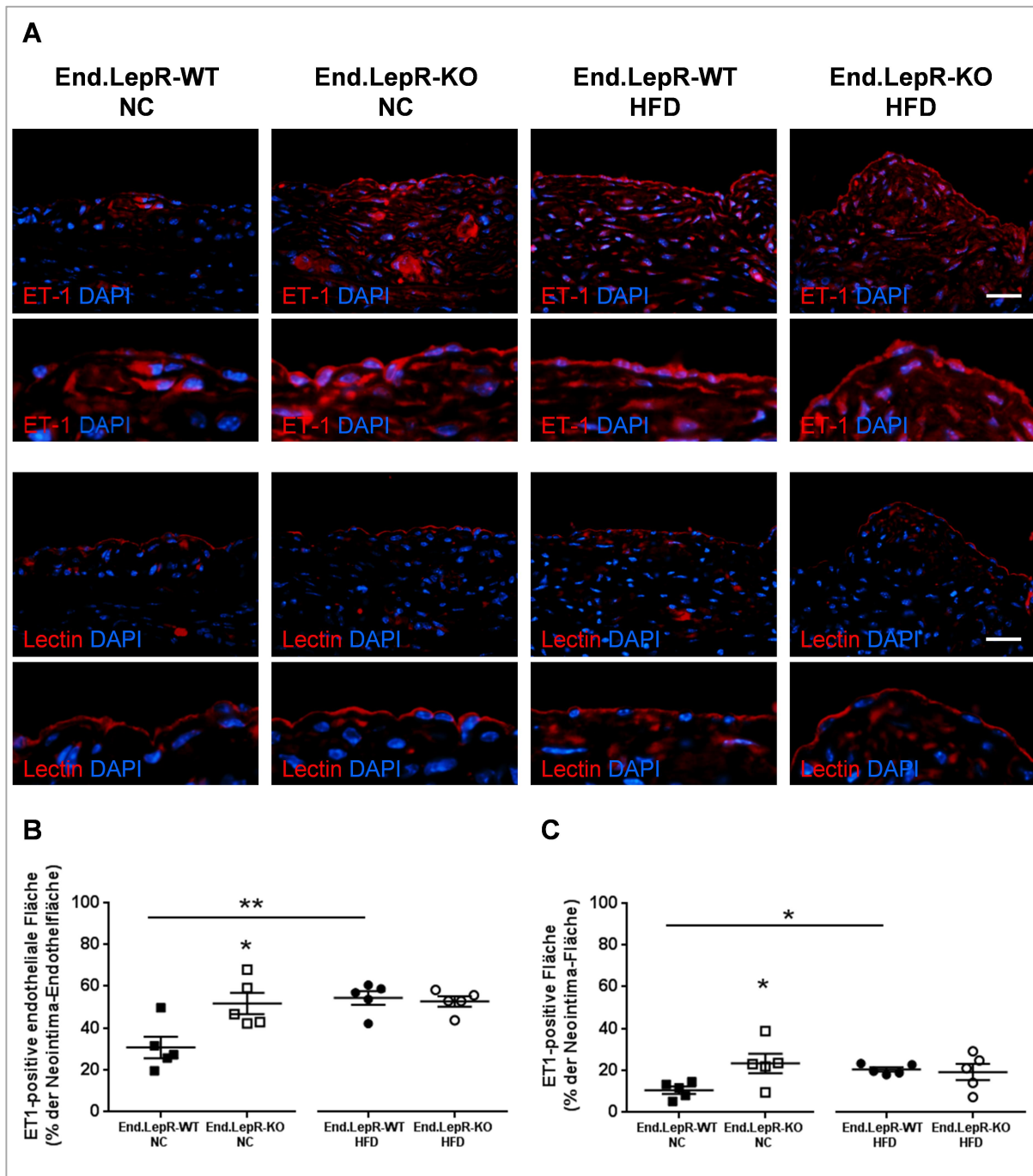


Abbildung 4-18: Endothelin-1 (ET-1)-Expression in vaskulären Läsionen von normalgewichtigen End.LepR-WT und LepR-KO Mäusen sowie übergewichtigen End.LepR-WT Mäusen. (A) Repräsentative Bilder der Immunfluoreszenzfärbung (erste und dritte Reihe: 1000-fache Vergrößerung; zweite und vierte Reihe: manuelle Detailvergrößerung). Lectin wurde zur Markierung des Endothels und DAPI zur Zellkernfärbung verwendet. Die Maßbalken repräsentiert 25 μ m. Quantitative Analyse der ET-1-immunpositiven Fläche im Endothel der Neointima (**B**) und in der Media (**C**). Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert \pm SEM. * $p < 0,05$ und ** $p < 0,01$ vs. End.LepR-WT+ NC. *Abkürzungen:* NC, Normalfutter; HFD, Hochfett-diät.

Darüber hinaus wiesen sowohl die LepR-defizienten End.LepR-KO Mäuse ($28,5 \pm 4,7$ vs. $14,2 \pm 1,9\%$; $p < 0,05$) als auch die übergewichtigen End.LepR-WT ($32,1 \pm 4,0$ vs. $14,2 \pm 1,9\%$; $p < 0,05$) und End.LepR-KO ($37,0 \pm 5,1$ vs. $14,2 \pm 1,9\%$; $p < 0,01$) Mäuse eine signifikant größere CD31-immunpositive Fläche im Endothel der Neointima auf (Abb. 4-19; repräsentative Bilder in A und Quantifizierung in B).

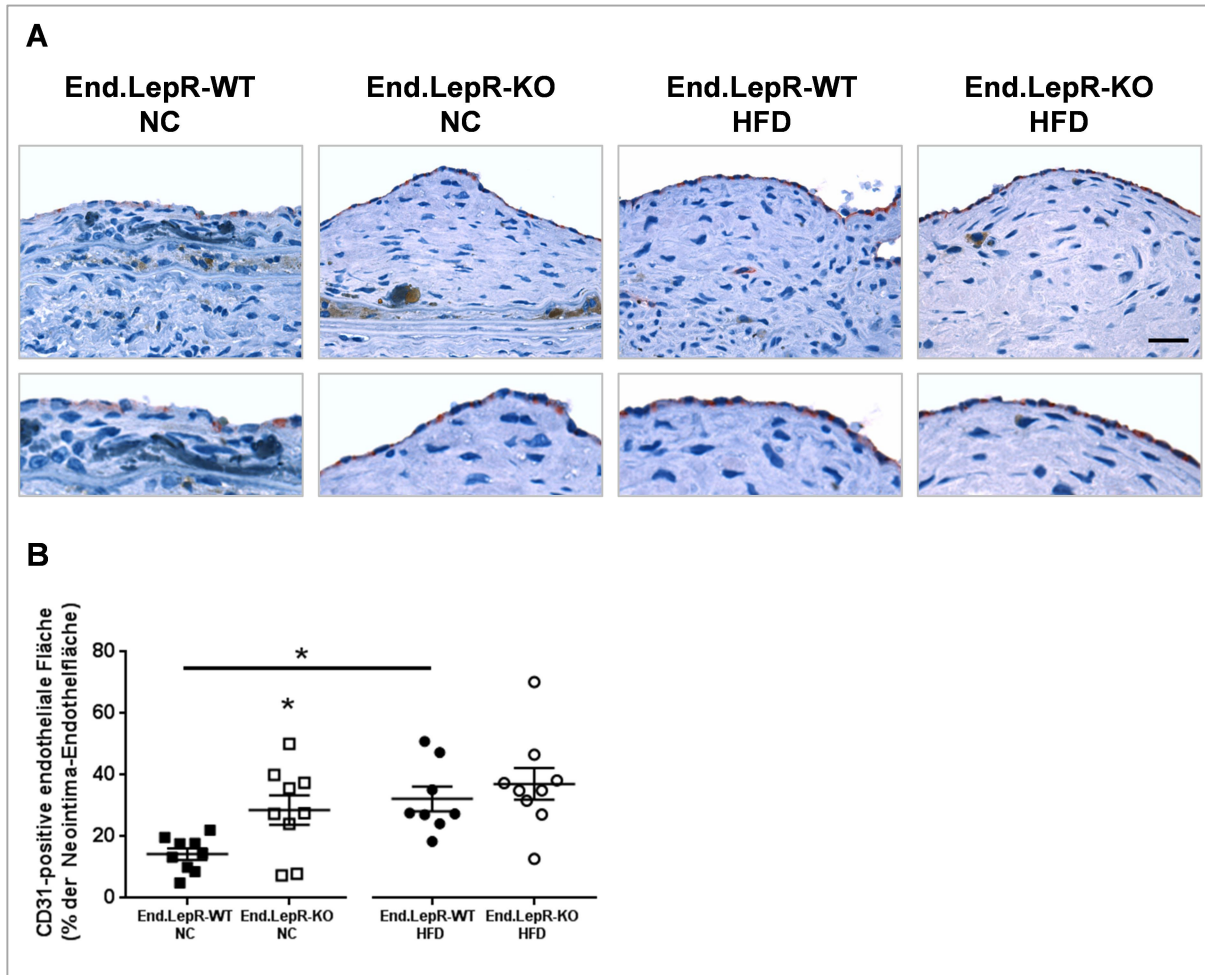


Abbildung 4-19: Endotheliale CD31-Expression in vaskulären Läsionen von normalgewichtigen End.LepR-WT und LepR-KO Mäusen sowie übergewichtigen End.LepR-WT Mäusen. (A) Repräsentative Bilder der Immunfluoreszenzfärbung (erste Reihe: 1000-fache Vergrößerung; zweite Reihe: manuelle Detailvergrößerung). Der Maßbalken repräsentiert 25 μm . **(B)** Quantitative Analyse der CD31-immunpositiven Fläche im Endothel der Neointima. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert \pm SEM. * $p < 0,05$ vs. End.LepR-WT+ NC. *Abkürzungen:* NC, Normalfutter; HFD, Hochfettdiät.

Weitere repräsentative Immunfluoreszenz-Färbungen von ICAM2, eNOS, iNOS, COX-1 und COX2 bestätigten in den unverletzten Carotiden von übergewichtigen End.LepR-WT Mäusen eine erhöhte endotheliale ICAM2- und COX2-Expression und somit das Vorliegen einer Endothelzellaktivierung (Abb. 4-20).

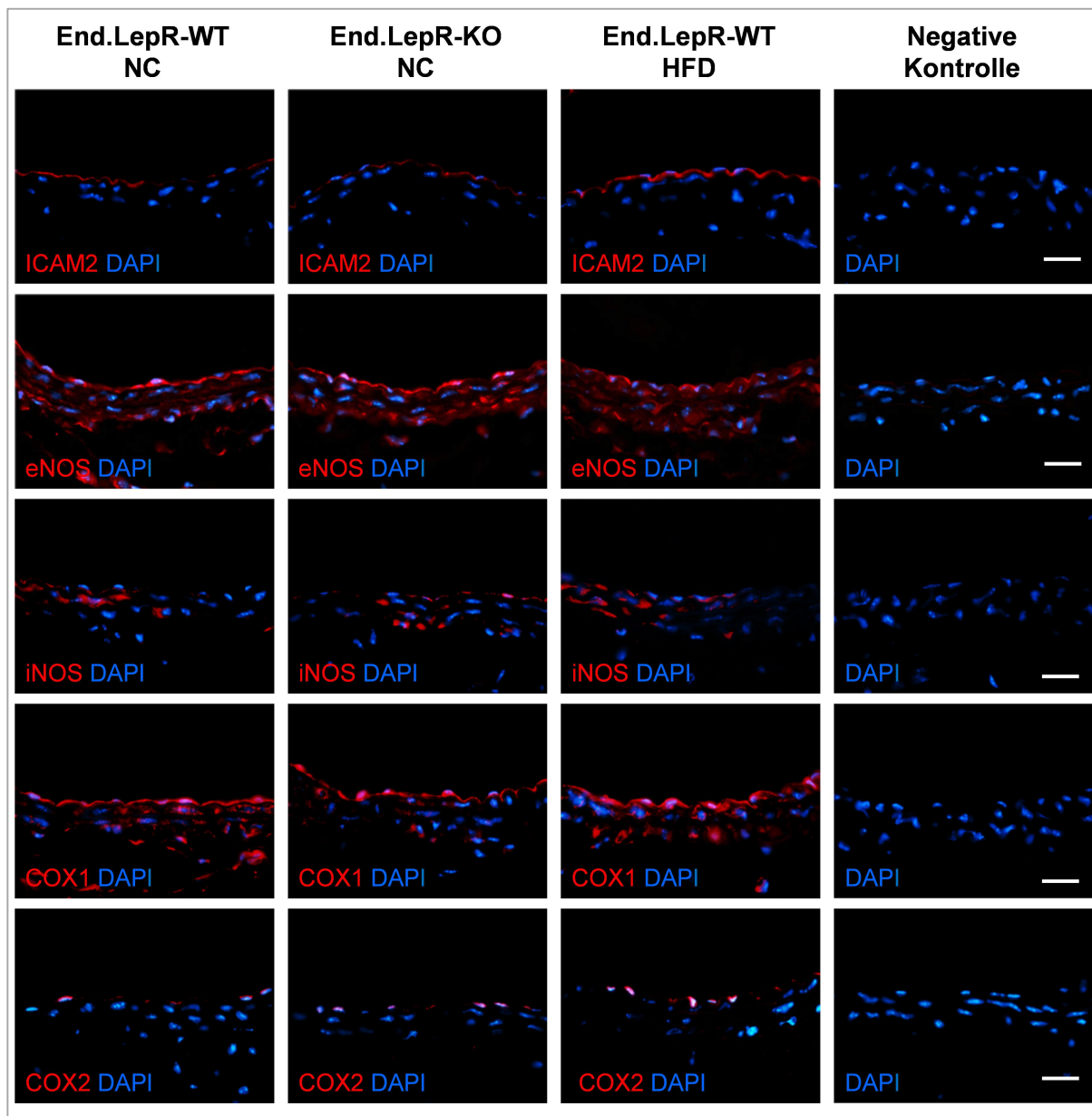


Abbildung 4-20: Repräsentativer Nachweis der Expression von ICAM2, eNOS, iNOS, COX1 und COX2 mittels Immunfluoreszenz in unverletzten Carotisarterien von normalgewichtigen End.LepR-WT und LepR-KO Mäusen sowie übergewichtigen End.LepR-WT Mäusen. DAPI wurde zur Zellkernfärbung verwendet. Aufnahme in 1000-facher Vergrößerung. Die Maßbalken repräsentieren 25 µm. *Abkürzungen:* NC, Normalfutter; HFD, Hochfettdiät.

4.9.4 Einfluss der erhöhten endothelialen Expression von Endothelin-1 auf den Blutdruck und die Endothelin-1-Serumspiegel

Da ET-1 ein potenter Vasokonstriktor ist [176], wurde außerdem untersucht, inwieweit sich die erhöhte endotheliale Expression von ET-1 in unverletzten Carotisarterien und in vaskulären Läsionen auf den Blutdruck auswirkt und die zirkulierenden ET-1-Spiegel beeinflusst. In der vorliegenden Arbeit konnten keine signifikanten Unterschiede bezüglich des mittleren systolischen, diastolischen und mittleren Blutdrucks zwischen den einzelnen Versuchsgruppen beobachtet werden. Darüber hinaus wiesen sowohl normalgewichtige als auch übergewichtige End.LepR-WT und -KO Mäuse ähnliche ET-1-Serumspiegel auf. Dabei wurde das Serum sowohl von Mäusen nach vaskulärer Verletzung mit FeCl₃ als auch von Mäusen ohne operativen Eingriff untersucht. Da jedoch keine Unterschiede zwischen den operierten und nicht operierten Mäusen verzeichnet werden konnten, wurden in der nachfolgenden Tabelle 4-5 die zirkulierenden ET-1-Spiegel zusammengefasst.

Tabelle 4-5: Systolischer, diastolischer und mittlerer Blutdruck und Endothelin-1-Spiegel im Serum normalgewichtiger und übergewichtiger End.LepR-WT und -KO Mäuse

	End.LepR-WT	End.LepR-KO	End.LepR-WT	End.LepR-KO
n	7	5	8	10
Diät	NC	NC	HFD	HFD
Systolischer Blutdruck [mmHg]	139 ± 3	140 ± 6	138 ± 6	139 ± 8
Diastolischer Blutdruck [mmHg]	106 ± 3	101 ± 5	112 ± 5	110 ± 9
Mittlerer Blutdruck [mmHg]	114 ± 4	112 ± 6	120 ± 5	120 ± 9
Serum-Endothelin-1 [pg/ml]	2,1 ± 0,2 (n=15)	2,0 ± 0,3 (n=15)	1,5 ± 0,1 (n=17)	1,4 ± 0,2 (n=14)

Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert ± SEM.

4.10 Mechanistische Untersuchungen

Zur Untersuchung der möglichen zugrunde liegenden Mechanismen der beobachteten erhöhten Expression von ET-1 in Leptin-Rezeptor-defizienten Endothelzellen wurden weitere *ex vivo* und *in vitro* Experimente durchgeführt. Der ET-1 Promotor enthält eine proximale Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor Aktivator-Protein-1 (AP-1) [177] und frühere *in vitro* Untersuchungen haben gezeigt, dass Leptin die ET-1 Expression über AP-1 vermittelte Mechanismen fördert [158]. Analysen mittels konfokaler Immunfluoreszenz von *c-jun*, einer Untereinheit des Transkriptionsfaktors AP-1, bestätigte in mPECs von End.LepR-WT Mäusen nach Leptin-Stimulation (10 ng/mL für 1 h) einen vermehrten prozentualen Anteil von Zellen mit nukleärer *c-jun* Lokalisation ($59,6 \pm 17,4$ vs. $5,6 \pm 3,1\%$ in mPEC-End.LepR-WT ohne Leptin; $p < 0,05$; Abb. 4-21 B). Im Gegensatz dazu wiesen die mPECs von End.LepR-KO Mäusen im Vergleich zu den mPECs der End.LepR-WT Kontrollen bereits basal, unabhängig von exogenem Leptin, eine vermehrte Translokation von *c-jun* in den Nukleus auf ($77,8 \pm 11,1\%$ in mPEC-End.LepR-KO ohne Leptin bzw. $73,4 \pm 7,0$ in mPEC-End.LepR-KO mit Leptin vs. $5,6 \pm 3,1\%$ in End.LepR-WT ohne Leptin; $p < 0,01$; Abb. 4-21 B). In der Abbildung 4-21 A sind repräsentative Immunfluoreszenz-Bilder der Konfokal-Mikroskopie sind gezeigt.

PPAR γ gilt als negativer Regulator von AP-1, indem er die Bindung von AP-1 an den ET-1 Promotor verhindert [174]. Wie in Abschnitt 4.9.1 bereits beschrieben konnte in mPEC von End.LepR-KO und übergewichtigen End.LepR-WT Mäusen eine signifikant niedrigere PPAR γ -mRNA-Expression nachgewiesen werden (siehe qPCR-Analyse Abb. 4-15). Zur Untersuchung, inwiefern die signifikant reduzierte PPAR γ -Expression in mPECs sowohl von LeR-defizienten und Leptin-resistenten übergewichtigen Mäusen an der beobachteten ET-1 Überexpression beteiligt ist, wurden humane Endothelzellen (HUVECs) mit dem PPAR γ -Antagonisten T0070907 behandelt. Die PPAR γ -Antagonisierung war bei allen eingesetzten Konzentrationen (1, 10 und 25 μ M für 24 h) mit einer erhöhten nukleären Lokalisation von *c-jun* assoziiert (1 μ M: $83,4 \pm 16,7$ vs. $10,3 \pm 5,2\%$ in der DMSO-Kontrolle; $p < 0,05$ bzw. 10 μ M: $84,5 \pm 1,2$ vs. $23,4 \pm 6,7\%$ in der DMSO-Kontrolle; $p < 0,05$ bzw. 25 μ M: $87,5 \pm 12,5$ vs. $10,0 \pm 10,0\%$ in der DMSO-Kontrolle; $p < 0,05$; Abb. 4-22 B). Repräsentative Immunfluoreszenz-Bilder der Konfokal-Mikroskopie sind in der Abbildung 4-22 A gezeigt. Darüber hinaus bestätigte die repräsentative Western Blot-Analyse eine erhöhte ET-1-Proteinexpression bei allen eingesetzten Konzentrationen des PPAR γ -Antagonisten (Abb. 4-22 C).

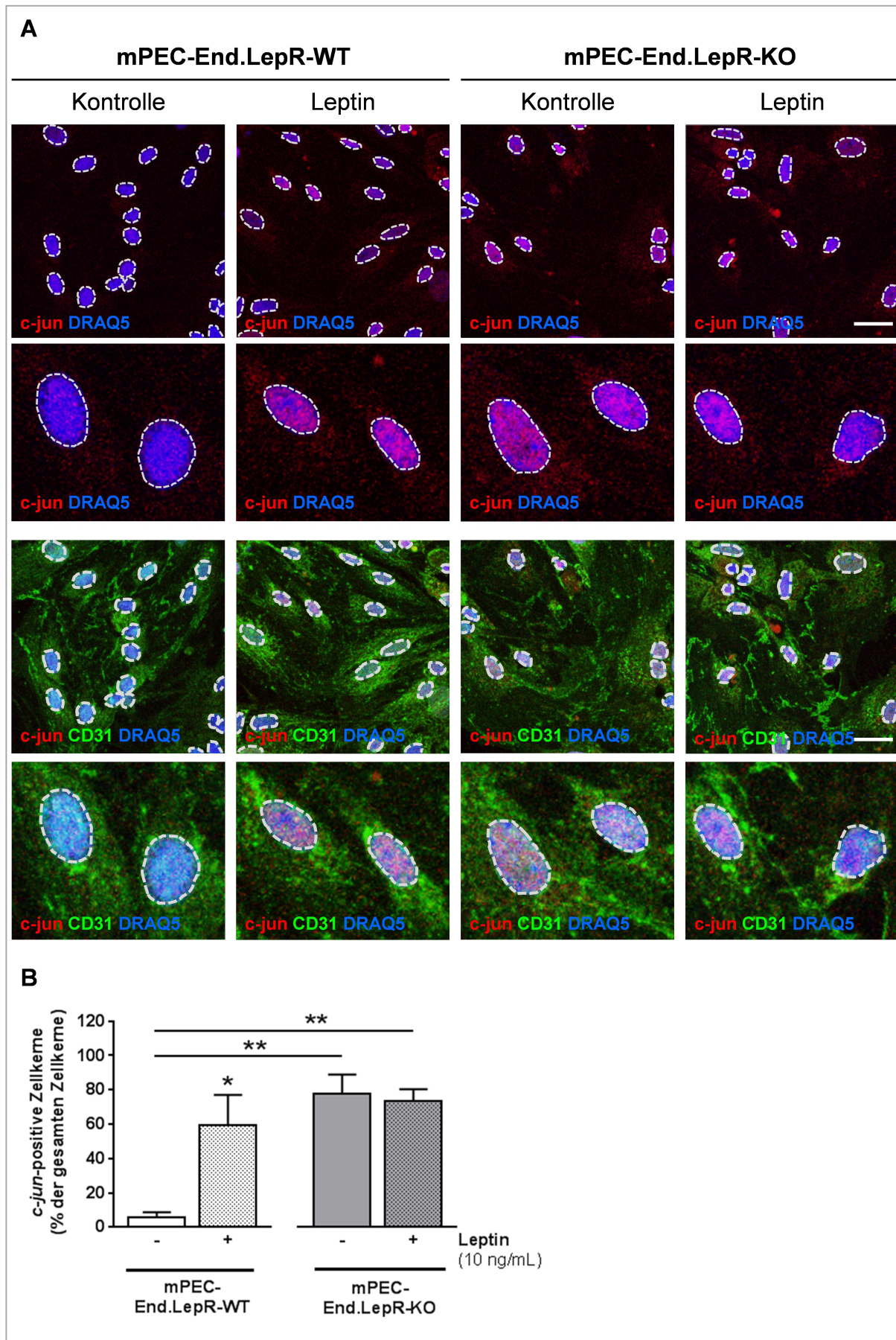


Abbildung 4-21: Effekt der murinen endothelialen Leptin-Rezeptor Defizienz und Leptin-Stimulation auf die nukleäre Lokalisation von *c-jun*. Murine primäre Endothelzellen (mPECs)

wurden aus den Lungen (von n=3 Mäusen pro Genotyp) isoliert und kultiviert. Die intrazelluläre Lokalisation von *c-jun*, eine Untereinheit des Transkriptionsfaktors AP-1, wurde ohne und nach Stimulation mit rekombinantem Leptin (10 ng/mL für 1 h) mittels Immunfluoreszenz und Konfokal-Mikroskopie untersucht. **(A)** Repräsentative Bilder der mPECs von End.LepR-WT und -KO Mäusen (erste und dritte Reihe: 630-fache Vergrößerung; zweite und vierte Reihe: manuelle Detailvergrößerung). Die endotheliale Identität der mPECs wurde mittels CD31-Antikörper bestätigt sowie die Zellkerne mit dem DNA-Fluoreszenzmarker DRAQ5 markiert. Die weiße gestrichelte Linie hebt die Zellkerne hervor. Die Maßbalken repräsentieren 25 μ m. **(B)** Quantifizierung der *c-jun*-positiven Zellkerne (in % bezogen auf die Gesamtanzahl der Zellkerne pro Sichtfeld). Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert \pm SEM mit *p<0,05 und **p<0,01 vs. mPEC-End.LepR-WT unstimuliert.

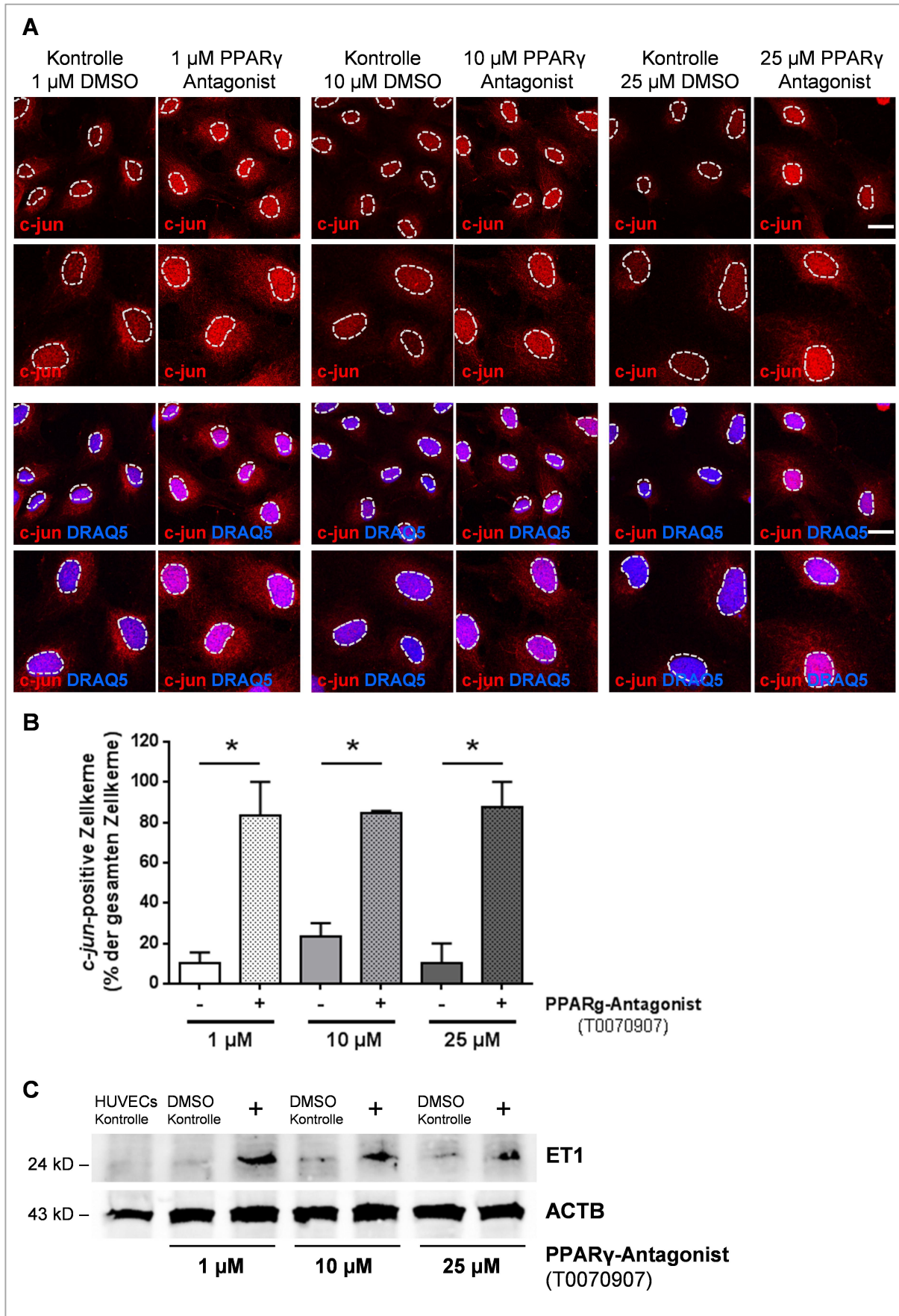


Abbildung 4-22: Effekt der PPAR γ -Antagonisierung auf die intrazelluläre Lokalisation von *c-jun* und die Expression von Endothelin-1 (ET-1) in humanen Endothelzellen. Humane umbilikale venöse Endothelzellen (HUVECs) wurden kultiviert und mit 1, 10 und 25 μ M eines PPAR γ -

Antagonisten (T0070907) oder mit der entsprechenden Konzentration DMSO für 1 h inkubiert. Die intrazelluläre Lokalisation der Untereinheit *c-jun* des Transkriptionsfaktors AP-1 wurde mittels Immunfluoreszenz und Konfokal-Mikroskopie untersucht. **(A)** Repräsentative Bilder der unterschiedlichen Versuchsansätze (erste und dritte Reihe: 630-fache Vergrößerung; zweite und vierte Reihe: manuelle Detailvergrößerung). Die Zellkerne wurden mit dem DNA-Fluoreszenzmarker DRAQ5 markiert. Die weiße gestrichelte Linie hebt die Zellkerne hervor. Die Maßbalken repräsentieren 25 μm . **(B)** Quantifizierung der *c-jun*-positiven Zellkerne (in % bezogen auf die Gesamtanzahl der Zellkerne pro Sichtfeld). Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert \pm SEM mit $*p < 0,05$ vs. jeweilige unstimulierte DMSO-Kontrolle. **(C)** Repräsentativer Western Blot der ET-1-Proteinexpression in unstimulierten HUVECS oder nach Stimulation mit dem PPAR γ -Antagonisten bzw. der entsprechenden DMSO-Kontrolle für 24 h. Die Proteinexpression von β -Aktin (ACTB) wurde als interne Kontrolle der gleichmäßigen Beladung verwendet.

5. Diskussion

Übergewicht ist mit erhöhten zirkulierenden Spiegeln des Hormons Leptin und einer Resistenz gegenüber den zentralen Effekten des Adipokins, wie die Regulation der Nahrungsaufnahme und des Körpergewichts assoziiert [20, 126]. Mehrere klinische Studien konnten eine sogenannte Hyperleptinämie als unabhängigen Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen identifizieren [27, 29, 30]. Darüber hinaus konnte in experimentellen Untersuchungen gezeigt werden, dass exogenes Leptin die Neointimabildung im Mausmodell fördert [96, 136, 143, 147]. Inwieweit die bei Übergewicht beobachtete Neointima-Hyperplasie eine Konsequenz der chronischen Hyperleptinämie und somit Aktivierung des Leptin-Signalwegs in vaskulären Zellen oder das Ergebnis einer vaskulären Leptin-Resistenz darstellt, ist bisher noch ungeklärt. Außerdem ist unklar, über welche vaskulären Zellen (glatte Muskelzellen, Endothelzellen) in der Gefäßwand Leptin primär seine Neointima-fördernde Wirkung ausübt. In der vorliegenden Arbeit wurden daher die Auswirkungen einer Zell-spezifischen vaskulären Leptin-Defizienz in Endothelzellen bzw. in glatten Muskelzellen mit Hilfe von Mausmodellen mit induzierbarer Endothelzell- (End.LepR) bzw. glatten Muskelzell-spezifischen (SMC.LepR) Leptin-Rezeptor-Deletion auf die vaskuläre Wundheilung von den gefäßschädigenden Effekten einer Hyperleptinämie bei Übergewicht nach Fütterung einer Hochfettdiät differenziert. Die zugrunde liegenden Mechanismen wurden *ex vivo* in primären murinen pulmonalen Endothelzellen (mPECs) von normalgewichtigen End.LepR-WT und -KO Mäusen sowie übergewichtigen End.LepR-WT Mäusen und murinen aortalen glatten Muskelzellen (mSMCs) normalgewichtiger und übergewichtiger Mäuse sowie *in vitro* in murinen und humanen Zelllinien untersucht.

5.1 Einfluss einer reduzierten Expression des Leptin-Rezeptors auf Endothel- und glatten Muskelzellen auf das Körpergewicht, die metabolischen Parameter und zirkulierenden Leptinspiegel

Eine reduzierte selektive Expression des Leptin-Rezeptors auf Endothelzellen und glatten Muskelzellen hat in normalgewichtigen Mäusen keinen Einfluss auf das Körpergewicht, die metabolischen Parameter und die zirkulierenden Leptinspiegel.

In den mit Normalfutter gefütterten Endothelzell-spezifischen Leptin-Rezeptor (LepR)-defizienten End.LepR-KO Mäusen konnten bezüglich des Körpergewichts und des Gewichts des viszeralen Fettgewebes (*visceral adipose tissue*, VAT) im Vergleich zu den End.LepR-WT Kontrollen keine Unterschiede festgestellt werden. In Übereinstimmung mit diesen

Befunden wiesen mit Normalfutter gefütterte Endothel-spezifische LepR-defiziente Mäuse in einer Untersuchung von Pan *et al.* ebenfalls ein normales Körpergewicht sowie eine normale Fettmasse auf [178]. Wie in Abschnitt 3.1.4 und 4.3.2 beschrieben, konnten linien- und zuchtbedingt nur die glatten Muskelzell-spezifischen LepR-defizienten SMC.LepR-KO Mäuse Tamoxifen-Futter erhalten, während SMC.LepR-WT Mäuse ohne Tamoxifen-Futter als Kontrolltiere verwendet werden mussten. Daher könnte es sich bei dem sowohl in den normalgewichtigen als auch in den übergewichtigen SMC.LepR-KO Mäusen verzeichneten niedrigeren Körpergewicht vermutlich um einen Tamoxifen-Futter-bedingten Effekt handeln. Nach Umstellung des Tamoxifen-Futters auf NC- bzw. HFD-Futter glich sich das Körpergewicht nach einigen Wochen allmählich an das der Mäuse ohne Tamoxifen-Futter an, was in einer signifikant erhöhten postoperativen Gewichtszunahme resultierte. Auf das VAT-Gewicht hatte die LepR-Reduktion auf glatten Muskelzellen keinen Einfluss. In beiden untersuchten Mauslinien konnten in den normalgewichtigen Mäusen bezüglich der gemessenen metabolischen Serumparameter (Glukose-, Cholesterin-, und Triglyzerid-Spiegel) keine Genotyp-abhängigen Unterschiede festgestellt werden.

Die in Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen gefundenen erhöhten Serumspiegel von Leptin sowie des löslichen Leptin-Rezeptors (sLepR) von Endothel-spezifischen LepR-defizienten Mäusen im Vergleich zu den WT-Kontrollen konnten in der vorliegenden Arbeit in normalgewichtigen Mäusen nicht bestätigt werden [178, 179]. Systemisch LepR-defiziente *db/db*-Mäuse weisen einen adipösen Phänotyp mit einer diabetisch-dyslipidämischen Stoffwechsellage sowie eine massive Hyperleptinämie auf [180-182]. Im Gegensatz zur systemischen LepR-Deletion ist in der vorliegenden Arbeit die Zell-spezifische LepR-Defizienz und folglich reduzierte LepR-Signaltransduktion lediglich auf vaskuläre Zellen wie den Endothelzellen bzw. glatten Muskelzellen beschränkt, so dass die Leptin-vermittelte LepR-Signaltransduktion auf allen anderen Zelltypen ungestört stattfinden kann. So exprimieren an der Regulation des Körpergewichts beteiligte neuronale Zellen, aber auch am Glukose- und Fettstoffwechsel beteiligte hepatische Zellen oder α - und β -Zellen des Pankreas weiterhin den Leptin-Rezeptor, was eine mögliche Erklärung für die fehlenden Unterschiede darstellt. Im Mausmodell führte die selektive neuronale LepR-Deletion zu Übergewicht, während eine selektive Hepatozyten-spezifische Deletion keine Auswirkungen auf das Körpergewicht hatte, was die Bedeutung der neuronalen Leptin-Signaltransduktion für die Regulation des Körpergewichts und die metabolischen Konsequenzen hervorhebt [59].

Eine reduzierte selektive Expression des Leptin-Rezeptors auf Endothelzellen und glatten Muskelzellen hat auch bei Übergewicht keinen Einfluss auf das Körpergewicht und die metabolischen Parameter. Übergewichtige Endothelzell-spezifische, jedoch nicht glatte Muskelzell-spezifische Mäuse weisen erhöhte zirkulierende Leptinspiegel auf.

In der vorliegenden Arbeit konnte in beiden untersuchten Mausmodellen bezüglich des Körpergewichts, VAT-Gewichts und der Glukose-Serumspiegel (bzw. Cholesterin-Serumspiegel in der End.LepR-Linie) lediglich ein Effekt der Hochfettdiät unabhängig vom Genotyp verzeichnet werden. Da Nicht-Nüchtern-Serum untersucht wurde, könnte dies eine mögliche Erklärung für den fehlenden Effekt der Hochfettdiät auf die Cholesterin-Serumspiegel in der SMC.LepR-Linie und auf die Triglyzerid-Serumspiegel in beiden Linien sein, da vor allem die Triglyzeride erheblichen intraindividuellen sowie starken nahrungsabhängigen Schwankungen innerhalb eines Tages unterliegen [183]. Passend zu den zahlreichen Befunden klinischer Studien [20, 21, 98] und experimenteller Untersuchungen im Mausmodell [96, 143] resultierte auch in der vorliegenden Arbeit das Hochfettdiät-induzierte Übergewicht in beiden Mauslinien in einer Hyperleptinämie. Interessanterweise waren die Leptin-Serumspiegel in übergewichtigen End.LepR-KO Mäusen stärker erhöht als in den End.LepR-WT Kontrolltieren. Passend dazu wurde von Hsuchou *et al.* in hyperleptinämischen Endothelzell-spezifischen LepR-KO Mäusen gezeigt, dass diese nach intravenöser Injektion eine geringere Leptin-Aufnahme zentraler und peripherer Organe aufwiesen [179]. In übergewichtigen End.LepR-WT Mäusen gingen die erhöhten Leptin-Serumspiegel mit signifikant erhöhten sLepR-Serumspiegeln einher, was letztlich in einem reduzierten Spiegel an freien und biologisch aktivem Leptin (dem sog. „Freien Leptin Index“, FLI) resultierte. Im Gegensatz dazu wiesen die End.LepR-KO+HFD Mäuse keine erhöhten sLepR-Serumspiegel auf, was folglich mit einem erhöhten FLI einherging. Da die proteolytische Abspaltung der extrazellulären Domäne membrangebundener Leptin-Rezeptoren eine relevante Quelle für zirkulierende lösliche Leptin-Rezeptoren darstellt [76], könnten reduzierte sLepR-Serumspiegel eine reduzierte Expression membrangebundener endothelialer Leptin-Rezeptoren widerspiegeln [184]. Dafür spricht auch, dass das Fehlen des Leptin-Rezeptors auf glatten Muskelzellen in übergewichtigen SMC.LepR-WT und -KO Mäusen keinen Genotyp-abhängigen Effekt auf die sLepR-Serumspiegel hatte. Hier waren die HFD-bedingt erhöhten zirkulierenden Leptinspiegel und sLepR-Serumspiegel gleichermaßen erhöht, was zu einem erhöhten FLI führte. Andererseits könnten erhöhte sLepR-Serumspiegel auch für eine Hochregulation membrangebundener Leptin-Rezeptoren sprechen. Passend dazu konnte in der vorliegenden Arbeit in mPECs von übergewichtigen End.LepR-WT+HFD Mäusen bereits basal eine signifikant erhöhte LepR-Proteinexpression nachgewiesen werden. Möglicherweise hat auch das ausgeprägtere VAT-Gewicht der End.LepR-KO+HFD Mäuse, wenn auch gegenüber der End.LepR-WT+HFD Kontrollgruppe nicht von statistischer Signifikanz, zu den erhöhten Leptinspiegeln beigetragen.

5.2 Einfluss einer reduzierten Expression des Leptin-Rezeptors auf Endothelzellen und glatten Muskelzellen auf die Neointimabildung

Eine reduzierte Expression des Leptin-Rezeptors und verminderte Leptin-Rezeptor-Signaltransduktion in Endothelzellen führt nach Gefäßverletzung zu einer Neointima-Hyperplasie und weist einen ähnlichen vaskulären Phänotyp auf wie übergewichtige WT-Mäuse.

In der vorliegenden Arbeit konnte in mPECs von End.LepR-KO Mäusen, passend zur in unterschiedlichen Geweben weit verbreiteten Ko-Expression der verschiedenen Isoformen [67], auf mRNA-Ebene eine signifikante Reduktion sowohl der kurzen (LepR_{short}) als auch der langen (LepR_{long}) Isoform nachgewiesen werden. Diese signifikant reduzierte LepR-Expression auf Endothelzellen sowie die reduzierte LepR-Signaltransduktion, welche durch eine fehlende Phosphorylierung des Surrogatmarkers der Leptin-Signaltransduktion STAT3 [172] in mPECs von End.LepR-KO Mäusen nachgewiesen wurde, resultierte nach Gefäßverletzung in einer signifikant erhöhten Neointima, Intima-Media-Ratio und folglich Lumenstenose. Auf die Fläche der Media und die Gesamtgefäßfläche hatte die endotheliale LepR-Reduktion keinen Einfluss. Die Untersuchung der zellulären Zusammensetzung der Neointima ergab eine signifikant erhöhte neointimale Zellularität und Anzahl proliferierender Zellen sowie eine erhöhte SMA-positive Fläche in End.LepR-KO Mäusen. Ein ähnlicher vaskulärer Phänotyp nach Gefäßverletzung wurde auch in mit einer Hochfettdiät gefütterten, übergewichtigen End.LepR-WT Mäusen beobachtet, was auf eine mögliche funktionelle LepR-Defizienz bei Übergewicht hinweist.

Diese Annahme konnte auch in mPECs von übergewichtigen Mäusen bestätigt werden, die im Gegensatz zu den mPECs von normalgewichtigen Mäusen keine Leptin-induzierte Hochregulation der LepR-Proteinexpression aufwiesen. Darüber hinaus konnte in mPECs übergewichtiger Mäuse, passend zu einer chronisch aktivierten Leptin-Signaltransduktion bei Hyperleptinämie, bereits basal eine signifikant erhöhte STAT3-Phosphorylierung und nach Leptin-Stimulation keine weitere Zunahme der STAT3-Aktivierung nachgewiesen werden. In früheren Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe resultierte die exogene Verabreichung von Leptin drei Wochen nach chemischer Gefäßverletzung (mit Eisen(III)-chlorid) der *Arteria Carotis* in einer signifikant erhöhten Neointimabildung, und die Tiere wiesen einen ähnlichen Phänotyp auf wie hyperleptinämische, übergewichtige Mäuse. Übergewichtige Leptindefiziente *ob/ob*-Mäuse waren dagegen vor der Entwicklung einer Neointima-Hyperplasie geschützt [96]. Die Bedeutung der Leptin – Leptin-Rezeptor-Achse für die Neointimabildung verdeutlichen Befunde in systemischen LepR-defizienten *db/db*-Mäusen, die trotz Übergewicht, Hyperleptinämie und auch nach exogener Leptin-Injektion vor einer Neointima-Hyperplasie geschützt waren [96, 143]. Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen konnten

nach Gefäßverletzung der *Arteria femoralis* ebenfalls bestätigen, dass *ob/ob*- und *db/db*-Mäuse eine geringere Neointima im Vergleich zu den WT-Kontrollen entwickelten [136, 138]. Eine mögliche Erklärung dieser scheinbaren widersprüchlichen Befunde der vorliegenden Arbeit mit vorherigen Arbeiten der eigenen und der anderer Arbeitsgruppen könnten in den unterschiedlichen zirkulierenden Leptinspiegeln begründet liegen. So hatte die Endothelzell-spezifische LepR-Deletion in der vorliegenden Arbeit in den normalgewichtigen Mäusen keine Auswirkungen auf die zirkulierenden Leptinspiegel, während die Leptinspiegel im Serum von systemisch LepR-defizienten *db/db*-Mäusen stark erhöht waren [181]. Da der Leptin-Rezeptor auch auf anderen an der Neointimabildung beteiligter Zelltypen wie glatten Muskelzellen, inflammatorischen Zellen und Thrombozyten lokalisiert ist [144, 185], sind diese in den Endothelzell-spezifischen LepR-defizienten Mäusen im Gegensatz zu einer systemischen Deletion weiterhin in der Lage zur LepR-vermittelten Signaltransduktion. Dennoch ermöglichen Mausmodelle mit einer Zell-spezifischen LepR-Defizienz die vaskulären Effekte von Leptin von den Effekten des Übergewichts *per se* zu differenzieren, da Übergewicht zwangsläufig mit metabolischen und inflammatorischen Veränderungen assoziiert ist, die Leptin-unabhängig ebenfalls zu den vaskulären Störungen beitragen können. So konnten in der vorliegenden Arbeit keine Unterschiede bezüglich des Körpergewichts, des VAT-Gewichts und auch keine metabolischen Veränderungen (Glukose-, Cholesterin- und Triglyzerid-Spiegel) zwischen den normalgewichtigen End.LepR-WT und End.LepR-KO Mäusen festgestellt werden, wohingegen Übergewicht *per se* unabhängig vom Genotyp mit metabolischen Veränderungen und einer erhöhten Infiltration hämatopoetischer CD45-positiver Zellen sowie F4/80-positiver Gewebsmakrophagen innerhalb der vaskulären Läsionen einherging. Ein Beitrag des ausgeprägteren, wenn auch statistisch nicht signifikant erhöhten, VAT-Gewichts und der erhöhten endogenen Leptinspiegel in übergewichtigen End.LepR-KO Mäusen zu dem noch weiter verstärkten vaskulären Phänotyp nach Gefäßverletzung auf die Neointima, Stenose und Intima-Media-Ratio kann nicht ausgeschlossen werden, jedoch sprechen die Befunde der normalgewichtigen Mäuse für eine wesentliche Beteiligung der Endothelzell-spezifischen Leptin-Signaltransduktion an der vaskulären Wundheilung. So zeigten bereits normalgewichtige End.LepR-KO Mäuse eine signifikant erhöhte Neointima, obwohl diese sich bezüglich des VAT-Gewichts und der zirkulierenden Leptinspiegel nicht von den End.LepR-WT Kontrollen unterschieden.

Wie bereits in einer früheren Publikation der eigenen Arbeitsgruppe gezeigt werden konnte [96], resultierte die HFD-Fütterung der End.LepR-WT Mäuse auch in der vorliegenden Arbeit im Vergleich zu den normalgewichtigen End.LepR-WT Kontrollen in einer signifikant verdickten Media. Passend dazu konnte auch *ex vivo* in primären murinen aortalen Muskelzellen (mSMCs) übergewichtiger Mäuse bereits basal eine erhöhte Proliferation und Migration im Vergleich zu den mSMCs normalgewichtiger Mäuse gezeigt werden. Hingegen

zeigte sich in den mit HFD-gefütterten End.LepR-KO Mäusen kein Effekt auf die Media, was gleichzeitig auch mit einer signifikant reduzierten SMA-positiven neointimalen Fläche im Vergleich zu den normalgewichtigen End.LepR-KO Mäusen einherging. Eine mögliche Erklärung ist, dass die ausgeprägtere Neointima übergewichtiger End.LepR-KO Mäuse mit einem vermehrten Phänotypwechsel der glatten Muskelzellen, die im Zuge der vaskulären Wundheilung von der Media in die Intima migrieren und dort vermehrt proliferieren, vom kontraktilen in den synthetischen Phänotyp einhergeht, welcher durch eine reduzierte Expression von Differenzierungsmarkern glatter Muskelzellen, wie Strukturproteinen des Zytoskeletts, charakterisiert ist [186-189]. Insgesamt resultierte die verdickte Media der übergewichtigen End.LepR-WT Mäuse und die ausgeprägtere Neointima der End.LepR-KO Mäuse jedoch in gleichem Ausmaß Genotyp-unabhängig in einer Größenzunahme der Gesamtgefäßfläche (positives *Remodeling*).

Eine reduzierte Expression des Leptin-Rezeptors auf glatten Muskelzellen resultiert nach Gefäßverletzung in einer Media-Hyperplasie, hat jedoch keinen Einfluss auf die Neointimabildung oder Lumenstenose.

Der Befund, dass die glatte Muskelzell-spezifische LepR-Deletion keinen Einfluss auf die Neointimabildung und die Lumenstenose hat, hebt die kritische Rolle einer intakten endothelialen Leptin-Signaltransduktion im Rahmen der vaskulären Wundheilung nochmals weiter hervor. Im Gegensatz zu den Endothelzell-spezifischen LepR-defizienten Mäusen, resultierte die glatte Muskelzell-spezifische LepR-Deletion in einer signifikanten Hyperplasie der Media, ähnlich wie sie in übergewichtigen WT-Mäusen sowohl in der vorliegenden Arbeit als auch in vorhergehenden Arbeiten der Arbeitsgruppe beobachtet werden konnte [96]. In übergewichtigen SMC.LepR-KO Mäusen war die Media-Hyperplasie in einem ähnlichen Ausmaß wie in den normalgewichtigen SMC.LepR-KO und übergewichtigen SMC.LepR-WT Mäusen ausgeprägt. Zusammenfassend suggerieren die unterschiedlichen Befunde der LepR-Deletion auf Endothelzellen und glatten Muskelzellen auf den vaskulären Phänotyp nach Gefäßverletzung, dass Übergewicht mit einer Leptin-Resistenz sowohl in Endothelzellen als auch in glatten Muskelzellen einherzugehen scheint. Diese Annahme konnte in der vorliegenden Arbeit in *ex vivo* Untersuchungen verstärkt werden. So zeigten von übergewichtigen WT-Mäusen isolierte mSMCs im Gegensatz zu mSMCs von normalgewichtigen Kontrollen keine Reaktion auf die exogene Leptin-Stimulation, sondern wiesen bereits basal eine erhöhte Proliferation und Migration auf. Insgesamt weisen diese *in vivo* und *ex vivo* Befunde darauf hin, dass neben anderen Faktoren die Resistenz der glatten Muskelzellen gegenüber den Leptin-vermittelten Effekten zur Entstehung einer Media-Hyperplasie nach Gefäßverletzung bei Übergewicht beigetragen haben könnte.

5.3 Übergewicht und Leptin-Resistenz

Übergewicht führt im Mausmodell zu einer endothelialen Leptin-Resistenz, welche als Unfähigkeit der Zellen zur Leptin-vermittelten Signaltransduktion definiert ist.

Die Wiederherstellung der endothelialen Integrität im Rahmen der vaskulären Wundheilung stellt einen kritischen Prozess dar zur Begrenzung oder sogar Verhinderung einer intimalen Hyperplasie, durch Verhindern der Thrombozytenaggregation oder Leukozytenadhäsion und Vermitteln einer „beruhigenden“ Wirkung auf die glatten Muskelzellen (verhindern einer übermäßigen Proliferation und Migration). *In vitro* und *in vivo* Untersuchungen der eigenen und anderer Arbeitsgruppen zeigten, dass Leptin die Proliferation, Migration und Angiogenese endothelialer (Vorläufer-)Zellen sowie die Neovaskularisierung fördert [151-153, 190-192]. Des Weiteren führte die exogene Leptin-Stimulation humaner endothelialer Vorläuferzellen (*endothelial progenitor cells*, EPCs), die nach vaskulärer Gefäßverletzung athymischen Mäusen injiziert worden waren, zu einer vermehrten Rekrutierung von EPCs im Läsionsbereich sowie verbesserten Re-Endothelialisierung und reduzierten Neointimabildung [154]. Während die akute Leptin-Stimulation einen fördernden positiven Effekt auf die Endothelfunktion zu haben scheint, konnten *in vitro* Untersuchungen in kultivierten Endothelzellen zeigen, dass die chronische Leptin-Exposition eine Leptin-Resistenz induziert. So konnte beispielsweise in humanen aortalen Endothelzellen (*human aortic endothelial cells*, HAECs) nach einer längeren Exposition (für 72 h) kein Leptin-induzierter Anstieg der eNOS-Expression, Phosphorylierung oder NO-Freisetzung verzeichnet werden [193]. Außerdem konnte in einer Untersuchung der eigenen Arbeitsgruppe in von übergewichtigen Probanden isolierten EPCs eine Resistenz gegenüber den proangiogenen Effekten von Leptin gezeigt werden [152]. In klinischen Untersuchungen wiesen Patienten mit einer Stentimplantation, die eine Restenose entwickelten, höhere Leptinspiegel auf als Patienten ohne Restenose [194] und hohe zirkulierende Leptinspiegel waren invers mit der Endothelfunktion assoziiert [195]. Dennoch ist die Existenz einer Leptin-Resistenz *in vivo* und dessen Rolle in der Pathogenese vaskulärer Erkrankungen ungeklärt, da jegliche direkte Effekte einer gestörten Leptin-Signaltransduktion nur schwer von den mit Übergewicht assoziierten Effekten differenziert werden können. Mehrere Untersuchungen bekräftigen das Vorhandensein einer Zell-spezifischen oder sogenannten selektiven Leptin-Resistenz. Beispielsweise behielten von normalgewichtigen und stark übergewichtigen Probanden isolierte Thrombozyten ihre Responsivität gegenüber erhöhtem Leptin bei und zeigten somit keine Resistenz gegenüber den Leptin-induzierten Effekten [196]. Auch Untersuchungen in murinen Übergewichtsmodellen konnten zeigen, dass die sympathoexzitorische Aktivität von Leptin erhalten bleibt, trotz gleichzeitiger Resistenz gegenüber den Sättigungs-fördernden und Körpergewichts-reduzierenden Effekten des Hormons [197-199]. Des Weiteren konnte nach der

16-wöchigen Fütterung einer Hochfettdiät in der Maus eine Region-spezifische Leptin-Resistenz innerhalb des Hypothalamus gezeigt werden. Dabei war die Leptin-induzierte STAT3-Phosphorylierung innerhalb des *Nukleus arcuatus* bei Übergewicht stark reduziert, während andere hypothalamische und extrahypothalamische Nuklei ihre Responsivität gegenüber Leptin beibehielten [109].

Insgesamt weisen die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen darauf hin, dass Übergewicht mit einer endothelialen Leptin-Resistenz assoziiert ist. Der Verlust der Sensitivität der Zellen gegenüber den Leptin-induzierten Effekten, welche für das Vorliegen einer Leptin-Resistenz charakteristisch sind, konnte durch die fehlende Leptin-induzierte STAT3-Phosphorylierung trotz einer erhöhten LepR-Expression in mPECs von übergewichtigen Mäusen bestätigt werden. Darüber hinaus sprechen die phänotypischen Ähnlichkeiten der vaskulären Wundheilung nach Gefäßverletzung bei Übergewicht mit denen normalgewichtiger LepR-defizienter Mäuse für das Vorliegen einer endothelialen Leptin-Resistenz bei Übergewicht.

Für die bei Übergewicht beobachtete verminderte Leptin-Sensitivität, die bis hin zu deren Verlust bei einer manifestierten Leptin-Resistenz reichen kann, werden verschiedene zugrunde liegende Mechanismen diskutiert. Dabei werden unter anderem Störungen auf Leptin-Rezeptor-Ebene und eine folglich reduzierte Leptin-induzierte Signaltransduktion in Betracht gezogen, wie eine verminderte Expression von Leptin-Rezeptoren [104-106] oder, wie oben bereits beschrieben, eine verminderte Responsivität gegenüber Leptin. Aber auch eine gestörte Bioverfügbarkeit von Leptin, beispielsweise aufgrund von erhöhten zirkulierenden sLepR-Spiegeln, kann durch die vermehrte Bindung und somit „Inaktivierung“ von zirkulierendem Leptin den Transport in die Zelle und das Überqueren der Blut-Hirn-Schranke sowie dessen Signaltransduktion inhibieren [79, 184, 200]. Klinische Untersuchungen fanden abhängig von der jeweiligen metabolischen Störung sowohl erniedrigte als auch erhöhte sLepR-Spiegel. So war Übergewicht mit erniedrigten zirkulierenden sLepR-Spiegel assoziiert, die nach Gewichtsabnahme wieder anstiegen [201]. Auch bezüglich des Risikos für Diabetes mellitus Typ 2 fand sich eine negative Assoziation mit dem sLepR-Spiegel unabhängig vom BMI oder den Leptinspiegeln [202], während bei Diabetes mellitus Typ 1 stark erhöhte Werte gefunden wurden [203, 204]. Insgesamt scheinen sowohl erniedrigte als auch erhöhte sLepR-Serumspiegel einen Hinweis auf pathophysiologische Veränderungen einer Leptin-Resistenz widerzuspiegeln, so dass die gleichzeitige Bestimmung der zirkulierenden sLepR- und Leptinspiegel einen möglichen diagnostischen Marker zur Beurteilung der Leptin-Sensitivität darstellen könnte [205]. In der vorliegenden Arbeit gingen die signifikant erhöhten Serum-Leptinspiegel in übergewichtigen End.LepR-WT Mäusen mit erhöhten zirkulierenden sLepR-Spiegeln einher, was in signifikant reduzierten Spiegel an freiem biologisch aktivem Leptin (FLI) resultierte. Im Gegensatz dazu konnte in

übergewichtigen End.LepR-KO kein Anstieg der sLepR-Spiegel beobachtet werden, was wie in Abschnitt 5.1 bereits diskutiert, die reduzierte LepR-Expression in End.LepR-KO Mäusen widerspiegeln könnte. Auf molekularer Ebene spielt auch die Überexpression negativer Regulatoren des Leptin-Signalwegs eine Rolle bei der Entwicklung einer Leptin-Resistenz. So konnte in Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe bereits gezeigt werden, dass EPCs übergewichtiger Probanden im Vergleich zu den normalgewichtigen Kontrollpersonen eine signifikant erhöhte basale PTP1B-Proteinexpression aufwiesen. In *Follow-up* Untersuchungen resultierte eine signifikante Gewichtsabnahme der übergewichtigen Probanden in einer signifikanten PTP1B-Proteinexpression auf das Niveau der normalgewichtigen Kontrollen. Gleichzeitig konnte in Angiogenese-Assays (*Matrigel* und *Speroid*-Assays) eine Wiederherstellung der Responsivität der EPCs nach Gewichtsabnahme auf die angiogenetischen Leptin-Effekte gezeigt werden [152]. In der vorliegenden Arbeit konnten auch in mPECs übergewichtiger Mäuse im Vergleich zu den normalgewichtigen Kontrollen eine signifikant erhöhte Proteinexpression von PTP1B und PTEN, beides negative Regulatoren des JAK2 bzw. PI3K/AKT Signalwegs [173], nachgewiesen werden. Bezüglich der SOCS3-Proteinexpression, ein weiterer für die Entwicklung einer Leptin-Resistenz bekannter Faktor [107, 206], konnten in mPECs übergewichtiger Mäuse keine signifikanten Unterschiede gegenüber den normalgewichtigen Kontrollen gefunden werden.

5.4 Rolle endothelialer parakriner Mediatoren auf die Neointimabildung

Die in vivo, ex vivo und in vitro Befunde lassen vermuten, dass eine erhöhte Freisetzung von Endothelin-1 und parakrine Stimulation der Endothelzell- und glatten Muskelzell-Proliferation zu der Neointima-Hyperplasie in Leptin-Rezeptor-defizienten und Leptin-resistenten übergewichtigen Mäusen beigetragen haben könnte.

Zur Untersuchung von Mediatoren, die an den veränderten parakrinen Effekten Leptin-Rezeptor-defizienter und Leptin-resistenter Endothelzellen auf die Neointimabildung beteiligt sind, wurde die Expression endothelialer Faktoren untersucht, die bekanntermaßen die Proliferation glatter Muskelzellen fördert. Die Untersuchungen zeigten sowohl in mPECs von LepR-defizienten End.LepR-KO als auch in übergewichtigen End.LepR-WT Mäusen eine signifikant erhöhte mRNA-Expression von Endothelin-1 (ET-1), ein von Endothelzellen gebildetes und sekretiertes vasoaktives Peptid, welches an der auto- und parakrinen Regulation des Gefäßtonus und der glatten Muskelzellproliferation beteiligt ist. Mehrere *in vitro* Untersuchungen zeigten, dass ET-1 die Proliferation glatter Muskelzellen fördert [207-209] und die Effekte anderer Wachstumsfaktoren wie PDGF (*platelet-derived growth factor*), bFGF (*basic fibroblast growth factor*) oder EGF (*epidermal growth factor*) verstärkt [210,

211]. Die signifikant abgeschwächte Antwort muriner aortaler glatter Muskelzellen (MOVAS) nach Inkubation mit konditioniertem Medium primärer mPECs von End.LepR-KO Mäusen bei gleichzeitiger Behandlung mit einem Endothelin-Rezeptor (ET_{A/B})-Antagonisten unterstreicht die Rolle von ET-1 als parakrinen Mediator der in der vorliegenden Arbeit beobachteten vermehrten SMC-Proliferation und Neointima-Zellularität nach vaskulärer Verletzung. Die fehlenden Unterschiede des konditionierten Mediums primärer mPECs von End.LepR-WT und -KO Mäusen auf das Migrationsverhalten der glatten Muskelzellen (MOVAS) könnte durch die *in vitro* Beobachtung erklärt werden, dass ET-1 das Migrationsverhalten pulmonaler, aber nicht aortaler glatter Muskelzellen beeinflusst [212]. Diese *ex vivo* und *in vitro* Befunde konnten auch *in vivo* in unverletzten Carotisarterien sowie in vaskulären Läsionen bestätigt werden. So war die endotheliale Expression von ET-1 sowohl in unverletzten Carotisarterien als auch entlang des Lumens und innerhalb der Läsionen in den End.LepR-KO Mäusen im Vergleich zu den End.LepR-WT Kontrollen signifikant erhöht. Übergewicht resultierte in End.LepR-WT Mäusen in einem fast identischen Phänotyp wie er bei den End.LepR-KO Mäusen beobachtet werden konnte. In Übereinstimmung mit den bekannten Effekten von ET-1 auf die Endothelzell-Proliferation [213] war auch die CD31-Expression im Endothel der Neointima von End.LepR-KO und übergewichtigen Mäusen signifikant erhöht. Die Schlussfolgerung, dass die verstärkte Neointimabildung in Mäusen mit einer endothelialen LepR-Deletion das Ergebnis einer vermehrten ET-1-Freisetzung sein könnte, wird auch durch mehrere tierexperimentelle Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen unterstützt. So erhöhte die exogene Administration von ET-1 die Neointimabildung nach einer experimentellen Ballon-Angioplastie der *Arteria Carotis* in der Ratte um etwa 65% im Vergleich zu den mit einer 0,9%igen Natriumchlorid-Lösung injizierten Kontrolltieren [214], während die Antagonisierung des ET-Rezeptors die intimale Hyperplasie in experimentellen Gefäßverletzungs-Modellen reduzierte [215-217]. Darüber hinaus resultierte in einem murinen Carotis-Ligationsmodell die selektive Deletion von ET-1 in murinen Endothelzellen in einer reduzierten Neointimabildung, die mit einer verminderten Expression vaskulärer Adhäsionsmoleküle und reduzierten Proliferation vaskulärer glatter Muskelzellen einherging [218]. Auf der anderen Seite war die endotheliale ET-1-Überexpression mit einer vaskulären Hypertrophie und endothelialer Dysfunktion assoziiert [219] und verschlimmerte die HFD-induzierte Atherosklerose in Apolipoprotein E Knockout Mäusen [220]. Die immunhistologischen Untersuchungen humaner koronarer Arterien fanden eine erhöhte lokale ET-1-Expression innerhalb der atherosklerotischen Plaques [221, 222], und eine höhere ET-1 und ET-1 Rezeptor Expression wurde auch in humanen atherosklerotischen Läsionen beschrieben [223, 224]. Bezüglich der Lokalisation konnte gezeigt werden, dass unter anderem Endothelzellen entlang des Gefäßlumens ET-1-immunpositiv waren [221, 224, 225]. Auf der anderen Seite hatte, in Übereinstimmung mit den fehlenden Unterschieden

bezüglich der Media-Dicke zwischen den End.LepR-WT und -KO Mäusen, die selektive Deletion des ET_B-Rezeptors auf glatten Muskelzellen im Mausmodell keinen Einfluss auf die Neointimabildung nach Verletzung der *Arteria femoralis* [226]. In einer populationsbasierten Studie, in der die Plasma-ET-1-Spiegel von 2.160 gesunden Erwachsenen gemessen wurden, fand sich eine hoch signifikante Assoziation zwischen den zirkulierenden ET-1-Spiegeln und dem mit Hilfe des PROCAM (*Prospective Cardiovascular Münster*)- und *Framingham-Scores* ermittelten kardiovaskulären Risikos [227]. In Patienten mit Angina Pectoris, die nach einer perkutanen transluminalen Koronarangioplastie eine Restenose entwickelten, waren die ET-1-Spiegel im *Sinus coronarius* signifikant erhöht im Vergleich zu den Patienten ohne post-operative Restenose [228]. In einer weiteren klinischen Studie wiesen Patienten, die nach einem Carotis-*Stenting* eine Restenose entwickelten, innerhalb der ersten sechs Monate nach dem Eingriff persistierend höhere ET-1-Spiegel im Plasma auf als die Patienten ohne Restenose [229]. Interessanterweise wurde eine erhöhte ET-1 Expression nicht nur in den mPECs isoliert von End.LepR-KO, sondern auch in denen von übergewichtigen End.LepR-WT Mäusen beobachtet, was die Hypothese unterstützt, dass eine funktionelle Leptin-Resistenz und Überexpression von ET-1 zum vaskulären Phänotyp bei Übergewicht beiträgt. Vorhergehende Humanstudien fanden erhöhte ET-1 Spiegel im Plasma von übergewichtigen Probanden [230] sowie in übergewichtigen Probanden mit manifestiertem metabolischen Syndrom [231], während eine Gewichtsabnahme mit einer Reduktion der erhöhten ET-1-Plasmaspiegel assoziiert war [230, 232]. Die klinische Relevanz von ET-1 bestätigen auch kürzlich publizierte Ergebnisse der eigenen Arbeitsgruppe. So konnten im Serum von übergewichtigen Probanden (BMI $37.6 \pm 2.9 \text{ kg/m}^2$) im Vergleich zu den schlanken Kontrollen (BMI $21.3 \pm 0.6 \text{ kg/m}^2$) im Mittel signifikant höhere ET-1-Proteinspiegel nachgewiesen werden [233].

Obwohl ET-1 ein potenter Vasokonstriktor ist, konnten zwischen den End.LepR-WT und -KO Mäusen keine Unterschiede bezüglich des mittleren sowie des systolischen und diastolischen Blutdrucks beobachtet werden. In Übereinstimmung mit diesen Befunden konnten während einer 24 h-Blutdruckmessung in einem Mausmodell mit einer nur auf das Endothel beschränkten ET-1-Überexpression ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den WT und den ET-1-transgenen Mäusen aufgezeigt werden [219]. *In vitro* konnte auch unter basalen Bedingungen eine Polarität der Endothelzellen bezüglich der Freisetzung von ET-1 gezeigt werden, wonach das gebildete ET-1 vor allem auf der basolateralen Seite der Zelle sekretiert wurde [234], so dass ET-1 möglicherweise auch in der vorliegenden Arbeit *in vivo* vorrangig auf die glatten Muskelzellen gewirkt und folglich deren Proliferation gefördert hat. Diese Annahme unterstützend konnten im Serum sowohl der normalgewichtigen als auch der übergewichtigen End.LepR-WT und -KO Mäuse keine Unterschiede bezüglich der zirkulierenden ET-1-Spiegel gemessen werden.

Der beobachtete Phänotyp könnte auch durch eine reduzierte Freisetzung von Faktoren mit inhibierender Wirkung auf die Proliferation von glatten Muskelzellen erklärt werden. Beispielsweise ist aus *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen bekannt, dass Stickstoffmonoxid (NO) die glatte Muskelzell-Proliferation inhibiert [235-237]. Außerdem konnte in kultivierten Endothelzellen und *ex vivo* in Aortenringen von Ratten sowie *in vivo* in murinen Aorten gezeigt werden, dass Leptin die endotheliale NO-Synthase (eNOS) stimuliert [156, 238]. In der vorliegenden Untersuchung konnte dies jedoch ausgeschlossen werden, da die NO-Sekretion in den Zellkulturüberständen der mPECs sowohl von End.LepR-WT als auch -KO Mäusen unterhalb der Detektionsgrenze lagen. Darüber hinaus konnten auch immunhistologisch in unverletzten Carotisarterien keine Unterschiede bezüglich der eNOS-Expression detektiert werden. Andererseits war die mRNA-Expression des Leptin-Zielgens VEGF (*vascular endothelial growth factor*) passend zur reduzierten LepR-Signaltransduktion in den mPECs von End.LepR-KO Mäusen, jedoch nicht in den mPECs der übergewichtigen Mäuse, signifikant reduziert. Aus der Literatur ist bekannt, dass das VEGF die Proliferation und Migration von glatten Muskelzellen fördert [239, 240].

Eine reduzierte PPAR γ -Expression sowohl in Leptin-Rezeptor-defizienten als auch in übergewichtigen Leptin-resistenten mPECs stellt einen möglichen zugrunde liegenden Mechanismus der erhöhten Translokation des Transkriptionsfaktors AP-1 in den Nukleus und folglich erhöhten Expression und Sekretion von ET-1 dar.

Obwohl erhöhte ET-1-Spiegel mit einer veränderten vaskulären Reaktivität in Verbindung gebracht werden, wurde die Rolle einer vaskulären ET-1 Überexpression für das erhöhte Risiko einer Restenose bei Übergewicht bisher noch nicht genauer untersucht. Die Befunde der vorliegenden Arbeit sind auch konsistent mit dem Vorliegen einer endothelialen Dysfunktion. So wiesen die mPECs übergewichtiger Mäuse, aber auch die von End.LepR-KO Mäusen eine reduzierte mRNA-Expression von PPAR γ (*peroxisome proliferator-activated receptor γ*) auf. *In vitro* konnte gezeigt werden, dass die PPAR γ -Aktivierung (mittels Agonisten oder konstitutiver Aktivierung) die Expression endothelialer Adhäsionsmoleküle inhibiert [241, 242]. *In vivo* reduzierte die Behandlung mit einem PPAR γ -Agonisten nach einer Ballon-induzierten Gefäßverletzung der *Arteria Carotis* in der Ratte die Intima-Media-Ratio im Vergleich zu den Kontrolltieren. In Übereinstimmung mit diesem Befund wiesen die mit einem PPAR γ -Agonisten behandelten ApoE-defizienten Mäuse nach Fütterung einer Hochfettdiät dosisabhängig eine verminderte aortale Läsionsgröße auf [243]. Mechanistische Untersuchungen in kultivierten Endothelzellen zeigten, dass PPAR γ -Aktivatoren oder PPAR γ -Agonisten die Expression und Sekretion von ET-1 inhibieren, indem sie mit dem Transkriptionsfaktor AP-1 (Aktivator-Protein-1) interferieren und diesen somit negativ regulieren [174, 175, 242]. In der vorliegenden Arbeit weisen die Analysen von mPECs und

HUVECs darauf hin, dass die reduzierte endotheliale Expression von PPAR γ zu der erhöhten mRNA-Expression beigetragen haben könnte, die sowohl in den Leptin-Rezeptor-defizienten als auch Leptin-resistenten mPECs beobachtet werden konnte. Darüber hinaus zeigte die Analyse der Zellkulturüberstände von mPECs isoliert von End.LepR-KO Mäusen eine signifikant erhöhte Sekretion von ET-1 im Vergleich zu den mPECs aus End.LepR-WT Kontrollen.

In Abbildung 5-1 sind die aus der Analyse der Endothelzellen gewonnenen Befunde mit intakter (A) oder fehlender Leptin-Rezeptor-Signaltransduktion (B) sowie die möglichen zugrunde liegenden Mechanismen schematisch zusammengefasst.

5.5 Fazit und Limitation der Arbeit

Zusammenfassend weisen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit darauf hin, dass sich die im Mausmodell nach Gefäßverletzung bei Übergewicht und dem Vorliegen einer systemischen Hyperleptinämie beobachtete Neointima-Hyperplasie infolge einer endothelialen Leptin-Resistenz entwickelt haben könnte. Dabei wurde ET-1 als möglicher parakriner Mediator identifiziert, welcher zu den vaskulären Komplikationen einer vermehrten Proliferation und Neointima-Zellularität bei Übergewicht beigetragen haben könnte. Mechanistische Untersuchungen ergaben, dass eine verminderte Expression von PPAR γ , ein negativer Regulator des Transkriptionsfaktors AP-1, zur Überexpression von ET-1 sowohl in murinen Leptin-Rezeptor-defizienten als auch Leptin-resistenten Endothelzellen beigetragen haben könnte. Jedoch muss in weiteren Untersuchungen im Detail geklärt werden, über welche Mechanismen die (funktionelle) LepR-Defizienz in einer reduzierten mRNA-Expression von PPAR γ resultiert und inwiefern diese über direkte Effekte vermittelt werden oder eine Folge der beobachteten endothelialen Resistenz in diesen Zellen darstellen. Darüber hinaus sollte angemerkt werden, dass in der vorliegenden Arbeit eine gezielte Analyse ausgewählter, Leptin-regulierter endothelialer Mediatoren mit bekannter parakriner Wirkung auf glatte Muskelzellen durchgeführt wurde. Demnach kann eine Beteiligung weiterer, nicht untersuchter wichtiger Faktoren nicht ausgeschlossen werden. Außerdem handelt es sich bei dem verwendeten murinen chemischen Gefäßverletzungsmodell um eine experimentelle Situation, die nicht den gleichen Mechanismen physiologischer und pathophysiologischer Prozesse unterliegen. Zudem muss durch weitere Untersuchung geklärt werden, inwieweit der endotheliale Leptin-Rezeptor oder endotheliale Faktoren wie ET-1 mögliche therapeutische Angriffspunkte zur Kontrolle der Proliferation glatter Muskelzellen nach Gefäßverletzung darstellen und die kardiovaskulären Risiken bei Übergewicht reduzieren könnten. PPAR γ -Agonisten (so genannte Thiazolidinedione) sind bereits verfügbar und

werden klinisch zur Behandlung metabolischer Störungen bei Übergewicht eingesetzt. Dennoch ist die Übertragbarkeit der vorliegenden Befunde der tierexperimentellen *in vivo* und *ex vivo* Untersuchungen sowie der *in vitro* Analysen in murinen und humanen Zelllinien auf den Menschen noch offen und muss in weitergehenden Untersuchungen überprüft werden.

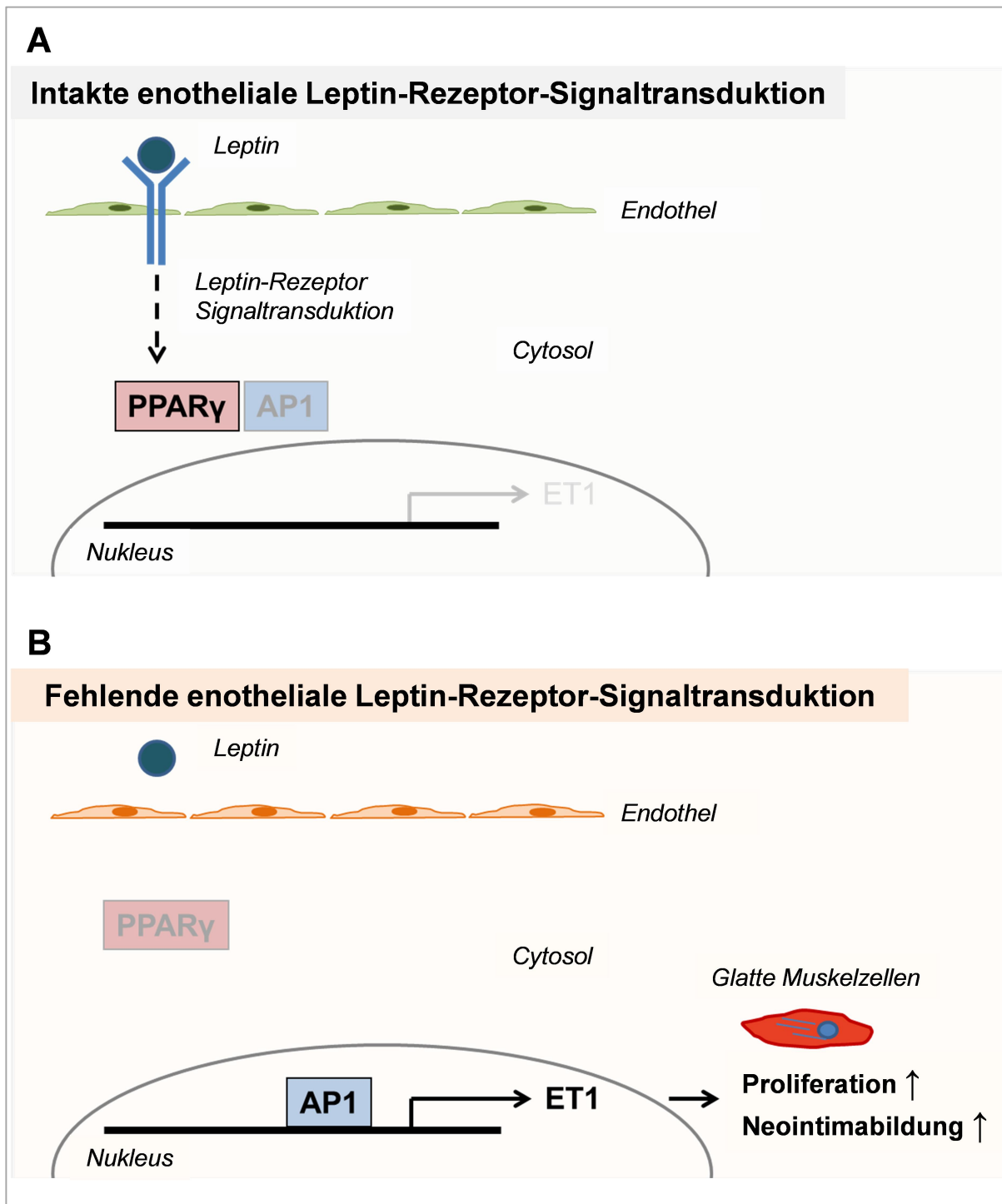


Abbildung 5-1: Schematische Darstellung der Befunde in Endothelzellen mit intakter und fehlender Leptin-Rezeptor-Signaltransduktion. Abkürzungen: AP-1, Aktivator-Protein-1; ET-1, Endothelin-1; PPAR γ , Peroxisome proliferator-activated receptor gamma.

6. Zusammenfassung

Übergewicht ist mit erhöhten zirkulierenden Spiegeln des Adipozytenhormons Leptin und einer hypothalamischen Leptin-Resistenz assoziiert. Klinische Studien identifizierten erhöhte Serum-Leptinspiegel als unabhängigen Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen. Leptin-Rezeptoren (LepR) werden auf Endothel- und glatten Muskelzellen exprimiert und experimentelle Befunde zeigen, dass Hyperleptinämie oder exogenes Leptin die Neointimabildung fördern. Ziel dieser Arbeit war es, die unterschiedliche Rolle der Endothel- und glatten Muskelzell-vermittelten LepR-Signaltransduktion auf die vaskuläre Wundheilung zu untersuchen und zu klären, inwieweit die Neointima-Hyperplasie bei Übergewicht aus der chronischen Hyperleptinämie und Aktivierung des Leptin-Signalwegs oder einer vaskulären Leptin-Resistenz resultiert.

Mäuse mit loxP-flankierten LepR-Allelen wurden mit Mäusen verpaart, die eine Ligandenaktivierbare Cre-Rekombinase unter Kontrolle des endothelialen Rezeptor-Tyrosinkinase (Tie2) oder glatte Muskelzell-Myosin-schwere Kette (SMMHC) Promotors exprimierten. Die Endothel (End.LepR)- oder glatte Muskelzell (SMC.LepR)-spezifische LepR-Genexzision erfolgte durch Gabe von Tamoxifen-Futter, Übergewicht wurde durch eine Hochfetttdiät induziert. Die Neointimabildung an der *Arteria Carotis* wurde nach Eisen(III)-chlorid-induzierter Gefäßverletzung untersucht. Die morphometrische Quantifizierung der Läsionen ergab eine signifikant erhöhte intimale Hyperplasie, neointimale Zellularität und Proliferation in End.LepR Knockout (KO) Mäusen. Ein ähnlicher vaskulärer Phänotyp wurde auch in übergewichtigen, hyperleptinämischen End.LepR Wildtyp (WT) Mäusen beobachtet. Dagegen ging der SMC.LepR-KO mit einer Media-Hyperplasie einher, hatte jedoch keinen Einfluss auf die Neointimabildung oder Lumenstenose. Die Analyse primärer pulmonaler Endothelzellen (mPECs) von End.LepR-KO und übergewichtigen End.LepR-WT Mäusen bestätigte die fehlende Leptin-induzierte Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors STAT3. Mittels quantitativer PCR und Immunfluoreszenz wurde eine signifikant erhöhte Expression von Endothelin-1 (ET-1) in Endothelzellen von LepR-defizienten und übergewichtigen, Leptin-resistenten Mäusen nachgewiesen. Mittels ELISA wurde eine erhöhte ET-1-Sekretion in Zellkulturüberständen von mPECs LepR-defizienter Mäuse bestätigt, während die ET_(A/B)-Rezeptor-Antagonisierung deren parakrine Effekte auf die Proliferation muriner glatter Muskelzellen signifikant abschwächte. Eine reduzierte Expression des Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptors- γ und vermehrte Translokation des Transkriptionsfaktors AP-1 in den Nukleus in mPECs von End.LepR-KO und übergewichtigen End.LepR-WT Mäusen wurde als möglicher Mechanismus identifiziert, wie die (funktionelle) LepR-Deletion zur ET-1-Überexpression beigetragen haben könnte.

Insgesamt heben die Ergebnisse die Bedeutung einer intakten endothelialen Leptin-Signaltransduktion bei der Limitierung der Neointimabildung hervor und weisen darauf hin, dass Übergewicht mit einer endothelialen Leptin-Resistenz einhergeht. ET-1 wurde als möglicher parakriner Mediator der vaskulären Komplikationen bei Übergewicht und potentieller therapeutischer Angriffspunkt zur Kontrolle der Proliferation glatter Muskelzellen nach Gefäßverletzung identifiziert.

Summary

Obesity is associated with elevated circulating levels of the adipocyte hormone leptin and hypothalamic leptin resistance. Clinical studies identified elevated serum leptin levels as an independent risk factor for cardiovascular disease. Leptin receptors (LepR) are expressed on endothelial and smooth muscle cells, and experimental studies have shown that hyperleptinemia or exogenous leptin promote neointima formation. The aim of this work was to distinguish the different roles of endothelial- and smooth muscle cell-mediated LepR signaling on vascular wound healing and to determine whether the neointima hyperplasia observed in obesity develops as a consequence of the chronic hyperleptinemia and activated leptin signaling or is the result of vascular leptin resistance.

Mice with loxP-flanked LepR alleles were mated with mice expression Cre recombinase under control of the inducible endothelial receptor tyrosine kinase (Tie2) promotor or smooth muscle myosin heavy chain (SMMHC) promotor. Endothelial (End.LepR) or smooth muscle cell (SMC.LepR)-specific LepR gene excision was induced by tamoxifen-containing chow, obesity was induced by feeding mice a high fat diet. Neointima formation at the carotid artery was examined after ferric chloride-induced vascular injury. Morphometric quantification of the lesions revealed significantly increased intimal hyperplasia, neointimal cellularity and proliferation in End.LepR knockout (KO) mice, and a similar vascular phenotype was also observed in obese, hyperleptinemic End.LepR wildtype (WT) mice. In contrast SMC.LepR-KO was associated with medial hyperplasia, but did not affect neointima size or lumen stenosis. Analysis of primary pulmonary endothelial cells (mPECs) from End.LepR-KO and obese End.LepR-WT mice confirmed abrogated leptin-induced phosphorylation of the transcription factor STAT3. Quantitative PCR and immunofluorescence analysis revealed significantly increased expression of endothelin-1 (ET-1) in endothelial cells from LepR-deficient and obese leptin-resistant mice. Elevated ET-1 secretion in medium conditioned with mPEC from LepR-deficient mice was confirmed using ELISA, whereas ET_(A/B) receptor antagonists significantly diminished their paracrine effects on murine smooth muscle cell proliferation. Reduced expression of peroxisome proliferator-activated receptor- γ and increased translocation of the transcription factor AP-1 into the nucleus in mPECs from End.LepR-KO and obese End.LepR-WT mice has been identified as a potential mechanism whereby (functional) LepR deletion may have contributed to ET-1 overexpression.

Overall, the results highlight the importance of intact endothelial leptin signaling in the limitation of neointima formation and suggest that obesity represents a state of endothelial leptin resistance. ET-1 has been identified as a potential paracrine mediator of vascular complications in obesity, which may represent a therapeutic target to control smooth muscle cell proliferation following vascular injury.

7. Literaturverzeichnis

1. Guh DP, Zhang W, Bansback N, Amarsi Z, Birmingham CL, Anis AH: **The incidence of comorbidities related to obesity and overweight: a systematic review and meta-analysis.** *BMC Public Health* 2009, **9**:88.
2. Ng M, Fleming T, Robinson M, Thomson B, Graetz N, Margono C, Mullany EC, Biryukov S, Abbafati C, Abera SF *et al*: **Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013.** *The Lancet* 2014, **384**(9945):766-781.
3. Alberti KG, Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ, Cleeman JI, Donato KA, Fruchart JC, James WP, Loria CM, Smith SC, Jr. *et al*: **Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity.** *Circulation* 2009, **120**(16):1640-1645.
4. Hubert HB, Feinleib M, McNamara PM, Castelli WP: **Obesity as an independent risk factor for cardiovascular disease: a 26-year follow-up of participants in the Framingham Heart Study.** *Circulation* 1983, **67**(5):968-977.
5. Jousilahti P, Tuomilehto J, Vartiainen E, Pekkanen J, Puska P: **Body weight, cardiovascular risk factors, and coronary mortality. 15-year follow-up of middle-aged men and women in eastern Finland.** *Circulation* 1996, **93**(7):1372-1379.
6. Kenchaiah S, Evans JC, Levy D, Wilson PW, Benjamin EJ, Larson MG, Kannel WB, Vasan RS: **Obesity and the risk of heart failure.** *N Engl J Med* 2002, **347**(5):305-313.
7. Manson JE, Colditz GA, Stampfer MJ, Willett WC, Rosner B, Monson RR, Speizer FE, Hennekens CH: **A prospective study of obesity and risk of coronary heart disease in women.** *N Engl J Med* 1990, **322**(13):882-889.
8. Rexrode KM, Hennekens CH, Willett WC, Colditz GA, Stampfer MJ, Rich-Edwards JW, Speizer FE, Manson JE: **A prospective study of body mass index, weight change, and risk of stroke in women.** *JAMA* 1997, **277**(19):1539-1545.
9. Gelber RP, Gaziano JM, Orav EJ, Manson JE, Buring JE, Kurth T: **Measures of obesity and cardiovascular risk among men and women.** *J Am Coll Cardiol* 2008, **52**(8):605-615.
10. Lakka TA, Lakka HM, Salonen R, Kaplan GA, Salonen JT: **Abdominal obesity is associated with accelerated progression of carotid atherosclerosis in men.** *Atherosclerosis* 2001, **154**(2):497-504.
11. Larsson B, Svardsudd K, Welin L, Wilhelmsen L, Bjorntorp P, Tibblin G: **Abdominal adipose tissue distribution, obesity, and risk of cardiovascular disease and death: 13 year follow up of participants in the study of men born in 1913.** *Br Med J (Clin Res Ed)* 1984, **288**(6428):1401-1404.
12. Rexrode KM, Carey VJ, Hennekens CH, Walters EE, Colditz GA, Stampfer MJ, Willett WC, Manson JE: **Abdominal adiposity and coronary heart disease in women.** *JAMA* 1998, **280**(21):1843-1848.
13. Zhang C, Rexrode KM, van Dam RM, Li TY, Hu FB: **Abdominal obesity and the risk of all-cause, cardiovascular, and cancer mortality: sixteen years of follow-up in US women.** *Circulation* 2008, **117**(13):1658-1667.
14. de Koning L, Merchant AT, Pogue J, Anand SS: **Waist circumference and waist-to-hip ratio as predictors of cardiovascular events: meta-regression analysis of prospective studies.** *Eur Heart J* 2007, **28**(7):850-856.
15. Kim SK, Kim HJ, Hur KY, Choi SH, Ahn CW, Lim SK, Kim KR, Lee HC, Huh KB, Cha BS: **Visceral fat thickness measured by ultrasonography can estimate not only visceral obesity but also risks of cardiovascular and metabolic diseases.** *Am J Clin Nutr* 2004, **79**(4):593-599.

16. Nakamura T, Tokunaga K, Shimomura I, Nishida M, Yoshida S, Kotani K, Islam AH, Keno Y, Kobatake T, Nagai Y *et al*: **Contribution of visceral fat accumulation to the development of coronary artery disease in non-obese men.** *Atherosclerosis* 1994, **107**(2):239-246.
17. Nicklas BJ, Penninx BW, Cesari M, Kritchevsky SB, Newman AB, Kanaya AM, Pahor M, Jingzhong D, Harris TB, Health A *et al*: **Association of visceral adipose tissue with incident myocardial infarction in older men and women: the Health, Aging and Body Composition Study.** *Am J Epidemiol* 2004, **160**(8):741-749.
18. Zamboni M, Armellini F, Sheiban I, De Marchi M, Todesco T, Bergamo-Andreis IA, Cominacini L, Bosello O: **Relation of body fat distribution in men and degree of coronary narrowings in coronary artery disease.** *Am J Cardiol* 1992, **70**(13):1135-1138.
19. Friedman JM, Halaas JL: **Leptin and the regulation of body weight in mammals.** *Nature* 1998, **395**(6704):763-770.
20. Considine RV, Sinha MK, Heiman ML, Kriauciunas A, Stephens TW, Nyce MR, Ohannesian JP, Marco CC, McKee LJ, Bauer TL *et al*: **Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans.** *N Engl J Med* 1996, **334**(5):292-295.
21. Maffei M, Halaas J, Ravussin E, Pratley RE, Lee GH, Zhang Y, Fei H, Kim S, Lallone R, Ranganathan S *et al*: **Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects.** *Nat Med* 1995, **1**(11):1155-1161.
22. Münzberg H, Myers MG, Jr.: **Molecular and anatomical determinants of central leptin resistance.** *Nat Neurosci* 2005, **8**(5):566-570.
23. Koh KK, Park SM, Quon MJ: **Leptin and cardiovascular disease: response to therapeutic interventions.** *Circulation* 2008, **117**(25):3238-3249.
24. Reilly MP, Iqbal N, Schutta M, Wolfe ML, Scally M, Localio AR, Rader DJ, Kimmel SE: **Plasma leptin levels are associated with coronary atherosclerosis in type 2 diabetes.** *J Clin Endocrinol Metab* 2004, **89**(8):3872-3878.
25. Sattar N, Wannamethee G, Sarwar N, Chernova J, Lawlor DA, Kelly A, Wallace AM, Danesh J, Whincup PH: **Leptin and coronary heart disease: prospective study and systematic review.** *J Am Coll Cardiol* 2009, **53**(2):167-175.
26. Söderberg S, Ahren B, Jansson JH, Johnson O, Hallmans G, Asplund K, Olsson T: **Leptin is associated with increased risk of myocardial infarction.** *J Intern Med* 1999, **246**(4):409-418.
27. Wallace AM, McMahon AD, Packard CJ, Kelly A, Shepherd J, Gaw A, Sattar N: **Plasma leptin and the risk of cardiovascular disease in the west of Scotland coronary prevention study (WOSCOPS).** *Circulation* 2001, **104**(25):3052-3056.
28. Wallerstedt SM, Eriksson AL, Niklason A, Ohlsson C, Hedner T: **Serum leptin and myocardial infarction in hypertension.** *Blood Press* 2004, **13**(4):243-246.
29. Söderberg S, Colquhoun D, Keech A, Yallop J, Barnes EH, Pollicino C, Simes J, Tonkin AM, Nestel P, Investigators LS: **Leptin, but not adiponectin, is a predictor of recurrent cardiovascular events in men: results from the LIPID study.** *Int J Obes (Lond)* 2009, **33**(1):123-130.
30. Wolk R, Berger P, Lennon RJ, Brilakis ES, Johnson BD, Somers VK: **Plasma leptin and prognosis in patients with established coronary atherosclerosis.** *J Am Coll Cardiol* 2004, **44**(9):1819-1824.
31. Qasim A, Mehta NN, Tadesse MG, Wolfe ML, Rhodes T, Girman C, Reilly MP: **Adipokines, insulin resistance, and coronary artery calcification.** *J Am Coll Cardiol* 2008, **52**(3):231-236.
32. Jamar G, Caranti DA, de Cassia Cesar H, Masquio DCL, Bandoni DH, Pisani LP: **Leptin as a cardiovascular risk marker in metabolically healthy obese: Hyperleptinemia in metabolically healthy obese.** *Appetite* 2017, **108**:477-482.
33. Chatterjee TK, Stoll LL, Denning GM, Harrelson A, Blomkalns AL, Idelman G, Rothenberg FG, Neltner B, Romig-Martin SA, Dickson EW *et al*: **Proinflammatory phenotype of perivascular adipocytes: influence of high-fat feeding.** *Circ Res* 2009, **104**(4):541-549.

34. Cheng KH, Chu CS, Lee KT, Lin TH, Hsieh CC, Chiu CC, Voon WC, Sheu SH, Lai WT: **Adipocytokines and proinflammatory mediators from abdominal and epicardial adipose tissue in patients with coronary artery disease.** *Int J Obes (Lond)* 2008, **32**(2):268-274.
35. Hummel KP, Dickie MM, Coleman DL: **Diabetes, a new mutation in the mouse.** *Science* 1966, **153**(3740):1127-1128.
36. Ingalls AM, Dickie MM, Snell GD: **Obese, a new mutation in the house mouse.** *J Hered* 1950, **41**(12):317-318.
37. Campfield LA, Smith FJ, Burn P: **The OB protein (leptin) pathway--a link between adipose tissue mass and central neural networks.** *Horm Metab Res* 1996, **28**(12):619-632.
38. Coleman DL: **Effects of parabiosis of obese with diabetes and normal mice.** *Diabetologia* 1973, **9**(4):294-298.
39. Coleman DL: **Obese and diabetes: two mutant genes causing diabetes-obesity syndromes in mice.** *Diabetologia* 1978, **14**(3):141-148.
40. Coleman DL: **A historical perspective on leptin.** *Nat Med* 2010, **16**(10):1097-1099.
41. Green ED, Maffei M, Braden VV, Proenca R, DeSilva U, Zhang Y, Chua SC, Jr., Leibel RL, Weissenbach J, Friedman JM: **The human obese (OB) gene: RNA expression pattern and mapping on the physical, cytogenetic, and genetic maps of chromosome 7.** *Genome Res* 1995, **5**(1):5-12.
42. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM: **Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue.** *Nature* 1994, **372**(6505):425-432.
43. Kline AD, Becker GW, Churgay LM, Landen BE, Martin DK, Muth WL, Rathnachalam R, Richardson JM, Schonert B, Ulmer M *et al*: **Leptin is a four-helix bundle: secondary structure by NMR.** *FEBS Letters* 1997, **407**(2):239-242.
44. Maffei M, Fei H, Lee GH, Dani C, Leroy P, Zhang Y, Proenca R, Negrel R, Ailhaud G, Friedman JM: **Increased expression in adipocytes of ob RNA in mice with lesions of the hypothalamus and with mutations at the db locus.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995, **92**(15):6957-6960.
45. Halaas JL, Gajiwala KS, Maffei M, Cohen SL, Chait BT, Rabinowitz D, Lallone RL, Burley SK, Friedman JM: **Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene.** *Science* 1995, **269**(5223):543-546.
46. Banks WA, Kastin AJ, Huang W, Jaspan JB, Maness LM: **Leptin enters the brain by a saturable system independent of insulin.** *Peptides* 1996, **17**(2):305-311.
47. Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, Deng N, Culpepper J, Devos R, Richards GJ, Campfield LA, Clark FT, Deeds J *et al*: **Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R.** *Cell* 1995, **83**(7):1263-1271.
48. Burguera B, Couce ME, Long J, Lamsam J, Laakso K, Jensen MD, Parisi JE, Lloyd RV: **The long form of the leptin receptor (OB-Rb) is widely expressed in the human brain.** *Neuroendocrinology* 2000, **71**(3):187-195.
49. Hakansson ML, Brown H, Ghilardi N, Skoda RC, Meister B: **Leptin receptor immunoreactivity in chemically defined target neurons of the hypothalamus.** *J Neurosci* 1998, **18**(1):559-572.
50. Schwartz MW, Morton GJ: **Obesity: keeping hunger at bay.** *Nature* 2002, **418**(6898):595-597.
51. Vadacca M, Margiotta DP, Navarini L, Afeltra A: **Leptin in immuno-rheumatological diseases.** *Cell Mol Immunol* 2011, **8**(3):203-212.
52. Pellemounter MA, Cullen MJ, Baker MB, Hecht R, Winters D, Boone T, Collins F: **Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice.** *Science* 1995, **269**(5223):540-543.
53. Campfield LA, Smith FJ, Guisez Y, Devos R, Burn P: **Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks.** *Science* 1995, **269**(5223):546-549.

54. Halaas JL, Boozer C, Blair-West J, Fidathusein N, Denton DA, Friedman JM: **Physiological response to long-term peripheral and central leptin infusion in lean and obese mice.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997, **94**(16):8878-8883.
55. Stephens TW, Basinski M, Bristow PK, Bue-Valleskey JM, Burgett SG, Craft L, Hale J, Hoffmann J, Hsiung HM, Kriauciunas A *et al*: **The role of neuropeptide Y in the antiobesity action of the obese gene product.** *Nature* 1995, **377**(6549):530-532.
56. Chen H, Charlat O, Tartaglia LA, Woolf EA, Weng X, Ellis SJ, Lakey ND, Culpepper J, Moore KJ, Breitbart RE *et al*: **Evidence that the diabetes gene encodes the leptin receptor: identification of a mutation in the leptin receptor gene in db/db mice.** *Cell* 1996, **84**(3):491-495.
57. Chua SC, Jr., Chung WK, Wu-Peng XS, Zhang Y, Liu SM, Tartaglia L, Leibel RL: **Phenotypes of mouse diabetes and rat fatty due to mutations in the OB (leptin) receptor.** *Science* 1996, **271**(5251):994-996.
58. Lee GH, Proenca R, Montez JM, Carroll KM, Darvishzadeh JG, Lee JI, Friedman JM: **Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice.** *Nature* 1996, **379**(6566):632-635.
59. Cohen P, Zhao C, Cai X, Montez JM, Rohani SC, Feinstein P, Mombaerts P, Friedman JM: **Selective deletion of leptin receptor in neurons leads to obesity.** *Journal of Clinical Investigation* 2001, **108**(8):1113-1121.
60. Muoio DM, Lynis Dohm G: **Peripheral metabolic actions of leptin.** *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2002, **16**(4):653-666.
61. Myers MG, Cowley MA, Munzberg H: **Mechanisms of leptin action and leptin resistance.** *Annu Rev Physiol* 2008, **70**:537-556.
62. Kamikubo Y, Dellas C, Loskutoff DJ, Quigley JP, Ruggeri ZM: **Contribution of leptin receptor N-linked glycans to leptin binding.** *Biochem J* 2008, **410**(3):595-604.
63. Mancour LV, Daghestani HN, Dutta S, Westfield GH, Schilling J, Oleskie AN, Herbstman JF, Chou SZ, Skiniotis G: **Ligand-induced architecture of the leptin receptor signaling complex.** *Mol Cell* 2012, **48**(4):655-661.
64. Wang MY, Zhou YT, Newgard CB, Unger RH: **A novel leptin receptor isoform in rat.** *FEBS Lett* 1996, **392**(2):87-90.
65. Fei H, Okano HJ, Li C, Lee GH, Zhao C, Darnell R, Friedman JM: **Anatomic localization of alternatively spliced leptin receptors (Ob-R) in mouse brain and other tissues.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997, **94**(13):7001-7005.
66. Hoggard N, Mercer JG, Rayner DV, Moar K, Trayhurn P, Williams LM: **Localization of leptin receptor mRNA splice variants in murine peripheral tissues by RT-PCR and in situ hybridization.** *Biochem Biophys Res Commun* 1997, **232**(2):383-387.
67. Li Z, Ceccarini G, Eisenstein M, Tan K, Friedman JM: **Phenotypic effects of an induced mutation of the ObRa isoform of the leptin receptor.** *Mol Metab* 2013, **2**(4):364-375.
68. Tartaglia LA: **The leptin receptor.** *J Biol Chem* 1997, **272**(10):6093-6096.
69. Frühbeck G: **Intracellular signalling pathways activated by leptin.** *Biochem J* 2006, **393**(Pt 1):7-20.
70. Gorska E, Popko K, Stelmaszczyk-Emmel A, Ciepiela O, Kucharska A, Wasik M: **Leptin receptors.** *Eur J Med Res* 2010, **15 Suppl 2**:50-54.
71. Münzberg H, Morrison CD: **Structure, production and signaling of leptin.** *Metabolism* 2015, **64**(1):13-23.
72. Hileman SM, Pierroz DD, Masuzaki H, Bjorbaek C, El-Haschimi K, Banks WA, Flier JS: **Characterization of short isoforms of the leptin receptor in rat cerebral microvessels and of brain uptake of leptin in mouse models of obesity.** *Endocrinology* 2002, **143**(3):775-783.
73. Hileman SM, Tornoe J, Flier JS, Bjorbaek C: **Transcellular transport of leptin by the short leptin receptor isoform ObRa in Madin-Darby Canine Kidney cells.** *Endocrinology* 2000, **141**(6):1955-1961.

74. Kastin AJ, Pan W, Maness LM, Koletsky RJ, Ernsberger P: **Decreased transport of leptin across the blood-brain barrier in rats lacking the short form of the leptin receptor.** *Peptides* 1999, **20**(12):1449-1453.
75. Dam J, Jockers R: **Hunting for the functions of short leptin receptor isoforms.** *Mol Metab* 2013, **2**(4):327-328.
76. Ge H, Huang L, Pourbahrami T, Li C: **Generation of soluble leptin receptor by ectodomain shedding of membrane-spanning receptors in vitro and in vivo.** *J Biol Chem* 2002, **277**(48):45898-45903.
77. Maamra M, Bidlingmaier M, Postel-Vinay MC, Wu Z, Strasburger CJ, Ross RJ: **Generation of human soluble leptin receptor by proteolytic cleavage of membrane-anchored receptors.** *Endocrinology* 2001, **142**(10):4389-4393.
78. Lammert A, Kiess W, Bottner A, Glasow A, Kratzsch J: **Soluble leptin receptor represents the main leptin binding activity in human blood.** *Biochem Biophys Res Commun* 2001, **283**(4):982-988.
79. Tu H, Kastin AJ, Hsueh H, Pan W: **Soluble receptor inhibits leptin transport.** *J Cell Physiol* 2008, **214**(2):301-305.
80. Chan JL, Blüher S, Yiannakouris N, Suchard MA, Kratzsch J, Mantzoros CS: **Regulation of circulating soluble leptin receptor levels by gender, adiposity, sex steroids, and leptin: observational and interventional studies in humans.** *Diabetes* 2002, **51**(7):2105-2112.
81. Walduck AK, Becher D: **Leptin, CD4(+) T(reg) and the prospects for vaccination against H. pylori infection.** *Front Immunol* 2012, **3**:316.
82. Anubhuti, Arora S: **Leptin and its metabolic interactions: an update.** *Diabetes Obes Metab* 2008, **10**(11):973-993.
83. Garofalo C, Surmacz E: **Leptin and cancer.** *J Cell Physiol* 2006, **207**(1):12-22.
84. Kaszubska W, Falls HD, Schaefer VG, Haasch D, Frost L, Hessler P, Kroeger PE, White DW, Jirousek MR, Trevillyan JM: **Protein tyrosine phosphatase 1B negatively regulates leptin signaling in a hypothalamic cell line.** *Mol Cell Endocrinol* 2002, **195**(1-2):109-118.
85. Myers MP, Andersen JN, Cheng A, Tremblay ML, Horvath CM, Parisien JP, Salmeen A, Barford D, Tonks NK: **TYK2 and JAK2 are substrates of protein-tyrosine phosphatase 1B.** *J Biol Chem* 2001, **276**(51):47771-47774.
86. Zabolotny JM, Bence-Hanulec KK, Stricker-Krongrad A, Haj F, Wang Y, Minokoshi Y, Kim YB, Elmquist JK, Tartaglia LA, Kahn BB *et al*: **PTP1B regulates leptin signal transduction in vivo.** *Dev Cell* 2002, **2**(4):489-495.
87. Li Z, Zhou Y, Carter-Su C, Myers MG, Jr., Rui L: **SH2B1 enhances leptin signaling by both Janus kinase 2 Tyr813 phosphorylation-dependent and -independent mechanisms.** *Mol Endocrinol* 2007, **21**(9):2270-2281.
88. Ren D, Li M, Duan C, Rui L: **Identification of SH2-B as a key regulator of leptin sensitivity, energy balance, and body weight in mice.** *Cell Metab* 2005, **2**(2):95-104.
89. Ren D, Zhou Y, Morris D, Li M, Li Z, Rui L: **Neuronal SH2B1 is essential for controlling energy and glucose homeostasis.** *J Clin Invest* 2007, **117**(2):397-406.
90. Baumann H, Morella KK, White DW, Dembski M, Bailon PS, Kim H, Lai CF, Tartaglia LA: **The full-length leptin receptor has signaling capabilities of interleukin 6-type cytokine receptors.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996, **93**(16):8374-8378.
91. Bjorbaek C, Uotani S, da Silva B, Flier JS: **Divergent signaling capacities of the long and short isoforms of the leptin receptor.** *J Biol Chem* 1997, **272**(51):32686-32695.
92. Ghilardi N, Ziegler S, Wiestner A, Stoffel R, Heim MH, Skoda RC: **Defective STAT signaling by the leptin receptor in diabetic mice.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996, **93**(13):6231-6235.
93. Murakami T, Yamashita T, Iida M, Kuwajima M, Shima K: **A short form of leptin receptor performs signal transduction.** *Biochem Biophys Res Commun* 1997, **231**(1):26-29.

94. Frederich RC, Hamann A, Anderson S, Lollmann B, Lowell BB, Flier JS: **Leptin levels reflect body lipid content in mice: evidence for diet-induced resistance to leptin action.** *Nat Med* 1995, **1**(12):1311-1314.
95. Lin S, Thomas TC, Storlien LH, Huang XF: **Development of high fat diet-induced obesity and leptin resistance in C57Bl/6J mice.** *Int J Obes Relat Metab Disord* 2000, **24**(5):639-646.
96. Schäfer K, Halle M, Goeschen C, Dellas C, Pynn M, Loskutoff DJ, Konstantinides S: **Leptin promotes vascular remodeling and neointimal growth in mice.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004, **24**(1):112-117.
97. Montague CT, Farooqi IS, Whitehead JP, Soos MA, Rau H, Wareham NJ, Sewter CP, Digby JE, Mohammed SN, Hurst JA *et al*: **Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans.** *Nature* 1997, **387**(6636):903-908.
98. Scholz GH, Englaro P, Thiele I, Scholz M, Klusmann T, Kellner K, Rascher W, Blum WF: **Dissociation of serum leptin concentration and body fat content during long term dietary intervention in obese individuals.** *Horm Metab Res* 1996, **28**(12):718-723.
99. Hamilton BS, Paglia D, Kwan AY, Deitel M: **Increased obese mRNA expression in omental fat cells from massively obese humans.** *Nat Med* 1995, **1**(9):953-956.
100. Lönnqvist F, Arner P, Nordfors L, Schalling M: **Overexpression of the obese (ob) gene in adipose tissue of human obese subjects.** *Nat Med* 1995, **1**(9):950-953.
101. Caro JF, Kolaczynski JW, Nyce MR, Ohannesian JP, Opentanova I, Goldman WH, Lynn RB, Zhang P-L, Sinha MK, Considine RV: **Decreased cerebrospinal-fluid/serum leptin ratio in obesity: a possible mechanism for leptin resistance.** *The Lancet* 1996, **348**(9021):159-161.
102. El-Haschimi K, Pierroz DD, Hileman SM, Bjorbaek C, Flier JS: **Two defects contribute to hypothalamic leptin resistance in mice with diet-induced obesity.** *J Clin Invest* 2000, **105**(12):1827-1832.
103. Schwartz MW, Peskind E, Raskind M, Boyko EJ, Porte D, Jr.: **Cerebrospinal fluid leptin levels: relationship to plasma levels and to adiposity in humans.** *Nat Med* 1996, **2**(5):589-593.
104. Hoffer U, Hobbie K, Wilson R, Bai R, Rahman A, Malarkey D, Travlos G, Ghanayem BI: **Diet-induced obesity is associated with hyperleptinemia, hyperinsulinemia, hepatic steatosis, and glomerulopathy in C57Bl/6J mice.** *Endocrine* 2009, **36**(2):311-325.
105. Lin S, Storlien LH, Huang XF: **Leptin receptor, NPY, POMC mRNA expression in the diet-induced obese mouse brain.** *Brain Res* 2000, **875**(1-2):89-95.
106. Martin RL, Perez E, He YJ, Dawson R, Jr., Millard WJ: **Leptin resistance is associated with hypothalamic leptin receptor mRNA and protein downregulation.** *Metabolism* 2000, **49**(11):1479-1484.
107. Bjorbaek C, Elmquist JK, Frantz JD, Shoelson SE, Flier JS: **Identification of SOCS-3 as a potential mediator of central leptin resistance.** *Mol Cell* 1998, **1**(4):619-625.
108. Enriori PJ, Evans AE, Sinnayah P, Jobst EE, Tonelli-Lemos L, Billes SK, Glavas MM, Grayson BE, Perello M, Nillni EA *et al*: **Diet-induced obesity causes severe but reversible leptin resistance in arcuate melanocortin neurons.** *Cell Metab* 2007, **5**(3):181-194.
109. Münzberg H, Flier JS, Bjorbaek C: **Region-specific leptin resistance within the hypothalamus of diet-induced obese mice.** *Endocrinology* 2004, **145**(11):4880-4889.
110. Howard JK, Cave BJ, Oksanen LJ, Tzamei I, Bjorbaek C, Flier JS: **Enhanced leptin sensitivity and attenuation of diet-induced obesity in mice with haploinsufficiency of Socs3.** *Nat Med* 2004, **10**(7):734-738.
111. Kievit P, Howard JK, Badman MK, Balthasar N, Coppari R, Mori H, Lee CE, Elmquist JK, Yoshimura A, Flier JS: **Enhanced leptin sensitivity and improved glucose homeostasis in mice lacking suppressor of cytokine signaling-3 in POMC-expressing cells.** *Cell Metab* 2006, **4**(2):123-132.
112. Mori H, Hanada R, Hanada T, Aki D, Mashima R, Nishinakamura H, Torisu T, Chien KR, Yasukawa H, Yoshimura A: **Socs3 deficiency in the brain elevates leptin sensitivity and confers resistance to diet-induced obesity.** *Nat Med* 2004, **10**(7):739-743.

113. Morrison CD, White CL, Wang Z, Lee SY, Lawrence DS, Cefalu WT, Zhang ZY, Gettys TW: **Increased hypothalamic protein tyrosine phosphatase 1B contributes to leptin resistance with age.** *Endocrinology* 2007, **148**(1):433-440.
114. White CL, Whittington A, Barnes MJ, Wang Z, Bray GA, Morrison CD: **HF diets increase hypothalamic PTP1B and induce leptin resistance through both leptin-dependent and -independent mechanisms.** *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2009, **296**(2):E291-299.
115. Bence KK, Delibegovic M, Xue B, Gorgun CZ, Hotamisligil GS, Neel BG, Kahn BB: **Neuronal PTP1B regulates body weight, adiposity and leptin action.** *Nat Med* 2006, **12**(8):917-924.
116. Cheng A, Uetani N, Simoncic PD, Chaubey VP, Lee-Loy A, McGlade CJ, Kennedy BP, Tremblay ML: **Attenuation of leptin action and regulation of obesity by protein tyrosine phosphatase 1B.** *Dev Cell* 2002, **2**(4):497-503.
117. Leon-Cabrera S, Solis-Lozano L, Suarez-Alvarez K, Gonzalez-Chavez A, Bejar YL, Robles-Diaz G, Escobedo G: **Hyperleptinemia is associated with parameters of low-grade systemic inflammation and metabolic dysfunction in obese human beings.** *Front Integr Neurosci* 2013, **7**:62.
118. Hosoi T, Sasaki M, Miyahara T, Hashimoto C, Matsuo S, Yoshii M, Ozawa K: **Endoplasmic reticulum stress induces leptin resistance.** *Mol Pharmacol* 2008, **74**(6):1610-1619.
119. Ozcan L, Ergin AS, Lu A, Chung J, Sarkar S, Nie D, Myers MG, Jr., Ozcan U: **Endoplasmic reticulum stress plays a central role in development of leptin resistance.** *Cell Metab* 2009, **9**(1):35-51.
120. Schneeberger M, Dietrich MO, Sebastian D, Imbernon M, Castano C, Garcia A, Esteban Y, Gonzalez-Franquesa A, Rodriguez IC, Bortolozzi A et al: **Mitofusin 2 in POMC neurons connects ER stress with leptin resistance and energy imbalance.** *Cell* 2013, **155**(1):172-187.
121. Won JC, Jang PG, Namkoong C, Koh EH, Kim SK, Park JY, Lee KU, Kim MS: **Central administration of an endoplasmic reticulum stress inducer inhibits the anorexigenic effects of leptin and insulin.** *Obesity (Silver Spring)* 2009, **17**(10):1861-1865.
122. Rahmouni K, Fath MA, Seo S, Thedens DR, Berry CJ, Weiss R, Nishimura DY, Sheffield VC: **Leptin resistance contributes to obesity and hypertension in mouse models of Bardet-Biedl syndrome.** *J Clin Invest* 2008, **118**(4):1458-1467.
123. Seo S, Guo DF, Bugge K, Morgan DA, Rahmouni K, Sheffield VC: **Requirement of Bardet-Biedl syndrome proteins for leptin receptor signaling.** *Hum Mol Genet* 2009, **18**(7):1323-1331.
124. Morris DL, Rui L: **Recent advances in understanding leptin signaling and leptin resistance.** *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2009, **297**(6):E1247-1259.
125. Sainz N, Gonzalez-Navarro CJ, Martinez JA, Moreno-Aliaga MJ: **Leptin signaling as a therapeutic target of obesity.** *Expert Opin Ther Targets* 2015, **19**(7):893-909.
126. Santoro A, Mattace Raso G, Meli R: **Drug targeting of leptin resistance.** *Life Sci* 2015, **140**:64-74.
127. Blann AD: **How a damaged blood vessel wall contributes to thrombosis and hypertension.** *Pathophysiol Haemost Thromb* 2003, **33**(5-6):445-448.
128. Libby P: **Inflammation in atherosclerosis.** *Nature* 2002, **420**(6917):868-874.
129. Robinson ST, Taylor WR: **Beyond the adventitia: exploring the outer limits of the blood vessel wall.** *Circ Res* 2009, **104**(4):416-418.
130. Ross R, Glomset J, Harker L: **Response to injury and atherogenesis.** *Am J Pathol* 1977, **86**(3):675-684.
131. Brown RA, Shantsila E, Varma C, Lip GY: **Current Understanding of Atherogenesis.** *Am J Med* 2017, **130**(3):268-282.
132. Ross R: **Atherosclerosis--an inflammatory disease.** *N Engl J Med* 1999, **340**(2):115-126.
133. Rana JS, Mittleman MA, Ho KK, Cutlip DE: **Obesity and clinical restenosis after coronary stent placement.** *Am Heart J* 2005, **150**(4):821-826.

134. Pourdjabbar A, Hibbert B, Simard T, Ma X, ER OB: **Pathogenesis of neointima formation following vascular injury**. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets* 2011, **11**(1):30-39.
135. De Meyer GR, Bult H: **Mechanisms of neointima formation--lessons from experimental models**. *Vasc Med* 1997, **2**(3):179-189.
136. Bodary PF, Shen Y, Ohman M, Bahrou KL, Vargas FB, Cudney SS, Wickenheiser KJ, Myers MG, Jr., Eitzman DT: **Leptin regulates neointima formation after arterial injury through mechanisms independent of blood pressure and the leptin receptor/STAT3 signaling pathways involved in energy balance**. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007, **27**(1):70-76.
137. Konstantinides S, Schafer K, Thinnis T, Loskutoff DJ: **Plasminogen activator inhibitor-1 and its cofactor vitronectin stabilize arterial thrombi after vascular injury in mice**. *Circulation* 2001, **103**(4):576-583.
138. Stephenson K, Tunstead J, Tsai A, Gordon R, Henderson S, Dansky HM: **Neointimal formation after endovascular arterial injury is markedly attenuated in db/db mice**. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003, **23**(11):2027-2033.
139. Wright MB, Seifert RA, Bowen-Pope DF: **Protein-tyrosine phosphatases in the vessel wall: differential expression after acute arterial injury**. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000, **20**(5):1189-1198.
140. Lau DC, Dhillon B, Yan H, Szmitko PE, Verma S: **Adipokines: molecular links between obesity and atherosclerosis**. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005, **288**(5):H2031-2041.
141. Schäfer K, Konstantinides SV: **Update on the cardiovascular risk in obesity: endocrine and paracrine role of the adipose tissue**. *Hellenic J Cardiol* 2011, **52**(4):327-336.
142. Drosos I, Chalikias G, Pavlaki M, Kareli D, Epitropou G, Bougioukas G, Mikroulis D, Konstantinou F, Giatromanolaki A, Ritis K *et al*: **Differences between perivascular adipose tissue surrounding the heart and the internal mammary artery: possible role for the leptin-inflammation-fibrosis-hypoxia axis**. *Clin Res Cardiol* 2016, **105**(11):887-900.
143. Schroeter MR, Eschholz N, Herzberg S, Jerchel I, Leifheit-Nestler M, Czepluch FS, Chalikias G, Konstantinides S, Schafer K: **Leptin-dependent and leptin-independent paracrine effects of perivascular adipose tissue on neointima formation**. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2013, **33**(5):980-987.
144. Schroeter MR, Schneiderman J, Schumann B, Gluckermann R, Grimmas P, Buchwald AB, Tirilomis T, Schondube FA, Konstantinides SV, Schafer K: **Expression of the leptin receptor in different types of vascular lesions**. *Histochem Cell Biol* 2007, **128**(4):323-333.
145. Li L, Mamputu JC, Wiernsperger N, Renier G: **Signaling pathways involved in human vascular smooth muscle cell proliferation and matrix metalloproteinase-2 expression induced by leptin: inhibitory effect of metformin**. *Diabetes* 2005, **54**(7):2227-2234.
146. Oda A, Taniguchi T, Yokoyama M: **Leptin stimulates rat aortic smooth muscle cell proliferation and migration**. *Kobe J Med Sci* 2001, **47**(3):141-150.
147. Schroeter MR, Leifheit-Nestler M, Hubert A, Schumann B, Gluckermann R, Eschholz N, Kruger N, Lutz S, Hasenfuss G, Konstantinides S *et al*: **Leptin promotes neointima formation and smooth muscle cell proliferation via NADPH oxidase activation and signalling in caveolin-rich microdomains**. *Cardiovasc Res* 2013, **99**(3):555-565.
148. Bouloumié A, Marumo T, Lafontan M, Busse R: **Leptin induces oxidative stress in human endothelial cells**. *FASEB J* 1999, **13**(10):1231-1238.
149. Yamagishi SI, Edelstein D, Du XL, Kaneda Y, Guzman M, Brownlee M: **Leptin induces mitochondrial superoxide production and monocyte chemoattractant protein-1 expression in aortic endothelial cells by increasing fatty acid oxidation via protein kinase A**. *J Biol Chem* 2001, **276**(27):25096-25100.
150. Shamsuzzaman AS, Winnicki M, Wolk R, Svatikova A, Phillips BG, Davison DE, Berger PB, Somers VK: **Independent association between plasma leptin and C-reactive protein in healthy humans**. *Circulation* 2004, **109**(18):2181-2185.
151. Bouloumié A, Drexler HC, Lafontan M, Busse R: **Leptin, the product of Ob gene, promotes angiogenesis**. *Circ Res* 1998, **83**(10):1059-1066.

152. Heida NM, Leifheit-Nestler M, Schroeter MR, Muller JP, Cheng IF, Henkel S, Limbourg A, Limbourg FP, Alves F, Quigley JP *et al*: **Leptin enhances the potency of circulating angiogenic cells via src kinase and integrin (alpha)vbeta5: implications for angiogenesis in human obesity**. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010, **30**(2):200-206.
153. Sierra-Honigmann MR, Nath AK, Murakami C, Garcia-Cardena G, Papapetropoulos A, Sessa WC, Madge LA, Schechner JS, Schwabb MB, Polverini PJ *et al*: **Biological action of leptin as an angiogenic factor**. *Science* 1998, **281**(5383):1683-1686.
154. Schroeter MR, Leifheit M, Sudholt P, Heida NM, Dellas C, Rohm I, Alves F, Zientkowska M, Rafail S, Puls M *et al*: **Leptin enhances the recruitment of endothelial progenitor cells into neointimal lesions after vascular injury by promoting integrin-mediated adhesion**. *Circ Res* 2008, **103**(5):536-544.
155. Heida NM, Muller JP, Cheng IF, Leifheit-Nestler M, Faustin V, Riggert J, Hasenfuss G, Konstantinides S, Schafer K: **Effects of obesity and weight loss on the functional properties of early outgrowth endothelial progenitor cells**. *J Am Coll Cardiol* 2010, **55**(4):357-367.
156. Vecchione C, Maffei A, Colella S, Aretini A, Poulet R, Frati G, Gentile MT, Fratta L, Trimarco V, Trimarco B *et al*: **Leptin effect on endothelial nitric oxide is mediated through Akt-endothelial nitric oxide synthase phosphorylation pathway**. *Diabetes* 2002, **51**(1):168-173.
157. Korda M, Kubant R, Patton S, Malinski T: **Leptin-induced endothelial dysfunction in obesity**. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008, **295**(4):H1514-1521.
158. Quehenberger P, Exner M, Sunder-Plassmann R, Ruzicka K, Bieglmayer C, Endler G, Muellner C, Speiser W, Wagner O: **Leptin Induces Endothelin-1 in Endothelial Cells In Vitro**. *Circulation Research* 2002, **90**(6):711-718.
159. Schinzari F, Tesauro M, Rovella V, Di Daniele N, Mores N, Veneziani A, Cardillo C: **Leptin stimulates both endothelin-1 and nitric oxide activity in lean subjects but not in patients with obesity-related metabolic syndrome**. *J Clin Endocrinol Metab* 2013, **98**(3):1235-1241.
160. Bodary PF, Gu S, Shen Y, Hasty AH, Buckler JM, Eitzman DT: **Recombinant leptin promotes atherosclerosis and thrombosis in apolipoprotein E-deficient mice**. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005, **25**(8):e119-122.
161. Schneiderman J, Simon AJ, Schroeter MR, Flugelman MY, Konstantinides S, Schaefer K: **Leptin receptor is elevated in carotid plaques from neurologically symptomatic patients and positively correlated with augmented macrophage density**. *J Vasc Surg* 2008, **48**(5):1146-1155.
162. Schneiderman J, Schaefer K, Kolodgie FD, Savion N, Kotev-Emeth S, Dardik R, Simon AJ, Halak M, Pariente C, Engelberg I *et al*: **Leptin locally synthesized in carotid atherosclerotic plaques could be associated with lesion instability and cerebral emboli**. *J Am Heart Assoc* 2012, **1**(5):e001727.
163. Metzger D, Chambon P: **Site- and time-specific gene targeting in the mouse**. *Methods* 2001, **24**(1):71-80.
164. Forde A, Constien R, Grone HJ, Hammerling G, Arnold B: **Temporal Cre-mediated recombination exclusively in endothelial cells using Tie2 regulatory elements**. *Genesis* 2002, **33**(4):191-197.
165. Wirth A, Benyo Z, Lukasova M, Leutgeb B, Wettschureck N, Gorbey S, Orsy P, Horvath B, Maser-Gluth C, Greiner E *et al*: **G12-G13-LARG-mediated signaling in vascular smooth muscle is required for salt-induced hypertension**. *Nat Med* 2008, **14**(1):64-68.
166. Miltenyi S, Muller W, Weichel W, Radbruch A: **High gradient magnetic cell separation with MACS**. *Cytometry* 1990, **11**(2):231-238.
167. Chomczynski P, Sacchi N: **Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction**. *Anal Biochem* 1987, **162**(1):156-159.
168. Chomczynski P, Sacchi N: **The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on**. *Nat Protoc* 2006, **1**(2):581-585.
169. Ginzinger DG: **Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream**. *Exp Hematol* 2002, **30**(6):503-512.

170. Livak KJ, Schmittgen TD: **Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method.** *Methods* 2001, **25**(4):402-408.
171. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC: **Measurement of protein using bicinchoninic acid.** *Anal Biochem* 1985, **150**(1):76-85.
172. Bjorbaek C, Kahn BB: **Leptin signaling in the central nervous system and the periphery.** *Recent Prog Horm Res* 2004, **59**:305-331.
173. St-Pierre J, Tremblay ML: **Modulation of leptin resistance by protein tyrosine phosphatases.** *Cell Metab* 2012, **15**(3):292-297.
174. Delerive P, Martin-Nizard F, Chinetti G, Trottein F, Fruchart JC, Najib J, Duriez P, Staels B: **Peroxisome proliferator-activated receptor activators inhibit thrombin-induced endothelin-1 production in human vascular endothelial cells by inhibiting the activator protein-1 signaling pathway.** *Circ Res* 1999, **85**(5):394-402.
175. Satoh H, Tsukamoto K, Hashimoto Y, Hashimoto N, Togo M, Hara M, Maekawa H, Isoo N, Kimura S, Watanabe T: **Thiazolidinediones suppress endothelin-1 secretion from bovine vascular endothelial cells: a new possible role of PPARgamma on vascular endothelial function.** *Biochem Biophys Res Commun* 1999, **254**(3):757-763.
176. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto K, Masaki T: **A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells.** *Nature* 1988, **332**(6163):411-415.
177. Lee ME, Dhady MS, Temizer DH, Clifford JA, Yoshizumi M, Quertermous T: **Regulation of endothelin-1 gene expression by Fos and Jun.** *J Biol Chem* 1991, **266**(28):19034-19039.
178. Pan W, Hsuchou H, Cornelissen-Guillaume GG, Jayaram B, Wang Y, Tu H, Halberg F, Wu X, Chua SC, Jr., Kastin AJ: **Endothelial leptin receptor mutation provides partial resistance to diet-induced obesity.** *J Appl Physiol (1985)* 2012, **112**(8):1410-1418.
179. Hsuchou H, Jayaram B, Kastin AJ, Wang Y, Ouyang S, Pan W: **Endothelial cell leptin receptor mutant mice have hyperleptinemia and reduced tissue uptake.** *J Cell Physiol* 2013, **228**(7):1610-1616.
180. Kobayashi K, Forte TM, Taniguchi S, Ishida BY, Oka K, Chan L: **The db/db mouse, a model for diabetic dyslipidemia: molecular characterization and effects of Western diet feeding.** *Metabolism* 2000, **49**(1):22-31.
181. Konstantinides S, Schäfer K, Koschnick S, Loskutoff DJ: **Leptin-dependent platelet aggregation and arterial thrombosis suggests a mechanism for atherothrombotic disease in obesity.** *Journal of Clinical Investigation* 2001, **108**(10):1533-1540.
182. Nishina PM, Lowe S, Wang J, Paigen B: **Characterization of plasma lipids in genetically obese mice: the mutants obese, diabetes, fat, tubby, and lethal yellow.** *Metabolism* 1994, **43**(5):549-553.
183. Renz H: **Integrative Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin: Pathophysiologie, Pathobiochemie, Hämatologie.** *de Gruyter Verlag* 2003.
184. Schaab M, Kausch H, Klammt J, Nowicki M, Anderegg U, Gebhardt R, Rose-John S, Scheller J, Thiery J, Kratzsch J: **Novel regulatory mechanisms for generation of the soluble leptin receptor: implications for leptin action.** *PLoS One* 2012, **7**(4):e34787.
185. Nakata M, Yada T, Soejima N, Maruyama I: **Leptin promotes aggregation of human platelets via the long form of its receptor.** *Diabetes* 1999, **48**(2):426-429.
186. Campbell GR, Campbell JH: **The phenotypes of smooth muscle expressed in human atheroma.** *Ann N Y Acad Sci* 1990, **598**:143-158.
187. Chaabane C, Coen M, Bochaton-Piallat ML: **Smooth muscle cell phenotypic switch: implications for foam cell formation.** *Curr Opin Lipidol* 2014, **25**(5):374-379.
188. Hao H, Gabbiani G, Bochaton-Piallat ML: **Arterial smooth muscle cell heterogeneity: implications for atherosclerosis and restenosis development.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003, **23**(9):1510-1520.

189. Thyberg J, Blomgren K, Hedin U, Dryjski M: **Phenotypic modulation of smooth muscle cells during the formation of neointimal thickenings in the rat carotid artery after balloon injury: an electron-microscopic and stereological study.** *Cell Tissue Res* 1995, **281**(3):421-433.
190. Goetze S, Bungenstock A, Czupalla C, Eilers F, Stawowy P, Kintscher U, Spencer-Hansch C, Graf K, Nurnberg B, Law RE *et al*: **Leptin Induces Endothelial Cell Migration Through Akt, Which Is Inhibited by PPAR -Ligands.** *Hypertension* 2002, **40**(5):748-754.
191. Park HY, Kwon HM, Lim HJ, Hong BK, Lee JY, Park BE, Jang Y, Cho SY, Kim HS: **Potential role of leptin in angiogenesis: leptin induces endothelial cell proliferation and expression of matrix metalloproteinases in vivo and in vitro.** *Exp Mol Med* 2001, **33**(2):95-102.
192. Schroeter MR, Stein S, Heida NM, Leifheit-Nestler M, Cheng IF, Gogiraju R, Christiansen H, Maier LS, Shah AM, Hasenfuss G *et al*: **Leptin promotes the mobilization of vascular progenitor cells and neovascularization by NOX2-mediated activation of MMP9.** *Cardiovasc Res* 2012, **93**(1):170-180.
193. Blanquicett C, Graves A, Kleinhenz DJ, Hart CM: **Attenuation of signaling and nitric oxide production following prolonged leptin exposure in human aortic endothelial cells.** *J Investig Med* 2007, **55**(7):368-377.
194. Piatti P, Di Mario C, Monti LD, Fragasso G, Sgura F, Caumo A, Setola E, Lucotti P, Galluccio E, Ronchi C *et al*: **Association of insulin resistance, hyperleptinemia, and impaired nitric oxide release with in-stent restenosis in patients undergoing coronary stenting.** *Circulation* 2003, **108**(17):2074-2081.
195. Gonzalez M, Lind L, Soderberg S: **Leptin and endothelial function in the elderly: the Prospective Investigation of the Vasculature in Uppsala Seniors (PIVUS) study.** *Atherosclerosis* 2013, **228**(2):485-490.
196. Dellas C, Schafer K, Rohm I, Lankeit M, Ellrott T, Faustin V, Riggert J, Hasenfuss G, Konstantinides S: **Absence of leptin resistance in platelets from morbidly obese individuals may contribute to the increased thrombosis risk in obesity.** *Thromb Haemost* 2008, **100**(6):1123-1129.
197. Correia ML, Haynes WG, Rahmouni K, Morgan DA, Sivitz WI, Mark AL: **The concept of selective leptin resistance: evidence from agouti yellow obese mice.** *Diabetes* 2002, **51**(2):439-442.
198. Mark AL, Correia ML, Rahmouni K, Haynes WG: **Selective leptin resistance: a new concept in leptin physiology with cardiovascular implications.** *J Hypertens* 2002, **20**(7):1245-1250.
199. Rahmouni K, Morgan DA, Morgan GM, Mark AL, Haynes WG: **Role of selective leptin resistance in diet-induced obesity hypertension.** *Diabetes* 2005, **54**(7):2012-2018.
200. Yang G, Ge H, Boucher A, Yu X, Li C: **Modulation of direct leptin signaling by soluble leptin receptor.** *Mol Endocrinol* 2004, **18**(6):1354-1362.
201. Ogier V, Ziegler O, Mejean L, Nicolas JP, Stricker-Krongrad A: **Obesity is associated with decreasing levels of the circulating soluble leptin receptor in humans.** *Int J Obes Relat Metab Disord* 2002, **26**(4):496-503.
202. Sun Q, van Dam RM, Meigs JB, Franco OH, Mantzoros CS, Hu FB: **Leptin and soluble leptin receptor levels in plasma and risk of type 2 diabetes in U.S. women: a prospective study.** *Diabetes* 2010, **59**(3):611-618.
203. Kratzsch J, Deimel A, Galler A, Kapellen T, Klinghammer A, Kiess W: **Increased serum soluble leptin receptor levels in children and adolescents with type 1 diabetes mellitus.** *Eur J Endocrinol* 2004, **151**(4):475-481.
204. Kratzsch J, Knerr I, Galler A, Kapellen T, Raile K, Korner A, Thiery J, Dotsch J, Kiess W: **Metabolic decompensation in children with type 1 diabetes mellitus associated with increased serum levels of the soluble leptin receptor.** *Eur J Endocrinol* 2006, **155**(4):609-614.
205. Schaab M, Kratzsch J: **The soluble leptin receptor.** *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2015, **29**(5):661-670.
206. Bjorbaek C, El-Haschimi K, Frantz JD, Flier JS: **The role of SOCS-3 in leptin signaling and leptin resistance.** *J Biol Chem* 1999, **274**(42):30059-30065.

207. Biasin V, Chwalek K, Wilhelm J, Best J, Marsh LM, Ghanim B, Klepetko W, Fink L, Schermuly RT, Weissmann N *et al*: **Endothelin-1 driven proliferation of pulmonary arterial smooth muscle cells is c-fos dependent**. *Int J Biochem Cell Biol* 2014, **54**:137-148.
208. Komuro I, Kurihara H, Sugiyama T, Yoshizumi M, Takaku F, Yazaki Y: **Endothelin stimulates c-fos and c-myc expression and proliferation of vascular smooth muscle cells**. *FEBS Lett* 1988, **238**(2):249-252.
209. Zhang YM, Wang KQ, Zhou GM, Zuo J, Ge JB: **Endothelin-1 promoted proliferation of vascular smooth muscle cell through pathway of extracellular signal-regulated kinase and cyclin D1**. *Acta Pharmacol Sin* 2003, **24**(6):563-568.
210. Hafizi S, Allen SP, Goodwin AT, Chester AH, Yacoub MH: **Endothelin-1 stimulates proliferation of human coronary smooth muscle cells via the ET(A) receptor and is co-mitogenic with growth factors**. *Atherosclerosis* 1999, **146**(2):351-359.
211. Yang Z, Krasnici N, Luscher TF: **Endothelin-1 potentiates human smooth muscle cell growth to PDGF: effects of ETA and ETB receptor blockade**. *Circulation* 1999, **100**(1):5-8.
212. Meoli DF, White RJ: **Endothelin-1 induces pulmonary but not aortic smooth muscle cell migration by activating ERK1/2 MAP kinase**. *Can J Physiol Pharmacol* 2010, **88**(8):830-839.
213. Kuhlmann CR, Most AK, Li F, Munz BM, Schaefer CA, Walther S, Raedle-Hurst T, Waldecker B, Piper HM, Tillmanns H *et al*: **Endothelin-1-induced proliferation of human endothelial cells depends on activation of K⁺ channels and Ca⁺ influx**. *Acta Physiol Scand* 2005, **183**(2):161-169.
214. Douglas SA, Ohlstein EH: **Endothelin-1 promotes neointima formation after balloon angioplasty in the rat**. *J Cardiovasc Pharmacol* 1993, **22 Suppl 8**:S371-373.
215. Dashwood MR, Noertersheuser P, Kirchengast M, Munter K: **Altered endothelin-1 binding following balloon angioplasty of pig coronary arteries: effect of the ETA receptor antagonist, LU 135252**. *Cardiovasc Res* 1999, **43**(2):445-456.
216. McKenna CJ, Burke SE, Opgenorth TJ, Padley RJ, Camrud LJ, Camrud AR, Johnson J, Carlson PJ, Lerman A, Holmes DR, Jr. *et al*: **Selective ET(A) receptor antagonism reduces neointimal hyperplasia in a porcine coronary stent model**. *Circulation* 1998, **97**(25):2551-2556.
217. Pu Q, Neves MF, Virdis A, Touyz RM, Schiffrin EL: **Endothelin antagonism on aldosterone-induced oxidative stress and vascular remodeling**. *Hypertension* 2003, **42**(1):49-55.
218. Anggrahini DW, Emoto N, Nakayama K, Widyantoro B, Adiarto S, Iwasa N, Nonaka H, Rikitake Y, Kisanuki YY, Yanagisawa M *et al*: **Vascular endothelial cell-derived endothelin-1 mediates vascular inflammation and neointima formation following blood flow cessation**. *Cardiovasc Res* 2009, **82**(1):143-151.
219. Amiri F, Virdis A, Neves MF, Iglarz M, Seidah NG, Touyz RM, Reudelhuber TL, Schiffrin EL: **Endothelium-restricted overexpression of human endothelin-1 causes vascular remodeling and endothelial dysfunction**. *Circulation* 2004, **110**(15):2233-2240.
220. Li MW, Mian MO, Barhoumi T, Rehman A, Mann K, Paradis P, Schiffrin EL: **Endothelin-1 overexpression exacerbates atherosclerosis and induces aortic aneurysms in apolipoprotein E knockout mice**. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2013, **33**(10):2306-2315.
221. Timm M, Kaski JC, Dashwood MR: **Endothelin-like immunoreactivity in atherosclerotic human coronary arteries**. *J Cardiovasc Pharmacol* 1995, **26 Suppl 3**:S442-444.
222. Zeiher AM, Goebel H, Schachinger V, Ihling C: **Tissue endothelin-1 immunoreactivity in the active coronary atherosclerotic plaque. A clue to the mechanism of increased vasoreactivity of the culprit lesion in unstable angina**. *Circulation* 1995, **91**(4):941-947.
223. Iwasa S, Fan J, Shimokama T, Nagata M, Watanabe T: **Increased immunoreactivity of endothelin-1 and endothelin B receptor in human atherosclerotic lesions. A possible role in atherogenesis**. *Atherosclerosis* 1999, **146**(1):93-100.
224. Jones GT, van Rij AM, Solomon C, Thomson IA, Packer SG: **Endothelin-1 is increased overlying atherosclerotic plaques in human arteries**. *Atherosclerosis* 1996, **124**(1):25-35.
225. Bacon CR, Cary NR, Davenport AP: **Endothelin peptide and receptors in human atherosclerotic coronary artery and aorta**. *Circ Res* 1996, **79**(4):794-801.

226. Miller E, Czopek A, Duthie KM, Kirkby NS, van de Putte EE, Christen S, Kimmitt RA, Moorhouse R, Castellani RF, Kotevlev YV *et al*: **Smooth Muscle Endothelin B Receptors Regulate Blood Pressure but Not Vascular Function or Neointimal Remodeling**. *Hypertension* 2017, **69**(2):275-285.
227. Bossard M, Pumpol K, van der Lely S, Aeschbacher S, Schoen T, Krisai P, Lam T, Todd J, Estis J, Risch M *et al*: **Plasma endothelin-1 and cardiovascular risk among young and healthy adults**. *Atherosclerosis* 2015, **239**(1):186-191.
228. Takase H, Sugiyama M, Nakazawa A, Toriyama T, Hayashi K, Goto T, Sato K, Ikeda K, Ueda R, Dohi Y: **Increased endogenous endothelin-1 in coronary circulation is associated with restenosis after coronary angioplasty**. *Can J Cardiol* 2003, **19**(8):902-906.
229. Yang H, Xu JX, Kong XZ, Ren ZG, Xia ZY, Qu HQ, Wang LX: **Relations between plasma von Willebrand factor or endothelin-1 and restenosis following carotid artery stenting**. *Med Princ Pract* 2012, **21**(6):538-542.
230. Ferri C, Bellini C, Desideri G, Di Francesco L, Baldoncini R, Santucci A, De Mattia G: **Plasma endothelin-1 levels in obese hypertensive and normotensive men**. *Diabetes* 1995, **44**(4):431-436.
231. Ferri C, Bellini C, Desideri G, Baldoncini R, Properzi G, Santucci A, De Mattia G: **Circulating endothelin-1 levels in obese patients with the metabolic syndrome**. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 1997, **105 Suppl 2**:38-40.
232. Maeda S, Jesmin S, Iemitsu M, Otsuki T, Matsuo T, Ohkawara K, Nakata Y, Tanaka K, Goto K, Miyauchi T: **Weight loss reduces plasma endothelin-1 concentration in obese men**. *Exp Biol Med (Maywood)* 2006, **231**(6):1044-1047.
233. Hubert A, Bochenek ML, Schutz E, Gogiraju R, Munzel T, Schafer K: **Selective Deletion of Leptin Signaling in Endothelial Cells Enhances Neointima Formation and Phenocopies the Vascular Effects of Diet-Induced Obesity in Mice**. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2017, **37**(9):1683-1697.
234. Wagner OF, Christ G, Wojta J, Vierhapper H, Parzer S, Nowotny PJ, Schneider B, Waldhausl W, Binder BR: **Polar secretion of endothelin-1 by cultured endothelial cells**. *J Biol Chem* 1992, **267**(23):16066-16068.
235. Garg UC, Hassid A: **Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells**. *J Clin Invest* 1989, **83**(5):1774-1777.
236. Marks DS, Vita JA, Folts JD, Keaney JF, Jr., Welch GN, Loscalzo J: **Inhibition of neointimal proliferation in rabbits after vascular injury by a single treatment with a protein adduct of nitric oxide**. *J Clin Invest* 1995, **96**(6):2630-2638.
237. Mooradian DL, Hutsell TC, Keefer LK: **Nitric oxide (NO) donor molecules: effect of NO release rate on vascular smooth muscle cell proliferation in vitro**. *J Cardiovasc Pharmacol* 1995, **25**(4):674-678.
238. Procopio C, Andreozzi F, Laratta E, Cassese A, Beguinot F, Arturi F, Hribal ML, Perticone F, Sesti G: **Leptin-stimulated endothelial nitric-oxide synthase via an adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase/Akt signaling pathway is attenuated by interaction with C-reactive protein**. *Endocrinology* 2009, **150**(8):3584-3593.
239. Cucina A, Borrelli V, Randone B, Coluccia P, Sapienza P, Cavallaro A: **Vascular endothelial growth factor increases the migration and proliferation of smooth muscle cells through the mediation of growth factors released by endothelial cells**. *J Surg Res* 2003, **109**(1):16-23.
240. Li D, Zhang C, Song F, Lubenec I, Tian Y, Song QH: **VEGF regulates FGF-2 and TGF-beta1 expression in injury endothelial cells and mediates smooth muscle cells proliferation and migration**. *Microvasc Res* 2009, **77**(2):134-142.
241. Pasceri V, Wu HD, Willerson JT, Yeh ET: **Modulation of vascular inflammation in vitro and in vivo by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activators**. *Circulation* 2000, **101**(3):235-238.

242. Wang N, Verna L, Chen NG, Chen J, Li H, Forman BM, Stemerman MB: **Constitutive activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma suppresses pro-inflammatory adhesion molecules in human vascular endothelial cells.** *J Biol Chem* 2002, **277**(37):34176-34181.
243. Lim S, Lee KS, Lee JE, Park HS, Kim KM, Moon JH, Choi SH, Park KS, Kim YB, Jang HC: **Effect of a new PPAR-gamma agonist, lobeglitazone, on neointimal formation after balloon injury in rats and the development of atherosclerosis.** *Atherosclerosis* 2015, **243**(1):107-119.

ERKLÄRUNG

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die als Dissertation vorliegende Arbeit mit dem Titel:

„Zell-spezifische Wirkungen der Leptin-Rezeptor-vermittelten Signaltransduktion und ihre Bedeutung für die vaskuläre Wundheilung“

selbstständig und ohne fremde Hilfe angefertigt habe und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe sowie die Stellen der Arbeit, die in anderen Werken dem Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind unter Angabe der Quelle als solche gekennzeichnet habe.

Diese Arbeit wurde in gleicher oder ähnlicher Form keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt und bei keiner anderen Fakultät bzw. keinem anderen Fachbereich eingereicht.

Ich bin mir bewusst, dass eine falsche Erklärung rechtliche Folgen haben kann.

Mainz, November 2017

Astrid Hubert

LEBENS LAUF

Astrid Hubert, Dipl. troph.

Persönliche Daten

Geburtsdatum: 02.10.1983
Geburtsort Temeschburg (Rumänien)
Staatsangehörigkeit: deutsch

Promotion

Wissenschaftliche Mitarbeiterin / Doktorandin

10/2013 – 07/2017 Wechsel an die *Universitätsmedizin Mainz* der Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Zentrum für Kardiologie der Kardiologie I
Forschungsgruppe „Translationale Vaskuläre Biologie“
von Univ.-Prof. Dr. med. [REDACTED]

05/2012 – 09/2013 *Universitätsmedizin Göttingen*, Klinik für Kardiologie und Pneumologie
Forschungsgruppe „Vaskuläre Biologie und Atheroskleroseforschung“ von Prof. Dr. med. [REDACTED]

Titel der Doktorarbeit:
„Zell-spezifische Wirkungen der Leptin-Rezeptor-vermittelten Signaltransduktion und ihre Bedeutung für die vaskuläre Wundheilung“

Studium

10/2004 – 09/2010 **Studium der Ernährungswissenschaft**
Universität Hohenheim Stuttgart
Abschluss: **Diplom-Ernährungswissenschaftlerin**
Titel der Diplomarbeit:
„Untersuchung der protektiven Wirkung einer Tryptophan-Supplementierung auf die Entstehung der fructoseinduzierten nicht-alkoholbedingten Fettlebererkrankung (NAFLD) im Mausmodell“

10/2003 – 09/2004 Pädagogische Hochschule Karlsruhe

Studienbegleitende Tätigkeiten

07/2008 – 09/2008 **Ernährungszentrum Mittlerer Neckar** (Praktikum)
Landratsamt Ludwigsburg, Geschäftsteil Ernährung und Haushaltsökonomie

05/2009 – 03/2010 **Institut für Ernährungsmedizin** (studentische Hilfswissenschaftlerin)
Universität Hohenheim Stuttgart, Lehrstuhl von Prof. Dr. med. [REDACTED],
[REDACTED], Forschungsgruppe „Neurogastroenterologie“

Schulbildung

09/1994 – 06/2003 **Allgemeine Hochschulreife**
Ev. Mörike-Gymnasium, Stuttgart

Konferenzen

- 03/2016 82. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie, Herz- und Kreislaufforschung in Mannheim (Freier Vortrag)
- 06/2015 *International Society on Thrombosis and Haemostasis* Kongress 2015 in Toronto, Kanada (Posterpräsentation)
- 04/2015 81. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie, Herz- und Kreislaufforschung in Mannheim (Posterpräsentation)
- 11/2009 2. Kongress des Zentrums für Ernährungsmedizin (ZEM) der Universitäten Tübingen und Hohenheim in Tübingen (Posterpräsentation)

Publikationen

Hubert A, Bochenek ML, Schütz E, Gogiraju R, Münzel T, Schäfer K. **Selective Deletion of Leptin Signaling in Endothelial Cells Enhances Neointima Formation and Phenocopies the Vascular Effects of Diet-Induced Obesity in Mice.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2017 Sep;37(9):1683-1697. doi:10.1161/ATVBAHA.117.309798. Epub 2017 Jul 13.

Gogiraju R, Schroeter MR, Bochenek ML, Hubert A, Münzel T, Hasenfuss G, Schäfer K. **Endothelial deletion of protein tyrosine phosphatase-1B protects against pressure overload-induced heart failure in mice.** *Cardiovasc Res.* 2016 Aug 1;111(3):204-16. doi: 10.1093/cvr/cvw101. Epub 2016 May 20.

Ritze Y, Bárdos G, Hubert A, Böhle M, Bischoff SC. **Effect of tryptophan supplementation on diet-induced non-alcoholic fatty liver disease in mice.** *Br J Nutr.* 2014 Jul 14;112(1):1-7. doi:10.1017/S0007114514000440. Epub 2014 Apr 8.

Ritze Y, Böhle M, Haub S, Hubert A, Enck P, Zipfel S, Bischoff SC. **Role of serotonin in fatty acid-induced non-alcoholic fatty liver disease in mice.** *BMC Gastroenterol.* 2013 Dec 9;13:169. doi:10.1186/1471-230X-13-169.

Schroeter MR, Leifheit-Nestler M, Hubert A, Schumann B, Glückermann R, Eschholz N, Krüger N, Lutz S, Hasenfuss G, Konstantinides S, Schäfer K. **Leptin promotes neointima formation and smooth muscle cell proliferation via NADPH oxidase activation and signalling in caveolin-rich microdomains.** *Cardiovasc Res.* 2013 Aug 1;99(3):555-65. doi:10.1093/cvr/cvt126. Epub 2013 May 30.

Haub S, Ritze Y, Ladel I, Saum K, Hubert A, Spruss A, Trautwein C, Bischoff SC. **Serotonin receptor type 3 antagonists improve obesity-associated fatty liver disease in mice.** *J Pharmacol Exp Ther.* 2011 Dec;339(3):790-8. doi:10.1124/jpet.111.181834. Epub 2011 Sep 8.

Mainz, November 2017



DANKSAGUNG