

Aus dem Institut für Pharmakologie  
(Prof. Dr. med. W. Zimmermann)  
im Zentrum Pharmakologie und Toxikologie  
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Regulation der Dual-leucine-zipper-Kinase (DLK) durch  
„prädiabetische“ Signale in endothelialen HUVEC-Zellen und  
die Bedeutung der DLK für die Angiogenese in einem  
Mausmodell**

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizinischen Fakultät der  
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von  
Julia Meike Krebs  
aus  
Stuttgart

Göttingen 2013

**Dekan:** Prof. Dr. rer. nat. Kroemer

**I. Berichterstatterin:** Prof. Dr. med. Oetjen

**II. Berichterstatterin:** Prof. Dr. med. Schäfer

**III. Berichterstatterin:** Prof. Dr. rer. nat. Virsik-Köpp

**Tag der mündlichen Prüfung:** 04.12.2013

# Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Einflüsse auf das Metabolische Syndrom und dessen Komplikationen .....	3
Abb. 1.2 MAPK-Signalweg .....	7
Abb. 1.3 Schematische Darstellung des Einflusses von JNK auf DLK.....	9
Abb. 1.4 Schematische Darstellung der Primärstruktur der DLK .....	10
Abb. 2.1: Konzentrationsbestimmung von DNA.....	20
Abb. 2.2: Reaktionsgleichung für die Proteinbestimmung nach Bradford .....	29
Abb. 2.3: Aufbau einer Blotkammer.....	33
Abb. 3.1: Expression von DLK in HUVECs .....	43
Abb. 3.2: Bestimmung der Halbwertszeit von DLK mittels Cycloheximid .....	45
Abb. 3.3: Phosphorylierung der DLK.....	47
Abb. 3.4: Phosphorylierung der DLK-untergeordneten Kinase JNK .....	49
Abb. 3.5: Phosphorylierung von DLK und JNK in der Gegenwart des JNK-Inhibitors SP600125 .....	51
Abb. 3.6 Potentielle Darstellung der Wirkung des JNK-Inhibitors auf die Phosphorylierung von JNK und DLK.....	52
Abb. 3.7 TNF $\alpha$ -Konzentrationswirkungskurve für DLK und die Phosphorylierung von DLK .....	54
Abb. 3.8 Zeitkurve: Wirkung von TNF $\alpha$ auf DLK und die Phosphorylierung von DLK ..	56
Abb. 3.9 Darstellung von pAd-DLK-Plasmid transfizierten HEK-293A-Zellen .....	58
Abb. 3.10 Darstellung der Infektion von HUVECs mit dem Ad-DLK-K185A und dem Ad-DLK-wt nach 24 Stunden .....	59
Abb. 3.11 Darstellung der Infektion von HUVECs mit dem Ad-DLK-K185A und dem Ad-DLK-wt nach 48 Stunden .....	60
Abb. 3.12 Kontrolle der Viren Ad-DLK-wt und Ad-DLK-K185A.....	61
Abb. 3.13 Gewichtszunahme aller Mäuse .....	62
Abb. 3.14 Gewichtszunahme der Mäuse mit Normaldiät.....	63
Abb. 3.15 Gewichtszunahme der Mäuse mit fettreicher Diät.....	64
Abb. 3.16 Gewichtszunahme der Mäuse mit kohlenhydratreicher Diät.....	65
Abb. 3.17 Blutzuckerwerte der Mäuse mit Normaldiät.....	66
Abb. 3.18 Blutzuckerwerte der Mäuse mit fettreicher Diät.....	67
Abb. 3.19 Blutzuckerwerte der Mäuse mit kohlenhydratreicher Diät .....	68
Abb. 3.20 HbA1c-Werte aller Mäuse .....	70
Abb. 3.21 Perfusionszunahme in den Hinterläufen nach Ligation der Arteria femoralis der Mäuse mit Normaldiät .....	71
Abb. 3.22 Perfusionszunahme in den Hinterläufen nach Ligation der Arteria femoralis der Mäuse mit fettreicher Diät .....	72

Abb. 3.23 Perfusionszunahme in den Hinterläufen nach Ligation der Arteria femoralis der Mäuse mit kohlenhydratreicher Diät .....	73
Abb. 3.24 Fluoreszenzmikroskopisches Bild von DAPI-angefärbten Muskelzellen .....	74
Abb. 3.25 Quantitative Auswertung der DAPI-positiven Zellen in den Muskelschnitten aller Mäuse.....	75
Abb. 3.26 Fluoreszenzmikroskopisches Bild von CD31-angefärbten Muskelzellen .....	76
Abb. 3.27 Quantitative Auswertung der CD31-positiven Zellen in den Muskelschnitten aller Mäuse.....	77
Abb. 3.28 Fluoreszenzmikroskopisches Bild von DAPI-und CD31-angefärbten Muskelzellen.....	78
Abb. 3.29 Typisches Fluoreszenzmikroskopisches Bild von DAPI-und CD31-angefärbten Muskelzellen eines linken und rechten Hinterlaufs .....	78
Abb. 4.1: Neovaskularisierung .....	86

## **Tabellenverzeichnis**

Tab. 1 Blutzuckerwerte aller Mäuse in Diätwoche 20 .....	69
--	----

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1	<i>Definition und Epidemiologie des Diabetes mellitus.....</i>	<i>1</i>
1.2	<i>Metabolisches Syndrom und Adipositas .....</i>	<i>2</i>
1.2.1	<i>Definition und Epidemiologie.....</i>	<i>2</i>
1.2.2	<i>Ätiologie .....</i>	<i>3</i>
1.3	<i>Endotheliale Dysfunktion und Gefäßerkrankungen bei Diabetes mellitus .....</i>	<i>4</i>
1.4	<i>Apoptose und die Rolle von TNF<math>\alpha</math>.....</i>	<i>5</i>
1.5	<i>Signaltransduktion und der Einfluss der Jun-amino-terminal-Kinase (JNK) auf die DLK.....</i>	<i>6</i>
1.5.1	<i>Der Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Weg.....</i>	<i>6</i>
1.6	<i>DLK und der Einfluss von JNK auf ihre Aktivität.....</i>	<i>9</i>
1.6.1	<i>DLK .....</i>	<i>9</i>
1.6.2	<i>Der Einfluss von JNK auf DLK.....</i>	<i>10</i>
1.7	<i>Zielsetzung .....</i>	<i>11</i>
<b>2</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>12</b>
2.1	<i>Material.....</i>	<i>12</i>
2.1.1	<i>Geräte und Verbrauchsmaterialien .....</i>	<i>12</i>
2.1.1.1	<i>Geräte .....</i>	<i>12</i>
2.1.1.2	<i>Verbrauchsmaterialien .....</i>	<i>13</i>
2.1.2	<i>Biologische und chemische Materialien .....</i>	<i>14</i>
2.1.2.1	<i>Chemikalien .....</i>	<i>14</i>
2.1.2.2	<i>Enzyme .....</i>	<i>16</i>
2.1.2.3	<i>Puffer und Stammlösungen .....</i>	<i>16</i>
2.1.2.4	<i>Kits .....</i>	<i>17</i>
2.1.2.5	<i>Antikörper .....</i>	<i>17</i>
2.1.2.6	<i>Antibiotika .....</i>	<i>18</i>
2.1.2.7	<i>Inhibitoren .....</i>	<i>18</i>
2.1.2.8	<i>Signalstoffe .....</i>	<i>18</i>
2.1.2.9	<i>Nachweissystem .....</i>	<i>18</i>
2.1.2.10	<i>Molekulargewichtsmarker .....</i>	<i>19</i>
2.1.2.10.1	<i>Protein .....</i>	<i>19</i>
2.1.2.10.2	<i>DNA .....</i>	<i>19</i>
2.1.2.11	<i>Medienbestandteile und Seren.....</i>	<i>19</i>
2.1.2.11.1	<i>Zellkultur .....</i>	<i>19</i>
2.1.2.11.2	<i>Bakterienkultur.....</i>	<i>19</i>

2.2	<i>Methoden</i> .....	19
2.2.1	Arbeiten mit Nukleinsäuren.....	19
2.2.1.1	Bestimmung von Konzentration der DNA.....	19
2.2.1.2	Agarose-Gelelektrophorese.....	20
2.2.1.3	Restriktionsenzymatische Spaltung von Nukleinsäuren.....	20
2.2.1.4	Herstellung antibiotikahaltiger Agarplatten.....	21
2.2.1.5	Transformation (mittels Elektroporation) kompetenter Bakterien.....	21
2.2.1.6	Minipräparation von Plasmid-DNA.....	22
2.2.1.7	Ethanolpräzipitation.....	23
2.2.2	Zellkultur.....	23
2.2.2.1	Zelllinie HUVEC.....	23
2.2.2.2	Zelllinie HEK-293A.....	23
2.2.2.3	Medien und Puffer.....	23
2.2.2.4	Standardbedingungen und Kultivierung von HUVECs.....	24
2.2.2.5	Standardbedingungen und Kultivierung von HEKs.....	25
2.2.2.6	Splitten der HUVECs.....	25
2.2.2.7	Splitten der HEKs.....	26
2.2.2.8	Mediumwechsel.....	27
2.2.2.9	Langzeitaufbewahrung und Reaktivierung.....	27
2.2.3	Proteinanalyse.....	28
2.2.3.1	Behandeln von Zellen zur Proteincharakterisierung.....	28
2.2.3.2	Zellernte und Herstellung von Zellextrakten.....	28
2.2.3.3	Bestimmung des Proteingehalts.....	29
2.2.3.4	SDS-PAGE.....	30
2.2.3.5	Proteintransfer auf Nitrozellulosemembran (Western Blot).....	32
2.2.3.6	Immunologischer Nachweis von Proteinen.....	33
2.2.3.7	Wiederaufbereitung der Nitrocellulosemembran.....	34
2.2.4	Herstellung der Viren Ad-DLK-wt und Ad-DLK-K185A.....	35
2.2.4.1	Transfektion von Plasmid-DNA nach der Metafectene <sup>TM</sup> -Easy-Methode.....	35
2.2.4.2	Virusernte nach Transfektion des Virus.....	36
2.2.4.3	Amplifikation des Virus.....	36
2.2.4.4	Virusaufreinigung mittels Cäsiumchloridgradienten.....	37
2.2.4.5	Titerbestimmung.....	38
2.2.5	Untersuchung der Angiogenese bei Diät-induzierter Adipositas und Diabetes mellitus.....	39
2.2.5.1	Mäuse.....	39
2.2.5.2	Diäten und Messungen.....	39
2.2.5.3	Ligation und Durchtrennung der Arteria femoralis.....	40
2.2.5.4	Perfusionsmessung durch LDI (=Laser Doppler Imaging).....	40
2.2.5.5	Präparation der Hinterlaufmuskeln.....	40
2.2.5.6	Gefrierkonservierung und Schneiden der Muskeln.....	40
2.2.5.7	Färbung.....	41

2.2.5.8	Auswertung der Muskelschnitte .....	41
2.2.6	Statistik .....	41
2.2.6.1	SEM .....	41
2.2.6.2	t-test .....	42
2.2.6.3	Abbildungen .....	42
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>42</b>
3.1	<i>Expression und Regulation von DLK in HUVECs.....</i>	42
3.1.1	Expression von DLK in HUVECs .....	42
3.1.2	Regulation der DLK.....	44
3.1.2.1	Halbwertszeit von DLK in HUVECs .....	44
3.1.2.2	Phosphorylierung der DLK durch prädiabetische Stoffe .....	45
3.1.2.3	Phosphorylierung der DLK-untergeordneten Kinase JNK.....	47
3.1.2.4	Phosphorylierung von DLK und JNK in Gegenwart des JNK-Inhibitors SP600125 .....	50
3.1.2.5	Konzentrationsabhängige Wirkung von TNF $\alpha$ auf DLK und P-DLK .	52
3.1.2.6	Zeitabhängige Wirkung von TNF $\alpha$ auf DLK und P-DLK .....	54
3.2	<i>Herstellung eines DLK-überexprimierenden Adenovirus DLK-wt und DLK- K185A .....</i>	57
3.2.1	Transfektion der HEK-Zellen .....	57
3.2.2	Infektion der HUVECs mit Ad-DLK-wt und Ad-DLK-K185A.....	58
3.2.3	Bestimmung des Titers von Ad-DLK-wt und Ad-DLK-K185A.....	61
3.3	<i>Untersuchung der Angiogenese bei Diät-induzierter Adipositas und Diabetes mellitus.....</i>	61
3.3.1	Gewichtsverlauf der Mäuse mit CRD, HFD und ND .....	62
3.3.2	Blutzucker der Mäuse unter unterschiedlichen Diäten .....	65
3.3.3	HbA1c-Wertmessung der Mäuse mit ND, HFD und CRD.....	69
3.3.4	Perfusion der Hinterläufe nach Ischämie der Mäuse mit ND, HFD und CRD .....	70
3.3.5	Untersuchung der Neovaskularisierung und Intimaneubildung bei Muskelzellen nach Ischämie .....	73
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>79</b>
4.1	<i>Expression der DLK in HUVECs.....</i>	79
4.2	<i>Regulation der DLK in HUVECS .....</i>	80
4.2.1	Halbwertszeit von DLK .....	80
4.2.2	Einfluss von TNF $\alpha$ auf DLK und JNK in HUVECs.....	80
4.2.3	Einfluss von JNK auf DLK ind HUVECS .....	81
4.3	<i>Herstellung zwei rekombinanter Adenoviren Ad-DLK-wt und Ad-DLK-K185A... .....</i>	82

---

4.4	<i>Einfluss von DLK auf die Angiogeneese bei unterschiedlichen Stoffwechsellagen</i> .....	83
4.4.1	Gewicht.....	83
4.4.2	Blutzucker und HbA1c .....	84
4.5	<i>Untersuchung der Angiogenese in einem Mausmodell</i> .....	85
4.5.1	Perfusionsmessung nach Ligation der Femoralisarterien .....	87
4.5.2	Neovaskularisation nach Liagtion der Femoralisarterien .....	88
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>90</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>91</b>



## Abkürzungsverzeichnis

<b>Abkürzung</b>	<b>Erläuterung</b>
A	Ampère (Einheit für Stromstärke)
Abb.	Abbildung
Ad	Adenovirus/adenoviral
AGE	advanced glycation end-products
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bFGF	basic fibroblast growth factor
bidest.	bidestilliert
BSA	Bovine Serum Albumine
cm	Zentimeter
°C	Grad Celsius
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
CRD	kohlenhydratreiche Diät
CREB	cyclic AMP response element-binding protein
CsCl	Cäsiumchlorid
C-terminal	Carboxy-Terminal
d	dezi
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DLK	Dual Leucine-Zipper Kinase
DM	Diabetes mellitus
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMT2	Diabetes mellitus Typ 2
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EC	endotheliale Zellen
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycoltetraacetat
EPC	endogene Progenitor Zellen
ERK	extracellular signal-related kinase
g	Gramm
G	Gauge (Einheit für den Außendurchmesser einer Kanüle)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	grün fluoreszierendes Protein
Glut 2	Glukosetransporter Typ 2
h	Stunde
H <sub>2</sub> O	Wasser
HbA1c	Glykohämoglobin
HCl	Salzsäure

---

HEK	human embryonal kidney
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethan-sulfonsäure
HFD	fetteiche Diät
HIF- $\alpha$	hypoxia-inducible factor
HIT	Hamster Insulinoma Tumorzelllinie
HLA	Humanes Leukozyten Antigen
HMGB1	high-mobility group box1 protein
HUVEC	human umbilical vein endothelial cell
IDF	International Diabetes Federation International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine
IFCC	Laboratory Medicine
IL-1 $\beta$	Interleukin-1 $\beta$
JIP	JNK-interacting protein
JNK	c-Jun-N-terminal Kinase
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dikaliumhydrogenphosphat
kb	Kilobasenpaare
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilo Dalton
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
$\lambda$	Lambda (Einheit für mittlere freie Wellenlänge)
l	Liter
LB	Lysogeny broth
LDI	Laser Doppler Imaging
m	milli (1x10 <sup>-3</sup> )
M	molar
m	Meter
$\mu$	mikro (1x10 <sup>-6</sup> )
MAPK	Mitogen-aktivierte Protein-Kinase
MAPKK	Mitogen-aktivierte Protein-Kinase-Kinase
MAPKKK	Mitogen-aktivierte Protein-Kinase-Kinase-Kinase
MG	Molekulargewicht
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MgSO <sub>4</sub>	Magnesiumsulfat
min	Minute
MS	Metabolisches Syndrom
n	nano (1x10 <sup>-9</sup> )
N	Normalität (Einheit für Konzentration)
NaCl	Natriumchlorid
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Natriumhydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
ND	Normaldiät

---

NF-kB	nuclear factor kappa B
NP-40	Nonidet P-40
N-terminal	Amino-Terminal
$\Omega$	Ohm (Einheit für elektrischen Widerstand)
Pa	Pascal (Einheit für Druck)
PBS	phosphate buffered saline, phosphatgepufferte Salzlösung
p-DLK	phosphorylierte DLK
PECAM	platelet endothelial cell adhesion molecule
pH	pH-Wert
p-JNK	phosphorylierte JNK
postOP	postoperativ
PPAR $\gamma$	peroxisome proliferator-activated receptor gamma
präOP	präoperativ
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
s.o.	siehe oben
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese
SEM	standard error of the mean, Standardfehler des Mittelwertes
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	Trisgepufferte Salzlösung
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
TNF $\alpha$	Tumor-Nekrose-Faktor $\alpha$
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Tween 20	Polyethylen-Sorbit-Monolaurat
U	Unit
UpM	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolettes Licht
V	Volt (Einheit für Spannung)
v/v	Volumen pro Volumen
VCMC	vascular smooth muscle cell, vaskuläre glatte Muskelzellen
VEGF	vacular endothelial growth factor
WHO	World Health Organisation
wt	Wildtyp
z. B.	zum Beispiel

# 1 Einleitung

## 1.1 Definition und Epidemiologie des Diabetes mellitus

Nach Berichten der World Health Organization (WHO) sind mittlerweile weltweit 347 Millionen Menschen an einer Form des Diabetes mellitus erkrankt. Allein 2004 starben circa 3,4 Millionen Menschen an den Folgen eines zu hohen Blutzuckers (WHO 2012). Die Inzidenz der Erkrankung ist steigend und die Bedeutung der zum Tode führenden Komplikationen rückt immer mehr in den Vordergrund. Hierbei scheinen vor allem die Makroangiopathien eine entscheidende Rolle zu spielen. Auch spätmanifeste Organschäden wie die Retinopathie, die Nephropathie und das diabetische Fußsyndrom treten bei betroffenen Patienten immer häufiger auf (Johnson und Taylor 1990). Die reduzierte Lebensqualität und dadurch die psychische Belastung für Betroffene und Angehörige ist enorm. Die Kosten für das Gesundheitssystem werden durch diese gravierenden Folgen immer mehr in die Höhe getrieben, was die Dringlichkeit, neue Therapieoptionen zu entwickeln, in den Vordergrund drängt.

Bei Diabetes mellitus (übersetzt aus dem Griechischen: „honigsüßer Durchfluss“) handelt es sich um eine weltweit sehr verbreitete, komplikationsreiche heterogene Stoffwechselerkrankung, die nach ihrer Ätiologie in mehrere unterschiedliche Typen eingeteilt werden kann. Das Hauptmerkmal aller Subtypen ist die chronische Hyperglykämie im Blutplasma und die daraus resultierende gestörte Glukosetoleranz.

Die Bauchspeicheldrüse des menschlichen Körpers kann in einen exokrinen und einen endokrinen Teil eingeteilt werden. Der exokrine Anteil schüttet Verdauungsenzyme aus und spielt somit eine wichtige Rolle bei der Aufnahme von Nährstoffen. Das endokrine Pankreas schüttet unter anderem das Peptidhormon Insulin aus, welches für einen regulierten Glukosestoffwechsel von Bedeutung ist. Bei gesunden Menschen wird Insulin in den Betazellen der Langerhans-Inseln produziert und wird durch hormonelle und metabolische Signale gesteuert. Insulin gelangt über verschiedene Transporter in die Zelle. Einige transportieren den Zucker insulinabhängig in die Zelle (GLUT4). Der Zucker wird mittels Insulin in die Zelle transportiert und phosphoryliert. Hauptaufnahmeorte sind Muskel- und Fettzellen. Außerdem findet in der Leber unter Gewinnung von ATP die Glykolyse statt und die Glukoneogenese wird gehemmt (Efrat et al. 1994; German 1993; MacDonald et al. 2005). Andere hingegen arbeiten insulinunabhängig (GLUT2). Dieser hormonunabhängige Transporter wird vor allem in der Leber, der  $\beta$ -Zelle im Pankreas und der Niere gebildet.

Die amerikanische Diabetes Gesellschaft (American Diabetes Association) veröffentlichte 2009 die neueste Klassifikation des Diabetes mellitus (Association 2009). Die beiden häufigsten Typen sind ein absoluter Insulinmangel durch eine autoimmune Zerstörung von Betazellen (Typ1) und eine relative Insulinresistenz (Typ2). Bei dem autoimmunvermittelten Typ 1, der circa 5% ausmacht, können sowohl verschiedene

Autoantikörper vorliegen als auch eine enge Verknüpfung zu spezifischen Humanen Leukozyten Antigenen (HLA) bestehen. Normalerweise wird bei diesem Subtyp die Erstdiagnose im Kindes- oder Jugendalter gestellt, jedoch kann die Krankheit in allen Altersgruppen auftreten. In manchen Fällen kann dieser Typ des Diabetes mellitus auch idiopathisch vorkommen. Der zu 90% vorkommende „Altersdiabetes“, Typ 2, beruht auf einem relativen Insulinmangel und einer verminderten Insulinempfindlichkeit der Zielgewebe. Die Gründe sind vielschichtig, jedoch scheinen Fettleibigkeit, hohes Alter, verminderte sportliche Aktivität, Entzündungskomponenten und eine genetische Disposition eine entscheidende Rolle in der Entstehung zu sein (Stumvoll et al. 2005). Zusätzlich ist Typ 3 zu nennen, der durch genetische Defekte, Entzündungen oder Infektionen zu Stande kommen kann und der Gestationsdiabetes (Typ 4), der in der Schwangerschaft auftreten kann (Association 2009).

## **1.2 Metabolisches Syndrom und Adipositas**

### **1.2.1 Definition und Epidemiologie**

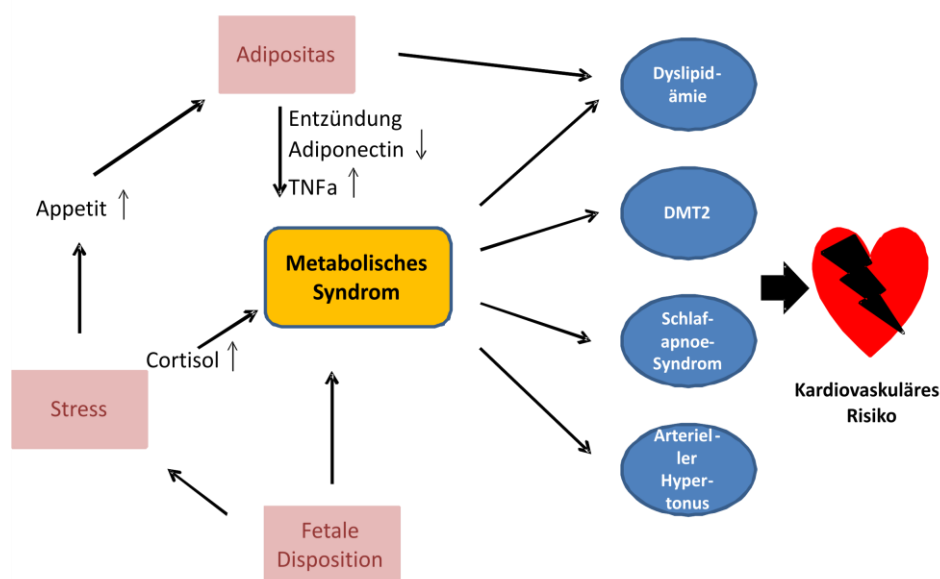
Früher wurde der Diabetes mellitus Typ 2 (DMT2) und dessen Komplikationen von anderen metabolischen Erkrankungen abgegrenzt. Heute weiß man, dass er nur ein Symptom einer weitaus größeren Stoffwechselerkrankung ist, die sich schon Jahre vor der Erstdiagnose Diabetes mellitus manifestieren kann. Das kardiovaskuläre Risiko, an einem Herzinfarkt oder Schlaganfall zu erkranken, steigt beispielsweise schon 15 Jahre vor Diagnosestellung (Hu et al. 2002). Dieses metabolische Zusammenspiel mehrerer Komponenten ist ein wichtiger Faktor in der Entstehung von Arteriosklerose und wird als Metabolisches Syndrom (MS) bezeichnet. 1988 wurde das MS erstmals als „Syndrom X“ beschrieben und umfasste die Komponenten Diabetes mellitus Typ 2, arterieller Bluthochdruck und Hypertriglyceridämie (Reaven 1988). Bald schon wurde das klinische Bild erweitert und mittlerweile bestehen mehrere Definitionen des Syndroms. 2005 publizierten einige Verbände (International Diabetes Federation (IDF), European group of the study of insulin resistance) eine mögliche Definition: Dazu gehören ein Nüchternblutglukosewert  $> 100$  mg/dl, Insulinresistenz, Dyslipoproteinämie, arterielle Hypertonie und stammbetonte Adipositas mit einem Taillenumfang von  $> 94$  cm bei Männern und  $> 80$  cm bei Frauen, wobei man nicht außer Acht lassen darf, dass die diagnostischen Kriterien nach wie vor umstritten sind.

Die Prävalenz dieses jetzt schon sehr verbreiteten Syndroms ist in westlichen Ländern immer mehr steigend, was wahrscheinlich auf die zunehmende Tendenz zur Fettleibigkeit der westlichen erwachsenen Bevölkerung zurückzuführen ist (Kassi et al. 2011). Auch im Kindes- und Jugendalter ist die Fettleibigkeit ein zunehmendes medizinisches Problem. Veröffentlichungen zeigen, dass Adipositas bei Kindern im direkten Zusammenhang mit dem MS steht (Sorof und Daniels 2002). Die aktuelle Definition für das MS im Kindes- und Jugendalter wurde 2007 von der IDF erstmals veröffentlicht. Diese berücksichtigt die Problematik der wechselnden Parameterwerte in der Pubertät und umfasst die Kriterien des Metabolischen Syndroms im Erwachsenenalter ausgenommen den Taillenumfang

(Zimmet et al. 2007). Aus diesem Grund ist es wichtig die Zusammenhänge zwischen MS, Fettleibigkeit und Diabetes mellitus besser zu verstehen.

### 1.2.2 Ätiologie

Pathophysiologisch setzt sich das Metabolische Syndrom aus einem Zusammenspiel von fetalen sowie molekulargenetischen Faktoren und Umwelteinflüssen zusammen. Es stehen hierbei vor allem die Insulin-Resistenz und Adipositas im Vordergrund, jedoch ergeben alle Einflüsse gemeinsam das klinische Bild mit den daraus folgenden Komplikationen (Kassi et al. 2011) Die Abb. 1.1 zeigt eine Übersicht über die verschiedenen Faktoren, die zu einem MS und folgedessen zu einem kardiovaskulären Risiko führen können.



**Abb. 1.1: Einflüsse auf das Metabolische Syndrom und dessen Komplikationen**

*TNF $\alpha$ : Tumor-Nekrose-Faktor  $\alpha$  (Modifiziert nach (Kassi et al. 2011), S.5).*

Die Entstehung des MS wird durch viele verschiedene Faktoren und Einflüsse begünstigt. Im Folgenden sind die wichtigsten Ansätze der molekulargenetischen Abläufe im Zusammenhang mit den dazu beitragenden Umweltfaktoren beschrieben und erläutert:

Im Organismus ist das viszerale vom Unterhautfettgewebe abzugrenzen. Das viszerale Fettgewebe ist im Gegensatz zu dem subkutanen Fettgewebe nicht direkt sichtbar, sondern macht sich erst nach einiger Zeit in einer Umfangsvergrößerung bemerkbar. Bei der Entstehung des DM spielt vor allem das Gewebefett eine entscheidende Rolle: dieses produziert ein Adipozytokin, Adiponektin, welches den Organismus vor DMT2, arterieller Hypertension, Arteriosklerose und anderen Entzündungen schützen soll, wird durch viszerale Fettakkumulation vermindert gebildet und kann somit die Entstehung des MS fördern (Okamoto et al. 2006). Diese Daten zeigen, dass das Erkrankungsrisiko für

MS in enger Beziehung zur Fettsucht steht. Durch Adipositaschirurgie konnte nach neuesten Studien das kardiovaskuläre Risiko bei DMT2-Patienten um 65% gesenkt werden (Johnson et al. 2013). Außerdem wurde gezeigt, dass Adipozyten das Zytokin TNF $\alpha$  (tumor necrosis factor  $\alpha$ ) ausschütten und die Konzentration dieses Zytokins bei Adipositas erhöht ist (Coppack 2001). Entzündungsmediatoren wie TNF $\alpha$  und Leptin sind Zeichen von Entzündungsreaktionen und können zu Veränderungen des immunologischen Milieus beitragen (Kassi et al. 2011; Matsuzawa 2008). Des Weiteren trägt Stress, beispielsweise durch Umwelteinflüsse oder auch Entzündungen im Organismus, zu der Entstehung des klinischen Bildes bei. Die chronische Hypersekretion von Stressmediatoren wie Cortisol kann zur Stammfettsucht führen, was wiederum in einer verminderten Ausschüttung von Adiponektin enden kann (Kassi et al. 2011).

Ein weiterer Faktor ist die individuelle Disposition durch Einflüsse auf den Fetus im Mutterleib. Es wurde gezeigt, dass der Ernährungszustand des Feten im Mutterleib sowie auch die hormonellen und metabolischen Einflüsse auf das ungeborene Kind eine spätere Entstehung des MS begünstigen können (Fernandez-Twinn und Ozanne 2010; Xita und Tsatsoulis 2010).

### **1.3 Endotheliale Dysfunktion und Gefäßerkrankungen bei Diabetes mellitus**

Eine der häufigsten und wichtigsten Komplikationen bei Diabetes mellitus sind die Makro- und Mikroangiopathien. Bei diesen Krankheitsbildern handelt es sich um Gefäßschädigungen oder Gefäßveränderungen von kleinen oder großen Blutgefäßen, die zu zahlreichen Folgeerkrankungen führen können (s. 1.2). Die großen Gefäße haben im Gesunden vor allem die Aufgabe, das Blut zu den Organen zu transportieren und diese mit genug Sauerstoff zu versorgen. Die kleinen Gefäße haben zusätzlich noch weitere spezifischere Aufgaben wie die Blutdruckregulation und die Nährstoffversorgung. Eine Veränderung der Gefäße kann gravierende Auswirkungen nach sich ziehen. Eine entscheidende Rolle in der Pathologie dieser Gefäßveränderungen spielt die Endotheliale Dysfunktion (Stehouwer et al. 1997).

Das Endothel kleidet die Gefäßwand mit Endothelzellen aus. Es bildet somit eine natürliche Barriere zwischen dem zirkulierenden Blut im Lumen und der Gefäßwand. Dadurch ist es entscheidend an der vaskulären Homöostase beteiligt. Es reguliert den Gefäßtonus und ist somit ein aktiver Bestandteil des Gerinnungssystems, insbesondere der Fibrinolyse und Thrombosebildung. Zusätzlich kann das Endothel andere Zellarten in ihrer Funktion beeinflussen und damit bei Reparaturprozessen einen entscheidenden Beitrag leisten (van den Oever et al. 2010).

Vor allem ein Ungleichgewicht zwischen Schädigung der Gefäße und deren Reparatur von Seiten des Organismus steht bei der Endothelialen Dysfunktion im Vordergrund. Hierbei können unterschiedliche Zellarten betroffen sein: Bei den Makroangiopathien sind vor allem die endothelialen Zellen (EC) und glatten Gefäßmuskelzellen, *vascular smooth muscle cells*, (VSMCs) beteiligt. Bei den Mikroangiopathien spielen die ECs, die

Perizyten (Retinopathie) und die Podozyten (Nephropathie) eine entscheidende Rolle (Orasanu und Plutzky 2009). Schwerwiegende Folgen dieser Veränderungen können eine herabgesetzte Dehnbarkeit und ein proinflammatorisches Stadium der Gefäße sein, was in einer erhöhten Verschlussgefahr der Gefäße endet. Mechanismen, die hierzu beitragen, sind unter anderem eine verminderte Stickstofffreisetzung und –empfindlichkeit, oxidativer Stress und die Produktion von *advanced glycation end-products* (AGEs). Letztere entstehen während Phasen einer Hyperglykämie bei Diabetes mellitus durch Akkumulation verschiedener Proteine im Plasma und in den Gefäßen (Endemann und Schiffrin 2004; Vlassara 1992; Zhang et al. 2003) (s. 1.2.2). Die Proteinkomplexe aktivieren durch Bindung an einen spezifischen Rezeptor auf der endothelialen Oberfläche den Transkriptionsfaktor *Nuclear factor kappa B* (NF- $\kappa$ B). Diese Aktivierung führt zur Entstehung von freien Radikalen und Erhöhung von TNF $\alpha$  (Wright et al. 2006). Neovaskularisation ist ebenso ein wichtiger Bestandteil, welcher in versorgenden Gefäßen eine Entstehung von Arteriosklerose fördern kann. Als schützende Zellen in diesem Zusammenhang wurden Endogene Progenitor Zellen (EPC) identifiziert, die zur Regeneration des Endotheliums beitragen. Dieser Zusammenhang könnte ein wichtiger Bestandteil in der Pathophysiology der Endothelialen Dysfunktion sein. Im Rahmen des DMT2 wurden EPCs vermindert nachgewiesen (Cubbon et al. 2007; Endemann und Schiffrin 2004).

#### 1.4 Apoptose und die Rolle von TNF $\alpha$

Die Auswirkung von Diabetes auf die Gefäßentwicklung und auf intravasale Umbauprozesse im klinischen Alltag ist enorm (S. 1.3). Hohe Glukosekonzentrationen fördern die Apoptose in Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVECs) *in vitro* und können zu vaskulären Schäden führen (Baumgartner-Parzer et al. 1995). *Vascular endothelial growth factor* (VEGF) hingegen ist ein schützender Faktor vor Apoptose in HUVECs und wird bei hohen Glukosekonzentrationen vermindert gebildet. Dies bedeutet, dass niedrige Konzentrationen von VEGF die Entstehung der Endothelialen Dysfunktion bei Diabetes begünstigen und VEGF in hohen Konzentrationen einen protektiven Faktor für die Gefäße darstellt (Yang et al. 2008).

Apoptose, oder auch programmierter Zelltod genannt, ist ein kontrollierter physiologischer Vorgang des Organismus um überflüssige Zellen zu eliminieren. Dies ist unter anderem dann notwendig, wenn alte Zellen ihre Funktion nicht mehr gewährleisten können oder der Körper eine Zelle als „krank“ oder „mutiert“ erkennt. Bei der Apoptose wird die Zelle aus ihrem ursprünglichen Gewebe ausgestoßen und abgeschnürt. Sie schrumpft und kondensiert bis der Rest der Zelle schließlich von Makrophagen phagozytiert wird. Es handelt sich hierbei nicht um eine Entzündung oder einen unkontrollierten Prozess wie er bei der Nekrose vorliegen würde (Raff 1998), sondern ist ein kontrollierter Vorgang der Körpers.

Apoptose ist ein wichtiger Bestandteil der embryonalen Entwicklung und des adulten Alters. Im gesunden Zustand stehen Apoptose und Proliferation neuer Zellen im



Gleichgewicht. Bei Krankheiten (z.B. Krebs) kann diese Balance gestört sein und mutierte Zellen proliferieren (van den Oever et al. 2010).

Die Apoptose kann durch unterschiedliche Wege eingeleitet werden. Über extrinsische Signale binden Liganden an spezifischen Rezeptoren. Dies führt zu einer Aktivierung zytotoxischer T-Lymphozyten wie es bei Viruserkrankungen der Fall sein kann. Über den intrinsischen Weg kann Apoptose durch zellulären Stress induziert werden, der beispielsweise durch freie Radikale oder eine verminderte Konzentrationen an VEGF zu Stande kommt.

Einer der wichtigsten Stimuli der Apoptose ist TNF $\alpha$ . TNF $\alpha$  ist ein pleiotropes Zytokin, welches von vielen Zelltypen im Körper hergestellt werden kann. Es kann beispielsweise über eine Bindung an seinen Rezeptor eine Kaskade aktivieren, die innerhalb von kürzester Zeit zum programmierten Zelltod führt. Eine andere Wirkung des Zytokins ist eine verminderte Insulin-vermittelte Glukose-Aufnahme in die Zelle durch Effekte auf den Glukose-Transporter (Coppack 2001). Dies sind nur wenige Gründe warum TNF $\alpha$  heutzutage mit vielen Erkrankungen wie z.B. Diabetes mellitus, Rheumatoide Arthritis, Morbus Crohn assoziiert wird und als der wichtigste Entzündungsmediator angesehen wird (Parameswaran und Patial 2010). Auch die Entstehung von Arteriosklerose wird mit TNF $\alpha$  in Verbindung gebracht, da eine vermehrte Produktion des Zytokins bei diesem Umbauprozess der Arterien nachgewiesen wurde (Tipping und Hancock 1993). Zusätzlich zeigte eine Studie von Michlewska und Kollegen, dass TNF $\alpha$  ebenso eine wichtige Rolle bei der Efferozytose (das Eliminieren toter Zellen von Phagozyten) spielt, indem es neutrophile Zellen hemmt und somit eine Entzündungslösung behindert (Michlewska et al. 2009).

## **1.5 Signaltransduktion und der Einfluss der Jun-amino-terminal-Kinase (JNK) auf die DLK**

### **1.5.1 Der Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Weg**

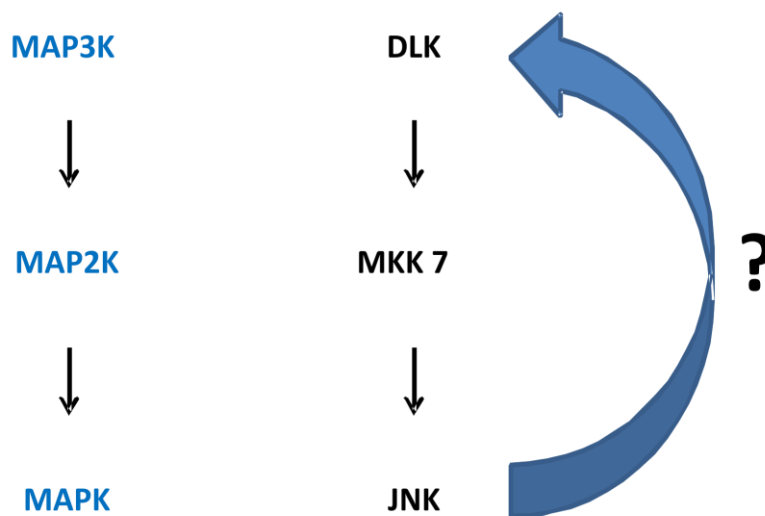
Der Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Weg (MAPK-Weg) ist ein wichtiger Bestandteil der Zellkommunikation bei Säugetieren und stellt eine komplexe Signalkaskade dar. Er existiert in allen eukaryonten Organismen und regelt verschiedenste zelluläre Abläufe. Ohne ihn könnten Vorgänge wie Mitose und Zellproliferation, Apoptose oder der metabolische Stoffwechsel nicht stattfinden (Gallo und Johnson 2002).

Der Signalweg besteht aus einem Drei-Modul-Modell, das von extrazellulären Reizen wie Strahlung oder Zytokinen angeregt werden kann (Chang und Karin 2001). Die Kaskade beinhaltet drei hintereinander geschaltete Kinasen, die sich nacheinander phosphorylieren und somit in einen aktivierten Zustand gelangen. Durch die genannten Einflüsse wird zunächst die MAPKK-Kinase (MAP3-Kinase) phosphoryliert, welche die MAPK-Kinase (MAP2-Kinase) aktiviert. Diese phosphoryliert im Anschluss die MAP-Kinase (MAP-Kinase) (Chang und Karin 2001; Robinson und Cobb 1997).



TNF $\alpha$  DLK direkt aktiviert, was die Bedeutung der DLK betont (Klimpel 2010). Zusätzlich ist die JNK-Aktivität bei Adipositas erhöht, was unter diesen Umständen bei Patienten in einer Insulinresistenz enden kann (Hirosumi et al. 2002). Untersuchungen weisen hin, dass durch eine zielgerichtete Hemmung von JNK die Apoptose von  $\beta$ -Zellen verhindert und dadurch die Insulinwirkung verbessert werden kann. Dies könnte ein Grundbaustein möglicher Therapieoptionen sein (Ammendrup et al. 2000; Kaneto et al. 2004).

Dass JNK durch Zytokine und mechanischen Stress in  $\beta$ -Zellen aktiviert werden kann und daher mit einer IL-1 $\beta$ -induzierten Apoptose endet, wurde schon mehrfach beschrieben (Abdelli et al. 2007). Gilt dies jedoch auch für endotheliale Zellen? Studien zeigen, dass das Endothelium an einer akuten Doppelstrang-DNA-induzierten Entzündungsreaktion beteiligt ist. Diese immunologische Reaktion ist JNK-abhängig und fördert die Sekretion von TNF $\alpha$  (Patel et al. 2011). Des Weiteren wurde gezeigt, dass JNK in kultivierten cerebralen endothelialen Zellen exprimiert wird und maßgeblich an der Entstehung von Schlaganfällen beteiligt ist (Wallace et al. 2012). Tatsächlich bestehen Hinweise darauf, dass JNK eine wichtige Rolle bei der Apoptoseinduktion in endothelialen Zellen übernimmt (Karahashi et al. 2009). In HUVECs ist JNK sowohl in der Entstehung von Arteriosklerose als auch im Apoptosevorgang beteiligt (Wang et al. 2011). JNK spielt ebenfalls in der diabetischen Retinopathie und somit in der Neovaskularisation eine entscheidende Rolle. Die Inhibition von JNK bewirkt eine verminderte VEGF-Expression und somit eine Verbesserung der Retinopathie (Guma et al. 2009). Umso wichtiger ist es zu verstehen, welchen Einfluss der JNK-Signalweg auf die endothelialen Zellen bei Diabetes mellitus ausübt und ob er eventuell eine regulierende Funktion auf die DLK besitzt, die als MAP3-Kinase die JNK-Signaltransduktion aktiviert.



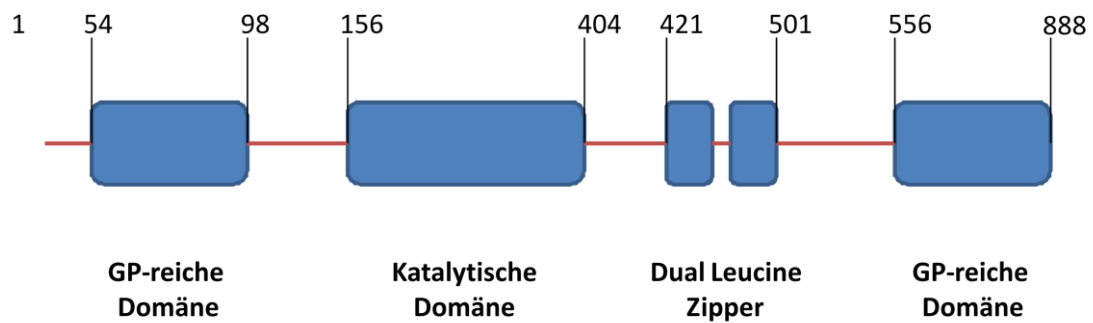
**Abb. 1.3 Schematische Darstellung des Einflusses von JNK auf DLK**

*DLK: Dual-Leucine-Zipper-Kinase, MKK: MAPK-Kinase, JNK: c-Jun-amino-terminal-Kinase.*

## 1.6 DLK und der Einfluss von JNK auf ihre Aktivität

### 1.6.1 DLK

Die DLK gehört zu der Familie der MAP3-Kinasen und ist somit in den komplexen MAPKinase-Weg involviert. 1994 wurde die DLK entdeckt und kloniert. Holzmann et al. fanden ein aus 888 Aminosäuren (AS) bestehendes Protein mit einer apparenten Masse von 130 kDa (rechnerisch 96 kDa), welches aus Mäusenieren isoliert werden konnte. Die DLK gehört zu den Serin-Threonin-Kinasen. Sie besitzt ihre katalytische Domäne zwischen den Aminosäuren (AS) 156 und 404. Ihre zwei Leucine-Zipper, die zwischen den AS 421 und 501 liegen und durch ein kurzes Zwischenstück voneinander getrennt sind, ermöglichen es, Homodimere zu bilden und dadurch zu autophosphorylieren. Sowohl das N-terminale als auch das C-terminale Ende besitzen Glycin- und Prolinreiche Sequenzen (Holzman et al. 1994). Die ATP-Bindungsstelle ist an AS 185 (Lysin) lokalisiert. Somit ist Lysin an dieser Stelle für die katalytische Aktivität verantwortlich. Manuel Wallbach, ein Mitglied unserer Arbeitsgruppe, hat herausgefunden, dass die DLK eine zweigeteilte Kernerkerungssequenz besitzt. Diese liegt zwischen den AS 186 und 200 (Wallbach 2010).



**Abb. 1.4 Schematische Darstellung der Primärstruktur der DLK**

GP steht für Glycin-Prolin-reiche Domäne innerhalb der DLK. Die Zahlen repräsentieren die jeweiligen Aminosäurestellen (modifiziert nach Holzman et al. 1994, S. 30813).

Nach der Entdeckung der DLK von Holzman et al. wurde in verschiedenen Studien die Expression der DLK in zahlreichen menschlichen Geweben bestätigt. Es wurde gezeigt, dass DLK in Nervenzellen exprimiert wird und dort im Nucleus und in den synaptischen Enden wichtige, vielseitige Funktionen übernimmt (Mata et al. 1996). Es wurde einerseits gezeigt, dass die DLK eine entscheidende Rolle für die Axonregeneration darstellt (Shin et al. 2012), andererseits spielt sie beim Nervenuntergang via JNK-Aktivierung eine Schlüsselrolle (Ghosh et al. 2011). Die Spezifität hängt unter anderem von der Interaktion mit dem Gerüstprotein JIP-3 ab (s. 1.6.2, S.11).

Die Besonderheit der DLK ist, dass sie durch ihre Leucine-zipper-Domäne eine Dimerisierung hervorruft. Dieser Dimerisierung folgt eine Autophosphorylierung, was bedeutet, dass DLK eine autokatalytische Aktivität besitzt (Gallo und Johnson 2002). Studien belegen, dass sie in vivo autophosphoryliert und unter reduzierten Bedingungen bei 130 kDa in einer SDS-PAGE migriert (Mata et al. 1996). Außerdem wurde gezeigt, dass eine Punktmutation von Lysin in Alanin an der Aminosäurestelle 185 (Mutante K185A) eine Verhinderung der ATP-Bindung nach sich zieht und somit die Kinase inaktiviert wird (Mata et al. 1996).

Es wurde gezeigt, dass DLK in der Betazelllinie HIT-T15 und in primären Maus-Inseln exprimiert wird (Jhala et al. 2003; Oetjen et al. 2006). Dort inhibiert sie die Aktivierung des Transkriptionsfaktors *cyclic AMP response element-binding protein* (CREB), welcher die  $\beta$ -Zellen vor Apoptose schützt (Oetjen et al. 2006). Unveröffentlichte Studien unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass die DLK in primären Maus-Inseln sowohl im Nucleus als auch im Zytoplasma vorliegt. Infolgedessen könnte die DLK für die Betazellregulation von Bedeutung sein, die Betazellapoptose induzieren (Oetjen et al. 2006; Plaumann et al. 2008) und in der Entstehung des Diabetes mellitus eine Schlüsselrolle spielen.

## 1.6.2 Der Einfluss von JNK auf DLK

DLK induziert die Aktivierung von JNK. Ein Knockdown der DLK führt zu einer verminderten Aktivierung von JNK (Eto et al. 2010). Die Phosphorylierung von JNK und

deren Substraten fördert durch eine positive Rückwärtsschleife die Aktivierung von DLK (Hirai et al. 2006; Xu et al. 2005).

Im inaktiven Zustand ist DLK an das Gerüstprotein JIP1 (*JNK-interacting protein*) gebunden. Diese Bindung geschieht unabhängig von der katalytischen Aktivität der Kinase (Nihalani et al. 2000). Die Assoziation von JNK an JIP, und somit die Phosphorylierung von JIP an Threonin-103, bewirkt eine verminderte Affinität von JIP zu DLK. Das Ablösen von DLK von JIP führt zur Dimerisierung, Autophosphorylierung und Aktivierung der DLK. JNK fördert dadurch die Aktivierung von DLK. (Nihalani et al. 2000; Nihalani et al. 2001; Nihalani et al. 2003).

Ob das Gerüstprotein JIP in endothelialen Zellen exprimiert wird und dieser Mechanismus auch in Gefäßzellen stattfindet, ist bisher noch unklar.

## 1.7 Zielsetzung

All diese Daten erläutern die Wichtigkeit und Dringlichkeit neue Therapieoptionen für Diabetes mellitus und dessen vaskulären Folgen zu entwickeln und zu testen. Trotz der schwerwiegenden Folgen der Zuckerkrankheit ist noch nicht vollkommen geklärt wie es im Rahmen des DM zu Gefäßschädigungen kommt. In der vorliegenden Arbeit sollte die Rolle der DLK in endothelialen Zellen und die Wirkung einer prädiabetischen Stoffwechsellage auf die Angiogenese in einem Mausmodell untersucht werden.

Die Untersuchungen sollten in drei Teile gegliedert:

- 1.) Untersuchung der Expression und Regulation der DLK in endothelialen Zellen
- 2.) Herstellung der Adenoviren Ad-DLK-wt und Ad-DLK-K185A, die in der Arbeitsgruppe für zukünftige Untersuchungen verwendet werden
- 3.) Untersuchung der Angiogenese bei heterozygoten DLK-Mäusen unter Diät-induzierter Adipositas

Die Methoden der Untersuchungen umfassen die Kultivierung von primären HUVEC-Zellen umfassen, die Herstellung zweier rekombinanter Adenoviren und die Durchführung von Immunoblotanalysen. Zusätzlich sollten in einem Tierversuch an Gefrierschnitten histologische Analysen durchgeführt werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

##### 2.1.1.1 Geräte

Analysewaage	Sartorius Göttingen
Autoclav Systec Vx150	Systec, Wettenberg
AxioCam MRm	Carl Zeiss AG, Deutschland
AxioImager.Z1	Carl Zeiss AG, Deutschland
Bakterieninkubator 37°C	Heraeus, Langenselbold
Beckman J2HS Zentrifuge	Beckman, München
Beckmann L8-70M Ultrazentrifuge	Beckman, München
Bioclav	Schütt, Göttingen
Biofuge pico	Heraeus Sepatech, Langenselbold
Blot-Kammer	Amersham Bioscience, Freiburg
Biometra® Standard Power Pack P25	Biometra, Göttingen
Certomat®HK Temperaturregulierer	Sartorius, Göttingen
Certomat®R Schüttelplattform	Sartorius, Göttingen
CO <sub>2</sub> -Inkubator STERI CULT 200	Forma Scientific Inc., San Bruno, USA
Electrophorese Kammer SE 600	Hofer Scientific Instruments, San Francisco, USA
Eppendorf Zentrifuge 5417R	Eppendorf AG, Hamburg
Feinwaage	Sartorius, Göttingen
GelDoc™ XR Molecular Imager	Bio-Rad, München
Glukose-Messgerät	Bayer, Leverkusen
HbA1c-Messgerät	Bayer, Leverkusen
Innova™4300 Incubator	New Brunswick Scientific GmbH, Nürtingen
Inverses Mikroskop TMS-F	Nikon, Tokio, Japan

Megafuge 1.0	Heraeus Sepatech, Langensfeld
MicroPulser™	Bio-Rad, München
Mighty Small™ Dual gel caster SE 245	Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, USA
Nano Drop™	peqLab, Erlangen
pH-Meter	inoLab, Weilheim
Pipetten (10 µl / 20 µl / 200 µl / 1 000 µl)	Eppendorf AG, Hamburg
Pipetus®-akku	Hischmann Laborgeräte, Eberstadt
Rocking platform	Biometra, Göttingen
Schüttelgerät	Jahnke & Kunkel, IKA® Labortechnik, Staufien
Sigma 3K30 Kühlzentrifuge	Sigma, Osterode am Harz
Spektralphotometer UV-160	Shimadzu GmbH, Duisburg
SteriGard Zellkulturbank	The Baker Company Inc., Stanford, USA
Thermomixer compact	Eppendorf AG, Hamburg
Transilluminator Biometra Ti1	Biometra, Göttingen
VersaDoc™ Molecular Imager	Bio-Rad, München
Wasserbad	Köttermann Labortechnik, Hänigsen
Zeiss Axiovert 200 Mikroskop	Carl Zeiss AG, Oberkochen

### 2.1.1.2 Verbrauchsmaterialien

10 cm-Agar-Platten	Greiner Bio One, Solingen
6-well-Platte	Sarstedt, Nümbrecht
96-well-Platte	Nunc, Roskilde, Dänemark
BD Falcon™-Röhrchen (15 ml / 50 ml)	Schuett24 GmbH, Göttingen
BD Falcon™-Zellkulturschalen (6 cm / 10 cm / 15 cm)	Schuett24 GmbH, Göttingen
Dialysierschlauch	Invitrogen, Karlsruhe
Deckgläschen	Thermo Scientific, Braunschweig
Einfrierröhrchen	Nunc, Roskilde, Dänemark
Elektroporationsküvette (1 mm/ 2 mm)	peq Lab, Erlangen



Eppendorf-Reaktions-Gefäße (200 µl / 1,5 ml / 2 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Filter Minisart (200 µm)	Sartorius, Göttingen
Glukose-Sticks	Bayer, Leverkusen
Handschuhe	Paul Hartmann AG, Heidenheim
Kanülen (20 G / 27 G)	Braun, Melsungen
Keto-Diabur-Sticks	Roche, Deutschland
Kunststoffküvetten (1 cm)	Sarstedt, Nümbrecht
Labortücher	Kimberly-Clark, Reigate, UK
Mikrowelle MWS 2820	Bauknecht, Stuttgart
Nitrozellulosemembran (Hybond ECL™)	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
Objektträger	Thermo Scientific, Braunschweig
Parafilm® M	Brand GmbH & Co KG, Wertheim
Pasteurpipetten	Brand, Wertheim
Pipettespitzen (10 µl)	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettenspitzen (200 µl, 1 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Serologische Pipetten (5 ml / 10 ml / 25 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Spritzen (5 ml)	Braun, Melsungen
Ultrazentrifugenröhrchen	Beckman, München
Whatmanpapier	Schleicher und Schüll, Dassel
Zellschaber	Sarstedt, Nümbrecht

## 2.1.2 Biologische und chemische Materialien

### 2.1.2.1 Chemikalien

AB-Diluent	DAKO GmbH, Hamburg
Acrylamid	AppliChem, Darmstadt
Aceton	AppliChem, Darmstadt
Agarose	Invitrogen, Karlsruhe
Amoniumpersulfat (APS)	AppliChem, Darmstadt
Borsäure	AppliChem, Darmstadt
Bovine Serum Albumine (BSA, Albumin Fraktion V)	AppliChem, Darmstadt

---

Cäsiumchlorid (CsCl)	AppliChem, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	AppliChem, Darmstadt
Eisessig	AppliChem, Darmstadt
Ethanol	AppliChem, Darmstadt
Ethidiumbromid	AppliChem, Darmstadt
Forene 100 %	Abbott, Wiesbaden
Gelatine	Sigma-Aldrich, Steinheim
Glucose	AppliChem, Darmstadt
Glycerin (87 %)	AppliChem, Darmstadt
Glycin	AppliChem, Darmstadt
Salzsäure (HCl)	AppliChem, Darmstadt
H <sub>2</sub> O, steril	Braun, Melsungen
Hepes	AppliChem, Darmstadt
Hefeextrakt	AppliChem, Darmstadt
Isofluran	Baxter, Unterschleißheim
Isopentan	Sigma-Aldrich, Steinheim
Isopropanol	AppliChem, Darmstadt
Kaliumchlorid (KCl)	AppliChem, Darmstadt
Kaliumacetat (C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> KO <sub>2</sub> )	Merck, Darmstadt
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	AppliChem, Darmstadt
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	AppliChem, Darmstadt
Magermilchpulver	AppliChem, Darmstadt
Matrigel	BD Biosciences, Heidelberg
METAFACTENE <sup>®</sup> EASY	Biontex Laboratories GmbH, Martinsried
Methanol	AppliChem, Darmstadt
MgCl <sub>2</sub>	AppliChem, Darmstadt
MgSO <sub>4</sub>	AppliChem, Darmstadt
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> *H <sub>2</sub> O	AppliChem, Darmstadt
NaCl	AppliChem, Darmstadt
NaOH	AppliChem, Darmstadt
NP-40	AppliChem, Darmstadt
PEG 6 000	AppliChem, Darmstadt
Pepton	AppliChem, Darmstadt
Phenol	Sigma-Aldrich, Steinheim

Select-Agar	AppliChem, Darmstadt
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	AppliChem, Darmstadt
$\beta$ -Mercaptoethanol	AppliChem, Darmstadt
TEMED	AppliChem, Darmstadt
OCT <sup>TM</sup> Compound	TissueTek Sakura, Staufen
Tris	AppliChem, Darmstadt
Triton-X-100	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tween 20	AppliChem, Darmstadt
VectaShield – with DAPI	LINARIS Biologische Produkte GmbH, Wertheim

### 2.1.2.2 Enzyme

Trypsin/EDTA-Lösung	GIBCO BRL, Karlsruhe
RNAse A (10 mg / ml)	Quiagen, Hilden

Restriktionendonuklease:

PacI (10 U /  $\mu$ l) NEB, Frankfurt a. M.

PacI wurde bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert und in Kombination mit dem empfohlenen Puffer (10 x) und BSA (10 x) entsprechend dem Herstellerhinweis verwendet.

### 2.1.2.3 Puffer und Stammlösungen

Acrylamid 30 %	29,2 g Acrylamid und 0,8 g Bisacrylamid wurden abgewogen und in 100 ml $\text{H}_2\text{O}$ gelöst. Lagerung bei $4^{\circ}\text{C}$ .
Ampicillin 5 %	500 mg Ampicillin wurden in 10 ml $\text{H}_2\text{O}$ gelöst, aliquotiert und bei $-20^{\circ}\text{C}$ eingefroren.
Ammoniumpersulfat 10 %	1 g Ammoniumpersulfat wurden in 10 ml $\text{H}_2\text{O}$ gelöst. Lagerung bei $-20^{\circ}\text{C}$ .
Borsäure 2 M	MG = 61,83; 61,83 g Borat wurden in 50 ml $\text{H}_2\text{O}$ gelöst und bei RT gelagert.
EDTA 0,5 M	MG = 372,24; 46,53 g EDTA wurden in 250ml $\text{H}_2\text{O}$ gelöst, die Lösung wurde mit 2 N NaOH auf einen pH-Wert von 8,0 titriert. Die Lagerung erfolgte bei RT.
Glucose 0,5 M	MG = 180,16; 9 g Glucose wurden in 100 ml $\text{H}_2\text{O}$ gelöst. Lagerung bei RT.
Glycin 200 mM	MG = 75,07; 7,51 g Glycin wurden in 500 ml $\text{H}_2\text{O}$ gelöst. Lagerung bei RT. Der pH-Wert wurde mit HCL auf 2,5 titriert.

HCL 6 N	H <sub>2</sub> O wurde vorgelegt und das gleiche Volumen an konzentrierter HCL hinzugefügt. Die Lagerung erfolgte bei RT.
HEPES 0,5 M	MG = 238,31; 11,91 g HEPES wurden in 100 ml H <sub>2</sub> O gelöst und mit 10 N NaOH auf den pH-Wert von 7,5 eingestellt. Lagerung bei RT.
Kanamycin 5 %	500 mg Kanamycin wurden in 10 ml H <sub>2</sub> O gelöst, aliquotiert und bei -20°C gelagert.
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1 M	MG = 136,09; 6,81 g K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> wurden in 50 ml H <sub>2</sub> O gelöst. Lagerung bei RT.
MgCl <sub>2</sub> 1 M	MG = 203,3; 20,33 g MgCl <sub>2</sub> wurden in 100 ml H <sub>2</sub> O gelöst. Lagerung bei RT.
MgSO <sub>4</sub> 1 M	MG = 246,48; 24,648 g MgSO <sub>4</sub> wurden in 100 ml H <sub>2</sub> O gelöst. Lagerung bei RT.
NaCl 5 M	MG = 58,44; 292,2 g NaCl wurden in 1 l H <sub>2</sub> O gelöst. Lagerung bei RT.
NaOH 2 N	MG = 39,99; 79,994 g wurden vorsichtig in 1 l H <sub>2</sub> O gelöst. Lagerung bei RT.
Nonidet P-40 10 %	10 ml NP-40 wurden in 100 ml H <sub>2</sub> O gelöst. Lagerung bei RT.
SDS-Lösung 10 %	1 g SDS wurde in 10 ml H <sub>2</sub> O gelöst. Lagerung bei RT.
Tris 1 M	MG = 121,14; 60,57 g Tris wurden in 500 ml H <sub>2</sub> O gelöst, die Lösung wurde mit HCl auf verschiedene pH-Werte eingestellt (pH 6,8 / pH 7,4 / pH 7,5 / pH 8) Lagerung bei RT.
Triton X-100 10 %	10 ml Triton X-100 wurden mit 90 ml H <sub>2</sub> O vermischt. Lagerung bei RT.

#### 2.1.2.4 Kits

Bio-Rad Bradford Protein Assay

Bio-Rad, München

#### 2.1.2.5 Antikörper

Primäre Antikörper, die für Western Blots genutzt wurden:

Name	Spezies	Klon	Hersteller/Referenz
DLK	Kaninchen	Polyklonal	Holzman et al. 1994
Phospho-DLK	Kaninchen	Polyklonal	in der Arbeitsgruppe hergestellt
GAPDH	Kaninchen	Monoklonal	Cell Signaling Inc. Beverly, USA
JNK	Kaninchen	Polyklonal	Cell Signaling Inc. Beverly, USA
Phospho-JNK	Maus	Monoklonal	Cell Signaling Inc. Beverly, USA
PECAM-1	Maus	Monoklonal	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland

Sekundäre Antikörper, die für Western Blots genutzt wurden:

Name	Markierung	Herkunft	Hersteller
anti-Maus-IgG-HRP	Meerrettich-Peroxidase	Schaf	GE Healthcare Buckinghamshire, UK
anti-Kaninchen-IgG-HRP	Meerrettich-Peroxidase	Esel	GE Healthcare Buckinghamshire, UK
MFP555 goat anti-rat IgG	Fluorescein	Ziege	MoBiTec, Göttingen, Deutschland

#### 2.1.2.6 Antibiotika

Penicillin (10000 U / ml)	GIBCO, BRL, Karlsruhe
Streptomycin (10000 µg / ml)	GIBCO, BRL, Karlsruhe
Kanamycin	AppliChem, Darmstadt

#### 2.1.2.7 Inhibitoren

Cycloheximid Translationshemmstoff	Sigma-Aldrich, Steinheim
JNK-Inhibitor SP600125	Calbiochem, San Diego, USA

#### 2.1.2.8 Signalstoffe

TNF-alpha, human	PromoKine, Heidelberg
Leptin, human	PromoKine, Heidelberg
VEGF121-Sf9, human	PromoKine, Heidelberg

#### 2.1.2.9 Nachweissystem

ECL <sup>TM</sup> Western Blotting Analysis System	GE Healthcare Buckinghamshire, UK
--	--------------------------------------

Immun-Star™WesternC™Chemiluminescent Kit

Bio-Rad, München

### 2.1.2.10 Molekulargewichtsmarker

#### 2.1.2.10.1 Protein

Molekulargewichtsmarker werden verwendet um die Größe von Proteinen abzuschätzen. Sie stellen eine Mischung dar aus Proteinen, deren Molekulargewicht und daraus ihr Migrationsverhalten bekannt sind. Sie sind farblich markiert, so dass man sie mit den jeweiligen zu untersuchenden Proteinen der eigentlichen Probe vergleichen kann. Sie ergeben somit einen Anhaltspunkt für ihre Migration und Identifizierung.

Als Molekulargewichtsmarker für die SDS-Polyacrylamidgele wurde der PageRuler™ PlusPrestained Protein Ladder (Fermentas, St.Leon-Rot) verwendet.

#### 2.1.2.10.2 DNA

Im Falle der Agarosegelelektrophorese bestehen die Größenmarker aus bekannten DNA-Fragmenten. Hierfür wurde der Größenmarker PageRuler™ 1 kb DNA Ladder (Fermentas, St. Leon-Rot) verwendet.

### 2.1.2.11 Medienbestandteile und Seren

#### 2.1.2.11.1 Zellkultur

DMEM Medium GIBCO

Invitrogen, Karlsruhe

Fötales Kälberserum

GIBCO BRL, Karlsruhe

Endotheliales Zellmedium

PromoCell, Heidelberg

SupplementPack

PromoCell, Heidelberg

#### 2.1.2.11.2 Bakterienkultur

Select-Agar

AppliChem, Darmstadt

Select Hefeextrakt

AppliChem, Darmstadt

Select Pepton

AppliChem, Darmstadt

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Arbeiten mit Nukleinsäuren

#### 2.2.1.1 Bestimmung von Konzentration der DNA

Die Konzentrationsbestimmung der DNA erfolgte spektralphotometrisch durch Extinktionsmessung bei 260 nm (OD260). Sie leitet sich vom Lambert-Beerschen Gesetz

ab. Eine DNA-Konzentration von 50 µg/ml ergibt sich bei einer Extinktion von 1,0. Daraus ergibt sich  $c = E \times K \times d^{-1}$ , und es lässt sich folgende Formel ableiten:

$$C_{\text{DNA}} (\mu\text{g/ml}) = OD_{260} \times 50 \mu\text{g/ml} \times \text{Verdünnungsvektor}$$

**Abb. 2.1: Konzentrationsbestimmung von DNA**

Nimmt man das Absorptionsmaximum von Proteinen, bei welchem die Extinktion bei 280nm gemessen wird, dann kann aus dem Verhältnis  $OD_{260}/OD_{280}$  die Reinheit der DNA berechnet werden. Der Quotient sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen (Sambrook et al. 1989).

### 2.2.1.2 Agarose-Gelelektrophorese

Durch die Agarose-Gelelektrophorese lassen sich DNA in linearisierte DNA-Fragmente anhand ihres Molekulargewichts auftrennen. Dazu wird ein elektrisches Feld angeschlossen und die einzelnen DNA-Fragmente wandern von der Kathode zur Anode. Der prozentuale Anteil der Agarose ist abhängig von der Größe der zu laufenden DNA. Um eine Fragmentgröße zwischen 500 und 10000 bp darzustellen, wurde ein 0,8 % Gel gewählt. Dazu wurde die Agarose kurz mit TAE-Puffer versetzt und in der Mikrowelle aufgeköcht. Anschließend wurde die Lösung auf ca. 50°C abgekühlt, mit Ethidiumbromid versetzt (0,5 µl / 20 ml) und in einen Gelschlitten mit dem passenden Kamm gegossen. Anschließend polymerisierte das Gel bei RT. Das polymerisierte Gel wurde in eine Elektrophoresekammer mit TAE-Puffer gelegt. Dabei war darauf zu achten, dass das Gel vollständig mit TAE-Puffer benetzt war. Zu den DNA-Proben wurden 6x-Loadingpuffer gegeben und in die Geltaschen pipettiert.

Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte bei einer Spannung von 80 V. Das in den DNA-Fragmenten interkalierte Ethidiumbromid wurde mit UV-Licht einer Wellenlänge von 254 oder 366 nm sichtbar gemacht. Das Ergebnis wurde mit Hilfe des Geldoc<sup>TM</sup> XR Molecular Imagers und der Image Software von Bio Rad (München) dokumentiert.

TAE Puffer	1x	1l
Tris	40 mM	4,84 g
EDTA	1 mM	2 ml von 0,5 M Stammlösung
Eisessig	20 mM	1,14 ml

### 2.2.1.3 Restriktionsenzymatische Spaltung von Nukleinsäuren

Um zu überprüfen, ob die Bakterien das richtige Plasmid aufgenommen und amplifiziert haben, wird die DNA mittels Restriktionsendonukleasen analysiert. Diese sind bakterielle Enzyme, die DNA an spezifischen Schnittstellen in Fragmente schneiden, sodass DNA-Bruchstücke definierter Länge vorliegen. Das Trennen erfolgt durch Spaltung von

Phosphodiesterbindungen. Diese Methode kann sowohl zur Sichtbarmachung anderer DNA-Fragmente als auch zur Überprüfung der Reinheit der DNA verwendet werden, da die Effizienz der Restriktionsenzyme von der Reinheit abhängig ist. Die hier verwendete Endonuklease ist Pac I mit einer Konzentration von 10 U/ $\mu$ l. Eine Unit ist die Enzymmenge, die bei 37°C 1 $\mu$ g DNA pro Stunde umsetzt.

<u>Restriktionsverdau</u>	<u>50 <math>\mu</math>l</u>
Gewünschtes DNA-Plasmid	5 $\mu$ l
Pac I	1 $\mu$ l
Pac I -Puffer	5 $\mu$ l
10 x BSA	5 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O bidest.	34 $\mu$ l

Der Verdau wurde für 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach vollständigem Verdau konnten die Proben mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert werden.

#### 2.2.1.4 Herstellung antibiotikahaltiger Agarplatten

<u>LB-Medium</u>	<u>1l</u>
NaCl	1 % 10 g
Pepton	1 % 10 g
Hefeextrakt	0,5 % 5 g
Select-Agar	1,5 % 15 g
H <sub>2</sub> O bidest.	1l

+Antibiotikum 50 mg / ml 1 ml der 5% Stammlösung

Das LB-Medium wurde für 1 Stunde bei 120 °C und 10<sup>5</sup> Pa autoklaviert und auf 60 °C abgekühlt. Das Antibiotikum Kanamycin wurde zur Selektion resistenter Klone in gewünschter Konzentration hinzugegeben und das flüssige Medium auf 10cm-Platten verteilt. Die Platten wurden bei RT stehen gelassen, sodass das Medium fest werden konnte. Die Aufbewahrung der Platten erfolgte bei 4°C.

#### 2.2.1.5 Transformation (mittels Elektroporation) kompetenter Bakterien

Als Elektroporation versteht man das Einbringen von DNA in prokaryontische Zellen mittels Stromschock. Dazu wird ein elektrisches Feld angelegt um die Zellmembran permeabel für verschiedenen Substanzen zu machen.

Elektrokompetente E.coli-Bakterienzellen vom Stamm Top 10 wurden bei -80°C gelagert und für die Elektroporation auf Eis aufgetaut. Es wurden 100 ng der Plasmid DNA zu 20



– 30 µl Bakterien gegeben und vorsichtig vermischt. Diese Lösung wurde in eine 0,1cm-Küvette überführt und mittels des Bio Rad Micropulser für 4 Sekunden eine Spannung von 1,75kVolt bei 200 Ohm erzeugt. Diese Spannung führt zur Permeabilisierung der Membran. Danach wurde zu der Lösung 1 ml-LB-Medium gegeben und die Suspension in ein Eppendorf-Cup überführt. Anschließend inkubierte die Suspension für 1 Stunde bei 37°C.

In dieser Zeit wurde die LB-Agarplatte vorgewärmt. Nach der Inkubation wurde die Bakteriensuspension nochmal kurz vorsichtig vermischt für den Fall, dass sich die Bakterien während der Inkubation auf den Grund abgelagert haben. 100 µl dieser Suspension wurden mithilfe einer abgeflamnten, gebogenen Pasteurpipettenspitze auf der Agarplatte ausplattiert und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

Aufgrund des antibiotikaresistenz-codierenden Genes des elektroporierten DNA-Plasmids, wuchsen nur Bakterien, die das Plasmid aufgenommen haben.

Einzelne Kolonien konnten vorsichtig von der Agarplatte gepickt werden. Danach wurde eine Minipräparation durchgeführt.

### 2.2.1.6 Minipräparation von Plasmid-DNA

Im Regelfall wird eine Minipräparation durchgeführt um nach einer Klonierung von Plasmid-DNA jedes Konstrukt auf seine Korrektheit hin zu überprüfen. In diesem Fall wurde die Präparation zu Amplifikation des schon vorhandenen DNA-Plasmids genutzt. Nach der Mini-Präparation erhält man etwa 20 µg DNA pro Konstrukt.

<u>Puffer P1</u>		<u>100 ml</u>
Tris (pH= 8,0)	50 mM	5 ml von 1 M Stammlösung
EDTA (pH=8,0)	10 mM	2 ml von 0,5 M Stammlösung
frisch dazu gegeben:		
RNAse		100 µl/ ml Puffer P1
<u>Puffer P2</u>		<u>5 ml</u>
NaOH	0,2 N	1 ml von 1 N Stammlösung
SDS	1 %	500 µl von 10 % Stammlösung
<u>Puffer P3</u>		<u>20 ml</u>
C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> KO <sub>2</sub> (pH=5,5)	3 M	5,88 g

Alle Puffer wurden bei RT gelagert.

Es wurden 6-8 Einzelkolonien von den Agar-Platten in je 3 ml LB-Antibiotika-Medium in einem 15-ml-Falcon angeimpft. Diese Kultur wurde über Nacht bei 37°C in einem Schüttler bei 190 rpm inkubiert.

1,5 ml der Kultur wurden in ein 2-ml-Eppendorf-Cup überführt und für 2 min bei 4°C und 6000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand konnte verworfen werden und das Sediment mit den Bakterientrümmern wurde in 250 µl P1 gelöst. Anschließend wurden rasch 250 µl von P2 dazugegeben und vorsichtig vermischt. Hierbei ist darauf zu achten, dass dieser Vorgang innerhalb von 5 min erfolgte, da die DNA andernfalls denaturiert. Im Anschluss werden 300 µl / Probe von P3 hinzugegeben und ebenfalls sehr vorsichtig geschwenkt. Danach konnten die Proben bei 13000 rpm bei 4°C für 5 min zentrifugiert werden.

Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Cup überführt und mit 600 µl Isopropanol vermischt. Die Suspension wurde für 45 min bei -80°C kalt inkubiert und für 40 min bei 13000rpm bei 4 °C zentrifugiert. Es folgte eine Ethanol-Präzipitation.

### 2.2.1.7 Ethanolpräzipitation

Bei einer Ethanol-Präzipitation kann DNA oder RNA aus Lösungen gefällt werden.

Dazu wurde das Sediment zur Salz Entfernung in 1 ml eisgekühltem 100%-Ethanol gelöst. Danach wurde die Lösung bei 14°C und 13000 rpm für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Eppendorf-Cup zum Trocknen gelagert. Anschließend wurde das Pellet in jeweils 10 µl H<sub>2</sub>O bidest. gelöst und bei 4°C gelagert.

## 2.2.2 Zellkultur

### 2.2.2.1 Zelllinie HUVEC

HUVECs (Human umbilical vein endothelial cells) sind primäre humane umbilicale venöse endotheliale Zellen, die aus der normalen menschlichen Nabelschnurvene entnommen und cryokonserviert werden. Unter sterilen Zellkulturbedingungen überleben sie die 16. Passage. HUVECs gelten als Modell für Endothelzellen.

### 2.2.2.2 Zelllinie HEK-293A

Die HEK-Zelllinie, *human embryonic kidney-cells*, werden aus der menschlichen Niere gewonnen und sind hypotriploide Epithelzellen. Sie besitzen DNA-Anteile des menschlichen Adenovirus 5 (E1A und E1B), weshalb sie zur Herstellung von Adenoviren eingesetzt werden können.

### 2.2.2.3 Medien und Puffer

PBS	1x	1l
NaCl	140 mM	8g
KCl	2,5 mM	0,2 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	8,1 mM	1,44 g

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,5 mM	0,24 g
---------------------------------	--------	--------

Der pH-Wert wurde mit NaOH auf 7,4 eingestellt.

#### Endothel-Komplettmedium

Endothelial-Cell-Medium (Promocell)		495 ml
-------------------------------------	--	--------

SupplementPack (Promocell)

Penicillin/ Streptomycin	1 %	5 ml
--------------------------	-----	------

<u>DMEM-Komplettmedium 10%</u>		<u>500 ml</u>
--------------------------------	--	---------------

DMEM-Medium		445 ml
-------------	--	--------

Fötale Kälberserum	10 %	50 ml
--------------------	------	-------

Penicillin/ Streptomycin	1 %	5 ml
--------------------------	-----	------

Dieses Medium wurde für die Aufzucht und Kultivierung von HEKs verwendet.

<u>DMEM-Komplettmedium</u>	<u>0,5 %</u>	<u>500 ml</u>
----------------------------	--------------	---------------

DMEM-Medium		490 ml
-------------	--	--------

Fötale Kälberserum	0,5 %	2,5 ml
--------------------	-------	--------

BSA	0,5 %	2,5 ml
-----	-------	--------

Penicillin/ Streptomycin	1 %	5 ml
--------------------------	-----	------

Dieses Medium wurde für die Transfektion der HEKs mit dem Plasmid und die weitere Aufzucht des Adenovirus verwendet.

Die Medien wurden bei 4°C gelagert und 15 min vor Benutzung auf 37°C aufgewärmt.

Der PBS-Puffer wurde bei RT gelagert.

#### **2.2.2.4 Standardbedingungen und Kultivierung von HUVECs**

Beim Arbeiten mit HUVEC wurde auf sterile Arbeitsbedingungen geachtet. Die benötigten Lösungen und Medien wurden steril filtriert oder autoklaviert. Die Arbeit fand unter der sterilen Werkbank bei Laminarluft statt. Zu Beginn wurde eine hygienische Händedesinfektion durchgeführt und alle Glas- und Kunststoffmaterialien vor Einbringen unter die Werkbank mit 70 % Isopropanol abgesprüht und gereinigt.

Das Medium und die verwendeten Puffer wurden in einem Wasserbad auf 37°C erwärmt. Die mit den HUVEC-kontaminierten Materialien und Lösungen wurden nach Gebrauch gesondert entsorgt. Die HUVECs wurden bei 37°C, 95 % Luftfeuchtigkeit und unter 5 % CO<sub>2</sub>-Begasung im Inkubator kultiviert. Für die Kultur der Zellen wurden Falcon-Zellkulturschalen unterschiedlicher Größe verwendet: Für die Kultivierung wurden Zellkulturplatten von 15 cm und 10 cm Durchmesser, für die Transfektion Zellkulturschalen von 6cm Durchmesser verwendet. Das Wachstum der Zellen wurde regelmäßig unter einem inversen Mikroskop kontrolliert.

Als HUVEC-Kulturmedium diente Endothelial-Komplett-Medium. Einmal pro Woche wurden die HUVECs im Verhältnis 1:3 bis 1:4 gesplittet. Der Mediumwechsel erfolgte am Tag 3 oder 4 nach dem Ausplattieren.

Nach dem Splitten oder Mediumwechsel mussten die HUVECs für die folgenden 48 h in diesem Kulturmedium ohne weitere Manipulation bleiben. Für Versuche konnten jedoch verschiedene Reagenzien zu den gewünschten Zeitpunkten in das Medium zugegeben werden.

#### **2.2.2.5 Standardbedingungen und Kultivierung von HEKs**

Beim Arbeiten mit HEKs wurde auf sterile Arbeitsbedingungen geachtet. Die benötigten Lösungen und Medien wurden steril filtriert oder autoklaviert. Die Arbeit fand unter der sterilen Werkbank bei Laminarluft statt. Zu Beginn wurde eine hygienische Händedesinfektion durchgeführt und alle Glas- und Kunststoffmaterialien vor Einbringen unter die Werkbank mit 70 % Isopropanol abgesprüht und gereinigt.

Das Medium und die verwendeten Puffer wurden in einem Wasserbad auf 37°C erwärmt. Die mit den HEK-kontaminierten Materialien und Lösungen wurden nach Gebrauch gesondert entsorgt. Die HEKs wurden bei 37°C, 95 % Luftfeuchtigkeit und unter 5 % CO<sub>2</sub>-Begasung im Inkubator kultiviert. Für die Kultur der Zellen wurden Falcon-Zellkulturschalen unterschiedlicher Größe verwendet: Für die Kultivierung wurden Zellkulturplatten von 15 cm und 10 cm Durchmesser, für die Transfektion Zellkulturschalen von 6cm Durchmesser verwendet. Das Wachstum der Zellen wurde regelmäßig unter einem inversen Mikroskop kontrolliert.

Als HEK-Kulturmedium diente das DMEM-Komplettmedium 10 %. Alle drei Tage wurden die HEKs im Verhältnis 1:10 gesplittet.

#### **2.2.2.6 Splitten der HUVECs**

War eine 15-cm-Zellkulturschale gleichmäßig mit einer einzelnen Schicht von HUVECs bewachsen, so wurden die Zellen auf neue Platten ausplattiert. Diesen Vorgang nennt man Splitten. Dies war nach etwa einer Woche der Fall. Einige der Platten wurden zur Weiterkultivierung im Verhältnis 1:3 oder 1:4 gesplittet, die restlichen Platten wurden für die anstehenden Versuche auf 6-cm-Zellkulturschalen ausplattiert und gegebenenfalls behandelt.

Die Anzahl der stattgefundenen Splitvorgänge gibt die Passagezahl und somit das Alter der HUVECs an. Es wurden Zellen der Passage 2 - 9 verwendet.

Auf die neuen Platten wurde vor dem Splitten 10 ml 0,1 %-Gelatine gegeben und 20 – 30 min gewartet, sodass die Zellkulturschale mit der Gelatine benetzt war. Anschließend wurde die Gelatine abgesaugt.

Von den alten Platten wurde vorsichtig das Komplett-Medium abgesaugt und mit PBS gewaschen. Dafür wurde etwa 10 ml PBS an den Rand der Zellkulturschale pipettiert und nach vorsichtigem Hin- und Herschwenken wieder abgesaugt. Auf diese Weise sollten tote Zellen oder Zellreste entfernt werden. Um eine Kontamination zu vermeiden wurde

sorgfältig darauf geachtet den Deckel der Zellkulturschalen nie ganz zu öffnen. Anschließend wurde 3 ml Trypsin/EDTA-Lösung pro Platte für 3 min auf die Zellen gegeben und bei 37°C in den Inkubator gestellt. Dies bezweckte das Ablösen der Zellen vom Zellkulturschalenboden. Durch leichtes Abklopfen der Ränder der Zellkulturschale sollte dieser Vorgang erleichtert werden. Durch die Zugabe von 8-10 ml Komplett-Mediums wurde die Trypsinwirkung und somit der Verdauvorgang gestoppt. Um noch verbliebene adhärenente Zellen vom Zellkulturschalenboden zu lösen wurde mehrmals mit einer Glaspipette die Zellkulturschale gespült. Um die entstandene Zellsuspension bei 1300 UpM für 2 min bei RT zu zentrifugieren, wurde die Zelllösung in ein steriles 50-ml-PP-Röhrchen überführt. Nach dem Zentrifugieren wurde der Überstand bis auf das Zellsediment abgesaugt und mit 10 ml Komplett-Medium gewaschen. Dafür wurden die Zellen vorsichtig mit einer Glaspipette resuspendiert und erneut zentrifugiert (1300 UpM, 2 min, RT). Nun wurde der Überstand bis auf das übriggebliebene Sediment abgesaugt und in der gewünschten Menge Komplett-medium gelöst. Davor wurden die Zellkulturschalen mit 27 ml Komplett-Medium vorbereitet, wozu jeweils vorsichtig 3 ml der Zellsuspension gegeben wurde. Um eine gleichmäßige Verteilung der Zellen auf den Zellkulturschalen sicher zu stellen, musste vor jedem Pipettierschritt erneut mit einer Glaspipette resuspendiert und nach dem Auftragen der Zellen die Schale vorsichtig geschwenkt werden. Die frisch ausplattierten Zellen werden bei 37°C inkubiert.

Gelatine	0,1 %	1 l
Gelatine	100%	1 g
H <sub>2</sub> O bidest.		ad 1000ml

Um die Gelatine löslich zu machen, erwärmt man das Gemisch unter ständigem Rühren. Danach wurde die Gelatinelösung steril filtriert.

### 2.2.2.7 Splitten der HEKs

War eine 15-cm-Zellkulturschale gleichmäßig mit einer einzelnen Schicht von HEKs bewachsen, so wurden die Zellen auf neue Platten ausplattiert. Dies war nach etwa drei Tagen der Fall. Einige der Platten wurden zur Weiterkultivierung im Verhältnis 1:10 gesplittet, die restlichen Platten wurden für die anstehenden Versuche auf 6-cm-Zellkulturschalen ausplattiert und gegebenenfalls behandelt.

Von den alten Platten wurde vorsichtig das Komplett-Medium abgesaugt und mit PBS gewaschen. Dafür wurde etwa 10 ml PBS an den Rand der Zellkulturschale pipettiert und nach vorsichtigem Hin- und Herschwenken wieder abgesaugt. Auf diese Weise sollten tote Zellen oder Zellreste entfernt werden. Um eine Kontamination zu vermeiden wurde sorgfältig darauf geachtet den Deckel der Zellkulturschalen nie ganz zu öffnen. Anschließend wurde 3 ml Trypsin/EDTA-Lösung pro Platte für 3 min auf die Zellen gegeben und bei 37°C in den Inkubator gestellt. Dies bezweckte das Ablösen der Zellen vom Zellkulturschalenboden. Durch leichtes Abklopfen der Ränder der Zellkulturschale sollte dieser Vorgang erleichtert werden. Durch die Zugabe von 8-10 ml Komplett-

Mediums wurde die Trypsinwirkung und somit der Verdauvorgang gestoppt. Um noch verbliebene adhärenente Zellen vom Zellkulturschalenboden zu lösen wurde mehrmals mit einer Glaspipette die Zellkulturschale gespült. Um die entstandene Zellsuspension bei 1300 UpM für 2 min bei RT zu zentrifugieren, wurde die Zelllösung in ein steriles 50-ml-PP-Röhrchen überführt. Nach dem Zentrifugieren wurde der Überstand bis auf das Zellsediment abgesaugt und mit 10 ml Komplett-Medium gewaschen. Dafür wurden die Zellen vorsichtig mit einer Glaspipette resuspendiert und erneut zentrifugiert (1300 UpM, 2 min, RT). Nun wurde der Überstand bis auf das übriggebliebene Sediment abgesaugt und in der gewünschten Menge Komplett-medium gelöst. Davor wurden die Zellkulturschalen mit 27 ml Komplett-Medium vorbereitet, wozu jeweils vorsichtig 3 ml der Zellsuspension gegeben wurde. Um eine gleichmäßige Verteilung der Zellen auf den Zellkulturschalen sicher zu stellen, musste vor jedem Pipettierschritt erneut mit einer Glaspipette resuspendiert und nach dem Auftragen der Zellen die Schale vorsichtig geschwenkt werden. Die frisch ausplattierten Zellen werden bei 37°C inkubiert.

#### **2.2.2.8 Mediumwechsel**

Der Wechsel des Kulturmediums war abhängig vom Wachstumsverhalten der HUVECs. In der Regel wurde 3 - 4 Tage nach dem Splitten das verbrauchte Medium abgesaugt und etwa 30 ml frisches Komplett-Medium vorsichtig an den Rand der Zellkulturschale pipettiert, sodass die Zellen sich nicht ablösen konnten.

#### **2.2.2.9 Langzeitaufbewahrung und Rekultivierung**

Da HUVECs nur etwa 16 Passagen lang kultiviert werden können, ist es besonders wichtig immer einen Vorrat tiefgekühlter Zellen aufzubewahren. Dazu wurden die Zellen von einer konfluent bewachsenen Zellkulturschale mittels Trypsin abgelöst. Dieser Vorgang entsprach dem des Splittens. Die Zellen wurden in Kulturmedium gewaschen und anschließend in 4,5 ml Kulturmedium resuspendiert. Um die Zellen beim Einfrieren vor Eiskristallen zu schützen wurde der Suspension 0,5 ml DMSO zugegeben, sodass das DMSO in einer Endkonzentration von 10 % (v/v) vorlag. Eine 15-cm-Zellkulturschale ergaben circa 3 Einfrierröhrchen. Die Röhrchen wurden mit jeweils 1,5 ml Zellsuspension gefüllt und sofort auf Eis gestellt. Nach 1 - 2 Stunden konnten sie bei -80°C zwischengelagert werden. Die Langzeitaufbewahrung erfolgte nach 2 - 4 Wochen bei -196°C in flüssigem Stickstoff.

Da DMSO über 10°C toxisch ist, erfolgte das Auftauen der Zellen sehr rasch. Die tiefgefrorenen Zellen wurden hierzu in einem 37°C-Wasserbad erwärmt und sofort in ein steriles 50-ml-Röhrchen überführt, indem sich schon 10 ml vorgewärmtes Kulturmedium befand. Die Suspension wurde für 2 min bei Raumtemperatur und 1300 rpm zentrifugiert. Nach dem Waschen wurden die Zellen in 10 ml frischem Komplettmedium aufgenommen und auf einer 10-cm-Zellkulturschale ausplattiert.

### 2.2.3 Proteinanalyse

#### 2.2.3.1 Behandeln von Zellen zur Proteincharakterisierung

Um die Proteine auf die Expression verschiedener Kinasen und Aktivitätsgrade hin zu untersuchen, wurden die Zellen mit verschiedenen Stoffen behandelt, bevor man einen Western Blot zur weiteren Darstellung durchführte. Hierfür wurden die Zellen 48 h nach dem Ausplattieren und 30 min vor der Ernte mit 5 µl TNF $\alpha$ , VEGF und Leptin in einer Endkonzentration von 10 ng/µl behandelt.

Bei einigen Versuchen wurden die Zellen zu unterschiedlichen Zeiten mit unterschiedlichen Konzentrationen behandelt. Diese Angaben sind der Legende der jeweiligen Abbildungen zu entnehmen.

Gegebenenfalls wurden die Zellen mit dem Hemmstoff für JNK SP600125 (kurz: JNK-Inhibitor) 90 min vor der Zellernte behandelt. Hierfür wurden 5 µl 25 mM SP600125 auf die jeweilige ausplattierte 6cm-Zellkulturschale gegeben. Damit in den Ergebnissen eine DMSO-toxische Wirkung ausgeschlossen werden konnte, wurde auf die nicht behandelten Zellen zum selben Zeitpunkt 5 µl DMSO gegeben.

#### SP600125 Stammlösung 25 mM

SP 600125 (MG 220,2)	1 mg
DMSO	182 µl

Um die Halbwertszeit eines Proteins zu bestimmen, eignet sich eine Behandlung mit Cycloheximid. Dies ist ein Antibiotikum, welches die Proteinbiosynthese an Ribosomen und somit die Translation hemmt. Die Zellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten mit einer Endkonzentration von 50 µg/ml behandelt.

#### Cycloheximid Stammlösung (180 mM)

Cycloheximid (MG 281,35)	50 µg
Ethanol absolut	1 ml

#### 2.2.3.2 Zellernte und Herstellung von Zellextrakten

<u>Lysispuffer</u>		<u>10 ml</u>
Hepes ( pH = 7,5)	50 mM	1 ml 0,5 M Hepes Stammlösung
NaCl	150 mM	300 µl 5 M NaCl
MgCl <sub>2</sub>	1,5 mM	15 µl 1 MgCl <sub>2</sub>
Glycerin	10 % (v/v)	56 µl 180 mM EGTA
Triton X-100	1 % (v/v)	100 mg
NP-40	1 % (v/v)	1 ml 10%ig NP-40 Lösung

Der Lysispuffer wurde bei 4°C aufbewahrt. Unmittelbar vor Gebrauch wurde Phosphatase Inhibitor (7x) und Protease Inhibitor (10x) hinzugegeben.

24 Stunden nach der Behandlung der HUVECs erfolgte die Zelllyse unter nicht sterilen Bedingungen auf Eis. Zuerst wurde das Medium von der 6-cm-Zellkulturschale abgesaugt und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Danach wurde rasch 90 µl des Lysispuffer auf die Zellen gegeben. Die Zelllösung wurde mit Hilfe eines Zellschabers am Rand der 6-cm-Zellkulturschale gesammelt und mit einer Pipette in ein Eppendorf-Cup überführt. Um die Zellmembran aufzubrechen wurden sie im flüssigen Stickstoff schockgefroren und bei 37°C im Wasserbad wieder aufgetaut. Dieser Vorgang wurde noch einmal wiederholt und anschließend die Zellen 15 min auf Eis stehen gelassen, bevor sie in einer auf 4°C vorgekühlten Zentrifuge für 10 min bei 14000 rpm zentrifugiert wurden. Hierbei wurden die Proteine von den Zelltrümmern separiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Cup überführt. 1 µl dieses Lysats wurde für die Proteinbestimmung verwendet.

### 2.2.3.3 Bestimmung des Proteingehalts

Da es beim Western Blot wichtig ist, dass gleiche Proteinmengen vorliegen, muss man zu Beginn eine genaue Proteinbestimmung des Zelllysats durchführen. Hierzu führt man mit Hilfe eines Bio-Rad-Protein-Assays eine photometrische Messung durch, die so genannte Proteinbestimmung nach Bradford (Bradford 1976). Hierbei wird genutzt, dass der Farbstoff Coomassie-Brilliant-Blau-G250 in drei unterschiedlichen Zuständen Licht verschiedener Wellenlänge absorbiert.



**Abb. 2.2:** Reaktionsgleichung für die Proteinbestimmung nach Bradford

Wenn der Farbstoff an ein Protein gebunden wird, wechselt er von seinen kationischen Zustand in einen anionischen Zustand, bei dem die Absorption bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen werden kann. Die Absorptionsänderung ist größtenteils mit der Proteinkonzentration proportional. Da verschiedene Proteine unterschiedlich viel an Coomassie-Blau binden, wird eine Standardkurve für ein definiertes Protein wie zum Beispiel BSA (*bovine serum albumin*) benötigt. Dazu wurde mit unterschiedlichen Konzentrationen von BSA eine Eichgerade erstellt, aus der der Bereich der linearen Absorptionsänderungen ablesbar war.

Für die photometrische Proteinbestimmung der Proben wurde in Doppelbestimmung 1 µl des Lysats in einer 1cm-Kunststoffküvette mit 800 µl H<sub>2</sub>O bidest. und 200 µl filtriertes Bio-Rad-Reagenz vorsichtig vermischt. Als Leerwert dienten 2 Küvetten 800 µl H<sub>2</sub>O



bidest. mit 200  $\mu$ l Bio-Rad-Reagenz versetzt. Nach 15 min war der Protein-Farbstoff-Komplex stabil und die Extinktion wurde bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 595$  nm gemessen. Die ermittelten Extinktionen wurden mit der zuvor erstellten Eichgeraden in Konzentrationen umgerechnet.

Gleiche Mengen an Proteinlysate wurden mit dem entsprechenden Volumen an 4x-SDS-Lämmli-Puffer versetzt (s.u.). Zum Volumenausgleich wurde Lysispuffer ohne Inhibitoren dazugegeben. Zur Denaturierung der Proteine wurden die Proben für 5 min bei 95°C gekocht. Anschließend konnte man sie bei -20°C einfrieren oder gleich für die Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) verwenden.

<u>Lämmli-Puffer</u>	<u>4x</u>	<u>100ml</u>
Tris (pH 6,8)	250mM	25 ml von 1M Stammlösung
Glycerin	40%	45,9 ml 87% Glycerin
SDS	8%	8 g
$\beta$ -Mercaptoethanol	10%	10 ml
Bromphenolblau	0,04%	40 mg

Lämmli-Puffer wurde bei -20°C aufbewahrt.

#### 2.2.3.4 SDS-PAGE

Die SDS-PAGE wird verwendet um Proteine im elektrischen Feld aufzutrennen (Laemmli 1970). Hierzu benötigt man zwei unterschiedliche Gelanteile: ein Sammelgel (pH=6,8) und ein Trenngel (pH=8,8). Das Sammelgel dient der Fokussierung der Proteine, das Trenngel trennt die Proteine anhand ihres Molekulargewichtes (in kDa). Die Konzentration des Trenngels wird in Abhängigkeit von der zu untersuchenden Proteingröße gewählt.

	<u>Sammelgel</u>	<u>4 %</u>	<u>Trenngel</u>	<u>10 %</u>
Acrylamidstammlösung	0,67 ml		3,33 ml	
Sammel-/Trenngelpuffer	1,25 ml		2,5 ml	
SDS 10% Stammlösung	50 $\mu$ l		100 $\mu$ l	
H <sub>2</sub> O bidest.	2,98 ml		4,0 ml	
Zugabe kurz vor dem Gießen der Gele:				
APS-Stammlösung	50 $\mu$ l		100 $\mu$ l	
TEMED	2,4 $\mu$ l		6 $\mu$ l	
<u>Trenngelpuffer</u>			<u>200 ml</u>	
Tris (pH 8,8)	1,5 M		36,24 g	

<u>Sammelgelpuffer</u>		<u>200 ml</u>
Tris (pH 6,8)	0,5 M	12,14 g

Das anionische Detergenz SDS bindet ausreichend an die zuvor denaturierten Proteine, wodurch diese eine negative Ladung erhalten und ihre Tertiär- und Sekundärstruktur verlieren.  $\beta$ -Mercaptoethanol wird hinzugefügt um die noch vorhandenen Disulfidbrücken zu spalten. Beim Anlegen einer elektrischen Spannung ist die Wanderungsgeschwindigkeit der Proteine proportional zu ihrem Molekulargewicht. Die Zugabe von Bromphenolblau ermöglicht eine visuelle Darstellung der Auftrennung. Dazu werden die Proben auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen, welches, bei angelegter Spannung, eine Migration der negativ geladenen Proteine bewirkt. Kleine Proteine wandern dabei schneller als Proteine mit einem höheren Molekulargewicht.

Gießen der Gele: Um die Polyacrylamidgele zu gießen, wurde eine Gießkammer, eine Glasplatte, eine Aluminiumplatte, ein geeigneter Kamm für die Probenaschen und zwei Platzhalter benötigt. Alle Materialien wurden zuvor mit 70 % Ethanol gereinigt und in die Gießkammer eingespannt. Im Anschluss konnten die flüssigen Lösungen für die Gele in die Kammern gegossen werden. Zuerst wurde das Trenngel zu 2/3 in den Platzhalter gegossen. Zur Sicherstellung einer geradlinige Trennschicht wurden 200  $\mu$ l Isopropanol auf das Trenngel pipettiert. Nach 15 min war das Trenngel polymerisiert und das Isopropanol konnte abgenommen werden. Anschließend wurde das Sammelgel auf das Trenngel gegossen und der ausgewählte Kamm vorsichtig in das noch flüssige Gel eingesetzt. Nach weiteren 15 min konnte das fertige Gel für die Elektrophorese verwendet werden.

<u>Laufpuffer</u>		<u>1 l</u>
Tris (pH 8,3)	25 mM	3,03 g
Glycin	192 mM	14,41 g
SDS	0,1 %	10 ml 10% Stammlösung

Alle Puffer wurden mit HCl auf den gewünschten pH-Wert eingestellt.

Für die SDS-PAGE wird ein Gel in die Elektrophoresekammer eingespannt und mit Laufpuffer gefüllt. Danach wurde vorsichtig der Kamm entfernt. Um die Probenaschen von Gelresten zu reinigen wurde mit einer 20-G-Kanüle und einer 5 ml-Spritze die Taschen mit Laufpuffer gespült. Anschließend konnte man die Taschen mit den vorbereiteten Proben, die alle identisch an Volumen und Proteinkonzentration sind, beladen. Es konnten maximal 45  $\mu$ l eingesetzt werden. Zusätzlich wurde ein Protein-Molekulargewichtsmarker zur Bestimmung der Proteingröße in die erste Tasche pipettiert. Pro Gel wurde zunächst 20 mA Stromstärke angelegt, bis die Proteine das Trenngel erreicht hatten. Für die Auftrennung wurden 25 mA pro Gel angelegt. Das Gel

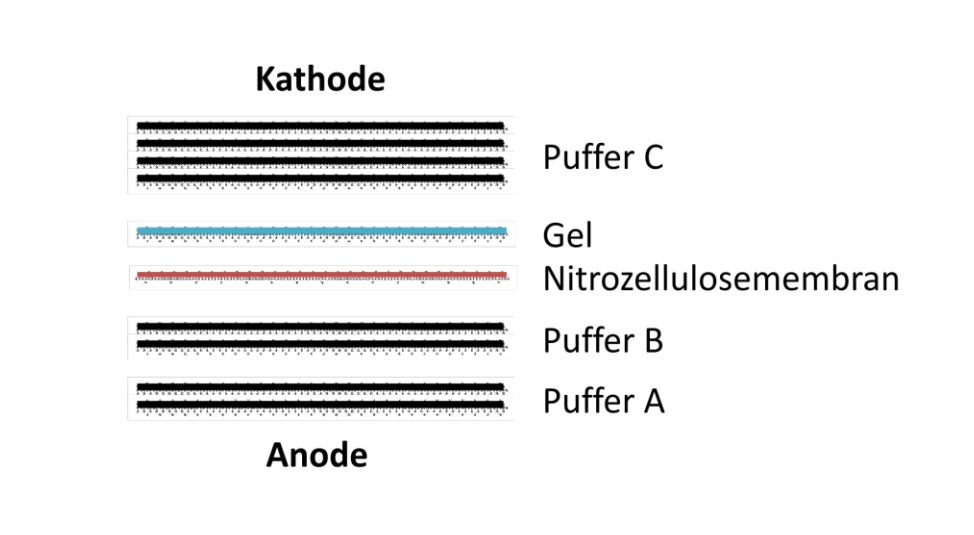
wurde solange laufen gelassen bis die Proben am unteren Rand des Gels zu sehen waren. Das Gel wurde aus der Kammer herausgenommen und für den späteren Western Blot vorbereitet.

### 2.2.3.5 Proteintransfer auf Nitrozellulosemembran (Western Blot)

<u>Puffer A ( Anodenpuffer)</u>		<u>1 l</u>
Tris ( pH= 11,3)	300 mM	36,6 g
Methanol	20 % 200 ml	
<u>Puffer B (Blotpuffer)</u>		<u>1 l</u>
Tris ( pH= 10,5)	25 mM	3,05 g
Methanol	20 %	200 ml
<u>Puffer C (Kathodenpuffer)</u>		<u>1 l</u>
Tris (pH= 9,0)	25 mM	3,05 g
Methanol	20 %	200 ml

Der pH-Wert wurde jeweils mit 2 M Borsäure titriert.

Beim Proteintransfer (Western Blot) werden die zuvor aufgetrennten Proteine ihrem Molekulargewicht entsprechend aus dem Gel auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Dazu wird die Semi-Dry-Methode verwendet. Das Sammelgel wurde vom Trenngel abgetrennt und das Trenngel für 20 min in Puffer C geschwenkt. In dieser Zeit wurde die Nitrozellulosemembran mit H<sub>2</sub>O angefeuchtet und für 10 min in Puffer B geschwenkt. Pro Gel wurden 8 Whatman-Papiere in Puffer A, B und C geschwenkt. Die Größe von Papier, Membran und Gel war gleich. Anschließend wurden das Gel, die Membran und die Papiere wie folgt (s. Abb. 2.3) in der Blotkammer angeordnet. Damit der Blotvorgang ohne Behinderungen stattfinden konnte, wurde sorgfältig darauf geachtet, dass zwischen den verschiedenen Lagen keine Luftblasen entstanden.



*Abb. 2.3: Aufbau einer Blotkammer*

Es wurde eine Stromstärke von 75 mA pro Gel für 60 min angelegt, wobei die Proteine von der Kathode zur Anode wanderten und somit von dem Gel auf die Membran übertragen wurden.

### 2.2.3.6 Immunologischer Nachweis von Proteinen

TBS-T		1 l
Tris ( pH= 8,0)		10 mM
NaCl		150 mM
Tween 20		0,1 % (v/v)
<b>Blockpuffer</b>		50 ml
Trockenmilchpulver	5 %	2,5 g
TBS-T		ad 50 ml
<b>Antikörperlösung</b>		50 ml
Trockenmilchpulver	1 %	0,5 g
TBS-T		ad 50 ml

Primärantikörper	Verdünnung
Phospho-DLK-Antikörper (Kaninchen)	1:1000 in 1 % Trockenmilch
DLK-Antikörper (Kaninchen)	1:1000 in 1 % Trockenmilch
Phospho-JNK-Antikörper (Maus)	1:500 in 1 % Trockenmilch
JNK-Antikörper (Kaninchen)	1:1000 in 1 % Trockenmilch
GAPDH-Antikörper (Kaninchen)	1:2000 in 1 % Trockenmilch

Um die durch das Blotting auf die Membran übertragenen Proteine quantitativ nachweisen zu können, wurde die Membran mit verschiedenen Antikörpern inkubiert. Dazu wurden in einem ersten Schritt unspezifische Bindungsstellen blockiert, indem die Membran zuvor für 1 Stunde bei RT in Blockpuffer auf der Schüttelplattform inkubiert wurde. Danach erfolgte die Inkubation der entsprechenden Primärantikörper in Tabelle angegebener Verdünnung über Nacht bei 4 °C auf einer Schüttelplattform. Am nächsten Tag wurde die Nitrozellulosemembran dreimal für 5 - 10 min in TBS-T gewaschen um den nicht-gebundenen Primärantikörper zu entfernen. Anschließend wurde die Membran mit dem Sekundärantikörper in einer Verdünnung von 1:10000 für 1 Stunde bei RT inkubiert. Der Sekundärantikörper bindet an den Primärantikörper derselben Spezies (Kaninchen oder Maus) und ist an eine Meerrettich-Peroxidase gekoppelt, welche die Oxidation von Luminol durch Reduktion von Wasserstoffperoxid bewirkt. Der nicht-gebundene Sekundärantikörper wurde ebenfalls nach der Inkubation mittels dreimaligem Waschen in TBS-T entfernt. Für die Detektion wurde die Membran für 2 min mit einem Gemisch aus je 200 µl der Peroxidlösung und der Luminol-Entwicklerlösung des Immun-Star™ WesternC™ Chemiluminescent Kit (Bio-Rad) inkubiert. Danach wurde die Membran luftblasenfrei in Parafilm® eingeschlagen und auf der Versa-Doc™-Plattform platziert. Auf diesem Weg konnten die Proteine mittels des VersaDoc™ Imaging Systems sichtbar gemacht werden. Abhängig von der Affinität des Primärantikörpers und der Menge des Proteins wurden die Membranen zwischen 15 sek und 20 min entwickelt. Mit der Software Quantity One 1D Version (Bio Rad) konnten die Proteine densitometrisch ausgewertet werden.

### 2.2.3.7 Wiederaufbereitung der Nitrocellulosemembran

Zur Detektion von weiteren Proteinen wurde die Membran von dem Antikörperkomplexen freigewaschen. Dazu musste die Membran erst für etwa 10 min in TBS-T gewaschen werden, um sie von der Entwicklerlösung zu befreien. Danach wurde der alte Antikörper mittels 200 mM Glycin (30 min bei RT) abgelöst. Anschließend wurde die Membran nochmals kurz gewaschen, erneut geblockt und konnte für die Detektion eines weiteren Proteins erneut eingesetzt werden.

## 2.2.4 Herstellung der Viren Ad-DLK-wt und Ad-DLK-K185A

Für weitere Forschungsarbeiten in unserer Arbeitsgruppe wurden zwei Adenoviren hergestellt:

Der Ad-DLK-wt ist der Adenovirus des DLK-Wildtyps. DLK hat seine katalytische Domäne zwischen den Aminosäuren (AS) 156 und 404. Das ATP-Bindungszentrum liegt bei AS 185, welches die AS Lysin darstellt. Der Ad-DLK-K185A ist der Adenovirus der DLK-Mutante, bei dem das ATP-Bindungszentrum mutiert ist. Hier wurde die AS Lysin durch Alanin ersetzt. Somit wird DLK inaktiviert.

Die Adenoviren sollen der Überexpression dienen und sicherstellen, dass bei weiteren Versuchen 90-100 % der Zellen mit DLK oder deren Mutante infiziert werden.

### 2.2.4.1 Transfektion von Plasmid-DNA nach der Metafectene<sup>TM</sup>-Easy-Methode

Bei einer Transfektion wird ein DNA-Plasmid in eine eukaryontische Zelle eingebracht. Die DNA wird jedoch nicht dauerhaft in das Genom der Zelle integriert.

Die Transfektion der Metafectene-Easy-Methode wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Metafectene-EASY, sowie der 10x-EASY-Buffer sollten bei -15°C gelagert werden, damit vor jeder Anwendung der *Freeze-Thaw-Mechanismus* durchgeführt werden kann. Hierbei wird vor jeder Anwendung der Puffer und Metafectene-EASY einmal eingefroren und wieder aufgetaut. Dies dient der optimalen Rekonstitution der Größenverteilung der Liposomen. Metafectene-EASY ist ein kationisches Lipid mit Kolipiden in Wasser. Es komplexiert die DNA in kompakte Strukturen und fördert die Aufnahme in die Zelle.

Das Vorbereiten der Reagenzien beinhaltet die Herstellung des Metafectene-EASY-Puffers:

Metafectene-EASY-Puffer	1x	100 µl
Metafectene-EASY-Puffer	10 x	10 µl
Steriles H <sub>2</sub> O		90 µl

Vor dem Gebrauch der Reagenzien wurden der Metafectene-Puffer, die DNA und das Metafectene-EASY auf RT erwärmt.

Für eine 6-cm-Zellkulturschale, auf der eine Zellmenge von  $0,5 \times 10^6$  Zellen wachsen, zu transfizieren, benötigt man folgende Mengen:

Zellsuspension	1xEASY-Puffer	Metafectene-EASY	DNA
5000 µl	100 µl	5 µl	5 µl

Zuerst wurde das Metafectene-EASY in den EASY-Puffer pipettiert und vorsichtig vermischt. Danach wurde die DNA dazugegeben und ebenfalls gemischt. Anschließend wurde die Lösung für 15 min bei RT inkubiert.

Danach wurde die Lipoplexlösung zu den 5 ml Zellsuspension gegeben und die Suspension vorsichtig ausplattiert.

Das erste grün fluoreszierende Protein (GFP) -gebundene Signal konnte nach 24 h detektiert werden. Dies war ein Zeichen dafür, dass die Zellen mit dem Virus infiziert wurden.

#### **2.2.4.2 Virusernte nach Transfektion des Virus**

Beim Arbeiten mit Viren war darauf zu achten sich streng an die S2-Richtlinien zu halten. Es wurde unter einer sterilen Werkbank entsprechenden Virus-Hood gearbeitet und nach Benutzung des Arbeitsplatzes für 60 min das UV-Licht angestellt. Der Müll wurde gesondert autoklaviert und entsorgt.

Um zu überprüfen, ob das Virus die ausgewählte DNA eingebaut hat, musste man das Virus von der 6-cm-Zellkulturschale ernten. Dafür spülte man die Schale mit dem schon vorhandenen Medium und einer Pipette vorsichtig ab, damit sich die Zellen lösen konnten. Falls sich die Zellen schlecht von dem Untergrund lösten, konnte man gegebenenfalls auch einen Zellschaber zur Hilfe nehmen. Anschließend überführte man die Zellsuspension in ein 15-ml-Falcon-Röhrchen.

Für die Zellyse wurden die Zellen im flüssigen Stickstoff schockgefroren und bei RT oder 37°C im Inkubator/Wasserbad aufgetaut. Das Einfrieren/Auftauen wurde dreimal durchgeführt. Im Anschluss konnten die Zellreste bei 2500 rpm für 5 min abzentrifugiert werden. Das Virus war nun im Überstand zu finden, den man entweder bei -20°C einfrieren oder gleich zum Testen weiterverwenden konnte.

Um zu untersuchen, ob das richtige Virus hergestellt wurde, wurde das zugehörige Protein kontrolliert. Hierzu wurde mit infizierten Zellen ein Western Blot durchgeführt.

Dafür wurden HUVECs vorbereitet, die in einer 6-Well-Plate ausplattiert wurden. Nach dem Ausplattieren wurde 48h gewartet um die Zellen anschließend mit verschiedenen Konzentrationen des Virus zu infizieren. Dabei wurde eine Zellkulturschale für die Kontrolle unbehandelt gelassen, die nachfolgenden mit 100 µl, 500 µl und 1000 µl infiziert. Nach 2-6 h wurde ein Mediumwechsel mit Endothelial-Medium durchgeführt.

Die infizierten Zellen wurden nach 48h geerntet. Das gewünschte Protein wurde anschließend mittels des Western Blots detektiert und somit das Virus indirekt kontrolliert.

#### **2.2.4.3 Amplifikation des Virus**

Nach der Kontrolle, konnte das Virus zur weiteren Herstellung amplifiziert werden. Hierfür wurden 2 x 15-cm-Zellkulturschalen HEKs angezchtet um sie mit dem Virus zu infizieren. Es wurden regelmäßig unter dem Fluoreszenz-Mikroskops die gekoppelten GFP-Signale beobachtet um zu untersuchen wie sich da Virus in den Zellen verhält. Bei

ausreichendem Signal wurde es von den 15-cm-Zellkulturschalen geerntet (s.o.) und entweder bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren oder weiter amplifiziert.

Im nächsten Schritt wurden 20 x 15-cm-Schalen infiziert und unter strenger Beobachtung der genaue Zeitpunkt der Ernte abgepasst. Es ist wichtig, dass die Zellen ausreichend infiziert sind und sich kurz vor dem Ablösen befinden.

Es wurden 17 ml Medium von den Platten entfernt. Mit dem restlichen Medium wurde die jeweilige Zellkulturschale nachgespült und die infizierten Zellen wurden in einem 50-ml-Falcon-Röhrchen gesammelt.

Die vier Falcon-Röhrchen wurden bei 1000 rpm für 2 min zentrifugiert. Der Virus-Überstand wurde in einem 50-ml-Tube gesammelt und in flüssigem Stickstoffschockgefroren. Bis zur weiteren Aufreinigung wurde das Röhrchen bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

#### 2.2.4.4 Virusaufreinigung mittels Cäsiumchloridgradienten

Bevor das Virus weiter aufgereinigt werden konnte, wurden die mit dem Virus infizierten Zellen erneut 3 mal aufgetaut und eingefroren und anschließend bei 2500 rpm für 5 min abzentrifugiert.

VSB-Puffer	10x	1l
Tris (basisch)		12,1 g
NaCl		80 g
MgCl <sub>2</sub> (6x H <sub>2</sub> O)		2,03 g
KCl		3,72 g
H <sub>2</sub> O bidest.		ad 1000 ml

Der pH-Wert wird mit 1 M HCl auf 7,4 eingestellt.

CsCl <sub>2</sub> - Heavy Stock		500 ml
CsCl <sub>2</sub>		211 g
VSB	1x	ad 500 g

Der pH-Wert wird auf 7,4 eingestellt. Die Dichte sollte 1,459 g/ml sein.

CsCl <sub>2</sub> -Light-Stock		500 ml
CsCl <sub>2</sub>		112 g
VSB	1x	ad 500 g

Der pH-Wert wird auf 7,4 eingestellt. Die Dichte sollte 1,209 g/ml sein.



---

<u>Einfrierpuffer</u>		<u>10 ml</u>
Glyzerin	90%	9 ml
1x VSB	10%	1 ml

Der Einfrierpuffer und das Virus werden 1:1 gemischt.

Nach Vorbereitung der Puffer und Lösungen wurde der CsCl<sub>2</sub>-Gradient hergestellt. Dafür wurden 5 ml vom Light-Stock in ein 50-ml-Falcon-Röhrchen pipettiert. Danach wurden 5 ml Lösung vom Heavy-Stock unterpipettiert. Aufgrund der verschiedenen Dichten der beiden Lösungen wurde eine klare Trennschicht sichtbar. Anschließend wurde das Virus auf die obere CsCl<sub>2</sub>-Schicht (Light-Stock) gegeben. Um mit der Ultrazentrifuge den Virus nachher abzuzentrifugieren müssen zwei Röhrchen von der CsCl<sub>2</sub>/Virus-Mischung vorbereitet werden. Darauf ist zu achten, dass zum Ausgleich der beide Röhrchen exakt gleich voll und schwer sind. Dazu werden sie auf die zweite Kommastelle genau abgewogen. Um Volumen- und Gewichtsunterschiede auszugleichen kann man PBS nachpipettieren.

Die Röhrchen wurden bei 10 °C, 22000 rpm für mindestens 4 Stunden oder über Nacht abzentrifugiert. Die Virionen und alle anderen Partikel trennten sich nach ihrer Dichte im CsCl<sub>2</sub>-Gradienten auf. Das Virus ist zwischen dem Heavy- und Light-Stock als milchige Phase deutlich erkennbar. Die Röhrchen wurden mit einer 20 G-Kanüle von unten angestochen und der Virus wurde in einer 5 ml-Spritze gesammelt und schließlich in ein 50-ml-Falcon überführt.

Im Anschluss wurde die virushaltige Lösung dialysiert. Dafür wurde sie in einen Dialysierschlauch mit einem Durchmesser von 7 mm gegeben und der Schlauch an beiden Seiten fest verschlossen. Danach verblieb er unter ständigem Rühren bei 4°C für 24 Stunden in einem mit VSB-gefüllten 1l-Becherglas. Die VSB-Lösung wurde zweimal gewechselt.

Nach der Dialyse konnte das Virus in einem Falcon-Röhrchen gesammelt werden. Um ihn später bei -80°C lagern zu können, wurde er mit dem Einfrierpuffer in einem Verhältnis 1:1 gemischt.

#### **2.2.4.5 Titerbestimmung**

Die Titerbestimmung wurde mit Hilfe von HEKs in einer 96-well-Platte durchgeführt. Dazu wurden die zuvor angezüchteten Zellen mit Trypsin von der Zellkulturschale abgelöst und in einem 50-ml-Falcon-Röhrchen gesammelt. Die Zellsuspension wurde für 2 min bei 1000 rpm zentrifugiert und das Zellsediment in 0,5%-Medium wieder aufgenommen. Pro well der 96er-Platte sollte 100 µl Medium mit je 20000 Zellen pipettiert werden.

Ausgehend von einer 1 µl Virus-Stammlösung wurde eine Verdünnungsreihe von 10<sup>-8</sup> bis 10<sup>-12</sup> hergestellt. Pro Verdünnung wurden 10 µl zu den 100 µl Medium-Zell-Gemisch

gegeben, was nochmal eine Verdünnung von 1:10 entsprach. Die verschiedenen Verdünnungen wurden aufsteigend in die Reihen 3 - 8 pipettiert. Die Positiv-Kontrolle, die dreimal 1 µl Virus entsprach, wurde in Reihe 1 pipettiert, die Negativ-Kontrolle ohne Virus war die Reihe 2.

Die Auswertung erfolgte nach 4 Tagen. Zur Identifizierung der infizierten Zellen wurden die GFP-Signale unter dem Fluoreszenzmikroskop gezählt. Als infiziert galt, wenn ein grünes Signal wahrgenommen wurde.

Anhand einer halbmaximalen Infektionsrate in einer logarithmischen Verdünnungsreihe wurde der Titer bestimmt.

## **2.2.5 Untersuchung der Angiogenese bei Diät-induzierter Adipositas und Diabetes mellitus**

### **2.2.5.1 Mäuse**

Die Versuche wurden an männlichen Wildtypmäusen des Stammes C57/Black6 und männlichen heterozygoten DLK<sup>+/-</sup>-Mäusen (B6xMUK, ebenfalls Stamm C57/BL6) durchgeführt. Homozygote DLK-Mäuse konnten nicht verwendet werden, da diese bereits perinatal versterben (Hirai et al. 2006).

### **2.2.5.2 Diäten und Messungen**

Als die Mäuse 8 Wochen alt waren, wurden sie anhand ihrer Diät in drei Gruppen aufgeteilt: Normaldiät (ND), fettreiche Diät (HFD) und kohlenhydratreiche Diät (CRD). Die Tiere wurden über einen Zeitraum von 20 Wochen mit den verschiedenen Diäten ernährt. Um die induzierte Fettleibigkeit und die Stoffwechsellage zu verfolgen, wurden die Tiere zweiwöchentlich gewogen und die Glucose im Urin mittels Keto-Urinsticks (Roche) bestimmt. Um den Blutzuckerspiegel zu bestimmen, wurden den Tieren alle 4 Wochen retrobulbär Blut entnommen.

<u>Normaldiät</u>	<u>100 %</u>
Proteine	19 %
Kohlenhydrate	77,7 %
Fett	3,3 %
<u>Fettreiche Diät</u>	<u>100 %</u>
Proteine	17 %
Kohlenhydrate	28 %
Fett	55 %

---

Kohlenhydratreiche Diät	100 %
Proteine	19 %
Kohlenhydrate	76 %
Fett	5 %

### **2.2.5.3 Ligation und Durchtrennung der Arteria femoralis**

Vor dem Eingriff werden die Mäuse gewogen und narkotisiert. Die intraperitoneale Injektionsnarkose richtet sich dabei nach dem Gewicht. Die Maus wurde auf den Rücken gedreht und unter dem Operationsmikroskop platziert. Die Extremitäten wurden mittels Pflaster fixiert. Nachdem die Haut am rechten Oberschenkel mit Ethanol desinfiziert wurde, wurde unterhalb des Leistenbandes eine mediane Inzision durchgeführt. Die Muskelfaszen konnten vorsichtig getrennt werden. Die rechte Arteria femoralis wurde freigelegt und von dem begleitenden Nerv und Vene separiert. Es wurde direkt ober- und unterhalb der abgehenden Arteria femoralis profunda mittels zwei Seidenfäden eine Ligation durchgeführt und anschließend die Arteria femoralis durchtrennt. Nach gelungener Operation wurde eine distale Ischämie verursacht. Die Operation wurde von Rohollah Babaeikelishomi durchgeführt.

### **2.2.5.4 Perfusionsmessung durch LDI (=Laser Doppler Imaging)**

Mittels des farbcodierten Gefäßlaserdopplers konnte unter Inhalationsnarkose (Isofluran) zu verschiedenen Zeitpunkten eine Aussage über die Durchblutung der Hinterläufe der Mäuse gemacht werden. Es wurden Messungen präOP, postOP und an den Tagen 7, 14, 21 und 28 durchgeführt. Die Messungen des rechten operierten Hinterlaufs wurden in Relation zum linken nicht operierten Hinterlauf gesetzt. Die Perfusionsmessung wurde von Annika Hunold und Diana Kaiser durchgeführt.

### **2.2.5.5 Präparation der Hinterlaufmuskeln**

Vier Wochen postOP wurden die Hinterläufe geerntet. Dazu wurden die Tiere mittels Inhalationsnarkose narkotisiert und auf den Rücken gedreht. Die Mäuse wurden wie oben beschrieben fixiert. Die Tiere wurden mittels zervikaler Dislokation getötet und die Muskulatur des rechten und linken Hinterlaufs wurde freipräpariert. Das Muskelgewebe konnte entnommen und sofort cryokonserviert werden.

### **2.2.5.6 Gefrierkonservierung und Schneiden der Muskeln**

Die Muskeln wurden mittels einer Stecknadel in senkrechte Position auf einen Korken gesteckt. Anschließend wurden sie in gekühltem Isopentan gefroren und die Stecknadel vorsichtig entfernt. Danach wurde TISSUE TEK O.C.T. um die Muskeln gegeben und alles erneut in Isopentan getaucht bis schließlich alles gefroren war. Die Muskeln wurden vorsichtig in Aluminiumfolie gewickelt und bei -80°C gelagert.

Das Schneiden der Muskeln wurde zeitnah vorgenommen und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  durchgeführt. Mittels eines Kryotoms wurden Schnitte von  $10\ \mu\text{m}$  und  $5\ \mu\text{m}$  Dicke erzeugt. Es wurden 10 Objektträger mit jeweils drei Schnitten angefertigt. Zwischen den Objektträgern wurde  $200\ \mu\text{m}$  Muskeldicke Platz gelassen.

Die Schnitte wurden bei  $-20^{\circ}\text{C}$ , zur Langzeitaufbewahrung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### **2.2.5.7 Färbung**

Um die Angiogenese zu analysieren wurde eine Fluoreszenzfärbung durchgeführt. Ein Antikörper gegen PECAM-1 (platelet/endothelial cell adhesion molecule-1), auch CD31 genannt, bindet an PECAM. MFP555 goat anti-rat IgG bindet an PECAM-1 und zeigt dadurch die Fluoreszenzfärbung.

Die Muskelschnitte werden bei RT ca. 5 min aufgetaut und anschließend 5 min in PBS gewaschen. Anschließend wurden die Schnitte zur Fixierung mit Aceton beträufelt und für 10 min bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert bis sie im Anschluss bei RT trocknen konnten. Danach wurden sie erneut mit PBS für 5 min gewässert und anschließend bei  $37^{\circ}\text{C}$  für 10 min in 0,05% Triton-X getaucht. Im Anschluss wurden die Schnitte erneut mehrmals mit PBS gespült und der erste Antikörper in einer Verdünnung von 1:100 auf die Schnitte gegeben. Dieser inkubiert in einer feuchten Kammer bei RT über Nacht.

Am nächsten Tag wurden die Objektträger für  $3 \times 5$  min in PBS gewaschen und anschließend bei RT für 1 h der zweite Antikörper auf die Schnitte gegeben. Es wurden  $50\ \mu\text{l}$  pro Schnitt mit einer Verdünnung von 1:400 verwendet. Danach wurden sie erneut  $3 \times 5$  min gewaschen und mittels VectaShield (mit DAPI) eingedeckt.

Die gefärbten, eingedeckten Muskelschnitte wurden bei  $4^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### **2.2.5.8 Auswertung der Muskelschnitte**

Nach dem Färben wurde mittels einer 10fachen Vergrößerung unter dem Fluoreszenzmikroskop die CD31-positiven Zellen, die für eine Gefäßneubildung stehen, und DAPI-angefärbten Zellen, die den Zellkern anfärben, gesucht. Es wurden 4 typische Bilder eines jeden Muskels aufgenommen und die Anzahl der CD31-positiven Zellen in Prozent zu den DAPI-positiven Zellen gesetzt. So erhält man den Anteil von den CD31-positiven Zellen zu allen Zellen um später die beiden Muskeln der einzelnen Maus und die verschiedenen Genotypen aller Mäuse untereinander vergleichen zu können.

## **2.2.6 Statistik**

### **2.2.6.1 SEM**

Es wurde jeweils der arithmetische Mittelwert und die dazugehörige Standardabweichung ( $\text{SEM} = \text{SD}/\sqrt{n}$ ) der jeweils identisch behandelten Proben berechnet und in den Ergebnissen dargestellt.

### 2.2.6.2 t-test

Die Signifikanz wurde mit dem gepaarten zweiseitigen Student's-t-Test mittels Microsoft® Excel 2007 berechnet und überprüft. Es wurde ein Signifikanzniveau von  $< 0,05$  (\*) festgelegt.

n bezeichnet die Anzahl der Versuche in Einfachbestimmung.

### 2.2.6.3 Abbildungen

Die Abbildungen wurde mit Hilfe der Programme CorelDRAW X3 (Version 13) und SigmaPlot (Version 11.0) erstellt. Die Bilder wurden mit AxioVision Release 4.8.2. aufgenommen.

## 3 Ergebnisse

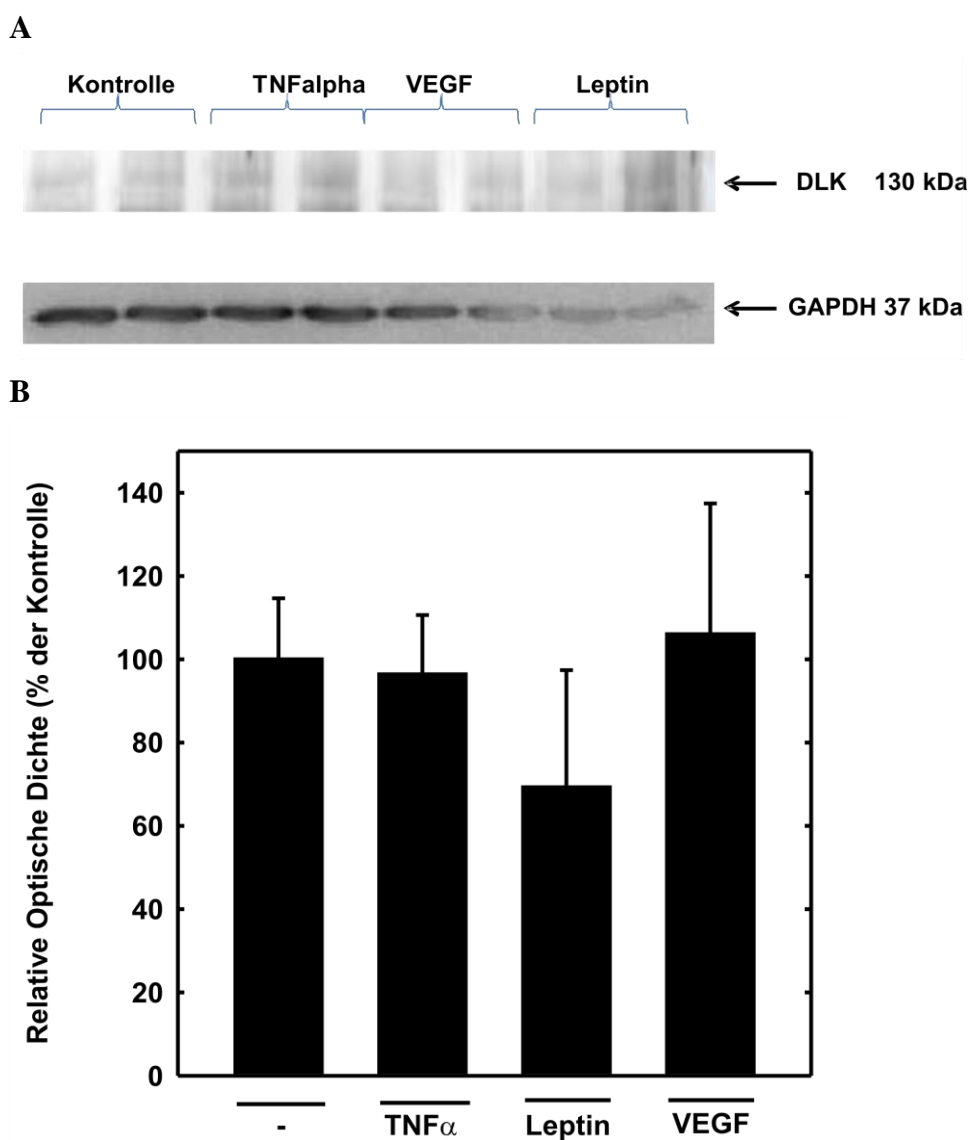
### 3.1 Expression und Regulation von DLK in HUVECs

#### 3.1.1 Expression von DLK in HUVECs

Es ist bekannt, dass die DLK in hohen Konzentrationen im Gehirn sowie auch in kleineren Mengen in der Lunge, den Nieren und in  $\beta$ -Zellen exprimiert wird (Holzman et al. 1994; Oetjen et al. 2006). Die Rolle der DLK in Gefäßen wurde bisher noch nicht näher untersucht. Im Folgenden sollte analysiert werden, ob die DLK in Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVECs) exprimiert und reguliert wird. Es sollte ebenfalls untersucht werden, ob DLK ihre Proteinmenge oder Aktivität unter dem Einfluss von verschiedenen prädiabetischen Mediatoren verändert.

Dazu wurde die Zelllinie HUVEC mit TNF $\alpha$ , VEGF und Leptin für 60 min in Doppelbestimmung behandelt. Es wurde zusätzlich eine Kontrolle ohne Behandlung in Doppelbestimmung angefertigt.

Abb. 3.1 A zeigt einen repräsentativen Western Blot. Die repräsentierende DLK-Bande migriert bei ca. 130 kDa. Durch das Programm Quantity One konnte die optische Dichte der Kinase unter den verschiedenen Behandlungen densitometrisch analysiert werden (Abb. 3.1 B). Die Optische Dichte wurde anschliessend mit der Optischen Dichte von GAPDH korreliert. Es zeigte sich, dass DLK ohne Behandlung und unter den oben genannten Behandlungen in HUVECs exprimiert wird. Im Vergleich zur Kontrolle (100%  $\pm$  14,7) ist bei der Behandlung mit TNF $\alpha$  (96,4 %  $\pm$  14,3), VEGF(106 %  $\pm$  31,4) und Leptin (69,2 %  $\pm$  28,2) kein signifikanter Unterschied bei der Expression in HUVECs zu sehen.



**Abb. 3.1: Expression von DLK in HUVECs**

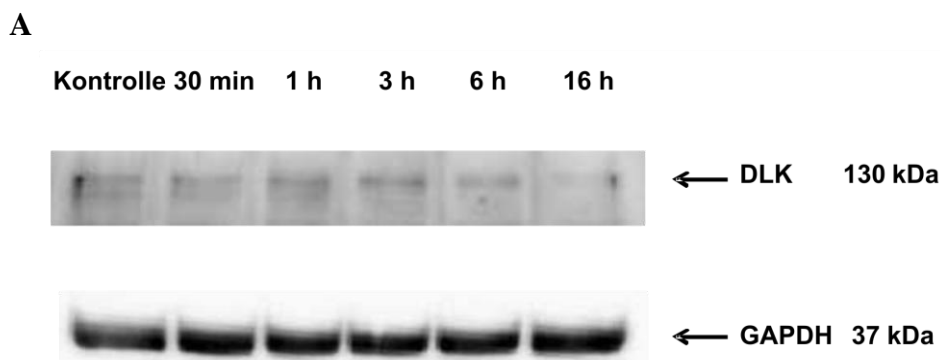
**A** zeigt einen repräsentativen Western Blot. **B** Quantitative Auswertung. HUVECs wurden für 60 min mit einer Konzentration von 10 ng/ml mit TNF $\alpha$ , VEGF und Leptin behandelt. Es wurde eine zusätzlich eine Kontrollgruppe ohne Behandlung angefertigt. Es wurde ein Western Blot durchgeführt und die optische Dichte der Banden gemessen. Die Werte wurden mit GAPDH korrigiert und zum Mittelwert der Kontrolle in Relation gesetzt. Abgebildet sind Mittelwerte  $\pm$  SEM aus 5 unabhängigen Versuchen jeweils in Doppelbestimmung (n=10).

## **3.1.2 Regulation der DLK**

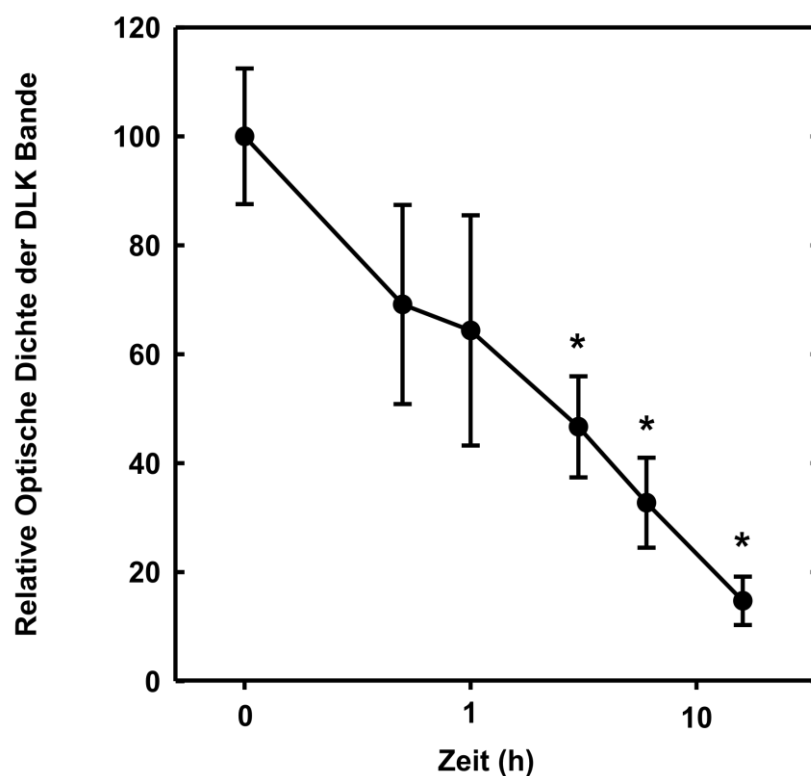
### **3.1.2.1 Halbwertszeit von DLK in HUVECs**

Um die Überlebenszeit der DLK in HUVECs zu bestimmen, wurden HUVECs ausplattiert und mit dem Translationshemmstoff Cycloheximid für unterschiedlich lange Zeiträume inkubiert. Mittels Western Blot Analyse konnte anschließend der Proteingehalt der Kinase gemessen und mit GAPDH korreliert werden.

Abb. 3.2 A zeigt einen repräsentativen Western Blot. In Abb. 3.2 B ist die quantitative Auswertung der Bandendichte zu sehen. Die Halbwertszeit der DLK beschreibt den Zeitraum, in dem der Gehalt der DLK unter der Behandlung von Cycloheximid um 50 % reduziert wird. Demzufolge liegt die Halbwertszeit der DLK in HUVECs bei 1,5 Stunden.



**B**



**Abb. 3.2: Bestimmung der Halbwertszeit von DLK mittels Cycloheximid**

**A** zeigt einen repräsentativen Western Blot. **B** Quantitative Auswertung. HUVECs wurden für 30 min, 1 h, 3 h, 6 h und 16 h mit Cycloheximid (50µl/ml) behandelt. Es wurde ein Western Blot durchgeführt und die Optische Dichte der Banden gemessen. Die Werte wurden mit GAPDH korrigiert und zum Mittelwert des Zeitpunktes 0 in Relation gesetzt. Abgebildet sind Mittelwerte  $\pm$  SEM aus 3 unabhängigen Versuchen jeweils in Doppelbestimmung (n=6). \* $p \leq 0,05$  (t-Test).

### 3.1.2.2 Phosphorylierung der DLK durch prädiabetische Stoffe

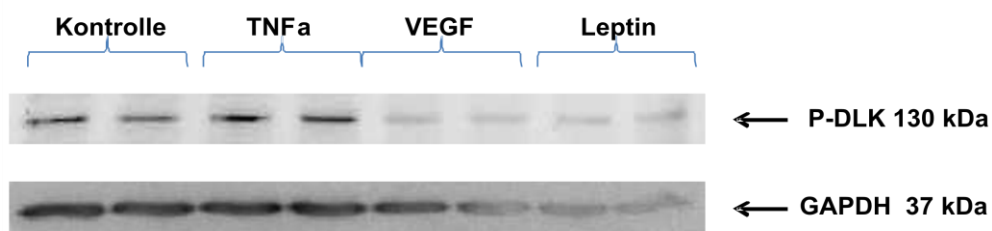
Um den Einfluss prädiabetischer Mediatoren wie TNF $\alpha$  und Leptin auf die DLK zu untersuchen, wurden die HUVECs mit TNF $\alpha$  und Leptin behandelt. Es wurde zusätzlich



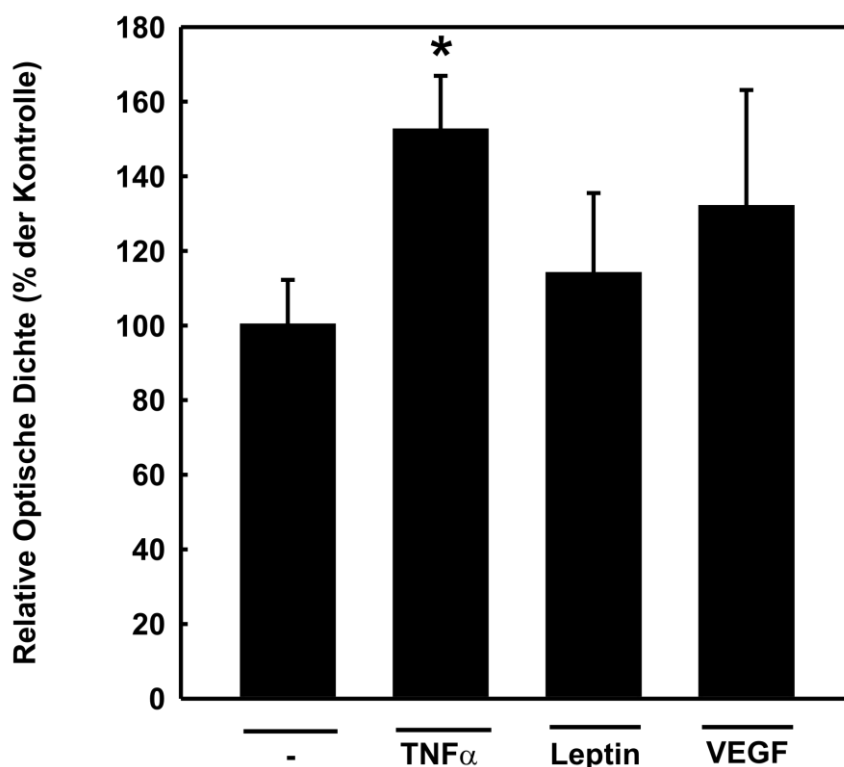
mit VEGF behandelt, was als Mediator des endothelialen Gefäßwachstums und somit als Positivkontrolle diente. Es wurde zusätzlich Zellen ohne Behandlung inkubiert, die als Kontrolle dienten. Anschließend wurde die Optische Dichte der phosphorylierten DLK gemessen. Bisher unveröffentlichte Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe geben Hinweise darauf, dass die Phosphorylierung einer Aktivierung der DLK entspricht.

Abb. 3.3 A zeigt einen repräsentativen Western Blot. Die quantitative Auswertung der Optischen Dichte der phosphorylierten DLK ist in Abb. 3.3 B zu sehen. Es zeigt sich, dass die Behandlungen mit VEGF ( $132 \% \pm 14,7$ ) und Leptin ( $113,7 \% \pm 21,7$ ) im Vergleich zur Kontrolle ( $100 \% \pm 12,3$ ) nur geringe Auswirkung auf die Phosphorylierung der DLK haben. TNF $\alpha$  hingegen erhöht, verglichen mit der Kontrolle, die Phosphorylierung an Serin-302 von DLK ( $152,2 \% \pm 14,7$ ).

A



B



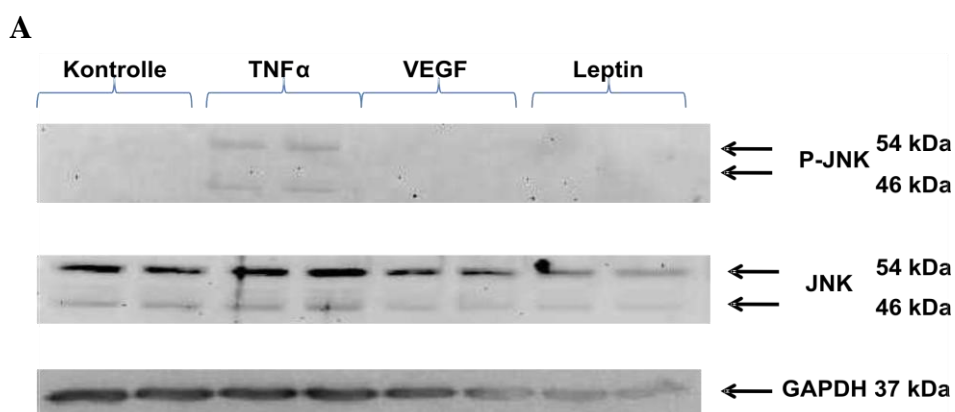
### Abb. 3.3: Phosphorylierung der DLK

**A** zeigt einen repräsentativen Western Blot. **B** Quantitative Auswertung. HUVECs wurden für 60 min mit einer Konzentration von 10 ng/ml mit TNF $\alpha$ , VEGF oder Leptin behandelt. Es wurde ein Western Blot durchgeführt und die Optische Dichte der Banden gemessen. Die Werte wurden mit den Werten für die DLK-repräsentierende Bande korrigiert und zum Mittelwert der Kontrolle in Relation gesetzt. Abgebildet sind Mittelwerte  $\pm$  SEM aus 5 unabhängigen Versuchen jeweils in Doppelbestimmung (n=10). \* $p \leq 0,05$  (t-Test).

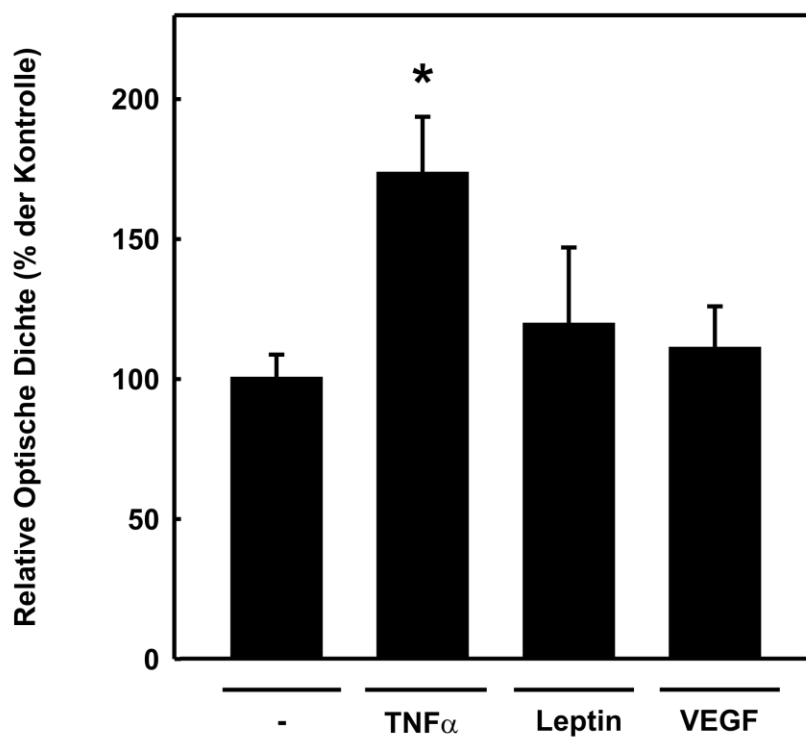
#### 3.1.2.3 Phosphorylierung der DLK-untergeordneten Kinase JNK

Die Phosphorylierung der DLK am Ser-302 und somit eine Aktivierung führt über die zwischengeschalteten Kinasen MKK7 und MKK4 zu einer Phosphorylierung ihrer untergeordneten Kinase JNK (Nihalani et al. 2001; Nihalani et al. 2003). Im Folgenden wurde die Phosphorylierung von JNK durch TNF $\alpha$ , VEGF und Leptin in HUVECs untersucht. Es wurde zusätzlich eine Kontrolle ohne Behandlung angefertigt.

Abb. 3.4 A zeigt einen repräsentativen Western Blot. In Abb. 3.4 B ist die quantitative Auswertung der Optischen Dichte des phosphorylierten JNK zu sehen. Es ist zu erkennen, dass die Behandlung von HUVECs mit  $\text{TNF}\alpha$  ( $173,2 \% \pm 20,5$ ) eine Phosphorylierung von JNK an Serin 63 und 73 verglichen mit der Kontrollgruppe ( $100 \% \pm 8,7$ ) in HUVECs nach sich zieht. Die Behandlungen mit VEGF ( $110,7 \% \pm 15,3$ ) und Leptin ( $119,3 \% \pm 27,7$ ) zeigen in HUVECs keine Aktivierung von JNK.



**B**



**Abb. 3.4: Phosphorylierung der DLK-untergeordneten Kinase JNK**

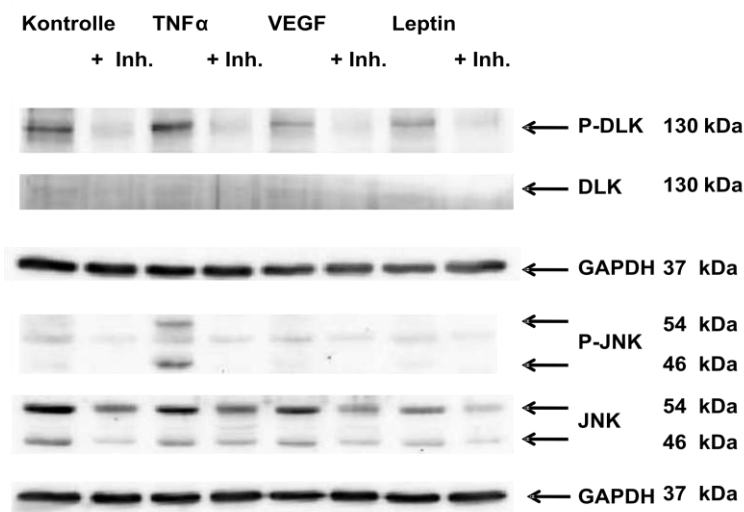
**A** zeigt einen repräsentativen Western Blot. **B** Quantitative Auswertung. HUVECs wurden für 60 min mit einer Konzentration von 10 ng/ml mit TNF $\alpha$ , VEGF und Leptin behandelt. Es wurde ein Western Blot durchgeführt und die Optische Dichte der Banden gemessen. Die Werte wurden mit den Werten für die JNK-repräsentierende Bande korrigiert und zum Mittelwert der Kontrolle in Relation gesetzt. Abgebildet sind Mittelwerte  $\pm$  SEM aus 5 unabhängigen Versuchen jeweils in Doppelbestimmung (n=10). \* $p \leq 0,05$  (t-Test).

### 3.1.2.4 Phosphorylierung von DLK und JNK in Gegenwart des JNK-Inhibitors SP600125

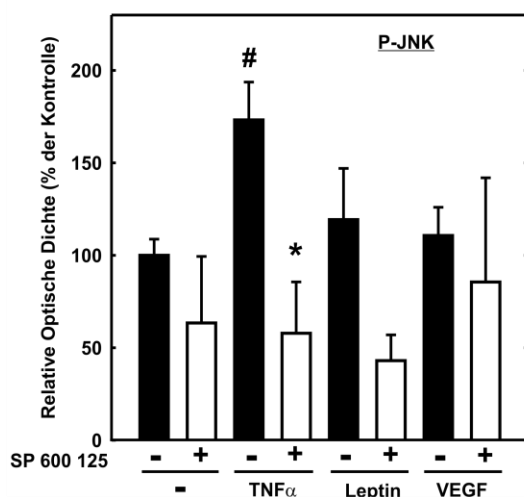
Im Folgenden wurde die Wirkung von JNK auf die TNF $\alpha$ -induzierte Aktivierung der DLK analysiert. Dazu wurde ein JNK-spezifischer Inhibitor (SP600125) eingesetzt. Dieser hemmt die Phosphorylierung und somit die Aktivierung von JNK (Bennett et al. 2001). Um die Wirkung und Spezifität in HUVECs zu untersuchen wurde der Proteingehalt von JNK und phosphoryliertem JNK (P-JNK) gemessen. Außerdem wurde der Proteingehalt von DLK und ihrer aktivierten Form, der phosphorylierten DLK (P-DLK), gemessen. JNK migriert beim Western Blot in zwei verschiedenen Banden (46 und 54 kDa) (Hibi et al. 1993). Dies ist Folge alternativen Spleissens der mRNA-Transkripte von JNK (Gupta et al. 1996).

Abb. 3.5 A zeigt einen repräsentativen Western Blot. In Abb. 3.5 B ist die quantitative Auswertung der Optischen Dichte des phosphorylierten JNKs mit und ohne Behandlung des spezifischen JNK-Inhibitors SP600125 zu sehen. Die basale Phosphorylierung von JNK ( $100 \% \pm 8,7$ ) wurde durch die Behandlung von SP600125 ( $63,4 \% \pm 35,9$ ) nicht gehemmt. Ebenso zeigt SP600125 bei P-JNK mit der zusätzlichen Behandlung von VEGF ( $85,6 \% \pm 56,3$ ) im Vergleich mit der VEGF-Gruppe ohne Inhibitor ( $110,6 \% \pm 15,3$ ) sowie Leptin mit ( $30,5 \% \pm 11,9$ ) und ohne SP600125 ( $119,3 \% \pm 27,7$ ) keine Hemmung in den HUVECs. Im Vergleich dazu ist jedoch zu sehen, dass die Behandlungen mit TNF $\alpha$  mit ( $57,9 \% \pm 27,8$ ) und ohne Inhibitor ( $173,2 \% \pm 20,5$ ) in HUVECs eine Hemmung des JNK-Inhibitors hervorrufen. Dies bezieht sich auf den Mittelwert der Kontrolle. In Abb. 3.5 C ist die quantitative Auswertung der Optischen Dichte von P-DLK mit und ohne SP600125 zu sehen. Es ist zu erkennen, dass die Behandlung von HUVECs mit SP600125 in der Kontrolle ohne Inhibitor ( $100 \% \pm 13,5$ ) verglichen mit der Kontrollgruppe mit Inhibitor ( $27,5 \% \pm 10,2$ ) eine Hemmung nach sich zieht. Ebenso zeigt SP600125 bei P-DLK in HUVECs mit der zusätzlichen Behandlung von TNF $\alpha$  ( $27,9 \% \pm 7,1$ ) im Vergleich mit der TNF $\alpha$ -Gruppe ohne Inhibitor ( $151,3 \% \pm 17,6$ ) eine Hemmung. Bei Leptin ohne Inhibitor ( $115,1 \% \pm 26,7$ ) und mit Inhibitor ( $15,9 \% \pm 3,5$ ), sowie bei VEGF ohne ( $124,7 \% \pm 23,7$ ) und mit Inhibitor ( $16,6 \% \pm 5,5$ ) zeigt sich keine Hemmung durch SP600125 in HUVECs bezogen auf den Mittelwert der Kontrolle.

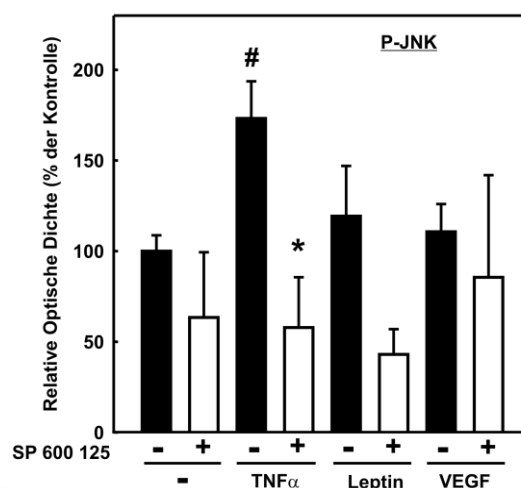
A



B



C

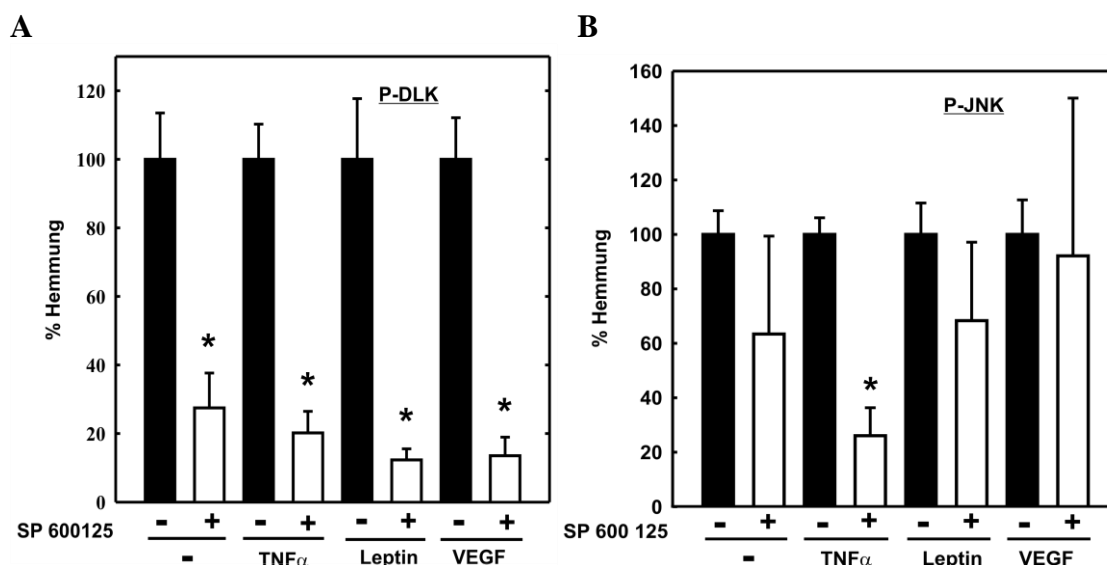


**Abb. 3.5: Phosphorylierung von DLK und JNK in der Gegenwart des JNK-Inhibitors SP600125**

**A** zeigt einen repräsentativen Western Blot. **B** Quantitative Auswertung von phosphoryliertem JNK. HUVECs wurden für 90 min mit dem JNK-Inhibitor SP600125 (25  $\mu$ M) und für 60 min mit einer Konzentration von 10 ng/ml mit TNF $\alpha$ , VEGF und Leptin behandelt. Es wurde ein Western Blot durchgeführt und die optische Dichte der Banden gemessen. Die Werte wurden mit den Werten für die JNK-repräsentierende Bande korrigiert und zum Mittelwert der Kontrolle in Relation gesetzt. Abgebildet sind Mittelwerte  $\pm$  SEM aus 3-6 unabhängigen Versuchen jeweils in Doppelbestimmung (n=6-12). \* $p \leq 0,05$  (t-Test) Hemmung innerhalb einer Behandlung. # $\leq 0,05$  (t-Test) Unterschied zum Mittelwert der Kontrolle. **C** Quantitative Auswertung von phosphorylierter DLK. HUVECs wurden für 90 min mit dem JNK-Inhibitor SP600125 (25  $\mu$ M) und für 60 min mit einer Konzentration von 10 ng/ml mit TNF $\alpha$ , VEGF und Leptin behandelt. Es wurde ein Western Blot durchgeführt und die optische Dichte der Banden gemessen. Die Werte wurden mit den Werten für die DLK-repräsentierende Bande korrigiert und zum Mittelwert der Kontrolle in Relation gesetzt. Abgebildet sind Mittelwerte  $\pm$  SEM aus 3-6 unabhängigen Versuchen jeweils in Doppelbestimmung (n=6-12). \* $p \leq 0,05$  (t-Test) Hemmung innerhalb einer Behandlung. # $p \leq 0,05$  (t-Test) Unterschied zum Mittelwert der Kontrolle.

Abb. 3.6 A stellt die Hemmung des JNK-Inhibitors auf P-JNK jeweils auf die behandelte Gruppe bezogen dar. Hier ist zu erkennen, dass SP600125 die TNF $\alpha$ -induzierte Phosphorylierung von JNK in HUVECs hemmt. Die Hemmung beträgt 73,9 %. Bei VEGF (7,9 %), Leptin (31,7 %) und die Kontrollgruppe (36,6 %) zeigt sich im Gegensatz dazu keine Hemmung des JNK-Inhibitors.

Abb. 3.6 B stellt die Hemmung des JNK-Inhibitors auf P-DLK jeweils auf die behandelte Gruppe bezogen dar. Hier ist zu sehen, dass SP600125 die Kontrollgruppe (72,5 %), die TNF $\alpha$ - (79,8 %), VEGF- (86,5 %) und Leptin-induzierte Phosphorylierung (87,7 %) von DLK in HUVECs hemmt.



**Abb. 3.6 Potentielle Darstellung der Wirkung des JNK-Inhibitors auf die Phosphorylierung von JNK und DLK**

**A** Quantitative Auswertung von P-JNK. HUVECs wurden für 90 min mit dem JNK-Inhibitor SP600125 (25  $\mu$ M) und für 60 min mit einer Konzentration von 10 ng/ml mit TNF $\alpha$ , VEGF und Leptin behandelt. Es wurde ein Western Blot durchgeführt und die Optische Dichte der Banden gemessen. Die Werte wurden mit den Werten für die JNK-repräsentierende Bande korrigiert und zum Mittelwert der Kontrolle in Relation gesetzt. Abgebildet sind Mittelwerte  $\pm$  SEM aus 3-6 unabhängigen Versuchen jeweils in Doppelbestimmung (n=6-12). \* $p \leq 0,05$  (t-Test) Hemmung innerhalb einer Behandlung. **B** Quantitative Auswertung von P-DLK. HUVECs wurden für 90 min mit dem JNK-Inhibitor SP600125 (25  $\mu$ M) und für 60 min mit einer Konzentration von 10 ng/ml mit TNF $\alpha$ , VEGF und Leptin behandelt. Es wurde ein Western Blot durchgeführt und die Optische Dichte der Banden gemessen. Die Werte wurden mit den Werten für die DLK-repräsentierende Bande korrigiert und zum Mittelwert der Kontrolle in Relation gesetzt. Abgebildet sind Mittelwerte  $\pm$  SEM aus 3-6 unabhängigen Versuchen jeweils in Doppelbestimmung (n=6-12). \* $p \leq 0,05$  (t-Test) Hemmung innerhalb einer Behandlung.

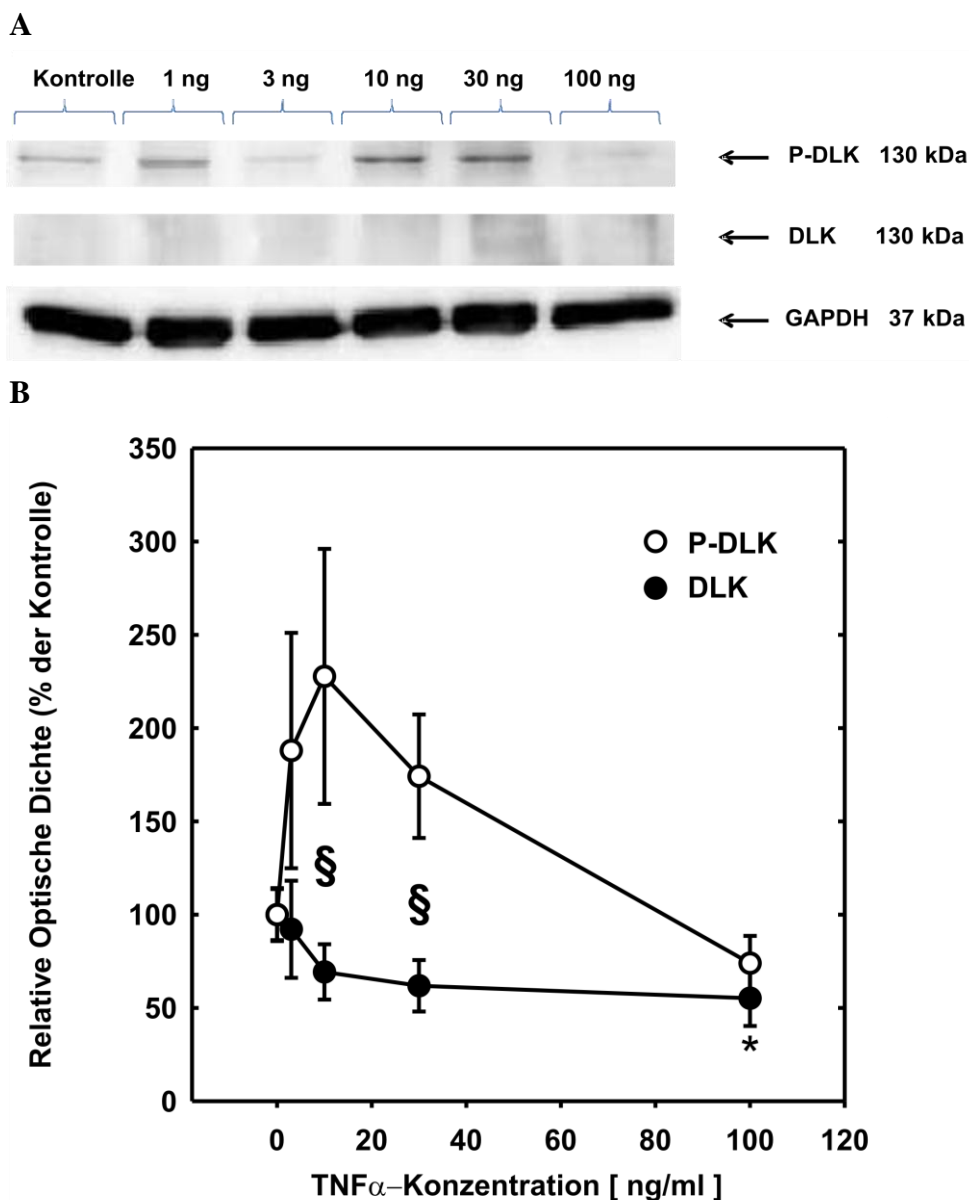
### 3.1.2.5 Konzentrationsabhängige Wirkung von TNF $\alpha$ auf DLK und P-DLK

Um die optimale Konzentration und somit die effektivste Wirkung von TNF $\alpha$  auf DLK und P-DLK in HUVECs zu erzielen, wurde eine TNF $\alpha$ -Wirkungskurve erstellt. Hierfür wurden HUVECs zu einem festen Zeitpunkt vor der Ernte mit verschiedenen Konzentrationen (s. Beschriftung) von TNF $\alpha$  behandelt.

Abb. 3.8 A zeigt einen repräsentativen Western Blot. In Abb. 3.8 B ist zu erkennen, dass P-DLK mit einer Behandlung von 10 ng/ml TNF $\alpha$  den höchsten Proteingehalt aufweist

(227,2 %  $\pm$  68,3), mit 30 ng/ml ein langsamer Rückgang einsetzt (174,2 %  $\pm$  33,1) und mit 100 ng/ml der gemessene Proteinwert unter dem Ausgangswert liegt (73,9 %  $\pm$  14,7). Zu keinem der Zeitpunkte zeigt sich eine Signifikanz zum Ausgangswert. DLK zeigt mit zunehmender Konzentration von TNF $\alpha$  einen kontinuierlichen Rückgang des gemessenen Proteingehalts. Der gemessene Proteinhöchstwert liegt bei 3 ng/ml TNF $\alpha$  (92,1 %  $\pm$  26,0), der niedrigste Wert bei 100 ng/ml TNF $\alpha$  (55,2 %  $\pm$  14,9).





**Abb. 3.7 TNF $\alpha$ -Konzentrationswirkungskurve für DLK und die Phosphorylierung von DLK**

**A** zeigt einen repräsentativen Western Blot. **B** Quantitative Auswertung von DLK- und P-DLK-repräsentierender Bande. HUVECs wurden für 30 min mit einer Konzentration von 0, 1, 3, 10, 30 und 100 ng/ml mit TNF $\alpha$  behandelt. Es wurde ein Western Blot durchgeführt und die Optische Dichte der Banden gemessen. Die Werte von DLK wurden mit GAPDH, die von P-DLK mit den Werten der DLK-präsentierenden Bande korrigiert und zum Mittelwert der Kontrolle in Relation gesetzt. Abgebildet sind Mittelwerte  $\pm$  SEM aus 3 unabhängigen Versuchen (zwei davon in Doppelbestimmung, ein Versuch in Einzelbestimmung) ( $n=5$ ). § $p \leq 0,05$  ( $t$ -Test) Unterschied zwischen DLK und phosphorylierter DLK innerhalb einer Konzentration.

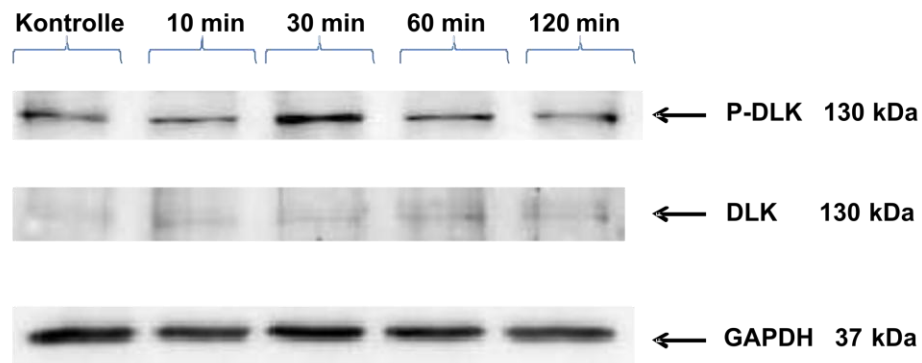
### 3.1.2.6 Zeitabhängige Wirkung von TNF $\alpha$ auf DLK und P-DLK

Um die optimale und effektivste Zeitdauer für die Behandlung mit TNF $\alpha$  in HUVECs zu untersuchen, wurden die HUVECs zu unterschiedlichen Zeiten (s. Beschriftungen) vor

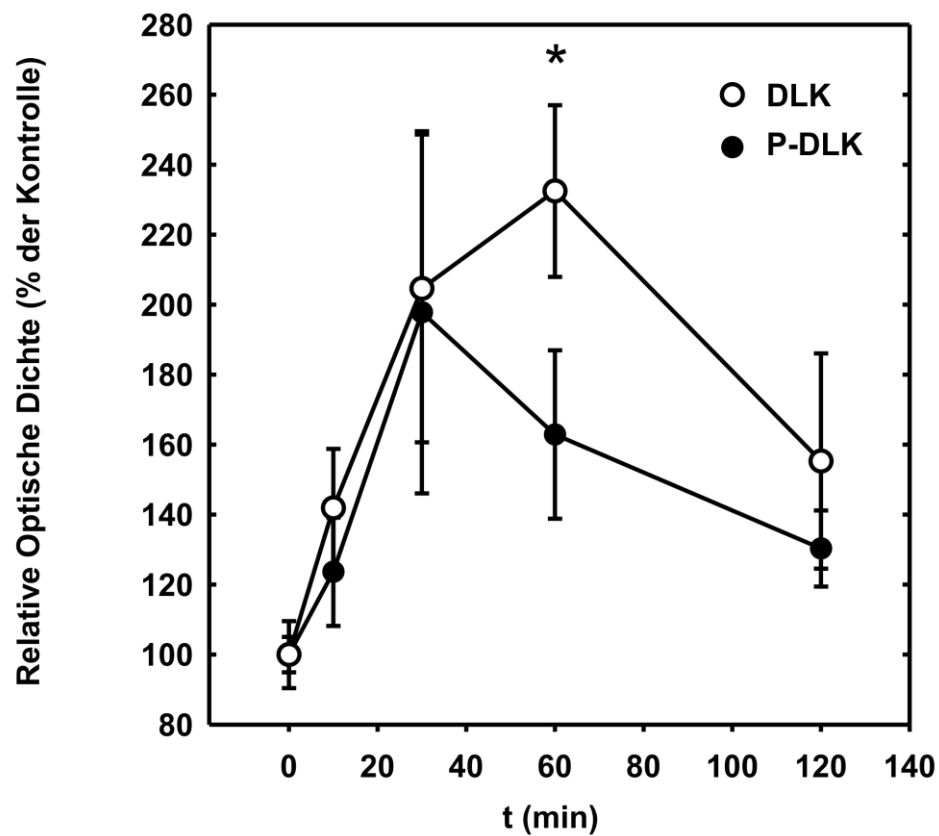
der Zellernte mit einer festen Konzentration von TNF $\alpha$  behandelt. Im Anschluss wurde ein Western Blot durchgeführt und der Proteingehalt von DLK und ihrer aktivierten Form P-DLK gemessen.

Abb. 3.7 A zeigt einen repräsentativen Western Blot. In Abb. 3.7 B ist die quantitative Auswertung der Optischen Dichte der DLK und P-DLK zu sehen. Es wurde analysiert, dass bei der Behandlung von DLK mit TNF $\alpha$  für 60 min im Vergleich zu den anderen Zeiten der größte Proteingehalt gemessen werden kann (232,4 %  $\pm$  24,5). Eine signifikante Erhöhung des Proteingehalts ist jedoch bei einer Zeit von 120 min (155,3 %  $\pm$  30,8) zu erkennen. Bei P-DLK liegt der größte gemessene Proteingehalt nach einer Behandlung von TNF $\alpha$  nach 30 min (197,8 %  $\pm$  51,7), die Erhöhung liegt hier nach 60 min (162,9 %  $\pm$  24,1) vor.

A



B



**Abb. 3.8 Zeitkurve: Wirkung von TNF $\alpha$  auf DLK und die Phosphorylierung von DLK**

A zeigt einen repräsentativen Western Blot. B Quantitative Auswertung von DLK und P-DLK. HUVECs wurden für 0, 10, 30, 60 und 120 min mit einer Konzentration von 10 ng/ml mit TNF $\alpha$  behandelt. Es wurde ein Western Blot durchgeführt und die optische Dichte der Banden gemessen. Die Werte von DLK wurden mit GAPDH, die von P-DLK wurden mit den Werten für die DLK-repräsentierende Bande korrigiert und zum Mittelwert der Kontrolle in Relation gesetzt. Abgebildet sind Mittelwerte  $\pm$  SEM aus 2 unabhängigen Versuchen jeweils in Doppelbestimmung (n=4). \* $p \leq 0,05$  (t-Test) Unterschied zum Ausgangswert bei 0 min.

## 3.2 Herstellung eines DLK-überexprimierenden Adenovirus DLK-wt und DLK-K185A

Eines der Ziele dieser Arbeit war es den letzten Arbeitsschritt zur Herstellung zweier rekombinanter, replikationsdefizienter Adenoviren, Ad-DLK-wt und Ad-DLK-K185A, zu leisten. Die zu entwickelnden Adenoviren sind vom Serotyp 5 und exprimieren DLK-wt oder ihre Mutante DLK-K185A. Sie sind membranumhüllte Viren und besitzen ein doppelsträngiges DNA-Genom von 36 kb.

Die hergestellten Adenoviren sollen für weitere Untersuchungen zur Wirkung der DLK auf die Funktion der HUVECs eingesetzt werden. Das Protokoll von He und Kollegen (1998) und Lou und Kollegen (2007) diente als Vorlage für die Herstellung.

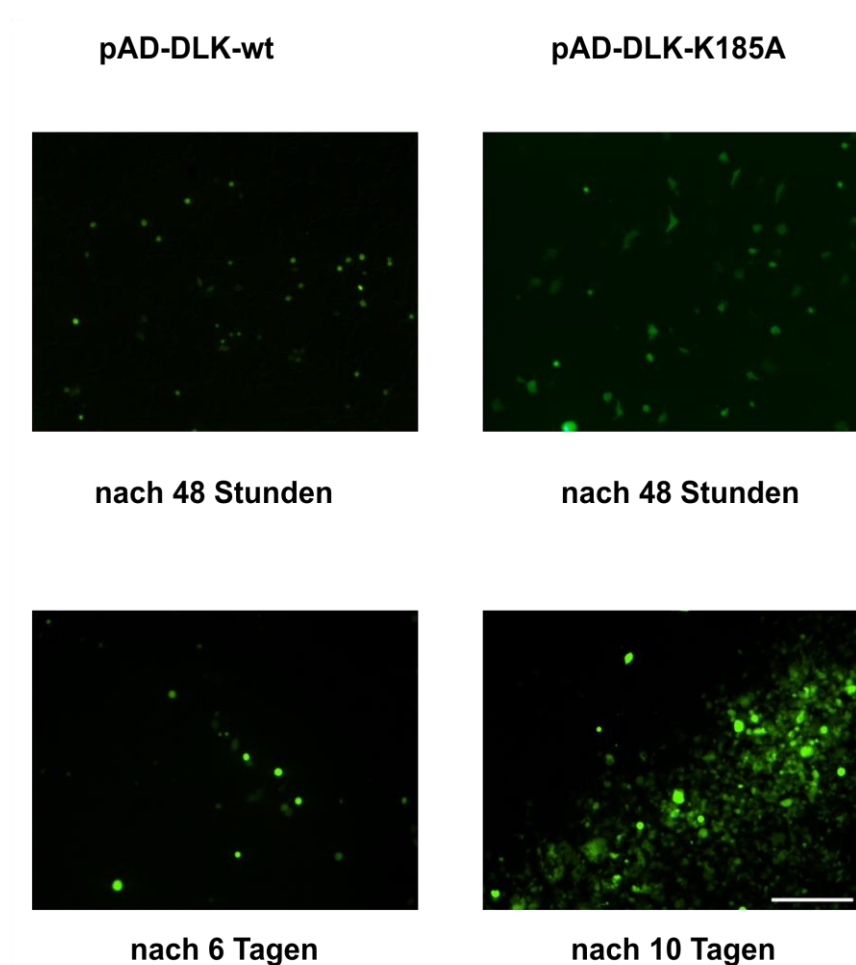
Zuerst wurde die transgene DNA in ein pAd-Track-CMV Vektor als Transfervektor kloniert. Der CMV-Vektor besitzt eine Expressionskassette für GFP sowie einen CMV-Promoter für die Expression der Zielsequenz (DLK). Danach wurde mittels Transformation des pAd-Easy-1-Adenovirus-Plasmids und homologe Rekombination zwischen dem pAd-Track-CMV Vektor und dem Zielplasmid pAd-Easy-1 das adenovirale Plasmid (pad-DLK Plasmid) hergestellt. Diese beiden Schritte wurden in der Arbeitsgruppe vorbereitet.

Nun wurde das pAd-DLK Plasmid in HEK-293A Zellen transfiziert. Diese dienen als Verpackungszellen und sind besonders gut dafür geeignet, weil sie die Deletion von E1 kodierenden Genen, welche das Plasmid nicht besitzt, ausgleichen können, indem sie diese Gene selber herstellen können (Luo et al. 2007). Mittels GFP-Detektion bei blauem oder ultraviolettem Licht (< 450nm Wellenlänge) konnte eine erfolgreiche Virusinfektion qualitativ analysiert werden. Nach ca. 14 Tagen konnte der Virus geerntet und mittels eines Cäsiumchloridgradienten aufgereinigt werden.

### 3.2.1 Transfektion der HEK-Zellen

Mit Hilfe des Metafectene-Easy-Systems (s. 2.2.4.1) wurde das pAd-DLK Plasmid in die HEK-293A-Zellen transfiziert. Durch die GFP-Expressionskassette konnte der Erfolg der Transfektion zu unterschiedlichen Zeiten (s. Beschriftungen) unter dem Fluoreszenzmikroskop kontrolliert werden.

Abb. 3.9 zeigt die Transfektion des pad-DLK-K185A-Plasmids nach 48 Stunden und nach 6 Tagen sowie die Transfektion des pad-DLK-wt-Plasmids nach 48 Stunden und 10 Tagen. Qualitativ wird bei der Transfektion des pad-DLK-wt-Plasmids im Vergleich zu dem pad-DLK-K185A-Plasmid nach 48 Stunden mehr GFP-Signal detektiert. Da das spätere aufgenommene Bild beider Plasmide zu unterschiedlichen Zeiten stattfand, ist es nicht miteinander vergleichbar. Jedoch ist zu erkennen, dass bei dem pAd-DLK-wt-Plasmid nach 10 Tagen ein deutlicheres und stärkeres GFP-Signal detektiert wurde als bei dem pad-DLK-K185A-Plasmid nach 6 Tagen.



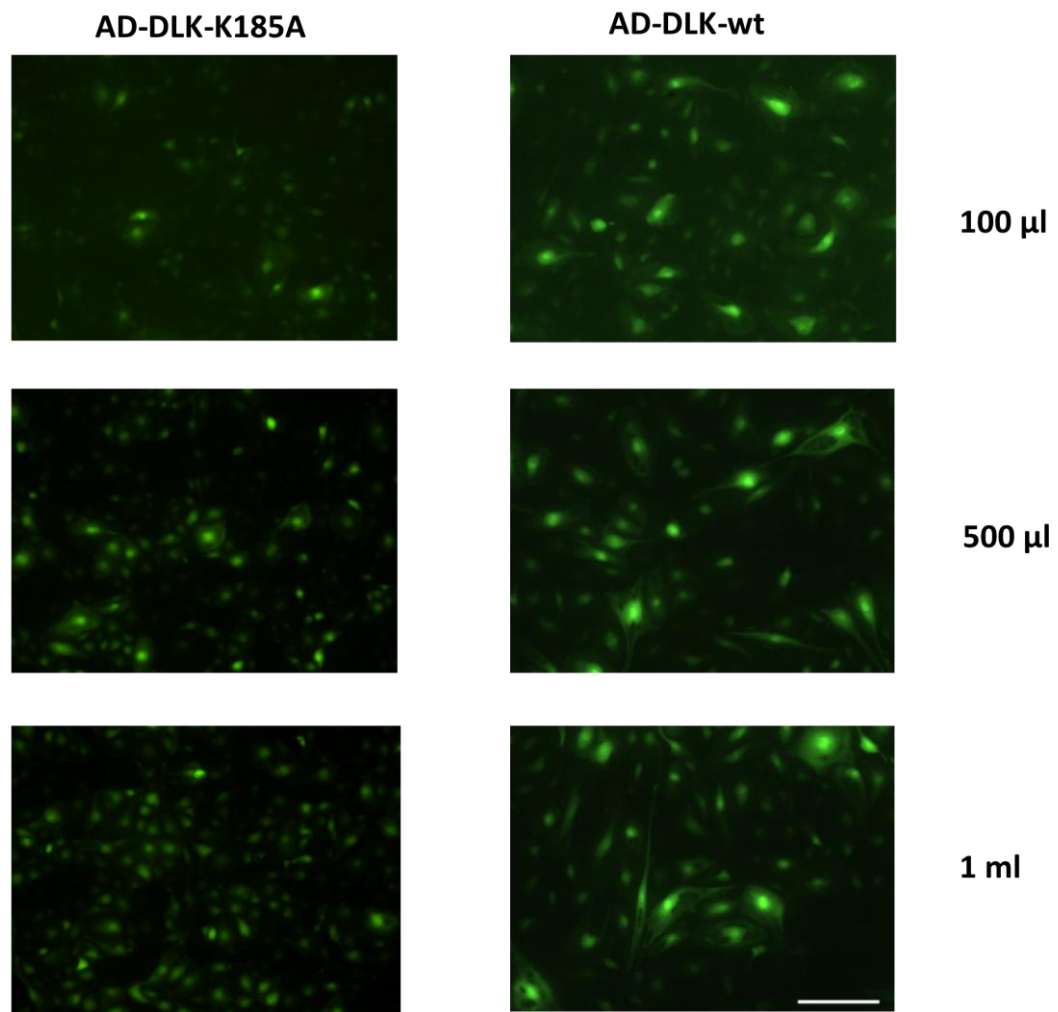
**Abb. 3.9** Darstellung von *pAd-DLK-Plasmid* transfizierten *HEK-293A-Zellen*

*HEK-293A-Zellen* wurden mittels des *Metafectene-Easy-Systems* mit dem *pAd-DLK-wt-Plasmid* und dem *pad-DLK-K185A-Plasmid* transfiziert. Das fusionierte *GFP-Signal* wurde nach 48 Stunden und 10, bzw. 6 Tagen bei einer Wellenlänge von  $<450\text{nm}$  detektiert. Die Vergrößerung ist fünffach und der Messbalken entspricht  $50\mu\text{m}$ .

### 3.2.2 Infektion der HUVECs mit Ad-DLK-wt und Ad-DLK-K185A

Um die Funktion und Richtigkeit der Viren zu überprüfen, wurden HUVECs mit den geernteten Ad-DLK-wt und Ad-DLK-K185A infiziert. Es wurde die Zelllinie HUVEC gewählt, da auch in späteren Versuchen endotheliale Zellen verwendet werden sollen. Die HUVECS wurden mit unterschiedlichem Volumen der Virussuspension infiziert und 2 Tage bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert.

Abb. 3.10 zeigen HUVECs, die mit  $100\ \mu\text{l}$ ,  $500\ \mu\text{l}$  und  $1\ \text{ml}$  Viruszellsuspension (Abb. 3.10) infiziert wurden. Die Bilder wurden 24 Stunden nach Infektion und Inkubation bei  $37^{\circ}\text{C}$  im Inkubator mit dem Fluoreszenzmikroskop aufgenommen und das *GFP-Signal* detektiert. Man erkennt, dass der Ad-DLK-wt bei der Infektion mit  $100\ \mu\text{l}$  Virussuspension ein stärkeres *GFP-Signal* liefert, als der Ad-DLK-K185A.

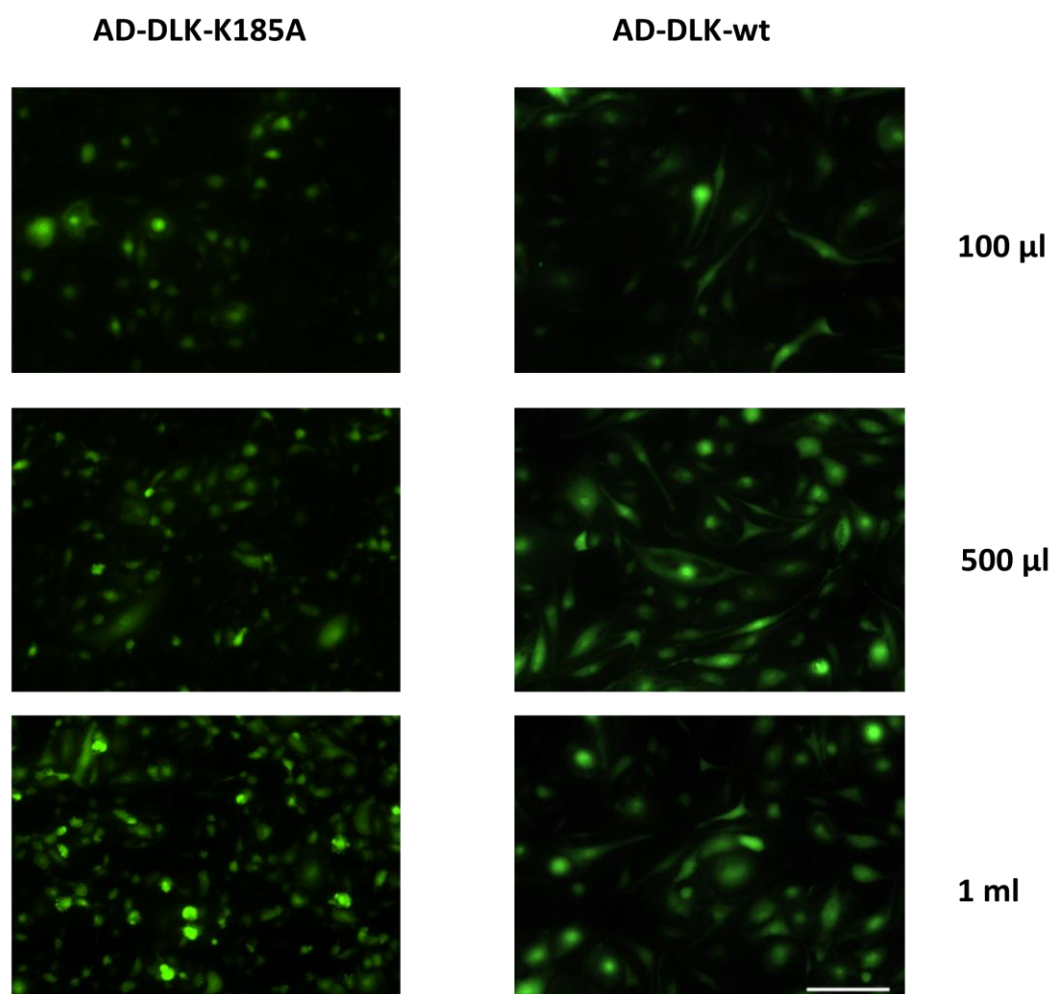


**Abb. 3.10 Darstellung der Infektion von HUVECs mit dem Ad-DLK-K185A und dem Ad-DLK-wt nach 24 Stunden**

HUVECs wurden in 6cm-Zellkulturschalen ausplattiert und mit 100 µl, 500 µl und 1 ml der Virussuspension von Ad-DLK-wt und Ad-DLK-K185A infiziert. Das fusionierte GFP-Signal wurde nach 24 Stunden unter dem Fluoreszenzmikroskop bei einer Wellenlänge von <math><450\text{ nm}</math> und fünffacher Vergrößerung detektiert. Der Messbalken entspricht 50 µm.

Danach ließ man die HUVECs weitere 24 Stunden bei 37°C inkubieren und analysierte sie unter dem Fluoreszenzmikroskop bevor sie geerntet wurden.

Abb. 3.11 zeigt HUVECs 48 Stunden nach der Infektion mit Ad-DLK-wt und Ad-DLK-K185A unter dem Fluoreszenzmikroskop. Qualitativ wird bei der Infektion mit 100 µl und 500 µl kaum ein Unterschied zum Vortag wahrgenommen, bei der Infektion mit 1 ml Virussuspension hingegen zeigen sich bei beiden Infektionen eine größere Anzahl von Zellen.

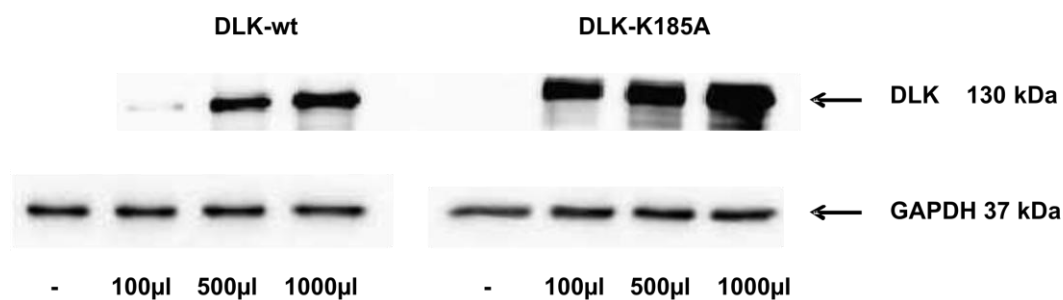


**Abb. 3.11 Darstellung der Infektion von HUVECs mit dem Ad-DLK-K185A und dem Ad-DLK-wt nach 48 Stunden**

HUVECs wurden in 6cm-Zellkulturschalen ausplattiert und mit 100 µl, 500 µl und 1 ml der Virussuspension von Ad-DLK-wt und Ad-DLK-K185A infiziert. Das fusionierte GFP-Signal wurde nach 48 Stunden unter dem Fluoreszenzmikroskop bei einer Wellenlänge von <math><450\text{ nm}</math> und fünffacher Vergrößerung detektiert. Der Messbalken entspricht 50 µm.

Um eine zusätzliche Kontrolle der Überexpression der DLK zu erhalten, wurden die HUVECs nach 48 Stunden geerntet und nach der Proteinbestimmung ein Western Blot mit dem DLK-spezifischen und GAPDH-spezifischen Antikörper und durchgeführt.

Abb. 3.12 zeigt einen repräsentativen Western Blot. Es ist zu erkennen, dass bei dem Ad-DLK-K185A schon bei der geringsten Menge ein deutliches Signal zu detektieren ist. Beim Ad-DLK-wt ist erst bei 500 µl ein vergleichbares Signal zu detektieren. Dies lässt schon zu diesem Zeitpunkt vermuten, dass der Ad-DLK-K185A infektiöser ist.



**Abb. 3.12 Kontrolle der Viren Ad-DLK-wt und Ad-DLK-K185A**

HUVECs wurden in 6cm-Zellkulturschalen ausplattiert und mit 100 µl, 500 µl und 1 ml der Virussuspension von Ad-DLK-wt und Ad-DLK-K185A infiziert. Zusätzlich wurde eine Kontrolle ohne Infektion angefertigt. Nach 48 Stunden wurden die HUVECs geerntet und ein Western Blot durchgeführt. GAPDH wurde als Kontrolle aufgeführt.

### 3.2.3 Bestimmung des Titers von Ad-DLK-wt und Ad-DLK-K185A

Um die hergestellten Viren in weiteren Experimenten adäquat nutzen zu können, wurde bei beiden Viren eine Titerbestimmung durchgeführt. Hierzu wurden HUVECs mit verschiedenen Verdünnungen der Virussuspension infiziert. Die weitestgehende Verdünnung, bei der noch eine Virusinfektion stattfand, wurde als Titer angegeben. Die Rechnung basierte auf dem Protokoll von (Nicklin und Baker 1999).

Die Titerbestimmung ergab:

Ad-DLK-wt/µl: 1.258.925.411,79

Ad-DLK-K185A/µl: 100.000.000.000

## 3.3 Untersuchung der Angiogenese bei Diät-induzierter Adipositas und Diabetes mellitus

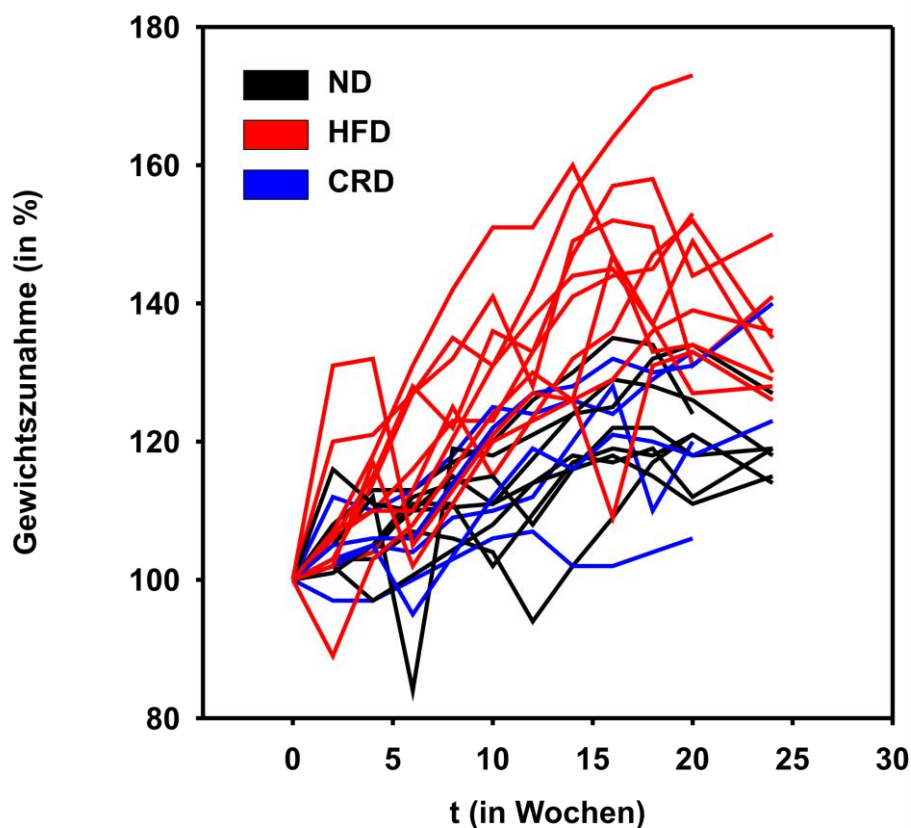
Um die Bedeutung der DLK für die Angiogenese bei Fettleibigkeit und Diabetes Mellitus zu untersuchen, wurden Mäuse im Alter von 8 Wochen für 20 Wochen verschiedenen Diäten unterworfen. Hierfür wurden männliche C57/BL6-Mäuse verwendet, die nur ein DLK-Allel besitzen sowie auch wildtyp (wt)-Mäuse mit zwei DLK Allelen. Die Diäten bestanden aus kohlenhydratreichem (CRD) und fettreichem Futter (HFD). Als Kontrollgruppe dienten heterozygote und wt-Mäuse mit Normaldiät (ND). In Abständen von zwei Wochen wurden die Mäuse regelmäßig gewogen und alle vier Wochen der Blutzucker kontrolliert um den Gewichtsverlauf und die Entwicklung eines Diabetes mellitus zu dokumentieren. Nach 20 Wochen Diät wurde bei den Tieren eine Ischämie am rechten Hinterlauf verursacht um im späteren Verlauf die Neovaskularisierung zu beurteilen. Nach weiteren vier Wochen, in denen regelmäßig eine Perfusionmessung beider Hinterläufe stattfand, wurden die Tiere getötet und die Muskeln der Hinterläufe entnommen. Die Re-Endothelialisierung wurde mittels CD31-spezifischer Färbung an Muskelschnitten untersucht.



### 3.3.1 Gewichtsverlauf der Mäuse mit CRD, HFD und ND

Die heterozygoten (+/-) und Wildtypmäuse wurden im Alter von 8 Wochen verschiedenen Diäten unterworfen. Im regelmäßigen Abstand von 2 Wochen wurden alle Mäuse unter gleichen Bedingungen gewogen.

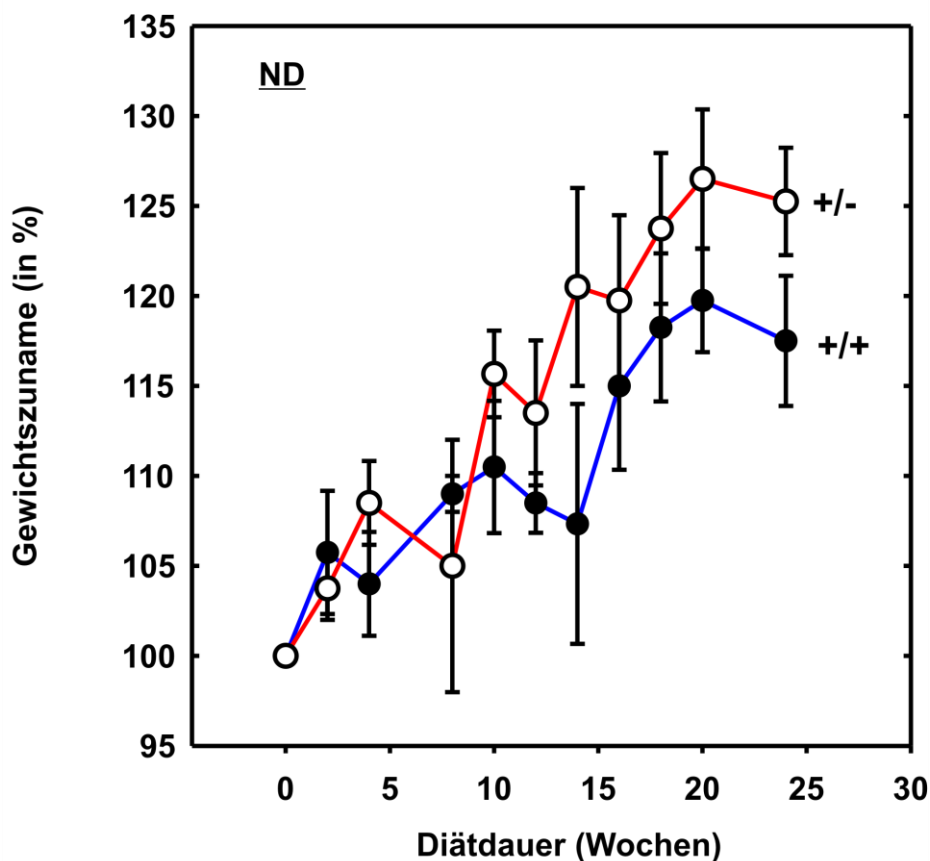
Abb. 3.13 zeigt den Gewichtsverlauf aller Mäuse. Die Mäuse mit HFD zeigen in der Gesamtbetrachtung eine größere Gewichtszunahme als die Mäuse mit CRD und ND.



**Abb. 3.13 Gewichtszunahme aller Mäuse**

Männliche C 57/Bl6-Mäuse wurden im Alter von acht Wochen einer Normaldiät (ND), kohlenhydratreicher (CRD) und fettreicher Diät (HFD) unterworfen und regelmäßig im Abstand von 2 Wochen gewogen. Die Gewichtszunahme ist in % angegeben und bezieht sich auf das Ausgangsgewicht zu Beginn der Diäten.

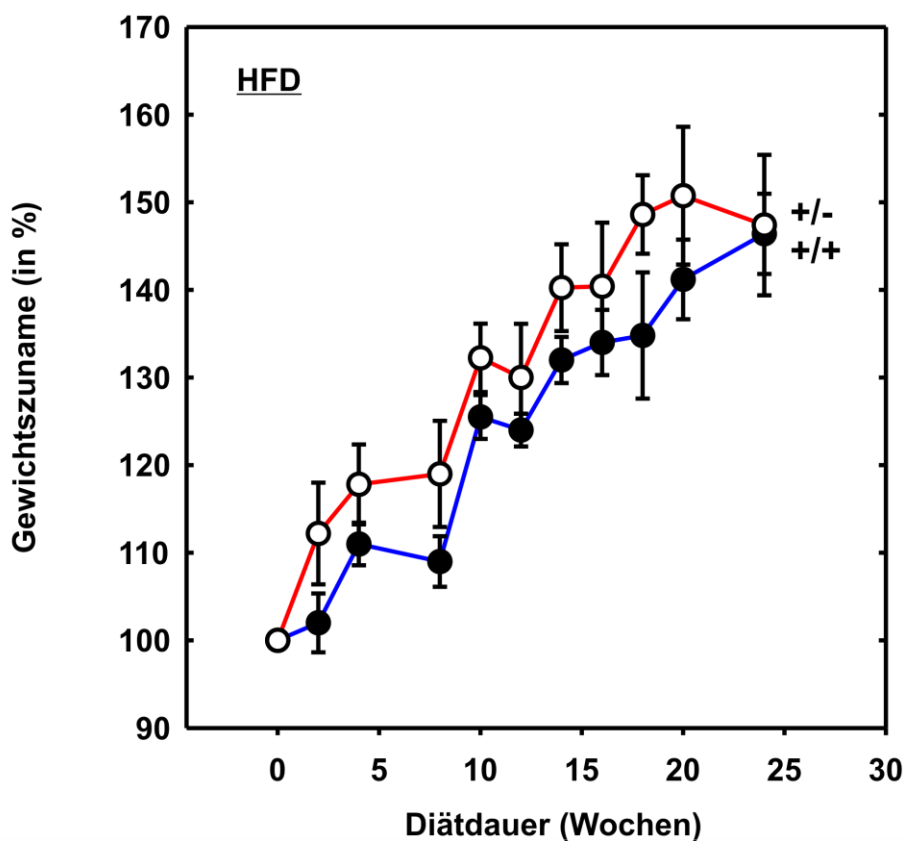
Abb. 3.14 zeigt die Gewichtszunahme der Mäuse, die Normaldiät bekamen, aufgeschlüsselt in heterozygote und wt-Mäuse. Es ist zu erkennen, dass die heterozygoten Mäuse mit nur einem DLK Allel im Durchschnitt eine stärkere Gewichtszunahme zeigen als die wt-Mäuse. Nach 20 Wochen beträgt die Gewichtszunahme der heterozygoten Mäuse  $125,3 \% \pm 3$ , die Gewichtszunahme der wt-Mäuse liegt bei  $117,5 \% \pm 3,6$ .



**Abb. 3.14** Gewichtszunahme der Mäuse mit Normaldiät

Männliche C57/Bl6-Mäuse wurden im Alter von acht Wochen bei Normaldiät (ND) belassen und regelmäßig im Abstand von 2 Wochen gewogen. Die Gewichtszunahme ist in % angegeben und bezieht sich auf das Ausgangsgewicht zu Beginn der Diäten. Die heterozygoten Mäuse (+/-) sind getrennt von den DLK-wt-Mäusen dargestellt. Die Anzahl der Mäuse beträgt  $n=2-4$ .

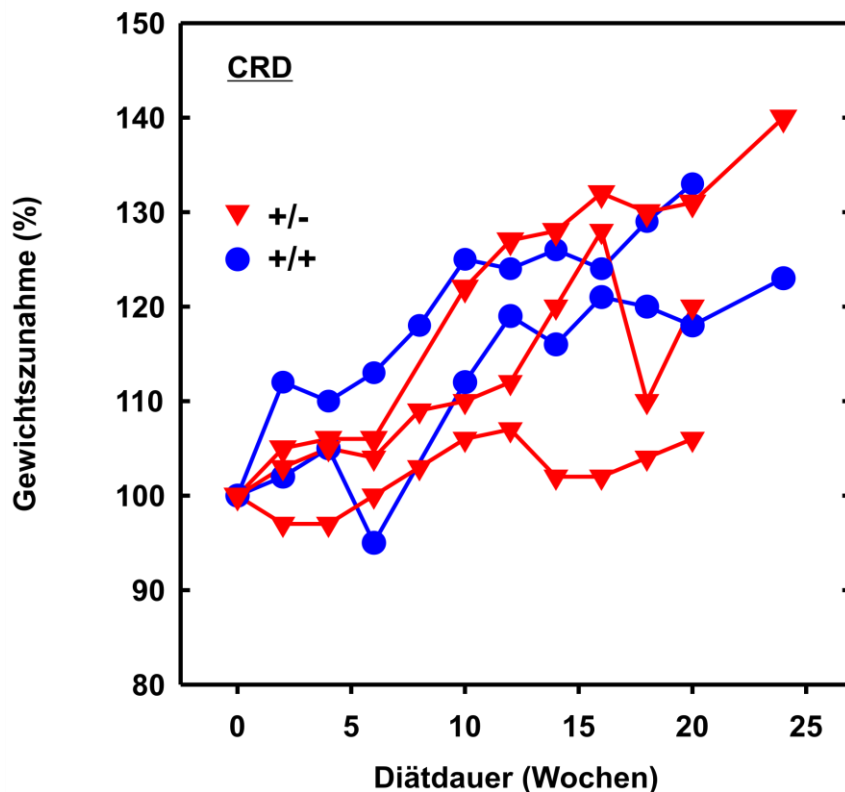
Abb. 3.15 zeigt die Gewichtszunahme der Mäuse, die fettreiche Diät bekamen, aufgeschlüsselt in heterozygote und wt-Mäuse. Es ist zu erkennen, dass die heterozygoten Mäuse mit nur einem DLK Allel im Durchschnitt eine stärkere Gewichtszunahme zeigt als die wt-Mäuse. Nach 20 Wochen zeigen die heterozygoten Mäuse eine Gewichtszunahme von  $150\% \pm 7,8$ , die wt-Mäuse eine Zunahme von  $141\% \pm 4,5$ .



**Abb. 3.15 Gewichtszunahme der Mäuse mit fettreicher Diät**

Männliche C57/Bl6-Mäuse wurden im Alter von acht Wochen fettreicher Diät (HFD) unterworfen und regelmäßig im Abstand von 2 Wochen gewogen. Die Gewichtszunahme ist in % angegeben und bezieht sich auf das Ausgangsgewicht zu Beginn der Diäten. Die heterozygoten Mäuse (+/-) sind getrennt von den Wildtypmäusen dargestellt. Die Anzahl der Mäuse beträgt  $n=2$  (+/-),  $n=5$  (+/+).

Abb. 3.16 zeigt die Gewichtszunahme der Mäuse, die kohlenhydratreiche Diät bekamen, aufgeschlüsselt in heterozygote und wt-Mäuse. Da bisher nur zwei wt-Mäuse an der Studie eingeschlossen wurden, ist die Gewichtszunahme der einzelnen Mäuse aufgeführt. Hier zeigt sich kein Unterschied der verschiedenen Gruppen.



**Abb. 3.16 Gewichtszunahme der Mäuse mit kohlenhydratreicher Diät**

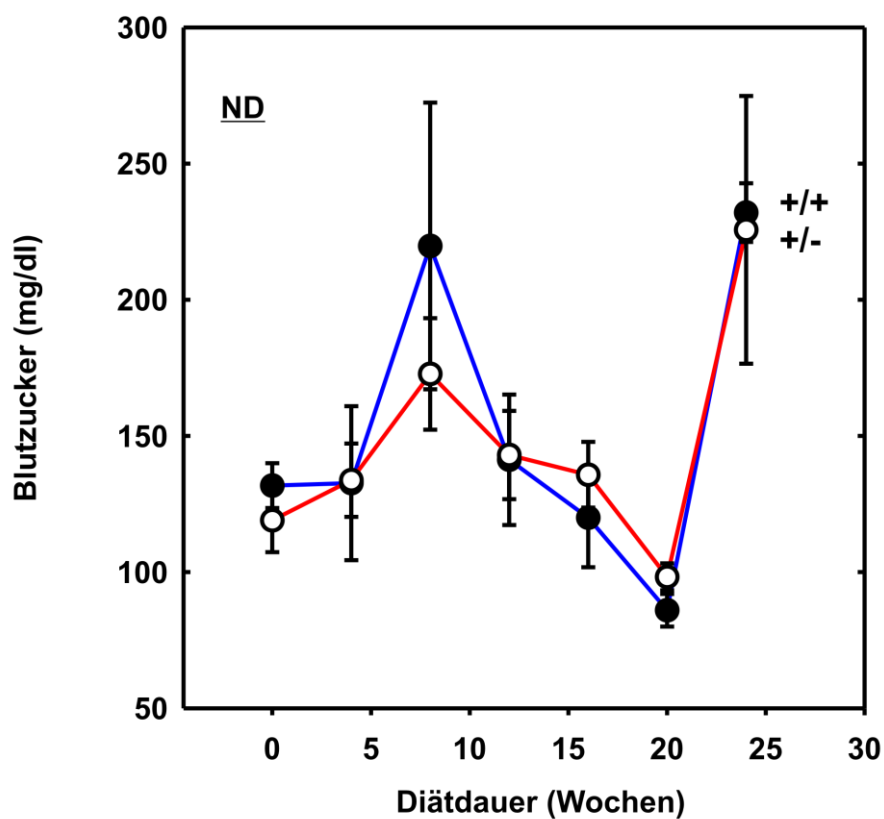
Männliche C 57/Bl6-Mäuse wurden im Alter von acht Wochen kohlenhydratreiche Diät (CRD) unterworfen und regelmäßig im Abstand von 2 Wochen gewogen. Die Gewichtszunahme ist in % angegeben und bezieht sich auf das Ausgangsgewicht zu Beginn der Diäten. Die heterozygoten Mäuse (+/-),  $n=3$ , sind getrennt von den Wildtypmäusen,  $n=2$ , dargestellt.

### 3.3.2 Blutzucker der Mäuse unter unterschiedlichen Diäten

Der Blutzucker gilt als entscheidender Verlaufsparemeter eines Diabetes mellitus. Zu Beginn der Diäten wurde ein Ausgangswert bestimmt und in regelmäßigem Abstand von 4 Wochen bei allen Mäusen der Blutzucker gemessen.

Abb. 3.17 zeigt die Blutzuckerwerte aller Mäuse mit ND. Die Mäuse sind getrennt in heterozygote und wt-Mäuse dargestellt. Qualitativ ist im gesamten Verlauf zu erkennen, dass alle Werte bis zur Diätwoche 8 leicht steigend sind, danach bis zur Woche 20 langsam wieder sinken. In Woche 24 sieht man bei allen Mäusen eine Steigerung des Blutzuckerwertes. Der Wert der heterozygoten Mäuse ist von  $98,2 \% \pm 5$  in Woche 20 auf  $225 \% \pm 49$  in Woche 24 gestiegen. Der Wert der wt-Mäuse ist von  $86 \% \pm 6$  in Woche 20 auf  $232 \% \pm 20,7$  in Woche 24 gestiegen. Zu Beginn der Messungen erkennt man, dass die wt-Mäuse mit ihrem Blutzucker leicht über den Werten der Heterozygoten liegen. Ab

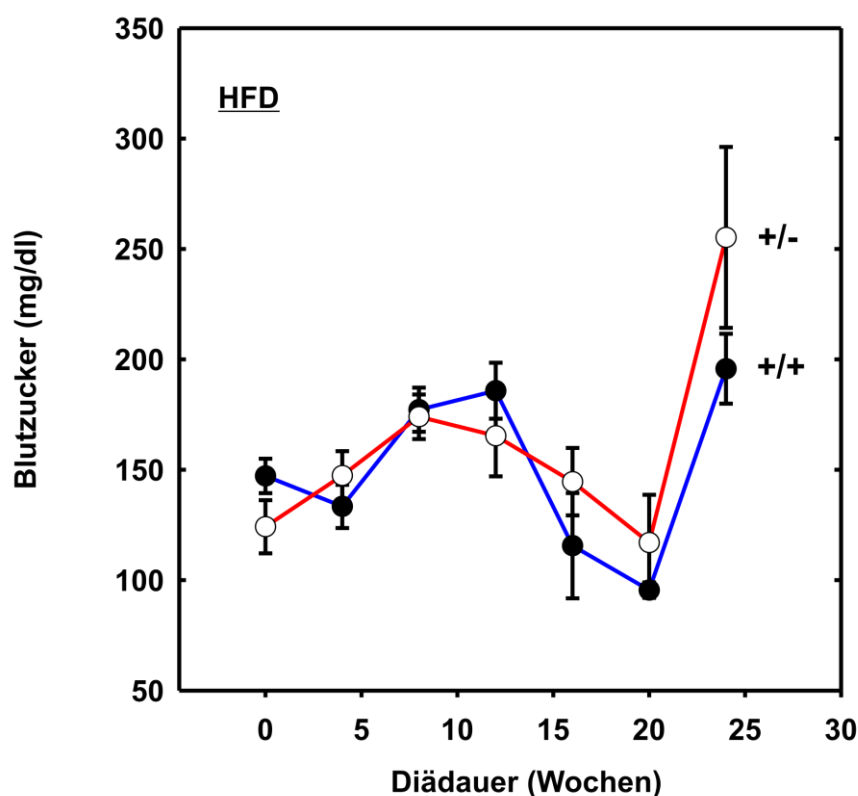
Woche 12 scheint sich die Tendenz umzukehren und die Blutzuckerwerte der heterozygoten Mäuse liegen über denen der wt-Mäuse.



**Abb. 3.17 Blutzuckerwerte der Mäuse mit Normaldiät**

Männliche C57/Bl6-Mäuse wurden im Alter von acht Wochen bei Normaldiät (ND) belassen und es wurde regelmäßig im Abstand von 4 Wochen der Blutzucker gemessen. Die Werte beziehen sich auf den Ausgangswert zu Beginn der Diäten. Die heterozygoten Mäuse (+/-) sind getrennt von den Wildtypmäusen dargestellt. Die Anzahl der Mäuse beträgt  $n=2-4$ .

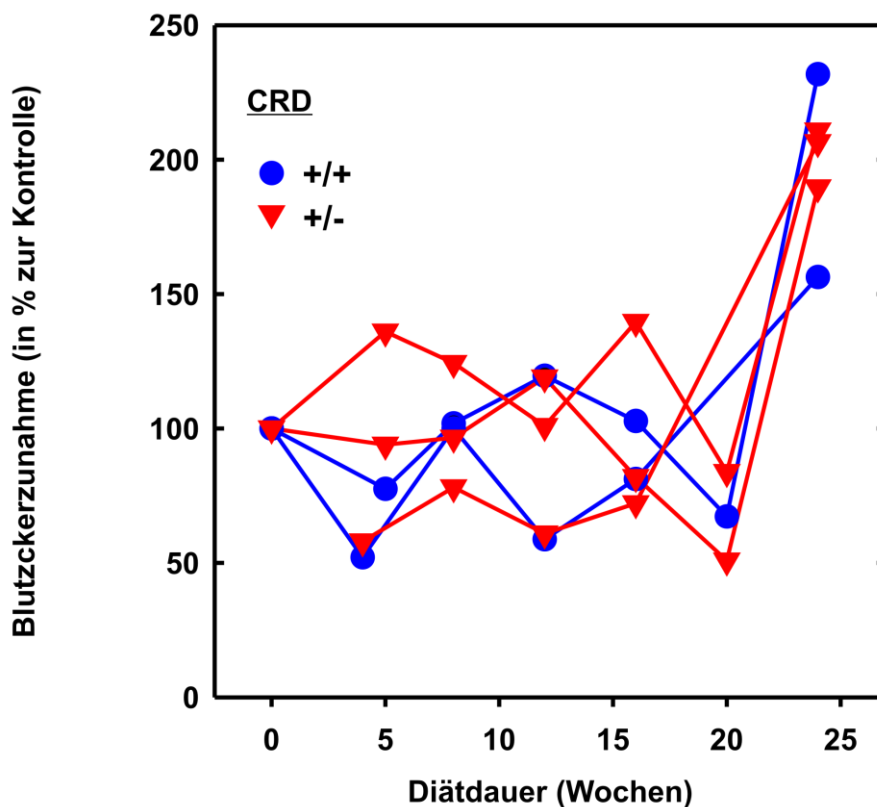
Abb. 3.18 zeigt die Blutzuckerwerte aller Mäuse mit HFD. Die Mäuse sind getrennt in heterozygote und wt-Mäuse dargestellt. Qualitativ ist im gesamten Verlauf keine klare Tendenz der Werte zu erkennen. Die Kurven der beiden Gruppen schneiden sich mehrmals. Ab Woche 16 zeigt sich, dass die Werte der heterozygoten Mäuse mit  $144,6\% \pm 15,2$  leicht über den Werten der wt-Mäuse mit  $115,6\% \pm 23,8$  liegen. Auch hier ist ein starker Anstieg der Werte von Woche 20 zu Woche 24 sichtbar.



**Abb. 3.18 Blutzuckerwerte der Mäuse mit fettreicher Diät**

Männliche C57/Bl6-Mäuse wurden im Alter von acht Wochen fettreicher Diät (HFD) unterworfen und es wurde regelmäßig im Abstand von 4 Wochen der Blutzucker gemessen. Die Werte beziehen sich auf den Ausgangswert zu Beginn der Diäten. Die heterozygoten Mäuse (+/-) sind getrennt von den Wildtypmäusen dargestellt. Die Anzahl der Mäuse beträgt  $n=2$  (+/-),  $n=5$  (+/+).

Abb. 3.19 zeigt die Blutzuckerwerte aller Mäuse mit CRD. Die Mäuse sind getrennt in heterozygote und wt-Mäuse dargestellt. Qualitativ ist im gesamten Verlauf bis Woche 20 keine klare Tendenz in den beiden Gruppen zu erkennen. In Woche 24 steigen die Werte aller Mäuse stark an.



**Abb. 3.19 Blutzuckerwerte der Mäuse mit kohlenhydratreicher Diät**

Männliche C 57/Bl6-Mäuse wurden im Alter von acht Wochen kohlenhydratreicher Diät (CRD) unterworfen, und es wurde regelmäßig im Abstand von 4 Wochen der Blutzucker gemessen. Die Werte beziehen sich auf den Ausgangswert zu Beginn der Diäten. Die Blutzuckerzunahme ist in % angegeben und bezieht sich auf den Ausgangswert zu Beginn der Diäten. Die heterozygoten Mäuse (+/-), n=3, sind getrennt von den Wildtypmäusen, n=2, dargestellt.

In Tabelle 1 sind alle Blutzuckerwerte der einzelnen Mäuse der Diätwoche 20 aufgelistet. Ein Unterschied zwischen den Diätformen ist nicht eindeutig zu erkennen. Innerhalb einer Diät ist jedoch auffällig, dass die Blutzuckerwerte der wt-Mäuse im Durchschnitt unter den Werten der heterozygoten Mäuse liegen.

<b>Blutzuckerwerte [mg/dl] der Diätwoche 20:</b>							
<b>ND</b>		<b>HFD</b>		<b>CRD</b>			
wt	heterozygot	wt	heterozygot	wt	heterozygot		
80	103	99	93	72	142		
92	97	92	97		59		
	108		182				
	85		96				

**Tabelle 1: Blutzuckerwerte aller Mäuse in Diätwoche 20**

Männliche C 57/Bl6-Mäuse wurden im Alter von acht Wochen verschiedenen Diätformen (ND, HFD, CRD) unterworfen, und es wurde regelmäßig im Abstand von 4 Wochen der Blutzucker gemessen. Aufgelistet sind die Blutzuckerwerte in Diätwoche 20 aller Mäuse. Die Werte der Mäuse sind eingeteilt in die verschiedenen Diäten und Phänotypen. Die Blutzuckerwerte sind in mg/dl angegeben.

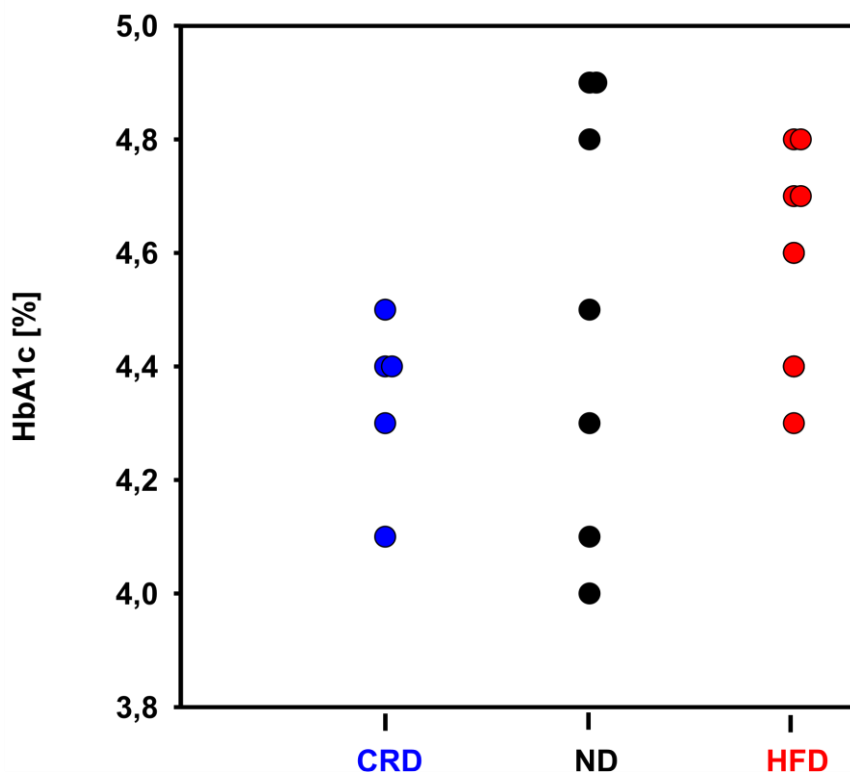
### 3.3.3 HbA1c-Wertmessung der Mäuse mit ND, HFD und CRD

Der HbA1c-Wert, auch Glykohämoglobin genannt, ist ein Langzeitblutzuckerwert bei dem der rote Blutfarbstoff Hämoglobin an Glukose bindet. Da diese Reaktion ohne Mitwirkung von Enzymen stattfindet handelt es sich nicht um eine Glykosylierung. Mithilfe des HbA1c-Wert ist es möglich Rückschlüsse auf die mittleren Blutzuckerwerte der letzten acht Wochen zu ziehen. Im Alltag wird der HbA1c-Wert als Kontrollwert bei Diabetikern verwendet. Der HbA1c-Wert wird im Alltag in % angegeben, jedoch standardisierte die IFCC (International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine) den HbA1c-Wert auf mmol/mol. Der Normwert bei Menschen sollte zwischen 29-42 mmol/mol liegen, was 4,8-6 % entspricht.

Um den durchschnittlichen Langzeitblutzuckerwert der Mäuse zu ermitteln wurde allen Mäusen unabhängig von ihrer Diät in der 24. Woche vor ihrer Tötung Blut abgenommen und der HbA1c-Wert gemessen.



Abb. 3.20 zeigt die HbA1c-Werte aller Mäuse aufgeschlüsselt nach ihrer Diät. Die Diäten scheinen keinen Einfluss auf den HbA1c-Wert zu haben. Man sieht in allen Diäten hohe und niedrige Werte. Auffallend ist, dass die Werte nicht im humanen Referenzintervall liegen sondern niedriger sind. Hier liegen die Werte zwischen 4,1 und 4,9 %, keiner der Werte übersteigt 6 %.



**Abb. 3.20 HbA1c-Werte aller Mäuse**

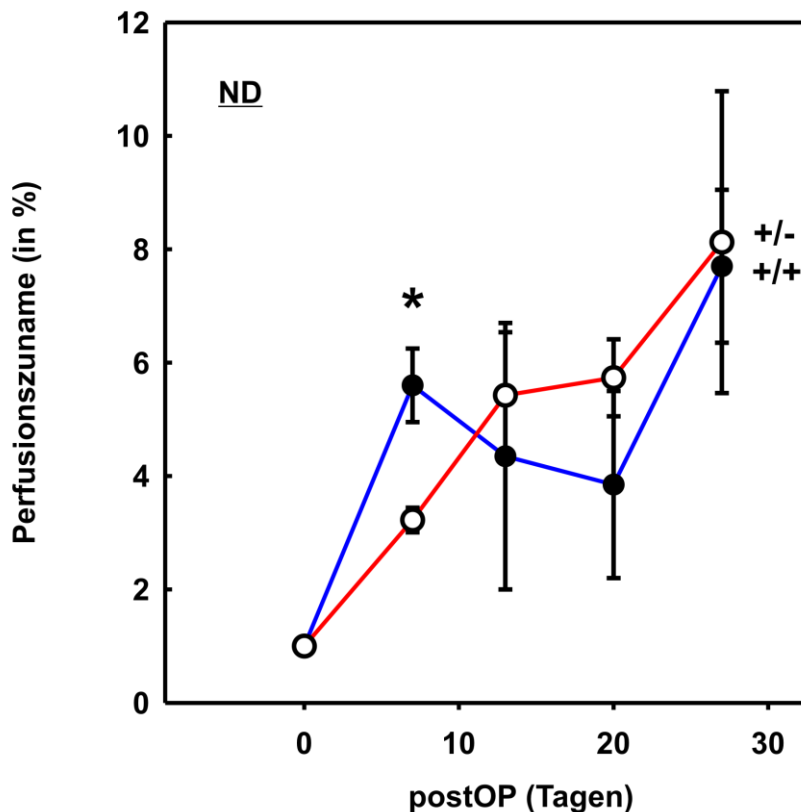
Männliche C 57/Bl6-Mäuse wurden im Alter von acht Wochen Normaldiät (ND), fettreicher Diät (HFD) und kohlenhydratreicher Diät (CRD) unterworfen. In der 24. Woche wurde der HbA1c-Wert gemessen. Die Werte sind nach der dazugehörigen Diät der Maus aufgeschlüsselt. Die Anzahl der Mäuse beträgt  $n=19$ .

### 3.3.4 Perfusion der Hinterläufe nach Ischämie der Mäuse mit ND, HFD und CRD

Um eine ischämieinduzierte Neovaskularisierung zu untersuchen, wurde den Tieren nach der 20. Diätwoche die Arteria femoralis des rechten Hinterlaufs ligiert. In den nachfolgenden vier Wochen wurde im regelmäßigen Abstand die Perfusion des rechten Hinterlaufs gemessen und mit dem gesunden linken Hinterlauf verglichen. Dies wurde als Maß einer Gefäßneubildung gewertet. Während dieser vier Wochen wurden die Tiere weiterhin mit ihrer entsprechenden Diätform ernährt.

Abb. 3.21 zeigt die Perfusion des ligierten rechten Hinterlaufs aller Mäuse mit Normaldiät. Die Mäuse sind nach ihrem Genotyp aufgeschlüsselt. Die Perfusion der linken Hinterläufe gilt als normale Durchblutung und wird als 100 % gesetzt. Die Perfusion der rechten Hinterläufe wird anteilmäßig verglichen mit dem linken Hinterlauf und in % angegeben. Die direkt nach OP-verbleibende Perfusion des rechten Hinterlaufs wurde als 1 gesetzt. Alle folgenden Werte werden relativ dazu ausgedrückt. Es ist zu

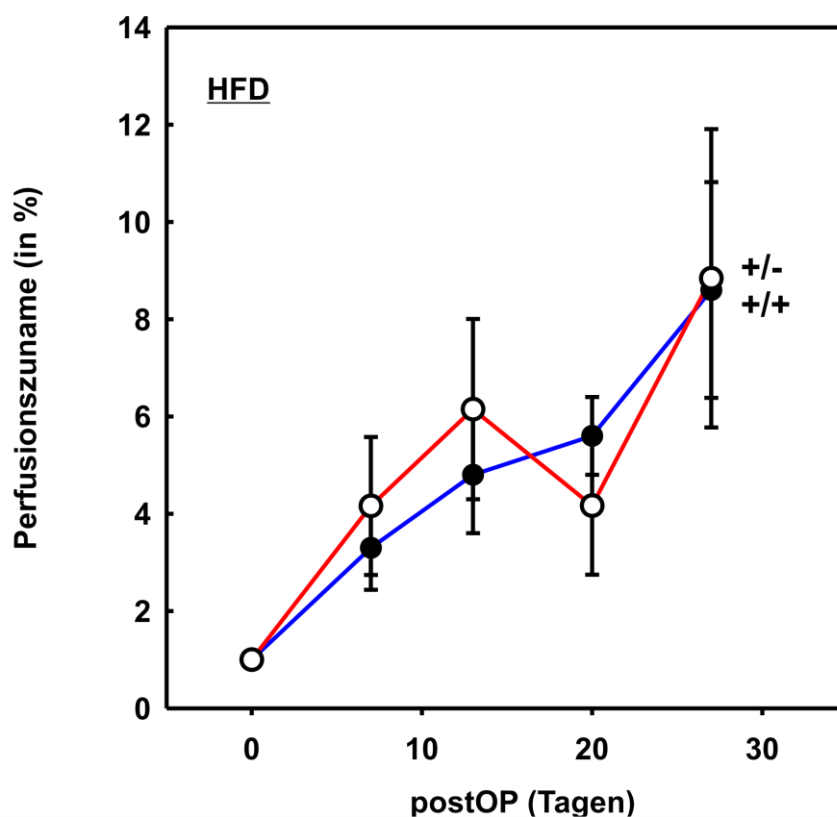
erkennen, dass die Perfusion der heterozygoten Mäuse bei Normaldiät kontinuierlich bis zum Tag der Finalisierung zunimmt. Die Perfusion der wt-Mäuse nimmt nach dem sechsten Tag etwas ab, nähert sich jedoch nach vier Wochen dem Wert der heterozygoten Mäuse an.



**Abb. 3.21** Perfusionszunahme in den Hinterläufen nach Ligation der Arteria femoralis der Mäuse mit Normaldiät

Männliche C57/Bl6-Mäuse wurden im Alter von acht Wochen Normaldiät (ND) unterworfen. Nach 20 Wochen wurden in den rechten Hinterläufen mittels einer Ligation der Arteria femoralis eine Ischämie indiziert und die Perfusionszunahme der ligierten Hinterläufe mittels Dopplermessgerät gemessen. Die Werte beziehen sich auf den Ausgangswert zu Beginn der Ischämie. Die heterozygoten Mäuse (+/-) sind getrennt von den Wildtypmäusen dargestellt. Die Anzahl der Mäuse beträgt  $n=2-4$ .  $*p \leq 0,05$  (t-Test) Unterschied zwischen +/- und +/+ am gleichen postOP-Tag.

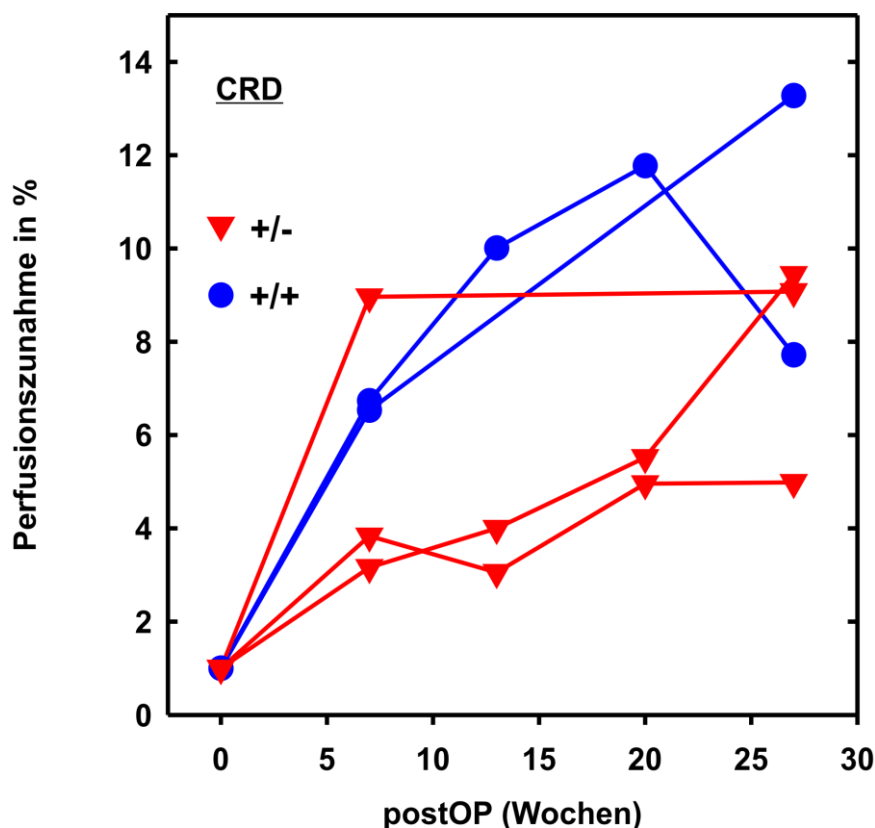
Abb. 3.22 zeigt die Perfusion des ligierten rechten Hinterlaufs aller Mäuse mit fettreicher Diät. Die Mäuse sind nach ihrem Genotyp aufgeschlüsselt. Die Perfusion der linken Hinterläufe gilt als normale Durchblutung und wird als 100 % gesetzt. Die Perfusion der rechten Hinterläufe wird anteilmäßig verglichen mit dem linken Hinterlauf und in % angegeben. Die direkt nach OP-verbleibende Perfusion des rechten Hinterlaufs wurde als 1 gesetzt. Alle folgenden Werte werden relativ dazu ausgedrückt. Es ist zu erkennen, dass die Perfusion der wt-Mäuse kontinuierlich bis zum Tag der Finalisierung zunimmt. Die Perfusion der heterozygoten Mäuse nimmt nach dem vierzehnten Tag etwas ab, nähert sich jedoch nach vier Wochen dem Wert der heterozygoten Mäuse an.



**Abb. 3.22** Perfusionszunahme in den Hinterläufen nach Ligation der Arteria femoralis der Mäuse mit fettreicher Diät

Männliche C57/Bl6-Mäuse wurden im Alter von acht Wochen fettreicher Diät (HFD) unterworfen. Nach 20 Wochen wurden in den rechten Hinterläufen mittels einer Ligation der Arteria femoralis eine Ischämie induziert und die Perfusionszunahme der ligierten Hinterläufe mittels Dopplermessgerät gemessen. Die Werte beziehen sich auf den Ausgangswert zu Beginn der Ischämie. Die heterozygoten Mäuse (+/-) sind getrennt von den Wildtypmäusen dargestellt. Die Anzahl der Mäuse beträgt  $n=2$  (+/-),  $n=5$  (+/+).

Abb. 3.23 zeigt die Perfusion des ligierten rechten Hinterlaufs aller Mäuse mit kohlenhydratreicher Diät. Die Mäuse sind getrennt in heterozygote und wt-Mäuse dargestellt. Da bisher nur zwei wt-Mäuse mit Normaldiät in die Studie mit einbezogen sind, sind hier die einzelnen Mäuse zu sehen. Der Ausgangswert einer jeden Perfusion ist eins. Qualitativ ist eine Tendenz zu erkennen, dass die Perfusion der wt-Mäuse im Vergleich zu den heterozygoten Mäusen bis zum Tag der Ernte stärker zunimmt.



**Abb. 3.23** Perfusionszunahme in den Hinterläufen nach Ligation der Arteria femoralis der Mäuse mit kohlenhydratreicher Diät

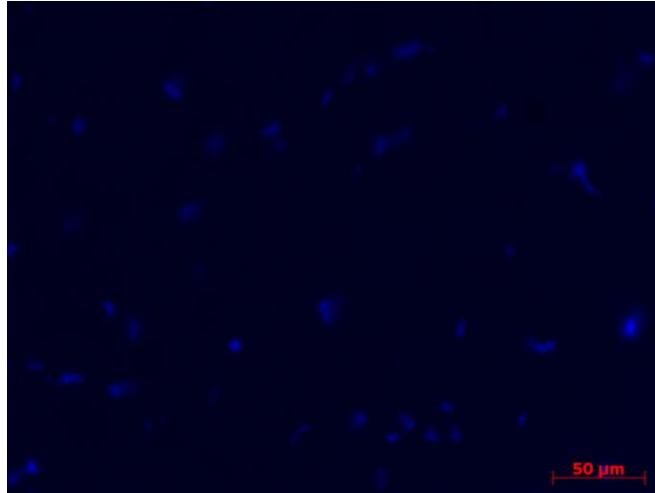
Männliche C 57/Bl6-Mäuse wurden im Alter von acht Wochen auf Kohlenhydratreiche Diät (CRD) gesetzt. Nach 20 Wochen wurden in den rechten Hinterläufen mittels einer Ligation der Arteria femoralis eine Ischämie indiziert und die Perfusionszunahme der ligierten Hinterläufe mittels Dopplermessgerät gemessen. Die Werte beziehen sich auf den Ausgangswert zu Beginn der Ischämie. Die heterozygoten Mäuse (+/-), n=2-3, sind getrennt von den Wildtypmäusen, n=1-2, dargestellt.

### 3.3.5 Untersuchung der Neovaskularisierung und Intimaneubildung bei Muskelzellen nach Ischämie

Um die Re-Endothelialisierung der Muskelzellen auf zellulärer Ebene zu untersuchen, wurden die Mäuse vier Wochen nach der ischämieinduzierten Ligation der rechten Hinterläufe getötet und sowohl der linke gesunde Hinterlauf, als auch der rechte ischämische Hinterlauf entnommen.

Die Muskeln wurden mittels Cryotoms in 5-10 µm dicke Schnitte geschnitten und anschließend mit einem Fluoreszenz markiertem Antikörper angefärbt. Es wurde einerseits ein Antikörper gegen PECAM-1 (platelet/endothelial cell adhesion molecule-1), auch CD31 genannt, verwendet, welcher die Gefäßzellen anfärbt. Andererseits wurde ein DAPI-Antikörper eingesetzt, der die Zellkerne aller Zellen sichtbar macht. Dies ermöglicht eine Auszählung der Gefäßzellen und der Zellkerne insgesamt.

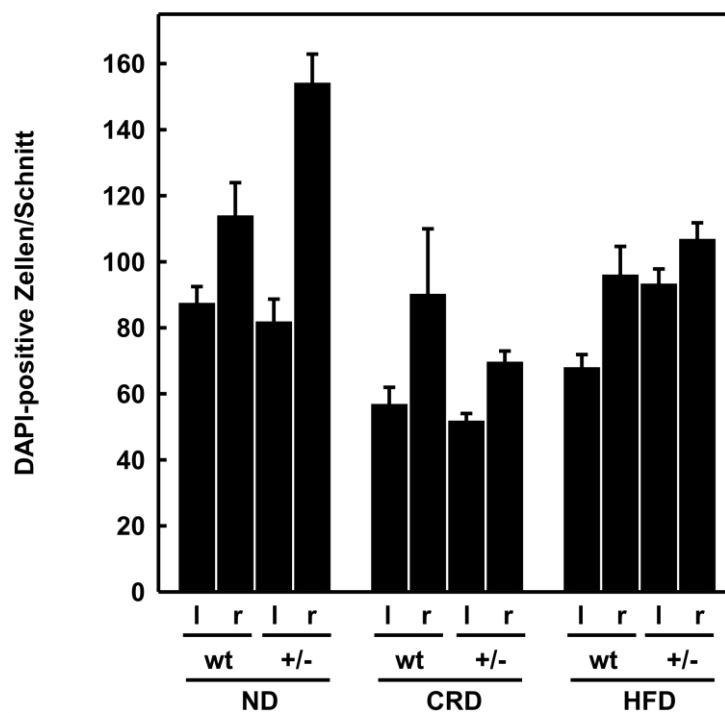
Abb. 3.24 zeigt ein typisches Bild durch den Querschnitt eines linken Hinterlauf-Muskels, bei dem alle Zellkerne angefärbt sind. Die Größe dieser Zellkerne entspricht der normalen Größe eines Zellkerns einer Skelettmuskelzelle von etwa 8-10  $\mu\text{m}$ .



**Abb. 3.24 Fluoreszenzmikroskopisches Bild von DAPI-angefärbten Muskelzellen**

Muskelzellen aus dem linken *Musculus gastrocnemius* einer Maus mit Normaldiät. Die Zellkerne (hier blau) wurden mittels DAPI-Färbung sichtbar gemacht. Skalierung entspricht 50  $\mu\text{m}$ .

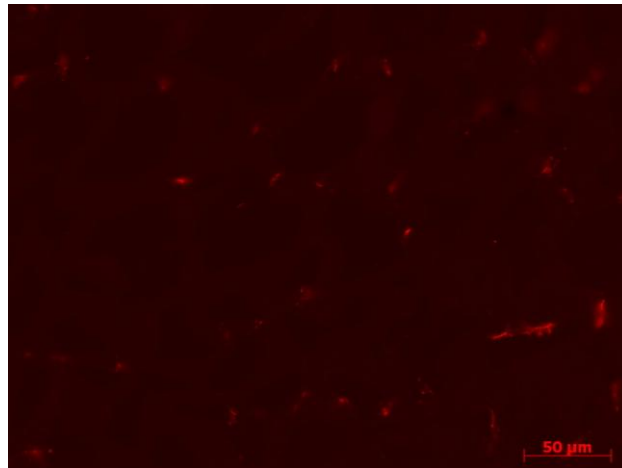
Abb. 3.25 zeigt die quantitative Auswertung der Zellkerne in allen Muskelschnitten. Man erkennt, dass in den rechten Hinterläufen unabhängig von der Diätform und dem Genotyp insgesamt mehr Zellkerne zu sehen sind als in den linken Hinterläufen. Insgesamt ist der Unterschied der verschiedenen Genotypen zueinander innerhalb einer Diätform nicht signifikant. Der geringste Unterschied ist bei den Mäusen mit fettreicher Diät zu sehen, der größte Unterschied bei den Mäusen mit Normaldiät.



**Abb. 3.25** Quantitative Auswertung der DAPI-positiven Zellen in den Muskelschnitten aller Mäuse

Muskelschnitte aller Mäuse vier Wochen nach der ischämieinduzierten Ligation des rechten Hinterlaufs. Es wurden 4 Schnitte pro Maushinterlauf ausgezählt,  $n=2-5$ .

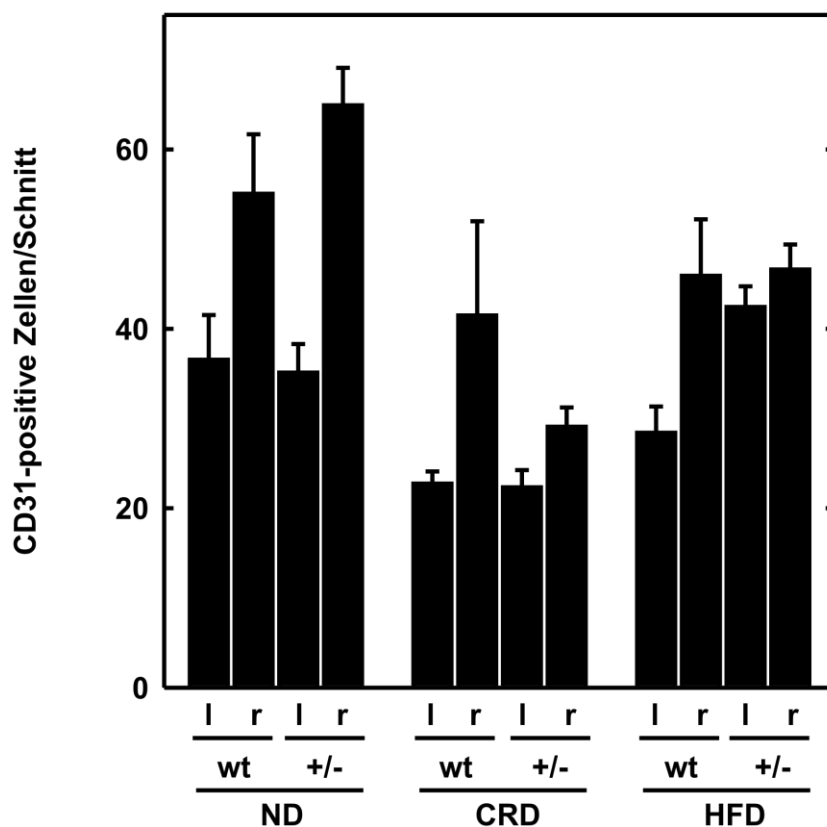
Abb.3.26 zeigt ein typisches Bild durch den Querschnitt eines linken Hinterlauf-Muskels, bei dem alle Gefäßzellen angefärbt sind. Die Blutgefäße dringen üblicherweise an den Areae nervovasculariae in den Muskel ein und bilden ein feines in sich aufzweigendes Kapillarnetz um eine einzelne Muskelfaser.



**Abb. 3.26 Fluoreszenzmikroskopisches Bild von CD31-angefärbten Muskelzellen**

*Muskelzellen aus dem linken Musculus gastrocnemius einer Maus mit Normaldiät. Die Endothelzellen (hier rot) wurden mittels PECAM-1-Färbung sichtbar gemacht. Die Skalierung entspricht 50 µm.*

Abb. 3.27 zeigt die quantitative Auswertung der Endothelzellen in allen Muskelschnitten. Man erkennt unabhängig von der Diätform eine Zunahme der Endothelzellen im rechten Hinterlauf. Bei der kohlenhydratreichen Diät ist zu sehen, dass der Muskel der heterozygoten Maus eine geringere Endothelzellzunahme zeigt als der wt-Muskel. Außerdem zeigen die Muskeln der Mäuse mit kohlenhydratreicher Diät insgesamt weniger Endothelzellen als die der Mäuse mit Normaldiät. Die Muskeln der Mäuse mit fettreicher Diät hingegen zeigen mehr Gefäßzellen im gesunden als auch im ischämieinduzierten Bein. Im heterozygoten Genotyp ist kaum noch eine Steigerung der Endothelialisierung zwischen linkem und rechtem Hinterlauf zu sehen.

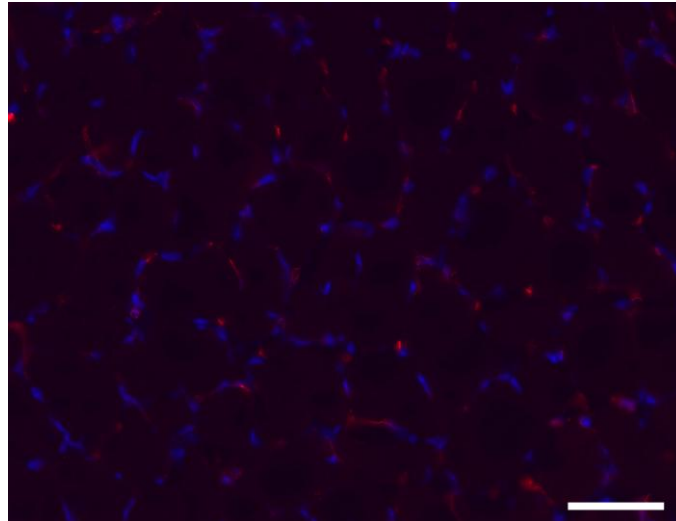


**Abb. 3.27** *Quantitative Auswertung der CD31-positiven Zellen in den Muskelschnitten aller Mäuse*

*Muskelschnitte aller Mäuse vier Wochen nach der ischämieinduzierten Ligation des rechten Hinterlaufs. Es wurden 4 Schnitte pro Maushinterlauf ausgezählt, n=2-5.*

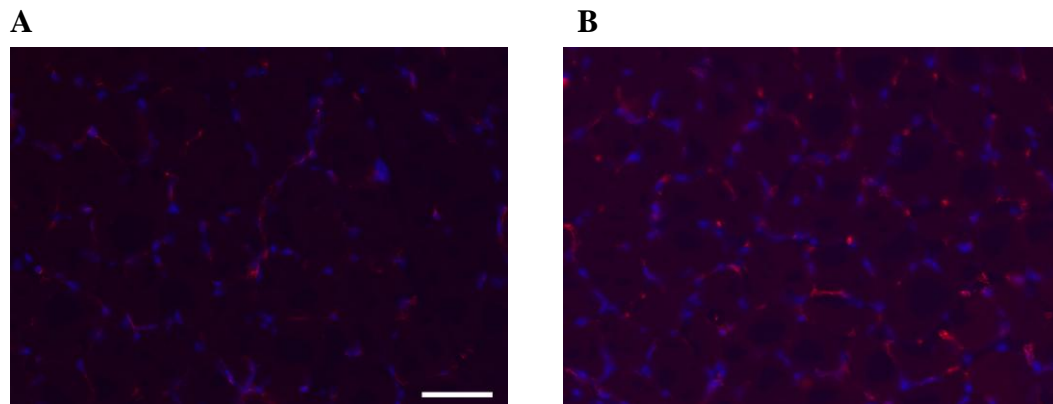
Abb.3.28 zeigt ein typisches Bild durch den Querschnitt eines linken Hinterlauf-Muskels, bei dem sowohl die Zellkerne als auch alle CD31-Zellen angefärbt sind. Man kann gut die blau angefärbten randständigen Zellkerne eines Muskelfaserquerschnitts erkennen. Die rot-angefärbten Endothelzellen liegen ebenfalls am Rand und lassen das Kapillarnetz um die einzelne Muskelfaser erahnen und verdeutlichen die Querschnitte eines Muskelfaserbündels. Der Durchmesser eines Bauelements beträgt ca. 40-80  $\mu\text{m}$ .





**Abb. 3.28** *Fluoreszenzmikroskopisches Bild von DAPI- und CD31-angefärbten Muskelzellen aus einem rechten Hinterlauf einer Maus mit Normaldiät. Die Endothelzellen (hier rot) wurden mittels PECAM-1-Färbung, die Zellkerne wurden mittels DAPI visualisiert. Der Messbalken entspricht 50  $\mu$ m.*

Abb.3.29 zeigt einen typischen rechten und linken Hinterlauf einer Maus mit Normaldiät. Es ist zu erkennen, dass der rechte operierte Hinterlauf, bei gleicher Färbung und Vergrößerung, eine deutliche Zellvermehrung zeigt und demnach auch die Gefäßzellen eine größere Anzahl aufweisen.



**Abb. 3.29** *Typisches Fluoreszenzmikroskopisches Bild von DAPI- und CD31-angefärbten Muskelzellen eines linken und rechten Hinterlaufs*

**A** Muskelzellen aus einem linken Hinterlauf einer Maus mit Normaldiät. Die Endothelzellen (hier rot) wurden mittels PECAM-1-Färbung sichtbar gemacht. Die Endothelzellen (hier rot) wurden mittels PECAM-1-Färbung, die Zellkerne wurden mittels DAPI visualisiert. **B** Muskelzellen aus einem rechten Hinterlauf einer Maus mit Normaldiät. Die Endothelzellen (hier rot) wurden mittels PECAM-1-Färbung, die Zellkerne wurden mittels DAPI visualisiert. Der Messbalken entspricht 50  $\mu$ m.

## 4 Diskussion

Diabetes mellitus ist weltweit eine stark verbreitete Erkrankung. Aufgrund der schwerwiegenden Folgen im Gefäßsystem schießen die Kosten für das Gesundheitssystem rapide in die Höhe. Nicht selten sind Herzinfarkt oder Schlaganfälle mit möglicher Todesfolge Konsequenzen jahrelanger Hyperglykämie. Patienten mit langfristig erhöhten Blutglukosespiegeln haben ein doppelt so hohes Risiko an einem Schlaganfall zu erkranken wie gesunde Menschen. Und auch bei Schlaganfall-Patienten ohne bekannten DM wurden in 30-40 % der Fälle eine Hyperglykämie im Blutplasma gefunden (Luitse et al. 2012). Die Insulinresistenz, welche für die Entwicklung von DM2 im Vordergrund steht, wurde bereits als fester Bestandteil in der Entstehung peripherer arterieller Gefäßerkrankungen gesehen (Pande et al. 2008). Die schwerwiegenden gesundheitlichen Folgen machen deutlich wie wichtig es ist den Einfluss prädiabetischer Signale auf das Gefäßsystem zu untersuchen.

Ziel der Arbeit war es die Bedeutung der DLK in endothelialen Zellen zu analysieren und die Rolle der DLK in Bezug auf eventuelle therapeutische Ansatzpunkte für Makro- und Mikroangiopathie herauszuarbeiten.

### 4.1 Expression der DLK in HUVECs

Die DLK wird als wichtiger Bestandteil der intrazellulären MAPK-Kaskade angesehen (Nihalani et al. 2000) und nimmt durch Folgen wie zellulären Stress und Apoptose entscheidenden Einfluss auf die Entstehung des DM. Mikro- und Makroangiopathien werden als wichtigste unerwünschte Wirkung von DM angesehen und führen einerseits zu schwerer psychischer Belastung und im schlimmsten Fall zum Tod der Patienten. Andererseits steigen die Therapiekosten ins Unermessliche. Wird die DLK in Endothelien exprimiert und welche Rolle spielt sie bei der Entstehung von Mikro- und Makroangiopathien? Auch für die Entwicklung neuer Therapieansätze ist diese Fragestellung von Bedeutung und leider bisher weitestgehend ungeklärt. Aufgrund dessen wurden für die folgenden Untersuchungen HUVECs ausgewählt. Da diese Zellen aus der normalen menschlichen Nabelschnurvene entnommen und cryokonserviert wurden, repräsentieren sie exakte menschliche Gefäßbedingungen und wurden als Modell für venöse Endothelzellen ausgewählt. Ein Nachteil dieser Zellen ist, dass sie unter sterilen Zellkulturbedingungen nur die 16. Passage überleben und sie sehr anfällig für Infektionen sind. Unter Berücksichtigung dieser beiden Punkte konnte mittels Western-Blot-Analyse eine Expression von DLK in HUVECS nachgewiesen werden. Dies ist eine wichtige Erkenntnis, da es bedeuten könnte, dass DLK nicht nur in Betazellen (Oetjen et al. 2006) sondern auch in Endothelien an der Apoptose beteiligt sein könnte. Dadurch würde sie die Vaskularisierung und endotheliale Funktion entscheidend mit beeinflussen. Außerdem betont das vielseitige Vorkommen dieser Kinase die Wichtigkeit und die Rolle der DLK im menschlichen Organismus.

## 4.2 Regulation der DLK in HUVECS

In der vorliegenden Arbeit wurde die Regulation von DLK in HUVECS unter prädiabetischen Umständen untersucht. Dazu wurden bei allen Versuchen HUVECs unter sterilen Bedingungen mit TNF $\alpha$  und Leptin behandelt. Als Positivkontrolle für das Wachstum der Endothelzellen wurden die Zellen zusätzlich mit VEGF behandelt.

### 4.2.1 Halbwertszeit von DLK

Um die Regulation der DLK in Endothelien besser abschätzen zu können, wurde in der vorliegenden Arbeit die Halbwertszeit der DLK in HUVECS bestimmt. Dazu wurden die endothelialen Zellen für unterschiedliche Zeiträume mit dem Translationshemmstoff Cycloheximid behandelt. Nach der Ernte der Zellen wurde mittels Immunoblotanalyse die Halbwertszeit bestimmt. Cycloheximid ist ein Antibiotikum, welches von gram-positiven aeroben Aktinobakterien produziert wird und die Proteinbiosynthese an Ribosomen hemmt. Dieser Vorgang führt zum Absterben der eukaryonten Zelle und dadurch zur Proliferationshemmung. Die Translation kann in drei Phasen unterteilt werden: Initiation, Elongation und Termination. In der Initiationsphase bindet das Ribosom an die Sequenz der Messenger-RNA, in der Elongation wird eine Peptidbindung gebildet. Dieser Vorgang wiederholt sich solange bis die Messenger-RNA vollständig umgewandelt wurde. In der Termination wird das fertige Protein, welches sich aus vielen Peptidbindungen zusammensetzt, freigesetzt (Hasilik 2007). Cycloheximid greift in der Phase der Initiation und Elongation der Translation ein und verhindert somit die Proteinbildung (Obrig et al. 1971).

Es stellt sich heraus, dass die Halbwertszeit der DLK in HUVECS 1,5 Stunden beträgt. Die kurze Halbwertszeit könnte bedeuten, dass die DLK-Aktivität auch über Proteinbiosynthese und Proteinabbau reguliert wird (Couture et al. 2009). Die Halbwertszeit der DLK in der Betazelllinie HIT beträgt 2,5 Stunden (Stahnke 2013), was vermuten lässt, dass Cycloheximid in HUVECS früher angreift und die Translation der DLK schneller hemmt.

### 4.2.2 Einfluss von TNF $\alpha$ auf DLK und JNK in HUVECS

Eine Erhöhung von TNF $\alpha$  steht in enger Korrelation zu Adipositas und Insulinresistenz (Hotamisligil et al. 1995) und begünstigt durch darauf folgende Entzündungsprozesse einen DMT2. Trotzdem stecken TNF $\alpha$ -inhibitorische Therapieansätze immer noch in den Kinderschuhen (Cheon 2012). Ein neuer Forschungsansatz beschäftigt sich mit TNF $\alpha$  als Gegenspieler von Adiponektin in der Regulation des Lipidmetabolismus. Das Cytokin hemmt laut neuester Untersuchungen die Adiponektinfreisetzung. Dies führt zu verstärkter Entzündungsreaktion und Fettakkumulation, was TNF $\alpha$  zu einem potentiellen Angriffspunkt in der Adipositas therapie macht (Wang et al. 2013). Interleukin-1 steht schon seit einiger Zeit im Mittelpunkt aktueller Therapieforschung, da man davon ausgeht, dass es in Betazellen als Antwort auf erhöhte Blutglukosekonzentrationen vermehrt gebildet wird (Maedler und Donath 2004). Es wurden bereits verschiedene

monoklonale Antikörper gegen Interleukin-1 entwickelt und geprüft (Larsen et al. 2007). Wie inflammatorische Zytokine an Endothelien wirken und ob sie an der Entstehung der endothelialen Dysfunktion beteiligt sind wurde bisher noch nicht näher untersucht. Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit die Gefäßzellen mit den Entzündungsmediatoren TNF $\alpha$  und Leptin behandelt. Ziel dessen war es herauszufinden, ob diese Substanzen durch eine Phosphorylierung der DLK eine endotheliale Dysfunktion begünstigen könnten. Als Positivkontrolle wurden HUVECs zusätzlich mit VEGF behandelt, was zum einen eine Neovaskularisation begünstigt und zum anderen Gefäße vor endothelialer Dysfunktion schützt.

Die Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit ergaben, dass TNF $\alpha$  die Phosphorylierung von DLK und ihrer untergeordneten Kinase JNK in HUVECs fördert. Das unterstützt die Annahme, dass DLK nach ihrer Phosphorylierung die MAP-Kinase JNK indirekt aktivieren kann, wobei man nicht außer Acht lassen darf, dass JNK gegebenenfalls auch über andere Wege aktiviert werden kann (Garrington und Johnson 1999). Unveröffentlichte Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe geben Hinweise darauf, dass DLK auch in Betazellen von TNF $\alpha$  aktiviert wird und dadurch zu der Apoptose dieser Zellen beiträgt. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass der Entzündungsmediator TNF $\alpha$  in vielen unterschiedlichen Zellarten an der Aktivierung des MAPK-Wegs beteiligt ist. Diese Signalkaskade endet schließlich in der Apoptose der jeweiligen Zellen und trägt dadurch am Umbau des Zielorgans bei.

Wenn man davon ausgeht, dass der TNF $\alpha$ -Spiegel bei der Entstehung eines Metabolischen Syndroms oder des Diabetes mellitus ansteigt (Coppack 2001; Kassi et al. 2011; Plomgaard et al. 2007), könnte die Regulation der DLK durch TNF $\alpha$  in endothelialen Zellen eine entscheidende Rolle in der Entwicklung neuer Therapieansätze spielen und folgedessen eine Bereicherung in der Behandlung von Mikro- und Makroangiopathien sein.

Auch das Proteohormon Leptin ist nicht nur durch seine hungerhemmende Wirkung ein wichtiger Bestandteil des Fettstoffwechsels, sondern wirkt auch als Entzündungsmediator. Durch die inflammatorische Wirkung kann es wie TNF $\alpha$  zu Veränderungen des immunologischen Milieus beitragen (Kassi et al. 2011; Matsuzawa 2008). Außerdem wurde gezeigt, dass Leptin an der Entstehung von DMT2 mitbeteiligt sein kann (Coppack 2001). Der Einfluss von Leptin und VEGF führte zu keiner signifikanten Phosphorylierung der DLK in HUVECs. Dies gibt Hinweise darauf, dass die DLK- und JNK-Aktivierung in HUVECs Leptin- und VEGF-unabhängig ist. Dies stützt die Annahme, dass VEGF eine schützende Funktion in der Gefäßregulation übernimmt (Yang et al. 2008).

### 4.2.3 Einfluss von JNK auf DLK in HUVECs

Einige Studien zeigen, dass DLK und JNK sich gegenseitig beeinflussen: DLK aktiviert ihre untergeordnete Kinase JNK durch Aktivierung von MKK4 und MKK7 (Garrington und Johnson 1999) und endet schließlich in Apoptose. Andererseits bestehen Hinweise darauf, dass JNK durch die Phosphorylierung von dem Gerüstprotein JIP die Dissoziation

der DLK von JIP fördert und somit zur Autophosphorylierung der DLK beiträgt. Diese Phosphorylierung wird mit einer Aktivierung der DLK gleichgesetzt (Nihalani et al. 2000; Nihalani et al. 2001; Nihalani et al. 2003). Daten unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass Serin-302 eine entscheidende Rolle für die katalytische Aktivität der DLK spielt und für die Phosphorylierung verantwortlich ist (Babaeikelishomi 2013).

Da die Rolle von JNK in Endothelien bislang nicht geklärt ist, wurde untersucht, ob dieser Prozess auch in Gefäßzellen stattfindet. Es wurde die Wirkung von JNK auf die TNF $\alpha$ -induzierte Aktivierung der DLK analysiert. Hierbei wurde in der vorliegenden Arbeit ein JNK-spezifischer Inhibitor (SP600125) verwendet. Dieser hemmt die Phosphorylierung und somit die Aktivierung von JNK (Bennett et al. 2001). Die Untersuchungen ergaben, dass eine Aktivierung von JNK zu einer TNF $\alpha$ -induzierten Aktivierung von DLK in HUVECs führt. Ebenso zeigte sich, dass eine Inhibition von JNK mit SP600125 eine Phosphorylierung von DLK in HUVECs verhindert. Dies führt zu der Annahme, dass JNK auch in Endothelzellen durch eine sogenannte Rückwärtsschleife die Fähigkeit besitzt DLK zu aktivieren und somit seine eigene Aktivierung zu amplifizieren. Unter dieser Erkenntnis kann JNK in Endothelzellen als Schlüsselprotein im Zusammenhang mit der Aktivierung des MAPK-Wegs angesehen werden und als Zielprotein für weiterführende Untersuchungen dienen.

Ob dieser beschriebene Mechanismus in HUVECs auf eine Assoziation mit dem Adapterprotein JIP zurückzuführen ist, ist noch weitestgehend unklar. Dafür werden weitere Untersuchungen benötigt, in denen eine Expression von JIP in HUVECs analysiert wird und der Einfluss von JIP auf die DLK-Phosphorylierung näher betrachtet wird.

### **4.3 Herstellung zwei rekombinanter Adenoviren Ad-DLK-wt und Ad-DLK-K185A**

1953 wurde zum ersten Mal ein humaner Adenovirus in einem *in vitro* Experiment identifiziert (Rowe et al. 1953). In den 1990er Jahren wurden erstmals Genuntersuchungen entwickelt und durchgeführt. Diese Analysen dienten damals dem Gensatz und der Genreparatur, welche neue Therapieschwerpunkte in der Behandlung von genetischen Erkrankungen wie Krebs werden sollten. Viele Forschungsansätze waren vielversprechend und der technische Fortschritt und das immer-wachsende Wissen über die Virologie verbesserte den Sicherheitsaspekt in *in vivo*- und *in vitro*-Experimenten. Um mögliche Therapien zu entwickeln ist das Einschleusen eines Gens in die Zelle von enormer Wichtigkeit. Dies kann auf zwei unterschiedlichen Wege geschehen: viral und nicht-viral. Der virale Weg ist in der vorliegenden Arbeit von Bedeutung und bringt wesentliche Vorteile gegenüber dem nicht-viralen Weg: Es ist möglich unterschiedlichste Zellarten zu infizieren. Diese Zellen müssen sich nicht teilen können. Zudem ist die transgene Expression enorm hoch (He et al. 1998). Ein Vorteil gegenüber einem retroviralen Vektor ist, dass Adenoviren in sehr hohen Titern produziert werden können (Romano et al. 1999).

Mittels zweier rekombinanter Adenoviren sollen innerhalb der Arbeitsgruppe weiterführende Experimente zur Überexpression der DLK in humanen Inseln und endothelialen Zellen stattfinden. Zu diesen Zwecken wurde in der vorliegenden Arbeit der letzte Schritt in der Herstellung des rekombinanten Adenovirus der DLK-wt und der Kinase-toten Mutante der DLK vorgenommen. Nach der Titerbestimmung wurde deutlich, dass Ad-DLK-K185A infektiöser ist als Ad-DLK-wt.

#### **4.4 Einfluss von DLK auf die Angiogenese bei unterschiedlichen Stoffwechsellagen**

Um zu analysieren, welche Wirkung DLK auf die Entstehung von Adipositas und DM hat, wurden Wildtypmäuse und heterozygote DLK-Mäuse (+/-) im Alter von 8 Wochen verschiedenen Diäten unterzogen. Währenddessen wurde bei den Mäusen das Gewicht, der Blutzucker und der HbA1c-Wert bestimmt um die Auswirkungen der Diät auf die beiden Mäusetypen zu untersuchen. Dass DLK eine lebenswichtige Kinase im Organismus darstellt, beweist die Tatsache, dass homozygote DLK-Knockout-Mäuse (-/-) perinatal sterben (Bloom et al. 2007; Ghosh et al. 2011; Hirai et al. 2006). Aus diesem Grunde wurden in der vorliegenden Arbeit mit heterozygoten Mäusen gearbeitet, die nach aktuellstem Wissenstand keinen ersichtlichen Unterschied im Phänotyp zu den Wildtyp-Mäusen aufzeigen. Bei den vorliegenden Untersuchungen waren ebenfalls keine äußerlichen Auffälligkeiten oder Eigenschaften der Mäuse erkennbar, die den Phänotyp der heterozygoten von den Wildtyp-Mäusen abgrenzen würde.

Es wurde bereits die Anfälligkeit des Mäusestammes C57/Black6 unter verschiedenen Diäten auf metabolische Defekte hin untersucht. Es zeigte sich, dass diese Mäuse unter fettreicher Diät zu Adipositas, Glukoseintoleranz und Insulinresistenz neigen und einen Diabetes-empfindlichen Mäusestamm darstellen (Clee und Attie 2007). Er gilt sogar als geeignetester Stamm metabolische Defekte zu untersuchen (Montgomery et al. 2013). Schon in der Vergangenheit haben Untersuchungen gezeigt, dass diese Mäuse unter fettreicher Diät hohe Nüchternblutglukosewerte entwickeln. Andere Mausstämmen mit einem unterschiedlichen genetischen Hintergrund zeigen hingegen kaum Fettakkumulation in den Organen (Montgomery et al. 2013). Dies gibt Hinweise darauf, dass der genetische Hintergrund entscheidend für die Entwicklung metabolischer Defekte sein kann (Surwit et al. 1988). Toye und Kollegen analysierten schließlich, dass die C57/BL6-Mäuse tatsächlich zu einem insulin-sekretorischen Defekt neigen (Toye et al. 2005).

##### **4.4.1 Gewicht**

Verschiedenste Faktoren können eine Gewichtszunahme bedingen. Fettreiche Diät und erhöhte Energiezufuhr bei niedrigem Energieverbrauch sind die einfachsten Erklärungen für diesen Umstand. Jedoch gibt es noch viele weitere Kriterien, die zu einer Regulation des Fetthaushaltes und Adipositasentstehung beitragen können: Untersuchungen zeigen, dass Nagetiere, die mit hohem Kalzium und fettreduzierte Trockenmilch gefüttert

wurden, eine Verbesserung der Glukose-Homöostase und eine Reduktion der Organverfettung nach sich ziehen (Thomas et al. 2012). ACE-Hemmer verringern bei Ratten die Nahrungsaufnahme und Gewichtszunahme (Mul et al. 2013), was die Annahme stützt, dass das Angiotensin-Aldosteron-Systems in engem Zusammenhang mit Adipositas steht (Giacchetti et al. 2005). Auch Cortisol und dessen Abkömmlinge können die Fettsucht entscheidend fördern. Dexamethason reduziert den Energieverbrauch und führt zu verstärkter Adipositas bei Mäusen mit Diät-induzierter Fettsucht (Poggioli et al. 2013).

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob DLK die Entstehung von Adipositas bei fettreicher Ernährung beeinflusst.

PPAR $\gamma$  (peroxisome proliferator-activated receptor gamma) ist ein Transkriptionsfaktor und wird als Hauptregulator der Adipozytenreifung und Fettbildung angesehen. Es wurde in der Zelllinie 3T3-L1 gezeigt, dass bei einem DLK-Knockdown PPAR $\gamma$  vermindert exprimiert wird. Daraus folgt, dass PPAR $\gamma$  in 3T3-L1-Prädipozyten notwendig für die transkriptionelle Aktivität des DLK-Gens ist (Couture und Blouin 2011). Außerdem ist DLK in diesen Zellen durch Regulation von PPAR $\gamma$  entscheidend an der Adipozytenreifung beteiligt (Couture et al. 2009). Dies lässt vermuten, dass die wt-Mäuse mehr an Gewicht zunehmen als die heterozygoten Mäuse.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen auf, dass die Mäuse unters HFD tendenziell mehr an Gewicht zunehmen als die übrigen Mäuse. Außerdem ist der Trend festzustellen, dass die heterozygoten DLK-Mäuse unter ND und HFD mehr an Gewicht zu nehmen als die Wildtyp-Mäuse. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass DLK benötigt wird um schlank zu bleiben und somit positiv für den Stoffwechsel ist. Allerdings müssen diese Vermutungen mit großer Vorsicht betrachtet werden, da in den vorliegenden Ergebnissen keine Signifikanzen zu erkennen sind. Es handelt sich lediglich um Trends und es bedarf weiterer Untersuchungen um diese Hypothese zu bestätigen.

#### **4.4.2 Blutzucker und HbA1c**

Gemessene hohe Nüchternblutzuckerwerte sind einer der wichtigsten Indikatoren für die Entwicklung eines Diabetes mellitus. In der vorliegenden Arbeit wurden Wildtyp-Mäuse und heterozygote DLK-Mäuse des C57/BL6-Stammes unter verschiedenen Diäten regelmäßig einer Blutglukosebestimmung unterzogen um die Auswirkungen der DLK unter der jeweiligen Diät auf den Blutzucker zu untersuchen.

Die Ergebnisse der Blutzuckermessung in der vorliegenden Arbeit zeigen keinen signifikanten Unterschied zwischen den Mäusen unterschiedlicher Diäten und Genotypen. Da der Blutglukosewert ein empfindlicher und variabler Wert ist, müssen alle Parameter der Untersuchung berücksichtigt und in die Interpretation einbezogen werden. Bei der Blutzuckermessung sollte berücksichtigt werden, dass die Mäuse möglichst keinem oder geringem Stress ausgesetzt werden, da die C57/BL6-Mäuse mit einer starken Blutglukoseerhöhung auf Stress reagieren (Surwit et al. 1988). Hier ist zu nennen, dass allein der Geruch von Isofluran, was als Narkosemittel für die Messungen und Tötung

eingesetzt wurde, bei den Mäusen Stress erzeugt. Dies würde die kurzfristigen stark erhöhten Blutzuckerwerte kurz vor der Tötung der Mäuse in der vorliegenden Arbeit erklären. Des Weiteren sollte darauf geachtet werden, dass die Messungen immer zum gleichen Zeitpunkt vorgenommen werden. Da die Mäuse nachtaktiv sind würde sich abends zum Messen anbieten um einen Nüchterblutglukosewert zu erhalten. Leider konnten beide letzten Punkte bei den Untersuchungen nicht immer erfüllt werden, sodass die Blutzuckerwerte Schwankungen unterliegen, was es erschwert die Daten miteinander zu vergleichen.

Hohe Blutglukosewerte aktivieren den JNK-Signalweg und führen zu Betazell-Apoptose (Maedler et al. 2008) mit verringerter Insulinausschüttung als Folge. Dies zieht wiederum einen erhöhten Blutglukosespiegel nach sich, da der Zucker durch das fehlende Insulin nicht ausreichend in die Zellen transportiert werden kann. Dieser Vorgang könnte den Zusammenhang zwischen aktiviertem MAPK-Weg und der hohen Blutglukose ausreichend erklären. Es wäre folgedessen zu erwarten, dass die Wildtyp-Mäuse durch stärkere Aktivierung des JNK-Pathways einen höheren Blutglukosespiegel zeigen. Jedoch zeigt sich kein Trend bei den verschiedenen Messungen. Dies wäre dadurch erklärbar, dass wir mit der Blutzuckermessung lediglich eine Momentaufnahme des Glukosestoffwechsels bekommen. Um mehr über den langfristigen Verlauf zu erfahren wurde vor der Tötung der Mäuse der HbA1c-Wert bestimmt.

Der HbA1c-Wert ist ein wichtiger Parameter in der Langzeitbestimmung des Blutzuckers bei DM-Patienten. Er spiegelt die mittlere Blutzuckerkonzentration der vergangenen Wochen und Monate wieder. Das Überwachen des HbA1c-Wertes erlaubt es den Grad des Glukosestoffwechsels im Körper zu kontrollieren und das Risiko eventueller Spätfolgen abzuschätzen (Koenig et al. 1976).

Alle HbA1c-Werte liegen unter dem humanen Referenzintervall. Die Diäten scheinen keinen Einfluss auf den HbA1c-Wert zu haben, was bedeuten könnte, dass zum Zeitpunkt der Messung noch kein Diabetes mellitus bei den Mäusen vorlag.

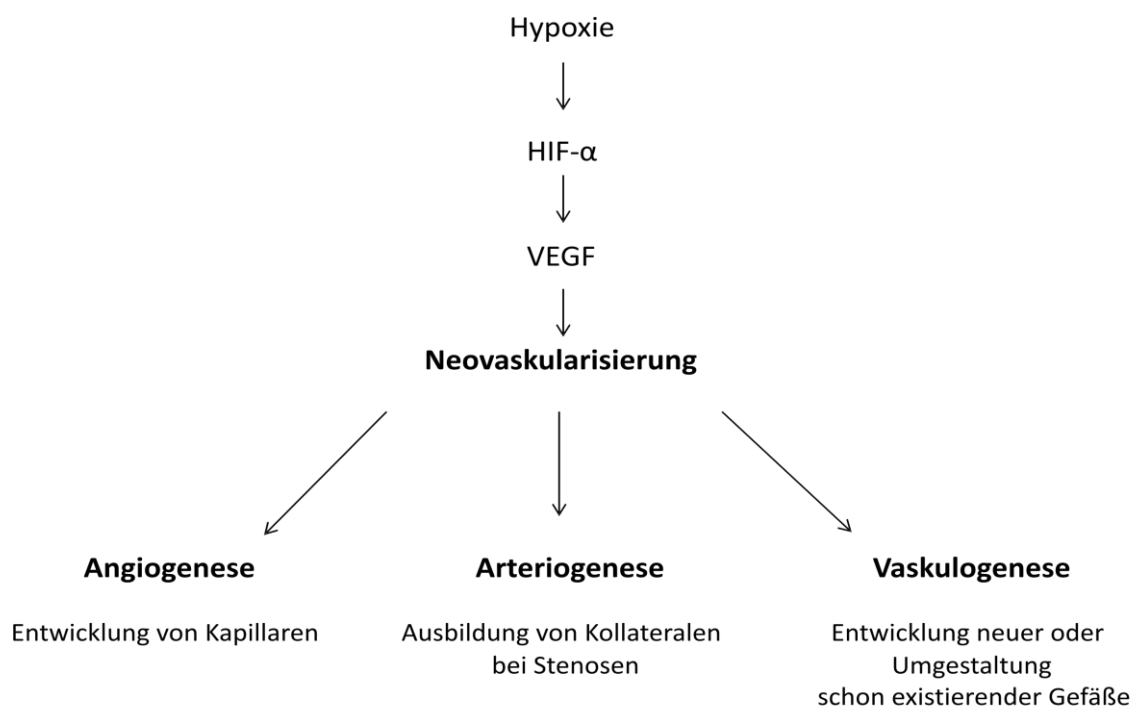
## **4.5 Untersuchung der Angiogenese in einem Mausmodell**

Wie wird Gefäßwachstum stimuliert? Wodurch wird es gehemmt? Gibt es Wechselwirkungen, die zu einem schnelleren oder verlangsamten Wachstum beitragen? Diese Fragen und das Zusammenspiel von Faktoren, die die Angiogenese beeinflussen, stehen schon seit Längerem im Fokus medizinischer Forschungsschwerpunkte. Das Wissen über Neovaskularisierung, Reendothelialisierung und Angiogenese würde viele Türen zu möglichen Therapieverfahren öffnen (Simons 2005).

Periphere Gefäßerkrankungen, stellen heutzutage einen Schwerpunkt der kardiovaskulären Erkrankungen dar und die Prävalenz dieser Erkrankungsgruppe ist immer noch steigend. Dieser Unstand kann zumindest teilweise durch die wachsende geriatrische Patientengruppe begründet werden (Bir et al. 2008). Jedoch auch das Auftreten von Gefäßerkrankungen bei Diabetespatienten nimmt in der Gesellschaft immer mehr zu. Menschen, die unter der Zuckerkrankheit leiden, besitzen oft auch andere zusätzlich



erhöhte Risikofaktoren für das Gefäßsystem. Entscheidend ist allerdings, dass Diabetespatienten mit erhöhten Risikofaktoren für eine kardiovaskuläre Erkrankung ein deutlich erhöhtes Mortalitätsrisiko besitzen als Patienten ohne Diabetes mellitus (Stamler et al. 1993). Dies demonstriert die Dringlichkeit an neuen möglichen Therapieansätzen für Makro- und Mikroangiopathien zu forschen.



**Abb. 4.1: Neovaskularisierung**

Drei Prozesse können an der Entwicklung und Veränderung von Gefäßen beteiligt sein. *HIF- $\alpha$* : hypoxia-inducible factor, *VEGF*: vascular endothelial growth factor. (Modifiziert nach (Simons 2005).

Die Neovaskularisierung ist ein Überbegriff für verschiedene Prozesse des Gefäßwachstums (s. Abb. 4.1). Zu der Gefäßneubildung gehören die Angiogenese, die Arteriogenese und die Vaskulogenese (Simons 2005). Hypoxie ist einer der wichtigsten Impulse für die Neovaskularisierung. Bei Sauerstoffmangel wird der Transkriptionsfaktor HIF- $\alpha$  (hypoxia-inducible factor) aktiviert, der anschließend VEGF stimuliert und dadurch die Gefäßneubildung anregt (Simons 2005). Obwohl der Mangel an Sauerstoff ein wichtiger Stimulus der Neovaskularisierung darstellt, ist er nicht der einzige Faktor. Das Spektrum der Reize ist weit gefächert und reicht von Gewebhypertrophie über Wundheilung bis zu Entzündungsreaktionen (Simons 2005). Die Arteriogenese benötigt beispielsweise viele verschiedene Faktoren, die das Wachstum der Gefäße stimulieren können (Yancopoulos et al. 2000). Ein essentieller Wachstumsfaktor im Gefäßsystem stellt VEGF dar. Jedoch ist die Beteiligung von VEGF am Tumorwachstum und neovaskulären Syndromen nicht zu vernachlässigen (Ferrara und Gerber 2001). Aus diesem Grund werden immer mehr angiogenesehemmende Medikamente zur Krebsbehandlung eingesetzt (Garcia und Singh 2013). Auch die Familie der *basic fibroblast growth factors* (bFGFs) stellt eine wichtige Gruppe für endothelialen und

vaskulären Wachstum der Muskelzellen dar. FGFs induzieren das Zellwachstum und die Zellmigration und wirken somit entscheidend bei der Wundheilung und Gewebereparatur mit (Bikfalvi et al. 1997; Simons 2005).

Auch Krankheiten können die Neovaskularisierung und im Speziellen die Artriogenese mit beeinflussen. Studien haben gezeigt, dass die Entwicklung von Kollateralgefäßen bei Patienten mit DM vermindert ausgeprägt ist. Dies lässt vermuten, dass DM die Entwicklung von Kollateralen entscheidend beeinflusst (Abaci et al. 1999). Außerdem lassen einige Studien vermuten, dass der genetische Hintergrund ebenfalls ein wichtige Rolle, sowohl in der Bildung von Kollateralen als auch in der Möglichkeit des Körpers auf Therapien zu reagieren, spielt (Schultz et al. 1999; Simons 2005).

Gibt es einen Zusammenhang zwischen DLK und endothelialer Dysfunktion? Oxidativer Stress ist ein möglicher Faktor, der zu einer Insulinresistenz und Schädigung des Gefäßsystems führen kann (Giacchetti et al. 2005; Huang et al. 2012). Huang und Kollegen haben herausgefunden, dass die Aktivierung von JNK in Gefäßzellen von diabetischen Mäusen zu gesteigertem oxidativen Stress führt. Der JNK-abhängige oxidative Stress beeinflusst die endotheliale Funktion bei Diabetes (Huang et al. 2012). Unter dem Gesichtspunkt, dass die DLK JNK im MAPK-Kaskade aktiviert, könnte die DLK als Angriffspunkt eventueller Therapieansätze bei endothelialer Dysfunktion bei DM dienen. Dies macht die Frage interessant, wie heterozygote Mäuse im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen auf eine Ischämie im Bereich der Femoralarterie reagieren.

Um die Auswirkungen der DLK auf die Neovaskularisierung zu untersuchen, wurden in der vorliegenden Arbeit bei Wildtyp- und heterozygoten DLK-Mäusen unter verschiedenen Diäten eine Ischämie am rechten Hinterlauf verursacht und durch regelmäßige Perfusionsmessungen und anschließender histologischen Auswertung der Grad der Gefäßneubildung dokumentiert.

#### **4.5.1 Perfusionsmessung nach Ligation der Femoralisarterien**

Eine vollständige Ligation der Femoralarterie führt zu Hypoxie als wichtigstem Stimulus der Neoangiogenese. Außerdem ist ein plötzlicher Anstieg des Blutdrucks mit hämodynamischen Veränderungen in den kleineren Nachbargefäßen zu messen. Dies führt im Anschluss zu einer verstärkten Durchblutung eines Kollateralkreislaufs, was eine zunehmende Scherspannung in den Gefäßen nach sich zieht. Dadurch wird zum einen eine Ausbildung eines funktionstüchtigen Gefäßsystems gefördert (Limbourg et al. 2009) und zum anderen der JNK-Signalweg aktiviert (Nagel et al. 1999) (s. 4.5.2).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Ausbildung eines Kollateralsystems durch die Perfusionsmessung mittels *Laser-Doppler-Imaging* (LDI) durchgeführt. Das LDI liefert ein farb-kodiertes zwei-dimensionales Bild der Gewebepfusion ohne dabei das Zielgewebe zu zerstören und sichert somit sehr gute Bedingungen für die mehrfache Perfusionsuntersuchung an demselben Tier (Forrester et al. 2002). Die Kontrolle der Messungen lieferte immer im Vergleich das nicht-operierte Bein des jeweiligen Tieres.

Die Genetik scheint in der Ausbildung von Kollateralgefäßen eine wichtige Rolle zu spielen. Helisch und Kollegen untersuchten verschiedene Mäusestämme auf ihre Eigenschaften Kollateralgefäße aufzubauen und analysierten, dass der Mausstamm C57/BL6 schon große vorbestehende Kollateralen im Bereich der Arteria femoralis aufweist. Diese sind vor allem zum Zeitpunkt der Ligation bis 1 Woche danach sehr stark ausgeprägt (Helisch et al. 2006). Dies begründet dem Umstand, dass in der vorliegenden Arbeit Mäuse des C57/BL6-Stammes untersucht wurden.

In der vorliegenden Arbeit wurde analysiert, dass die Wildtyp-Mäuse unter Normaldiät am siebten postoperativen Tag eine signifikant stärkere Perfusionszunahme zeigen als die heterozygoten Mäuse. Im späteren Verlauf erkennt man keinen Unterschied mehr zwischen den beiden Genotypen. Dies lässt vermuten, dass DLK zur Neoangiogenese mit Kollateralbildung in der frühen Phase beiträgt, in der späten Phase jedoch ein anderer Kompensationsweg greift. Ein ähnlicher Trend wird bei den Mäusen unter CRD beobachtet.

#### **4.5.2 Neovaskularisation nach Ligation der Femoralisarterien**

Nach der Perfusionsmessung sollte in der vorliegenden Arbeit als ein weiteres Maß für die Angiogenese die Neovaskularisierung bei Mäusen quantitativ untersucht werden. Helisch und Kollegen demonstrieren in Nagerstudien, dass hierbei vor allem die Arteriogenese eine wichtige Rolle spielt (Helisch und Schaper 2003).

Die ersten Studien über wachsende Kollateralkreisläufe wurden an Hundeherzen durchgeführt (Schaper et al. 1976). Viele weitere ähnliche Untersuchungen in verschiedenen Spezies folgten. Scholz und Kollegen untersuchten schließlich das Kollateralwachstum in einem Ischämie-Modell bei Mäusen. Dort wurde nach Ligation der Arteria femoralis das Gefäßwachstum und die Histologie der Gefäßwände untersucht. Sie vermuteten, dass die Kollateralbildung in diesem Mausmodell auf schon bestehenden Verbindungen zwischen Arteriolen basiert (Scholz et al. 2002).

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die operierten Hinterläufe der Mäuse unabhängig ihrer Diät und ihres Genotyps mehr Zellkerne und mehr Endothelzellen aufweisen als die nicht-operierten Hinterläufe. Dies bestärkt die Annahme von Celletti und Kollegen, dass Hypoxie und ischämische Gewebsareale starke Stimuli für Neovaskularisierung sind (Celletti et al. 2001). Jedoch ist Hypoxie nicht alleiniger Stimulus für Gefäßneubildung. Es existieren viele Faktoren, die das Wachstum von Kollateralen aktivieren können. VEGF und sein korrespondierender Rezeptor sind wichtige und essentielle wachstumstimulierende Faktoren (Heil et al. 2000; Olsson et al. 2006). Die zunehmende Scherspannung in den Gefäßen durch den zunehmenden Druck bei einer Okklusion hat zusätzlich Auswirkung auf das Wachstum. Zum einen wird die DNA-Synthese für neues Endothelium aktiviert (Davies et al. 1986), zum anderen wird durch die Scherspannung die Proliferation endothelialer Zellen stimuliert (White et al. 2001). Eine weitere wichtige Erkenntnis ist, dass Transkriptionsfaktoren wie NF- $\kappa$ B oder c-Jun durch diese Spannung gereizt werden (Nagel et al. 1999) was eine Aktivierung des

MAPK-Weges nach sich ziehen kann. Dies betont die Relevanz der DLK und ihrer untergeordneten Kinase JNK in der Ausbildung neuer Gefäße oder Kollateralen.

Weitere Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die heterozygoten Mäuse unter ND und HFD tendenziell mehr Endothelien aufweisen als die Wildtyp-Mäuse. Dies ist gegensinnig zu den Perfusionsergebnissen am siebten postoperativen Tag. Eine mögliche Erklärung ist, dass hier unterschiedliche Messzeitpunkte vorliegen. Die Endothelien wurden knapp 3 Wochen später ausgezählt. In dieser Zeit könnte bei den heterozygoten Mäusen durch den Mangel an DLK ein anderer kompensatorischer Weg aktiviert worden sein um die Hypoxie auszugleichen.

Wenn man die Wildtyp-Mäuse unter CRD und HFD mit den Wildtyp-Mäusen unter ND vergleicht, wird sichtbar, dass die Nager unter ND tendenziell mehr Endothelien aufweisen als die unter CRD und HFD. Eine mögliche Schlussfolgerung wäre, dass kohlenhydratreiche und fettreiche Ernährung nicht zur Gefäßneubildung beiträgt und somit nicht gesundheitsfördernd wirkt.

Viele orale Antidiabetika sind auf dem Markt. Sulfonylharnstoffe, Biguanide, Gliptine und  $\alpha$ -Glukosidase-Hemmer sind nur Wenige von Vielen. Die meisten von ihnen senken den HbA1c-Wert (glycated haemoglobin A1c), jedoch sind sie als Monotherapie ungeeignet, da sie nur mit gravierenden Nebenwirkungen wie Gewichtszunahme oder Hypoglykämie die Betazellfunktion verbessern (Cheon 2012).

In Anbetracht der Untersuchungsergebnisse wäre ein möglicher weiterer Ansatzpunkt in der Therapie des DM die Hemmung der DLK. Da jedoch die DLK für die Kollateralbildung von Bedeutung ist (s.4.5.1) wäre eine systemische Hemmung der Kinase bei Diabetes-Patienten mit Mikro- und Makroangiopathien nicht wünschenswert. Jedoch wäre es denkbar die DLK lokal zu hemmen und somit unerwünschte Gefäßneubildungen wie beispielsweise bei der diabetischen Retinopathie zu inhibieren.

## 5 Zusammenfassung

Diabetes mellitus und seine schwerwiegenden Folgen im Gefäßsystem sind ein großes Problem in der heutigen Gesellschaft. Sowohl die persönlichen Einschränkungen bis hin zum Tod eines Diabetespatienten, als auch die enormen Kosten für das Gesundheitssystem betonen die Relevanz dieser Krankheit im klinischen Alltag. Ein wichtiger Aspekt sind die Mikro- und Makroangiopathien, unter denen viele Diabetespatienten leiden, und die im schlimmsten Fall zu einem Herzinfarkt oder Schlaganfall führen können. Dies macht deutlich, wie wichtig es ist, die Entstehungsmechanismen dieser Erkrankungen und deren Folgen in endothelialen Zellen zu untersuchen.

Viele Studien weisen darauf hin, dass Entzündungsmediatoren wie  $\text{TNF}\alpha$  an der Entstehung von Diabetes mellitus beteiligt sind. Sie führen zu einer Aktivierung der DLK und ihrer untergeordneten Kinase JNK, was in Betazellen zu Apoptose führt. In der vorliegenden Arbeit sollte die Rolle und Regulation der DLK in Gefäßzellen untersucht werden. Analysen ergaben, dass bei erhöhten Entzündungsparametern, wie es beispielsweise bei einem MS oder DM der Fall ist, die DLK durch proinflammatorische Stoffe in endothelialen Zellen aktiviert wird.

Um die Auswirkung der DLK im Gefäßsystem näher zu untersuchen, wurde in der vorliegenden Arbeit zusätzlich die Angiogenese bei Diät-induzierter Adipositas und Diabetes mellitus in einem Mausmodell untersucht. Die Analysen ergaben, dass die DLK in der frühen Phase einer Ischämie für die Gefäßneubildung und Entstehung von Kollateralkreisläufen von Bedeutung ist.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die DLK in Gefäßzellen einen wichtigen Bestandteil in der Entstehung des Diabetes mellitus darstellt und dass die Regulation von  $\text{TNF}\alpha$  ein entscheidender therapeutischer Ansatzpunkt bei der Entstehung der endothelialen Dysfunktion ist. Zusätzlich wird die Relevanz der DLK in Endothelien durch den Umstand betont, dass das Ausschalten nur eines Allels der DLK einen messbaren Unterschied im Zusammenhang mit früher Kollateralbildung nach Ischämie erbringt. Diese beiden Punkte rücken die DLK in den pharmakotherapeutischen Mittelpunkt. Dadurch, dass die DLK die Kollateralausbildung fördert, wäre zwar eine systemische Inhibition der DLK nicht in Betracht zu ziehen, jedoch wäre sie als lokales Therapeutikum bei der diabetischen Retinopathie ein möglicher Ansatzpunkt die Gefäßproliferation auf der Netzhaut einzudämmen.

## 6 Literaturverzeichnis

- Abaci A, Oguzhan A, Kahraman S, Eryol NK, Unal S, Arinc H, Ergin A (1999): "Effect of diabetes mellitus on formation of coronary collateral vessels." *Circulation* 99(17): 2239-2242.
- Abdelli S, Abderrahmani A, Hering BJ, Beckmann JS, Bonny C (2007): "The c-Jun N-terminal kinase JNK participates in cytokine- and isolation stress-induced rat pancreatic islet apoptosis." *Diabetologia* 50(8): 1660-1669.
- Ammendrup A, Maillard A, Nielsen K, Aabenhus Andersen N, Serup P, Dragsbaek Madsen O, Mandrup-Poulsen T, Bonny C (2000): "The c-Jun amino-terminal kinase pathway is preferentially activated by interleukin-1 and controls apoptosis in differentiating pancreatic beta-cells." *Diabetes* 49(9): 1468-1476.
- Association AD (2009): "Diagnosis and classification of diabetes mellitus." *Diabetes Care* 32 Suppl 1: S62-67.
- Babaeikelishomi R: "Regulation of Dual Leucine Zipper Kinase (DLK) by Prediabetic signals." *Med. Diss. Göttingen*, 2013.
- Baumgartner-Parzer SM, Wagner L, Pettermann M, Grillari J, Gessl A, Waldhausl W (1995): "High-glucose--triggered apoptosis in cultured endothelial cells." *Diabetes* 44(11): 1323-1327.
- Bennett BL, Sasaki DT, Murray BW, O'Leary EC, Sakata ST, Xu W, Leisten JC, Motiwala A, Pierce S, Satoh Y, et al. (2001): "SP600125, an anthrapyrazolone inhibitor of Jun N-terminal kinase." *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(24): 13681-13686.
- Bikfalvi A, Klein S, Pintucci G, Rifkin DB (1997): "Biological roles of fibroblast growth factor-2." *Endocr Rev* 18(1): 26-45.
- Bir SC, Fujita M, Marui A, Hirose K, Arai Y, Sakaguchi H, Huang Y, Esaki J, Ikeda T, Tabata Y, et al. (2008): "New therapeutic approach for impaired arteriogenesis in diabetic mouse hindlimb ischemia." *Circ J* 72(4): 633-640.
- Bloom AJ, Miller BR, Sanes JR, DiAntonio A (2007): "The requirement for Phr1 in CNS axon tract formation reveals the corticostriatal boundary as a choice point for cortical axons." *Genes Dev* 21(20): 2593-2606.
- Bradford MM (1976): "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal Biochem* 72: 248-254.
- Celletti FL, Waugh JM, Amabile PG, Brendolan A, Hilfiker PR, Dake MD (2001): "Vascular endothelial growth factor enhances atherosclerotic plaque progression." *Nat Med* 7(4): 425-429.
- Chang L, Karin M (2001): "Mammalian MAP kinase signalling cascades." *Nature* 410(6824): 37-40.
- Cheon HG (2012): "Latest research and development trends in non-insulin anti-diabetics." *Arch Pharm Res* 36(2): 145-153.
- Clee SM, Attie AD (2007): "The genetic landscape of type 2 diabetes in mice." *Endocr Rev* 28(1): 48-83.

- 
- Coppack SW (2001): "Pro-inflammatory cytokines and adipose tissue." *Proc Nutr Soc* 60(3): 349-356.
- Couture JP, Blouin R (2011): "The DLK gene is a transcriptional target of PPARgamma." *Biochem J* 438(1): 93-101.
- Couture JP, Daviau A, Fradette J, Blouin R (2009): "The mixed-lineage kinase DLK is a key regulator of 3T3-L1 adipocyte differentiation." *PLoS One* 4(3): e4743.
- Cubbon RM, Rajwani A, Wheatcroft SB (2007): "The impact of insulin resistance on endothelial function, progenitor cells and repair." *Diab Vasc Dis Res* 4(2): 103-111.
- Davies PF, Remuzzi A, Gordon EJ, Dewey CF, Jr. Gimbrone MA, Jr. (1986): "Turbulent fluid shear stress induces vascular endothelial cell turnover in vitro." *Proc Natl Acad Sci U S A* 83(7): 2114-2117.
- Efrat S, Tal M, Lodish HF (1994): "The pancreatic beta-cell glucose sensor." *Trends Biochem Sci* 19(12): 535-538.
- Endemann DH, Schiffrin EL (2004): "Endothelial dysfunction." *J Am Soc Nephrol* 15(8): 1983-1992.
- Eto K, Kawauchi T, Osawa M, Tabata H, Nakajima K (2010): "Role of dual leucine zipper-bearing kinase (DLK/MUK/ZPK) in axonal growth." *Neurosci Res* 66(1): 37-45.
- Fernandez-Twinn DS, Ozanne SE (2010): "Early life nutrition and metabolic programming." *Ann N Y Acad Sci* 1212: 78-96.
- Ferrara N Gerber HP (2001): "The role of vascular endothelial growth factor in angiogenesis." *Acta Haematol* 106(4): 148-156.
- Forrester KR, Stewart C, Tulip J, Leonard C, Bray RC (2002): "Comparison of laser speckle and laser Doppler perfusion imaging: measurement in human skin and rabbit articular tissue." *Med Biol Eng Comput* 40(6): 687-697.
- Gallo KA, Johnson GL (2002): "Mixed-lineage kinase control of JNK and p38 MAPK pathways." *Nat Rev Mol Cell Biol* 3(9): 663-672.
- Garcia A, Singh H (2013): "Bevacizumab and ovarian cancer." *Ther Adv Med Oncol* 5(2): 133-141.
- Garrington TP, Johnson GL (1999): "Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways." *Curr Opin Cell Biol* 11(2): 211-218.
- German MS (1993): "Glucose sensing in pancreatic islet beta cells: the key role of glucokinase and the glycolytic intermediates." *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(5): 1781-1785.
- Ghosh AS, Wang B, Pozniak CD, Chen M, Watts RJ, Lewcock JW (2011): "DLK induces developmental neuronal degeneration via selective regulation of proapoptotic JNK activity." *J Cell Biol* 194(5): 751-764.
- Giacchetti G, Sechi LA, Rilli S, Carey RM (2005): "The renin-angiotensin-aldosterone system, glucose metabolism and diabetes." *Trends Endocrinol Metab* 16(3): 120-126.
- Guma M, Rius J, Duong-Polk KX, Haddad GG, Lindsey JD, Karin M (2009): "Genetic and pharmacological inhibition of JNK ameliorates hypoxia-induced retinopathy through interference with VEGF expression." *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(21): 8760-8765.

- Gupta S, Barrett T, Whitmarsh AJ, Cavanagh J, Sluss HK, Derijard B, Davis RJ (1996): "Selective interaction of JNK protein kinase isoforms with transcription factors." *EMBO J* 15(11): 2760-2770.
- Hasilik A: "Biosynthese von Proteinen.;" in: "Biochemie und Pathobiochemie", hrsg. von Löffler G, Heinrich P, Petrides PE, Springer Medizin Verlag Heidelberg, 2007, 287-301.
- He TC, Zhou S, da Costa LT, Yu J, Kinzler KW, Vogelstein B (1998): "A simplified system for generating recombinant adenoviruses." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(5): 2509-2514.
- Heil M, Clauss M, Suzuki K, Buschmann IR, Willuweit A, Fischer S, Schaper W (2000): "Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates monocyte migration through endothelial monolayers via increased integrin expression." *Eur J Cell Biol* 79(11): 850-857.
- Helisch A, Schaper W (2003): "Arteriogenesis: the development and growth of collateral arteries." *Microcirculation* 10(1): 83-97.
- Helisch A, Wagner S, Khan N, Drinane M, Wolfram S, Heil M, Ziegelhoeffer T, Brandt U, Pearlman JD, Swartz HM, et al. (2006): "Impact of mouse strain differences in innate hindlimb collateral vasculature." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26(3): 520-526.
- Hibi M, Lin A, Smeal T, Minden A, Karin M (1993): "Identification of an oncoprotein- and UV-responsive protein kinase that binds and potentiates the c-Jun activation domain." *Genes Dev* 7(11): 2135-2148.
- Hirai S, Cui de F, Miyata T, Ogawa M, Kiyonari H, Suda Y, Aizawa S, Banba Y, Ohno S (2006): "The c-Jun N-terminal kinase activator dual leucine zipper kinase regulates axon growth and neuronal migration in the developing cerebral cortex." *J Neurosci* 26(46): 11992-12002.
- Hirosumi J, Tuncman G, Chang L, Gorgun CZ, Uysal KT, Maeda K, Karin M, Hotamisligil GS (2002): "A central role for JNK in obesity and insulin resistance." *Nature* 420(6913): 333-336.
- Holzman LB, Merritt SE, Fan G (1994): "Identification, molecular cloning, and characterization of dual leucine zipper bearing kinase. A novel serine/threonine protein kinase that defines a second subfamily of mixed lineage kinases." *J Biol Chem* 269(49): 30808-30817.
- Hotamisligil GS (2005): "Role of endoplasmic reticulum stress and c-Jun NH2-terminal kinase pathways in inflammation and origin of obesity and diabetes." *Diabetes* 54 Suppl 2: S73-78.
- Hotamisligil GS, Arner P, Caro JF, Atkinson RL, Spiegelman BM (1995): "Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor-alpha in human obesity and insulin resistance." *J Clin Invest* 95(5): 2409-2415.
- Hu FB, Stampfer MJ, Haffner SM, Solomon CG, Willett WC, Manson JE (2002): "Elevated risk of cardiovascular disease prior to clinical diagnosis of type 2 diabetes." *Diabetes Care* 25(7): 1129-1134.
- Huang A, Yang YM, Yan C, Kaley G, Hintze TH, Sun D (2012): "Altered MAPK signaling in progressive deterioration of endothelial function in diabetic mice." *Diabetes* 61(12): 3181-3188.



- Jhala US, Canettieri G, Sreaton RA, Kulkarni RN, Krajewski S, Reed J, Walker J, Lin X, White M, Montminy M (2003): "cAMP promotes pancreatic beta-cell survival via CREB-mediated induction of IRS2." *Genes Dev* 17(13): 1575-1580.
- Johnson AB, Taylor R (1990): "Diabetes mellitus." *Postgrad Med J* 66(782): 1010-1024.
- Johnson BL, Blackhurst DW, Latham BB, Cull DL, Bour ES, Oliver TL, Williams B, Taylor SM, Scott JD (2013): "Bariatric Surgery Is Associated with a Reduction in Major Macrovascular and Microvascular Complications in Moderately to Severely Obese Patients with Type 2 Diabetes Mellitus." *J Am Coll Surg* 216(4): 545-556.
- Kaneto H, Nakatani Y, Miyatsuka T, Kawamori D, Matsuoka TA, Matsuhisa M, Kajimoto Y, Ichijo H, Yamasaki Y, Hori M (2004): "Possible novel therapy for diabetes with cell-permeable JNK-inhibitory peptide." *Nat Med* 10(10): 1128-1132.
- Karahashi H, Michelsen KS, Arditi M (2009): "Lipopolysaccharide-induced apoptosis in transformed bovine brain endothelial cells and human dermal microvessel endothelial cells: the role of JNK." *J Immunol* 182(11): 7280-7286.
- Kassi E, Pervanidou P, Kaltsas G, Chrousos G (2011): "Metabolic syndrome: definitions and controversies." *BMC Med* 9: 48.
- Klimpel C: "Wirkung der proinflammatorischen Zytokine TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$  auf die Aktivität und die Proteinmenge der Dual-Leucine-Zipper-Bearing Kinase in einer Betazelllinie." *Med. Diss. Göttingen*, 2010.
- Koenig RJ, Peterson CM, Jones RL, Saudek C, Lehrman M, Cerami A (1976): "Correlation of glucose regulation and hemoglobin A1c in diabetes mellitus." *N Engl J Med* 295(8): 417-420.
- Laemmli UK (1970): "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* 227(5259): 680-685.
- Larsen CM, Faulenbach M, Vaag A, Volund A, Ehres JA, Seifert B, Mandrup-Poulsen T, Donath MY (2007): "Interleukin-1-receptor antagonist in type 2 diabetes mellitus." *N Engl J Med* 356(15): 1517-1526.
- Limbourg A, Korff T, Napp LC, Schaper W, Drexler H, Limbourg FP (2009): "Evaluation of postnatal arteriogenesis and angiogenesis in a mouse model of hind-limb ischemia." *Nat Protoc* 4(12): 1737-1746.
- Luitse MJ, Biessels GJ, Rutten GE, Kappelle LJ (2012): "Diabetes, hyperglycaemia, and acute ischaemic stroke." *Lancet Neurol* 11(3): 261-271.
- Luo J, Deng ZL, Luo X, Tang N, Song WX, Chen J, Sharff KA, Luu HH, Haydon RC, Kinzler KW, et al. (2007): "A protocol for rapid generation of recombinant adenoviruses using the AdEasy system." *Nat Protoc* 2(5): 1236-1247.
- MacDonald PE, Joseph JW, Rorsman P (2005): "Glucose-sensing mechanisms in pancreatic beta-cells." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 360(1464): 2211-2225.
- Maedler K, Donath MY (2004): "Beta-cells in type 2 diabetes: a loss of function and mass." *Horm Res* 62 Suppl 3: 67-73.
- Maedler K, Schulthess FT, Bielman C, Berney T, Bonny C, Prentki M, Donath MY, Roduit R (2008): "Glucose and leptin induce apoptosis in human beta-cells and impair glucose-stimulated insulin secretion through activation of c-Jun N-terminal kinases." *FASEB J* 22(6): 1905-1913.
- Mata M, Merritt SE, Fan G, Yu GG, Holzman LB (1996): "Characterization of dual leucine zipper-bearing kinase, a mixed lineage kinase present in synaptic terminals

- whose phosphorylation state is regulated by membrane depolarization via calcineurin." *J Biol Chem* 271(28): 16888-16896.
- Matsuzawa Y (2008): "The role of fat topology in the risk of disease." *Int J Obes (Lond)* 32 Suppl 7: S83-92.
- Michlewska S, Dransfield I, Megson IL, Rossi AG (2009): "Macrophage phagocytosis of apoptotic neutrophils is critically regulated by the opposing actions of pro-inflammatory and anti-inflammatory agents: key role for TNF-alpha." *FASEB J* 23(3): 844-854.
- Montgomery MK, Hallahan NL, Brown SH, Liu M, Mitchell TW, Cooney GJ, Turner N (2013): "Mouse strain-dependent variation in obesity and glucose homeostasis in response to high-fat feeding." *Diabetologia* 56(5): 1129-1139.
- Mul JD, Seeley RJ, Woods SC, Begg DP (2013): "Angiotensin-converting enzyme inhibition reduces food intake and weight gain and improves glucose tolerance in melanocortin-4 receptor deficient female rats." *Physiol Behav* 31(13): 29-32.
- Nagel T, Resnick N, Dewey CF, Jr. Gimbrone MA, Jr. (1999): "Vascular endothelial cells respond to spatial gradients in fluid shear stress by enhanced activation of transcription factors." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19(8): 1825-1834.
- Nicklin SA, Baker AH (1999): "Simple methods for preparing recombinant adenoviruses for high-efficiency transduction of vascular cells." *Methods Mol Med* 30: 271-283.
- Nihalani D, Merritt S, Holzman LB (2000): "Identification of structural and functional domains in mixed lineage kinase dual leucine zipper-bearing kinase required for complex formation and stress-activated protein kinase activation." *J Biol Chem* 275(10): 7273-7279.
- Nihalani D, Meyer D, Pajni S, Holzman LB (2001): "Mixed lineage kinase-dependent JNK activation is governed by interactions of scaffold protein JIP with MAPK module components." *Embo J* 20(13): 3447-3458.
- Nihalani D, Wong HN, Holzman LB (2003): "Recruitment of JNK to JIP1 and JNK-dependent JIP1 phosphorylation regulates JNK module dynamics and activation." *J Biol Chem* 278(31): 28694-28702.
- Obrig TG, Culp WJ, McKeegan WL, Hardesty B (1971): "The mechanism by which cycloheximide and related glutarimide antibiotics inhibit peptide synthesis on reticulocyte ribosomes." *J Biol Chem* 246(1): 174-181.
- Oetjen E, Lechleiter A, Blume R, Nihalani D, Holzman L, Knepel W (2006): "Inhibition of membrane depolarisation-induced transcriptional activity of cyclic AMP response element binding protein (CREB) by the dual-leucine-zipper-bearing kinase in a pancreatic islet beta cell line." *Diabetologia* 49(2): 332-342.
- Okamoto Y, Kihara S, Funahashi T, Matsuzawa Y, Libby P (2006): "Adiponectin: a key adipocytokine in metabolic syndrome." *Clin Sci (Lond)* 110(3): 267-278.
- Olsson AK, Dimberg A, Kreuger J, Claesson-Welsh L (2006): "VEGF receptor signalling - in control of vascular function." *Nat Rev Mol Cell Biol* 7(5): 359-371.
- Orasanu G, Plutzky J (2009): "The pathologic continuum of diabetic vascular disease." *J Am Coll Cardiol* 53(5 Suppl): S35-42.
- Pande RL, Perlstein TS, Beckman JA, Creager MA (2008): "Association of insulin resistance and inflammation with peripheral arterial disease: the National Health and Nutrition Examination Survey, 1999 to 2004." *Circulation* 118(1): 33-41.

- 
- Parameswaran N, Patial S (2010): "Tumor necrosis factor-alpha signaling in macrophages." *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 20(2): 87-103.
- Patel SJ, Jindal R, King KR, Tilles AW, Yarmush ML (2011): "The inflammatory response to double stranded DNA in endothelial cells is mediated by NFkappaB and TNFalpha." *PLoS One* 6(5): e19910.
- Plaumann S, Blume R, Borchers S, Steinfelder HJ, Knepel W, Oetjen E (2008): "Activation of the dual-leucine-zipper-bearing kinase and induction of beta-cell apoptosis by the immunosuppressive drug cyclosporin A." *Mol Pharmacol* 73(3): 652-659.
- Plomgaard P, Nielsen AR, Fischer CP, Mortensen OH, Broholm C, Penkowa M, Krogh-Madsen R, Erikstrup C, Lindgaard B, Petersen AM, et al. (2007): "Associations between insulin resistance and TNF-alpha in plasma, skeletal muscle and adipose tissue in humans with and without type 2 diabetes." *Diabetologia* 50(12): 2562-2571.
- Poggioli R, Ueta CB, RA ED, Castillo M, Fonseca TL, Bianco AC (2013): "Dexamethasone reduces energy expenditure and increases susceptibility to diet-induced obesity in mice." *Obesity (Silver Spring)*.
- Raff M (1998): "Cell suicide for beginners." *Nature* 396(6707): 119-122.
- Reaven GM (1988): "Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease." *Diabetes* 37(12): 1595-1607.
- Robinson MJ, Cobb MH (1997): "Mitogen-activated protein kinase pathways." *Curr Opin Cell Biol* 9(2): 180-186.
- Romano G, Pacilio C, Giordano A (1999): "Gene transfer technology in therapy: current applications and future goals." *Stem Cells* 17(4): 191-202.
- Rowe WP, Huebner RJ, Gilmore LK, Parrott RH, Ward TG (1953): "Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture." *Proc Soc Exp Biol Med* 84(3): 570-573.
- Schaper J, Konig R, Franz D, Schaper W (1976): "The endothelial surface of growing coronary collateral arteries. Intimal margination and diapedesis of monocytes. A combined SEM and TEM study." *Virchows Arch A Pathol Anat Histol* 370(3): 193-205.
- Scholz D, Ziegelhoeffer T, Helisch A, Wagner S, Friedrich C, Podzuweit T, Schaper W (2002): "Contribution of arteriogenesis and angiogenesis to postocclusive hindlimb perfusion in mice." *J Mol Cell Cardiol* 34(7): 775-787.
- Schultz A, Lavie L, Hochberg I, Beyar R, Stone T, Skorecki K, Lavie P, Roguin A, Levy AP (1999): "Interindividual heterogeneity in the hypoxic regulation of VEGF: significance for the development of the coronary artery collateral circulation." *Circulation* 100(5): 547-552.
- Shin JE, Cho Y, Beirowski B, Milbrandt J, Cavalli V, DiAntonio A (2012): "Dual leucine zipper kinase is required for retrograde injury signaling and axonal regeneration." *Neuron* 74(6): 1015-1022.
- Simons M (2005): "Angiogenesis: where do we stand now?" *Circulation* 111(12): 1556-1566.
- Sorof J, Daniels S (2002): "Obesity hypertension in children: a problem of epidemic proportions." *Hypertension* 40(4): 441-447.

- Stahnke M (2013): "Hemmung des  $\beta$ -zellspezifischen Transkriptionsfaktors MafA durch die Dual Leucine-Zipper Kinase (DLK)." Med. Dissertation Göttingen (in Vorbereitung\*).
- Stamler J, Vaccaro O, Neaton JD, Wentworth D (1993): "Diabetes, other risk factors, and 12-yr cardiovascular mortality for men screened in the Multiple Risk Factor Intervention Trial." *Diabetes Care* 16(2): 434-444.
- Stehouwer CD, Lambert J, Donker AJ, van Hinsbergh VW (1997): "Endothelial dysfunction and pathogenesis of diabetic angiopathy." *Cardiovasc Res* 34(1): 55-68.
- Stumvoll M, Goldstein BJ, van Haeften TW (2005): "Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy." *Lancet* 365(9467): 1333-1346.
- Surwit RS, Kuhn CM, Cochrane C, McCubbin JA, Feinglos MN (1988): "Diet-induced type II diabetes in C57BL/6J mice." *Diabetes* 37(9): 1163-1167.
- Thomas AP, Dunn TN, Drayton JB, Oort PJ, Adams SH (2012): "A dairy-based high calcium diet improves glucose homeostasis and reduces steatosis in the context of pre-existing obesity." *Obesity (Silver Spring)* 21(3): 229-235.
- Tipping PG, Hancock WW (1993): "Production of tumor necrosis factor and interleukin-1 by macrophages from human atheromatous plaques." *Am J Pathol* 142(6): 1721-1728.
- Toye AA, Lippiat JD, Proks P, Shimomura K, Bentley L, Hugill A, Mijat V, Goldsworthy M, Moir L, Haynes A, et al. (2005): "A genetic and physiological study of impaired glucose homeostasis control in C57BL/6J mice." *Diabetologia* 48(4): 675-686.
- van den Oever IA, Raterman HG, Nurmohamed MT, Simsek S (2010): "Endothelial dysfunction, inflammation, and apoptosis in diabetes mellitus." *Mediators Inflamm* 2010: 792393.
- Vlassara H (1992): "Receptor-mediated interactions of advanced glycosylation end products with cellular components within diabetic tissues." *Diabetes* 41 Suppl 2: 52-56.
- Wallace BK, Jelks KA, O'Donnell ME (2012): "Ischemia-induced stimulation of cerebral microvascular endothelial cell Na-K-Cl cotransport involves p38 and JNK MAP kinases." *Am J Physiol Cell Physiol* 302(3): C505-517.
- Wallbach M: "Identifikation einer funktionellen Kerner kennungssequenz in der Dual-Leucine-Zipper-Bearing Kinase." Med. Diss. Göttingen, 2010.
- Wang J, An FS, Zhang W, Gong L, Wei SJ, Qin WD, Wang XP, Zhao YX, Zhang Y, Zhang C, et al. (2011): "Inhibition of c-Jun N-terminal kinase attenuates low shear stress-induced atherogenesis in apolipoprotein E-deficient mice." *Mol Med* 17(9-10): 990-999.
- Wang Y, Wang H, Hegde V, Dubuisson O, Gao Z, Dhurandhar NV, Ye J (2013): "Interplay of pro- and anti-inflammatory cytokines to determine lipid accretion in adipocytes." *Int J Obes (Lond)*.
- White CR, Haidekker M, Bao X, Frangos JA (2001): "Temporal gradients in shear, but not spatial gradients, stimulate endothelial cell proliferation." *Circulation* 103(20): 2508-2513.
- WHO (2012): "Factsheet N°312; <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/>."
- Wright E, Jr., Scism-Bacon JL, Glass LC (2006): "Oxidative stress in type 2 diabetes: the role of fasting and postprandial glycaemia." *Int J Clin Pract* 60(3): 308-314.

- 
- Xita N, Tsatsoulis A (2010): "Fetal origins of the metabolic syndrome." *Ann N Y Acad Sci* 1205: 148-155.
- Xu Z, Kukekov NV, Greene LA (2005): "Regulation of apoptotic c-Jun N-terminal kinase signaling by a stabilization-based feed-forward loop." *Mol Cell Biol* 25(22): 9949-9959.
- Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J (2000): "Vascular-specific growth factors and blood vessel formation." *Nature* 407(6801): 242-248.
- Yang Z, Mo X, Gong Q, Pan Q, Yang X, Cai W, Li C, Ma JX, He Y Gao G (2008): "Critical effect of VEGF in the process of endothelial cell apoptosis induced by high glucose." *Apoptosis* 13(11): 1331-1343.
- Zhang L, Zalewski A, Liu Y, Mazurek T, Cowan S, Martin JL, Hofmann SM, Vlassara H, Shi Y (2003): "Diabetes-induced oxidative stress and low-grade inflammation in porcine coronary arteries." *Circulation* 108(4): 472-478.
- Zimmet P, Alberti KG, Kaufman F, Tajima N, Silink M, Arslanian S, Wong G, Bennett P, Shaw J Caprio S (2007): "The metabolic syndrome in children and adolescents - an IDF consensus report." *Pediatr Diabetes* 8(5): 299-306.

\*mit freundlicher Genehmigung des Verfassers

---

## Danksagung

Ich möchte mich von ganzem Herzen bei meiner Betreuerin Prof. Dr. Elke Oetjen bedanken, die mich während meiner Promotion mit viel Geduld, Motivation und Zuverlässigkeit unterstützt hat. Sie hat mir die Freude am wissenschaftlichen Arbeiten vermittelt und hatte immer ein offenes Ohr für mich. Ich danke ihr für ihre herzliche Art und dass sie mir immer mit einem Lächeln begegnet ist.

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Zimmermann, da ich in seiner Abteilung die Arbeit verrichten durfte.

Ich möchte mich bei allen aktuellen und ehemaligen Kollegen der Abteilungen Pharmakologie und Kardiologie bedanken. Mein besonderer Dank geht an PD Dr. Susanne Lutz und Prof. Dr. Katrin Schäfer, die mir beim Erlernen von neuen Methoden mit Rat und Tat zur Seite standen.

Ich danke Dr. Marie Stahnke, Dr. Roholla Babaei und Dr. Diana Kaiser für die schöne und lockere Atmosphäre in der Arbeitsgruppe, für den Zusammenhalt, die Hilfe und die schönen Stunden, die wir zusammen hatten.

Ein besonderer Dank geht an Cordelia Imig und Dr. Benjamin Cooper vom Max-Planck-Institut Göttingen, die meine Arbeit Korrektur gelesen und mich während der gesamten Zeit meiner Promotion unterstützt haben. Danke, dass ihr euch immer Zeit für mich genommen habt.

Ich danke Kai für die Unterstützung und Geduld während meiner Promotion. Ich danke ihm, dass er mir in technischen Fragen immer zur Seite stand.

Ich danke Michi für das Korrekturlesen meiner Arbeit und die Unterstützung, die ich in der gesamten Zeit von ihm bekommen habe. Er hat immer die richtigen motivierenden Worte gefunden.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern. Ohne sie hätte ich nie die Möglichkeit bekommen, diese Arbeit zu schreiben und zu vollenden. Ich danke ihnen für ihr Vertrauen und dass sie immer an mich glauben.

---

## Lebenslauf

Am 7. April 1986 wurde ich in Stuttgart als zweites Kind von Dieter und Renate Krebs geboren. Meine Mutter, geboren am 07. August 1944, arbeitete als Luftverkehrsangestellte bei der Lufthansa. Mein Vater, geboren am 01. Februar 1943, arbeitete als Betriebswirt bei Daimler Chrysler.

1992 wurde ich in die Wolfschlüger Grundschule eingeschult. 1996 wechselte ich zum Hölderlin-Gymnasium Nürtingen. Während meiner Schulzeit wurde ich als Mediator ausgebildet und vermittelte zwischen jüngeren Schülern bei Streitgesprächen. Im Juni 2005 erlangte ich mit den Neigungs- und Profulfächern Chemie und Kunst die allgemeine Hochschulreife mit der Note 1,8.

Im Sommersemester 2006 begann ich das Studium der Humanmedizin an der Georg-August-Universität in Göttingen. Während des Studiums arbeitete ich als studentische Hilfskraft in der Anatomie und begleitete als Tutor Seminare der Allgemeinmedizin.

Den ersten Abschnitt der ärztlichen Prüfung absolvierte ich im April 2008 mit der Note „befriedigend“ (3,5). Meine Famulaturen leistete ich der Gynäkologie (Robert-Bosch-Krankenhaus Stuttgart), Inneren Medizin (Marienhospital Stuttgart), Allgemeinmedizin (Dr. Wirth, Harthausen), Chirurgie (Christian Hospital, Nowrangpur, Indien) und der Pädiatrie (Dr. Obwald, Esslingen) ab. Im Frühjahr 2010 nahm ich am Wahlfach „Advanced clinical and functional Anatomy of the internal organs“ an der Universität Galway, Irland teil. Beide Auslandsaufenthalte während meines Studiums haben meinen weiteren klinischen Weg sehr bereichert und geprägt.

Im Mai 2010 begann ich mit der experimentellen Doktorarbeit im Bereich der experimentellen Pharmakologie an der Universität Göttingen unter Leitung von Frau Prof. Dr. med. Elke Oetjen. Im Frühjahr 2011 stellte ich meine bisherigen Ergebnisse auf der 77. Jahrestagung der DGPT (Deutsche Gesellschaft für Pharmakologie und Toxikologie) mit einem Poster vor.

Das praktische Jahr absolvierte ich an Lehrkrankenhäusern der Universität Göttingen und bestand im November 2012 erfolgreich den zweiten Abschnitt der ärztlichen Prüfung (Staatsexamen) mit der Note „gut“ (2,5).

Im Sommer dieses Jahres werde ich voraussichtlich als Assistenzärztin in der Neurologie im Karl-Olga-Hospital Stuttgart meine Weiterbildung beginnen.