

Aus der Klinik für Kardiologie und Pneumologie
(Prof. Dr. med. G. Hasenfuß)
im Zentrum Innere Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Bedeutung der Leptinrezeptor-vermittelten Aktivierung des
Transkriptionsfaktors STAT3 für die Effekte des Adipokins Leptin auf
Blutplättchen**

INAUGURAL-DISSERTATION

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

vorgelegt von

Kristina Friederike Stroebe

aus

Bremen

Göttingen 2013

Dekan:

Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer

I. Berichterstatterin:

Prof. Dr. med. K. Schäfer

II. Berichterstatter:

Prof. Dr. mult. Th. Meyer

III. Berichterstatter/in:

Tag der mündlichen Prüfung:

15.10.2014

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1
1. Einleitung	1
1.1 Thrombozyten	1
1.1.1 Funktion von Thrombozyten	2
1.1.2 Risikofaktoren und Entstehung einer Thrombose	4
1.2 Leptin und der Leptinrezeptor.....	6
1.2.1 Das Adipokin Leptin.....	6
1.2.2 Der Leptinrezeptor: Aufbau und Funktion.....	7
1.2.3 Leptins prothrombotische Wirkung auf Plättchen	9
1.3 Die ObRs/s-Maus und ihre Eigenschaften.....	13
1.4 Ziel der Arbeit	14
2 Material und Methoden	16
2.1 Verwendete Geräte und Materialien.....	16
2.1.1 Chemikalien	16
2.1.2 Geräte	18
2.1.3 Versuchstiere.....	18
2.2 Methoden	19
2.2.1 Charakterisierung der Versuchstiere.....	19
2.2.1.1 Gewicht.....	19
2.2.1.2 Erstellung eines Blutbildes	19
2.2.1.3 Thrombozytenzählung	19
2.2.2 Isolation von Blutplättchen.....	20
2.2.2.1 Plättchenisolation aus Mausblut.....	20
2.2.2.2 Plättchenisolation aus humanem Blut	21
2.2.3 Proteinlysate	22
2.2.3.1 Herstellung von Proteinlysaten	22

2.2.3.2 Bicinchoninic Acid (BCA) Assay.....	22
2.2.4 Western-Blot-Analyse	23
2.2.4.1 SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese	23
2.2.4.2 Western Blot	25
2.2.4.3 Färbung der Nitrozellulose-Membran mit Ponceau S	25
2.2.4.4 Blocken und Bindung der Antikörper.....	26
2.2.4.5 ECL-Entwicklung.....	26
2.2.5 Plättchenadhäsions-Assay	27
2.2.5.1 Beschichtung der Deckgläschen.....	27
2.2.5.2 Zugabe muriner Blutplättchen	28
2.2.6 Thrombozyten-Funktionstest	30
2.2.6.1 Blutungszeit (sog. „Tail Bleeding Assay“)	30
2.2.7 Durchflusszytometrie	31
2.2.7.1 Darstellung des Fibrinogenrezeptors	31
2.2.7.2 FITC-Markierung von Fibrinogen	32
2.2.7.3 Nachweis einer STAT3-Aktivierung	33
2.2.8 Statistische Auswertung.....	34
3 Ergebnisse	35
3.1 Blutbild und Plättchenfunktionstest	36
3.1.1 Blutbild	36
3.1.2 Blutungszeit (sog. „Tail Bleeding Assay“)	37
3.2 Plättchenadhäsion	40
3.3 Durchflusszytometrische Analysen.....	45
3.3.1 Expression des Fibrinogenrezeptors	45
3.4 Aktivierung von Jak2-STAT3 nach Leptinstimulation	49
3.4.1 Nachweis der Jak2-Aktivierung.....	49
3.4.1.1 Ergebnis der Western-Blot-Analyse	49
3.4.2 Nachweis der STAT3-Aktivierung	51
3.4.2.1 Ergebnis der Western-Blot-Analyse	51
3.4.2.2 Ergebnis der Durchflusszytometrie	52
4 Diskussion	53
4.1 Einfluss von Leptin auf die Plättchenaktivierung	54

4.2 STAT3-Signaltransduktion in Plättchen	59
4.3 STAT3 und Megakaryopoese	61
4.4 Limitationen der Studie	62
5 Zusammenfassung.....	63
6 Abkürzungsverzeichnis	68
7 Literaturverzeichnis	70
Lebenslauf.....	81

1. Einleitung

1.1 Thrombozyten

Thrombozyten sind kernlose Blutpartikel, die unter dem Einfluss von Thrombopoetin (TPO) durch zytoplasmatische Abschnürung aus mehrkernigen Megakaryozyten im Knochenmark gebildet werden. Sie sind nach Erythrozyten die zweithäufigsten korpuskulären Elemente im zirkulierenden Blut (*Junqueira et al. 2002*).

Im inaktivierten Zustand gleichen Blutplättchen flachen, bikonvexen Scheiben (*Junqueira et al. 2002*). Ihre Hauptaufgabe ist die Blutstillung. Diese geht mit morphologischen Veränderungen der Thrombozyten im Rahmen ihrer Adhäsion und Aktivierung einher.

Thrombozyten enthalten viele verschiedene Organellen. α -Granula machen hierbei den größten Anteil aus. Der Inhalt setzt sich aus den Adhäsionsmolekülen Fibrinogen, Fibronectin, Thrombospondin und von-Willebrand-Faktor (vWF), sowie Gerinnungsfaktor V, Plättchen-Faktor 4 (Antiheparin), Platelet-Derived-Growth-Factor (PDGF), P-Selektin (CD62P) und chemotaktischen Faktoren zusammen (*Quinn 2005*). Gerinnungsfaktor V, vWF und Fibronectin machen den größten Proteinanteil in den α -Granula aus (*Linß und Fanghänel 1998*). Die Freisetzung dieser Granula aus aktivierten Plättchen führt neben einer Verstärkung der Aggregationsreaktion auch zur Freisetzung von Wachstumsfaktoren. Die sog. „dense bodies“ oder auch als δ -Granula bezeichneten Strukturen gehören mit einem Durchmesser von etwa 150 nm zu den kleinsten Granula in Blutplättchen. Da von ihnen nur 5-6 pro Thrombozyt existieren, machen sie den geringsten Anteil aus. δ -Granula sind reich an Serotonin und Kalzium. Aber auch ADP (Adenosindiphosphat) und ATP (Adenosintriphosphat) gehören zum Inhalt dieser Granula (*Junqueira et al. 2002*). Bei Freisetzung besitzen diese Substanzen eine aggregationsfördernde Wirkung. Schließlich gibt es noch die primären Lysosomen. Neben Proteasen (z.B. Kathepsin, Kollagenasen, Phosphatasen) enthalten diese Glykohydrolasen (z.B. Heparinase, Galaktosidase, Glukosidase), CD63 und LAMP1/2 (Lysosomal-Associated-Membrane-Protein). Ihr Inhalt dient der Auflösung kleiner Thrombozytenaggregate.

Hinsichtlich Zahl und Morphologie gibt es wichtige Unterschiede zwischen murinen und humanen Plättchen. Während Menschen $150-400 \times 10^3$ Thrombozyten pro Mikroliter Blut haben, besitzen Mäuse in der Regel $300-1000 \times 10^3$ Plättchen pro Mikroliter (McGarry et al. 2009). Die Größe humaner Thrombozyten beträgt $1-2 \mu\text{m}$, Mausplättchen hingegen sind nur etwa $0,5 \mu\text{m}$ groß (Schmitt et al. 2001). Nach Ausschwemmung in das periphere Blut beträgt die durchschnittliche Überlebenszeit humaner Plättchen 10, die muriner Plättchen 3,5 Tage (Schmitt et al. 2001). Auch in Bezug auf den Gehalt und die Zusammensetzung der Granula gibt es Unterschiede zwischen Maus und Mensch. Die in geringerer Anzahl vorhandenen murinen α -Granula sind bei Mäusen wesentlich heterogener hinsichtlich ihrer Form und Größe.

1.1.1 Funktion von Thrombozyten

Zu den physiologischen Aufgaben der Thrombozyten gehört die primäre Hämostase (Blutstillung), die durch ein Zusammenspiel von Vasokonstriktion, Thrombozytenadhäsion und -aggregation gelingt. Die nach Gefäßverletzung eintretende Blutstillung lässt sich in drei Phasen einteilen: Plättchenadhäsion, Plättchenaktivierung und Plättchenaggregation.

Zwischen Thrombozyten und unbeschädigtem Endothel findet normalerweise keine Interaktion statt. Aktivierung (z.B. durch kardiovaskuläre Risikofaktoren) oder Verletzung der Endothelzellschicht sind dagegen Signale für Thrombozyten, über Integrine (Adhäsionsmoleküle) an bestimmte Liganden zu binden (Ruggeri 2002). Mögliche Bindungspartner für Integrine sind vor allem Kollagen und vWF, aber auch Fibronectin (Beumer et al. 1995), Laminin (Hindriks et al. 1992) oder Thrombospondin (Jurk et al. 2003). Alle aufgeführten Proteine können über spezifische Integrine auf Thrombozyten mit diesen interagieren, auch wenn nur einige wenige eine wirklich essentielle Rolle bei der Thrombusentstehung spielen. Der vWF sorgt für eine indirekte, aber dafür sehr feste Adhäsion der Thrombozyten, indem er eine Bindung zwischen dem GPIIb/IIIa des Glykoprotein-Ib-IX-V-Komplexes der Thrombozytenmembran und dem Kollagen vermittelt. Besonders bei hohen Scherkräften (Stenosen, Arteriolen) ist dies von Bedeutung (Savage et al. 1996, 1998).

Die Plättchenadhäsion triggert die Plättchenaktivierung. Es kommt zur Freisetzung der Granulainhalte. ADP führt zu einer autokrinen Thrombozytenstimulation, während Serotonin die Kontraktion der glatten Gefäßmuskulatur fördert. Thromboxan A₂ (TXA₂), Platelet-Activating-Factor (PAF), Thrombin und andere granuläre Plättchen-Agonisten unterhalten den Vorgang der Adhäsion durch die Erhöhung der thrombozytären Adhäsionsfähigkeit (*Junqueira et al. 2002*). Die Thrombozyten werden größer, nehmen eine kugelige Gestalt an (*Junqueira et al. 2002*) und bilden durch Kontraktion zytoskelettaler Mikrofilamente Pseudopodien aus. Die Interaktion der Thrombozyten mit ADP, Thrombin und TXA₂ über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren führt letztendlich über einen Anstieg des zytosolischen Kalziums zur Aktivierung des Integrin $\alpha\text{IIb}\beta_3$ (Fibrinogenrezeptor, GPIIb/IIIa), die gemeinsame Endstrecke aller Plättchen-aktivierenden Substanzen. Durch Konformationsänderung des Rezeptors wird dieser hoch-affin für das in großer Menge im Plasma vorhandene Fibrinogen. Fibrinogen fungiert als Brücke zwischen aktivierten Thrombozyten und dient außerdem der Anlagerung weiterer Plättchen. Die Fibrinogenbindung ist somit Grundlage der Aggregation. Resultat ist ein vorläufiges Thrombozytenaggregat mit der Funktion eines hämostatischen Pfropfs.

Der plättchenabhängigen Blutstillung (1-3 Minuten) folgt die der Pfropfstabilisierung dienende Blutgerinnung (sekundäre Hämostase). Sie findet im Zusammenspiel mit den Molekülen der Enzymkaskade des Gerinnungssystems, Kalzium und negativ geladenen Phospholipiden statt. Ziel hierbei ist die Polymerisierung des löslichen Fibrinogens in ein unlösliches, stabiles Fibrinnetz (*Junqueira et al. 2002*). Die Aktivierung der Gerinnungsfaktoren kann über zwei Wege ablaufen. Man unterscheidet eine „endogene“ (Dauer: einige Minuten) von einer „exogenen“ Aktivierung (Dauer: wenige Sekunden). Bei letzterer erfolgt die Aktivierung des Faktor VII über die Bindung an Gewebsthromboplastin (TF, Tissue Factor, Faktor III). Dieses integrale Membranprotein wird von verschiedenen hämatopoetischen und vaskulären Zelltypen exprimiert. Eine Endothelverletzung ist somit Voraussetzung dafür, dass das Plasmaprotein Faktor VII mit TF in Kontakt treten und so nicht-proteolytisch aktiviert werden kann (*Boulpaep 2009*). Daraufhin bildet sich der exogene Tenase-Komplex (Faktor VIIa, TF, Phospholipide, Ca²⁺), der wiederum den Faktor X zu Xa aktiviert (*Deetjen et al. 2005*). Bei der „endogenen“ Aktivierung werden die Enzymreaktionen durch den Kontakt von Blut mit den negativ geladenen

Oberflächen der verletzten Gefäßzellen ausgelöst. Genauer gesagt binden Präkallikrein, hochmolekulares Kininogen und FXII an diese negativ geladenen Oberflächen und führen zu einer Aktivierung. Weitere Enzymaktivierungen (Faktor XI zu XIa, Faktor IX zu IXa) folgen. Wie bei dem exogenen Weg wird schließlich Faktor X aktiviert. Beide Wege haben eine gemeinsame Endstrecke: Über den Prothrombinaktivator (Faktor Xa, Faktor Va, Phospholipide, Ca²⁺) kommt es schließlich zur Thrombin (FIIa)- und Fibrinbildung (*Deetjen et al. 2005*).

Die Fibrinolyse dient der Thrombusauflösung. Die Aktivatoren Tissue-Type Plasminogen Activator (tPA) und Urokinase Plasminogen Activator (uPA) konvertieren inaktives Plasminogen zu Plasmin, das durch Abspaltung von Fibrinolyseprodukten innerhalb des Fibringerüsts eine Thrombusauflösung erzielt. Dieser Ablauf wird durch körpereigene Hemmstoffe wie PAI-1 (Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1) begrenzt (*Deetjen et al. 2005*).

1.1.2 Risikofaktoren und Entstehung einer Thrombose

Thrombosen sind der Ursprung vieler schwerwiegender Folgeerkrankungen. Tiefe Venenthrombosen und daraus möglicherweise resultierende Lungenembolien, sowie Herzinfarkte und Schlaganfälle zählen zu den häufig im klinischen Alltag anzutreffenden Komplikationen. Es gibt bestimmte Risikofaktoren, die die Entstehung von Thrombosen fördern. Diese stehen im Zusammenhang mit der sog. „Virchow-Trias“. Endothelalterationen stellen eine Säule dieser Trias dar und können unterschiedlicher Genese sein. Neben traumatisch bedingten Gefäßwandschäden (z.B. durch Operationen, Quetschungen) gibt es auch degenerative (z.B. Arteriosklerose, Varikosis) und entzündliche (Phlebitis, Arteriitis) Endothelveränderungen. Die Blutströmungsgeschwindigkeit ist ein weiterer, bei der Thromboseentstehung zu berücksichtigender Faktor. Eine verlangsamte oder gestörte Blutströmung (z.B. im Rahmen von Immobilisation, Herzinsuffizienz, Schock oder Polyglobulie) vereinfacht die Thrombozytenadhäsion. Schließlich spielt auch die Blutbeschaffenheit eine Rolle. Herrscht Ungleichgewicht zwischen Blutgerinnung und Thrombolysen zugunsten der Gerinnung (Hyperkoagulabilität, erhöhte Gerinnungsneigung), ist das Risiko einer Thrombose deutlich erhöht. Dies ist beispielsweise bei Exsikkose, Rauchen oder post-operativ durch vermehrte

Freisetzung von Gerinnungsfaktoren der Fall. Aber auch Malignome, Entzündungsprozesse, bestimmte Medikamente (z.B. östrogenhaltige Präparate) und Übergewicht spielen eine wichtige Rolle.

Übergewicht und das mit diesem häufig einhergehende metabolische Syndrom, bestehend aus Adipositas, arterieller Hypertonie, Glukoseintoleranz/Diabetes mellitus Typ 2, Hyperlipidämie, ist ein häufig auftretendes Gesundheitsproblem, mit steigender Inzidenz. Das Vorliegen eines metabolischen Syndroms birgt ein dreifach erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre Komplikationen (z.B. *Dieterle und Landgraf 2006, Rana et al. 2007*). Adipositas ist auf unterschiedliche Art und Weise thrombosefördernd. Zum einen ist sie meist mit mangelnder Bewegung assoziiert, zum anderen werden im Fettgewebe Substanzen (Adipokine) synthetisiert und bei Übergewicht vermehrt freigesetzt, von denen einige prothrombotische bzw. antifibrinolytische Eigenschaften besitzen.

PAI-1 ist der wichtigste physiologische Inhibitor der fibrinolytischen Faktoren uPA und tPA und hemmt dadurch die Fibrinolyse (*Eitzman und Ginsburg 1997*). PAI-1 wird unter anderem auch in Adipozyten produziert und Übergewicht ist mit erhöhten PAI-1-Spiegeln im Plasma und einer reduzierten fibrinolytischen Kapazität (*Samad et al. 1996a/b, Morange et al. 1999*) assoziiert. Mithilfe von Mausmodellen für arterielle Thrombose konnte gezeigt werden, dass PAI-1 Thrombose-stabilisierende Effekte hat (z.B. *Farrehi et al. 1998, Konstantinides et al. 2001b*).

Das im Fettgewebe produzierte Adipokin Adiponektin wird bei Übergewicht vermindert gebildet (*Hu et al. 1996*). Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass Adiponektin anti-thrombotisch wirkt: niedrige Adiponektinspiegel förderten die Thromboseentstehung, hohe Spiegel waren protektiv (*Kato et al. 2006*). Adiponektin-defiziente Mäuse zeigten nach arterieller Gefäßverletzung eine verstärkte Thrombusbildung (*Kato et al. 2006*).

Die Wirkung des Adipokins Leptin auf Thrombozyten und die Thrombose wird ausführlich in Kapitel 1.2 besprochen.

1.2 Leptin und der Leptinrezeptor

1.2.1 Das Adipokin Leptin

Das Proteohormon Leptin (griechisch: λεπτός / leptos=dünn) wurde 1994 erstmals von Zhang Y et al. in Mäusen entdeckt. Leptin besitzt eine Molekulargröße von 16 kDa und setzt sich aus 167 Aminosäuren zusammen (*Zhang et al. 1994*). Das für Leptin kodierende „obese-Gen“ befindet sich beim Menschen auf Chromosom 7, bei Mäusen liegt es auf Chromosom 6 (*Zhang et al. 1994*). Leptin wird überwiegend in den Adipozyten produziert und von diesen ins Blut sezerniert. Geringe Mengen werden jedoch auch in anderen Geweben wie Plazenta, Magenschleimhaut, Knochenmark, Skelettmuskel, Hypothalamus, Hypophyse, Mamma-Epithel und Knochen gebildet (*Masuzaki et al 1997, Bado et al. 1998, Morash et al. 1999*).

Lange Zeit kannte man Leptin hauptsächlich als ein Appetit und Nahrungsaufnahme regulierendes „Sättigungshormon“. Die Leptinausschüttung aus den Adipozyten korreliert mit den Energiereserven (z.B. *Banks WA 2004, Frühbeck et al. 1998*). Das ZNS wird über diesen Botenstoff über den Energiestatus informiert und reguliert die Nahrungsaufnahme bzw. Energieausgabe. Steigende Serum-Leptinspiegel führen zur Expression und Sekretion appetitzügelnder Neuropeptide, während die Synthese und Sekretion appetitanregender Peptide (AgRP und NPY) gehemmt wird. Über einen STAT3-vermittelten Anstieg der POMC (Proopiomelanocortin)-Produktion, der wiederum ein Signal über das Spaltprodukt α -MSH (α -Melanozyten-stimulierendes Hormon) und die Melanokortin-Rezeptoren MC3 und MC4 vermittelt, resultiert ein Rückgang des Appetits (z.B. *Elmquist et al. 1998, 1999, Elias et al. 1999, Schwartz et al. 2000*). Hunger, und der damit assoziierte niedrige Leptinspiegel, führt zu hormonellen und metabolischen Veränderungen, die uns letztendlich wieder Nahrung aufnehmen lassen (*Campfield et al. 1995, Ioffe et al. 1998*).

Die Plasma-Leptin-Spiegel korrelieren mit der Körperfettmasse und sind deshalb bei Adipositas meist erhöht (*Maffei et al. 1995*). Im Durchschnitt liegen die Leptin-Spiegel schlanker Menschen bei $6,5 \pm 0,7$ ng/ml und die adipöser Menschen bei etwa $49,7 \pm 3,4$ ng/ml (*Dellas et al. 2008*). Als Grund für das trotz hoher Plasmakonzentrationen des Sättigungsfaktors Leptin bestehende Übergewicht vermutet man eine

zentralnervöse Resistenz gegen die gewichtsreduzierenden Effekte von Leptin (Friedman und Halaas 1998, Münzberg et al. 2005). Verschiedene Ursachen für diese Resistenz werden diskutiert: Neben leptinbindenden Plasma-Proteinen wie z.B. das C-reaktive Protein (Chen et al. 2006), könnten auch (Transport-) Störungen der Blut-Hirn-Schranke (Münzberg et al. 2005) für die Leptinresistenz verantwortlich sein. Aber auch Post-Rezeptor-Ereignisse wie die Leptin-vermittelte Tyr985-Phosphorylierung und SOCS3-Generierung (SOCS3 bindet an das Tyr985 und Jak2 und schwächt so die Leptin-induzierte Signaltransduktion) führen zu einer Abnahme der Leptinsignalwirkung und begünstigen so die zelluläre Leptinresistenz (Bjørbaek et al. 2000).

1.2.2 Der Leptinrezeptor: Aufbau und Funktion

Der Leptinrezeptor ist ein Transmembranrezeptor, der aufgrund seiner strukturellen Ähnlichkeit zu Zytokinrezeptoren der sog. Klasse-1-Zytokinrezeptor-Familie angehört (Tartaglia 1997). Die Signaltransduktion dieser Rezeptoren läuft über JAKs (Janus-Kinasen) und STATs (signal transducers and activators of transcription). Durch unterschiedliches Spleißen des ObR-Gens, können letztendlich sechs verschiedene Isoformen des Leptinrezeptors (OB-Ra, OB-Rb, OB-Rc, OB-Rd, OB-Re, OB-Rf) entstehen (Lee et al. 1996, Wang et al. 1998). Allen Isoformen gemein ist dabei eine aus 800 Aminosäuren bestehende extrazelluläre Domäne und eine 34 Aminosäuren große Transmembrandomäne. Die intrazelluläre Domäne hingegen variiert, was dazu führt, dass sich die Isoformen noch einmal in drei Klassen (kurz, lang, löslich) einteilen lassen. Die lange Form (OB-Rb) gilt als die funktionelle Form. Grund hierfür ist die erweiterte intrazelluläre Domäne, die sich aus 300 zytoplasmatischen Resten zusammensetzt. Diese enthalten die für die Interaktion mit anderen Signaltransduktionsproteinen wichtigen und für die Aktivierung des Signalweges notwendigen, verschiedenen Motive (Tartaglia et al. 1995). Die Leptinbindung führt zu einer Aktivierung von Jak2-Molekülen, was zur Folge hat, dass Jak2 sich selbst und den Leptinrezeptor phosphoryliert (Tartaglia 1997, Kloek et al. 2002). Die weitere Signaltransduktion läuft über drei unterschiedliche Pfade. Ein Weg führt hierbei über phosphoryliertes Tyrosin 985 (Tyr985) und die SHP-2 (SH-containing tyrosine phosphatase) und ist hauptsächlich für die Aktivierung der ERK (extracellular signal regulated kinases; Mitglieder der MAPK) verantwortlich (Banks et al. 2000, Bjørbaek

et al. 2001). Die Phosphorylierung von Tyrosin 1138 (Tyr1138) ist Voraussetzung für die STAT3-Aktivierung nach Leptinstimulation. Nach Translokation von STAT3-Dimeren in den Zellkern wird unter anderem die Transkription von SOCS3 (suppressor of cytokine signaling 3)-Gens vermittelt (Banks et al. 2000, White et al. 1997), welcher über Rückkopplungsmechanismen als Inhibitor der Leptin-vermittelten Signaltransduktion bei chronischer Leptinstimulation fungiert (Bjørbaek et al. 2000). Bindung des SOCS3-Proteins an phosphoryliertes Tyr985, aber auch direkt an Jak2 resultiert in der Hemmung Leptinrezeptor-vermittelter Signaltransduktion (Bjørbaek et al. 2000; Dunn et al. 2005, Sasaki et al. 1999). Der dritte Signalweg läuft über das Tyr1077 (Tyrosin 1077) und die STAT5-Aktivierung. Welche Bedeutung diesem Pfad in der physiologischen Leptinantwort zukommt, bleibt jedoch bislang unklar.

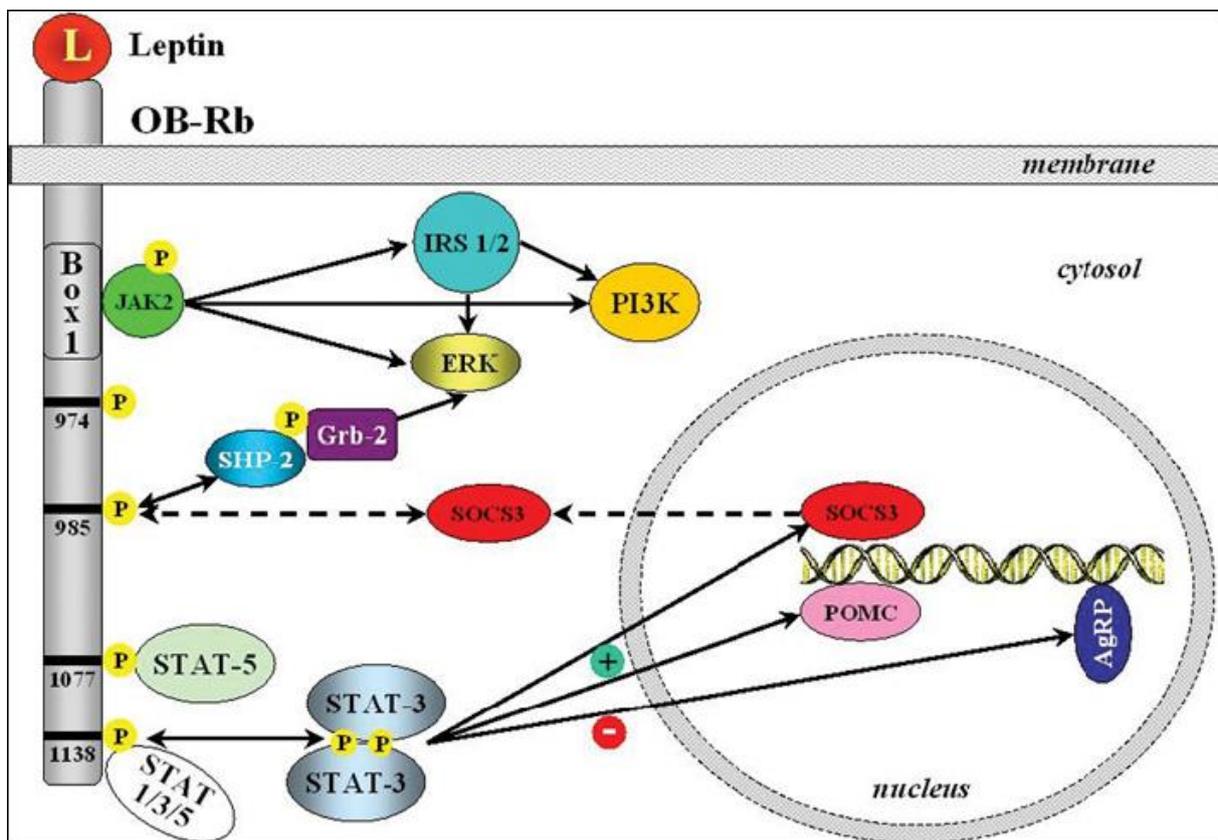


Abb.1 Rolle spezifischer Phosphotyrosine innerhalb des Leptinrezeptors bei der Leptin-vermittelten Signaltransduktion (Frühbeck 2006, S. 10)

Das Fehlen der langen Isoform des Leptinrezeptors charakterisiert die db/db-Maus (db=diabetes) und ist für ihren adipösen Phänotyp verantwortlich (*Chua Jr et al. 1996*). Leptin-Injektionen erzielten bei diesem Genotyp keinen Gewichtsverlust (*Maffei et al. 1995*). Im ob/ob-Mausmodell hingegen brachte die Injektion den erwünschten Erfolg der Gewichtsreduktion (*Halaas et al. 1995*), da die adipöse Konstitution dieser Mäuse auf einer mutationsbedingten Leptindefizienz beruht, der Rezeptor für Leptin aber vorhanden ist.

OB-Rb wird vor allem im Hypothalamus exprimiert, während die kurzen Isoformen (OB-Ra, OB-Rc) sich eher im Plexus choroideus und auf Mikrogefäßen finden. Dort wird ihnen eine mögliche Funktion bei der Leptinaufnahme bzw. -abgabe in den Liquor und dem Leptintransport über die Blut-Hirn-Schranke zugesprochen (*Bjørbaek und Kahn 2004, Hileman et al. 2002*). OB-Re (lösliche Isoform) fehlt die intrazelluläre Domäne. Die genaue Funktion ist unklar, besteht aber möglicherweise in der kompetitiven Hemmung der Bindung von Leptin an seinen Rezeptor und könnte damit ebenfalls ein Mediator der sog. Leptinresistenz sein.

1.2.3 Leptins prothrombotische Wirkung auf Plättchen

Im Jahr 1999 konnten Nakata et al. erstmals die Expression des Leptinrezeptors (lange Isoform) auf humanen Blutplättchen und eine Leptin-vermittelte Verstärkung der agonisten-induzierten Plättchenaggregation zeigen (*Nakata et al. 1999*). Diese ersten Befunde wurden kurz darauf ergänzt und es konnte gezeigt werden, dass Leptin die Plättchenaggregation in vitro und die arterielle Thrombose in vivo fördert. Außerdem wurde herausgefunden, dass die lange Isoform des Leptinrezeptors für diese Effekte notwendig ist (*Konstantinides et al. 2001a*).

Mithilfe verschiedenster Versuchsmodelle (in vivo) konnte in Mäusen die prothrombotische Wirkung von Leptin genauer untersucht werden: Im Eisen-Chlorid-Modell wurden Mäusen artifizielle Verletzungen der Arteria carotis zugefügt, somit eine arterielle Thrombose induziert und die Zeit bis zum Gefäßverschluss gemessen. Leptin-defiziente Mäuse wiesen trotz Übergewicht und assoziierter metabolischer Störungen verlängerte Thrombosezeiten und instabile Thromben im Vergleich zu WT-Tieren auf (16 vs. 8,5 min), durch Injektion rekombinanten Leptins konnte der

Phänotyp einer WT-Maus wiederhergestellt werden. Für die Bedeutung des Leptin-Rezeptors für die prothrombotische Wirkung von Leptin sprechen Befunde, dass db/db-Mäuse nicht auf Leptin reagieren (*Konstantinides et al. 2001a*).

Mit einem anderen Gefäßverletzungs-Modell (Rose-Bengal-Modell) und photochemischer Induktion einer arteriellen Thrombose ließen sich ebenfalls unterschiedlich lange Okklusionszeiten (WT: 42,2 min; ob/ob: 75,2 min, db/db: 68,6 min) nachweisen und der Beitrag von Leptin zur Förderung arterieller Thrombosen bestätigen (*Bodary et al. 2002*). Nach Knochenmarktransplantation von Leptinrezeptor-defizienten (db/db) in WT-Mäuse verlängerte sich die Okklusionszeit (von 22,3 min auf 56,8 min) der Empfänger-Mäuse. Das Zusammenspiel von Leptin und der langen Isoform des Rezeptors ist für die Leptinantwort notwendig und somit für die Thrombusgenese wichtig (*Bodary et al. 2002*).

Mit dem Kollagen-Epinephrin-Modell wurde einige Jahre später dann auch der Zusammenhang zwischen Leptin und venösen Thrombosen bzw. Lungenembolien untersucht. WT-Mäuse wurden mit unterschiedlichen Antikörpern vorbehandelt. Eine Gruppe erhielt unspezifisches IgG, die andere einen leptinneutralisierenden Antikörper. Nach Kollagen-Epinephrin-Injektion in die Jugularvene überlebten weniger als 10% aus der ersten, hingegen 60% aus der zweiten Gruppe. Daraus ließ sich schlussfolgern, dass endogenes Leptin auch eine entscheidende Rolle in der venösen Thrombusbildung spielt und das Nichtvorhandensein (ob/ob) bzw. das Neutralisieren von Leptin vor venösen Thrombosen und Lungenembolien schützt (*Konstantinides et al. 2004*). Die histochemische Untersuchung von Lungengewebe zeigte zwar fibrin- und plättchenreiche Thromben in beiden Genotypen, eine quantitative histologische Analyse Masson-Trichom gefärbter Schnitte machte jedoch deutlich, dass erheblich mehr Gefäße bei WT-Mäusen okkludiert waren (*Konstantinides et al. 2004*).

Die Erkenntnisse über die prothrombotischen Wirkungen von Leptin in Mausmodellen führten zu genaueren Untersuchungen des Leptineffekts auch auf humanen Plättchen. Aggregationsstudien ergaben neben dem schon bekannten verstärkenden Effekt von Leptin auf die agonisteninduzierte (ADP, Epinephrin, Kollagen) Thrombozytenaggregation interessanterweise unterschiedliche Ansprechraten auf

Leptin („Responder“= schwache ADP-induzierte Aggregation konvertiert durch Leptin in eine irreversible Aggregation; „Non-Responder“= keine Verstärkung der ADP-vermittelten Aggregation durch Leptin), möglicherweise aufgrund individuell unterschiedlicher Expressionsdichte des Leptinrezeptors und damit Leptinbindung an Thrombozyten (*Giandomenico et al. 2005*). Plasmafaktoren (*Giandomenico et al. 2005*) oder die Konstitution des Blutspenders (adipös vs. normalgewichtig) konnten dagegen als Ursachen ausgeschlossen werden (*Dellas et al. 2008*).

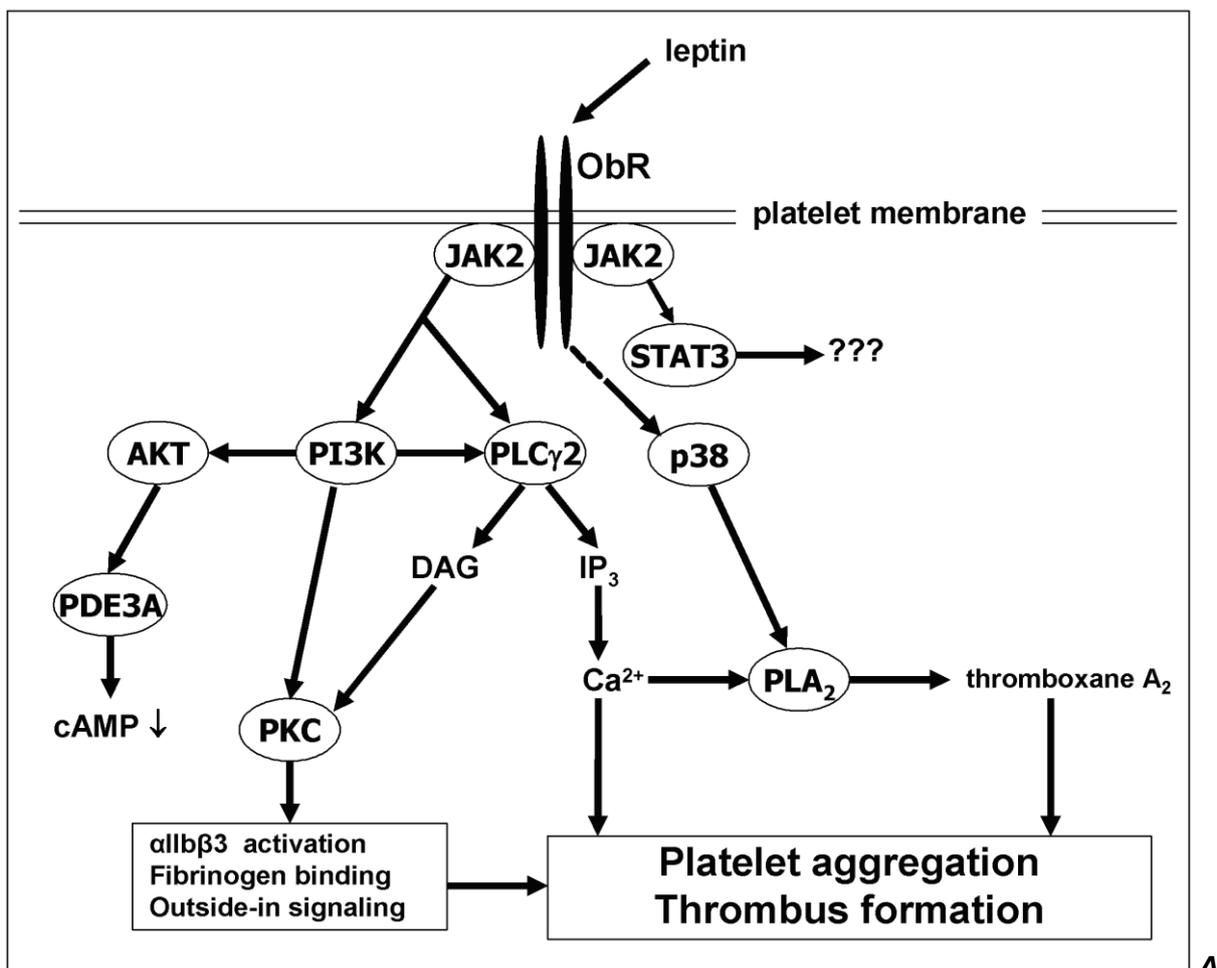
Aus den Ergebnissen der o.g. Studien wurde geschlossen, dass die Hyperleptinämie bei Übergewicht zum erhöhten Thromboserisiko übergewichtiger Personen beitragen könnte. In dieser Hinsicht konnte auch in klinischen Studien gezeigt werden, dass Leptin eine Rolle als unabhängiger Faktor (d.h. nach Berücksichtigung von Alter, Geschlecht, BMI, CRP-Spiegel) in der Entwicklung einer Koronararterienverkalkung spielt und als Risikofaktor für die Entstehung einer koronaren Herzkrankheit oder eines Herzinfarktes anzusehen ist (*Qasim et al. 2008, Wallace et al. 2001, Soderberg et al. 1999*). Darüber hinaus konnte festgestellt werden, dass die Reaktivität von Blutplättchen hyperleptinämischer Personen auf Leptin erhalten bleibt, d.h. sie weisen keine Resistenz gegen Leptin auf (*Dellas et al. 2008*). Aber es gibt auch Studien, die dem widersprechen. Im Rahmen der „Quebec Cardiovascular Study“ kamen Couillard et al. 1998 zu dem Ergebnis, dass Leptin kein Risikofaktor für kardiovaskuläre Ereignisse ist.

Hinsichtlich der Wirkungsmechanismen von Leptin nach Bindung an seinen Rezeptor auf Blutplättchen konnte bislang gefunden werden, dass die Stimulation mit Leptin (allein und zusammen mit ADP) eine Größenzunahme und dosisabhängige Verstärkung der Fibrinogenrezeptorexpression und Zunahme der Adhäsion an Fibrinogen nach sich zieht (*Dellas et al. 2007*). Diese Ergebnisse verdeutlichen den Einfluss Leptins auf die Thrombozytenadhäsion und –aktivierung, allerdings sind die genauen Wege noch unverstanden. Aus der Untersuchung der intrazellulären Signaltransduktion mithilfe von Western-Blot-Analysen resultierte nach Leptinbindung eine zeit- und dosisabhängige Phosphorylierung von Jak2 und STAT3. Die Aktivierung von Jak2 führt wiederum zu einer Phosphorylierung der PLC γ 2 (Phospholipase C γ 2) und der PI3K (Phosphatidylinositol 3-Kinase) und nachfolgend der PKC (Proteinkinase C). Die Aktivierung des Fibrinogenrezeptors konnte mit

Hemmstoffen gegen die oben genannten Signaltransduktionsmoleküle gehemmt werden.

Ein anderer Schenkel der Signaltransduktion führt über den p38-MAP-Kinase-PLA₂ (Phospholipase A₂) Signalweg zu einer vermehrten Thromboxan-A₂-Bildung. Diese verstärkte Bildung des prothrombotischen Proteins konnte auch durchflusszytometrisch mit Messungen in leptinstimuliertem PRP (im Vergleich zu unstimuliertem PRP) bestätigt werden (Dellas et al. 2007). Beiden Signalwegen gemein ist die resultierende verstärkte Plättchenaggregation.

Bislang ungeklärt bleibt die Bedeutung der Leptin-induzierten STAT3-Aktivierung in Blutplättchen.



bb. 2 Leptin-induzierte Signaltransduktion in Thrombozyten (aus eigener Arbeitsgruppe).

1.3 Die ObRs/s-Maus und ihre Eigenschaften

Die ObRs/s-Maus (leprS1138) wurde von Prof. Martin Myers generiert und hinsichtlich ihres metabolischen Phänotyps näher beschrieben (Bates et al. 2003). Das den Leptinrezeptor kodierende Gen wurde durch ein Allel ersetzt, in welchem der Tyrosinrest an Stelle 1138 des Leptinrezeptors durch Serin ersetzt worden war. Aufgrund dieser Mutation ist die Leptin-induzierte Aktivierung von STAT3 über die lange Isoform des Leptinrezeptors (OB-Rb) nicht mehr möglich. Somit eignen sich diese Mäuse zur Untersuchung der Funktion bzw. Notwendigkeit des Transkriptionsfaktors STAT3 für die Vermittlung der Wirkung von Leptin über seinen Rezeptor. Die bisherigen Untersuchungen dieser Mäuse führten zu folgenden Ergebnissen. Ebenso wie db/db-Mäuse sind sie hyperphagisch, haben einen geringeren Energieumsatz und eine Schilddrüsenunterfunktion. Das Resultat ist eine ausgeprägte Adipositas und ein stark erhöhter Serum-Leptinspiegel (WT= 3,4 ng/ml, s/s= 56,8 ng/ml). Im Vergleich zu db/db-Mäusen sind sie länger (db/db= 85 mm, s/s= 95 mm) und weniger hyperglykämisch (Glukose: db/db= 29,7 mM, s/s=14 mM, WT= 8,5 mM). Weibliche ObRs/s-Mäuse sind im Ggs. zu db/db-Mäusen zwar fertil, produzieren jedoch keine Milch und die Neugeborenen eines homozygoten Paares versterben innerhalb von 24 Stunden an Mangelernährung (Bates et al. 2003). Überlebende Nachkommen können demnach nur durch die Verpaarung zweier heterozygoter (s/+) Mäuse gezeugt werden.

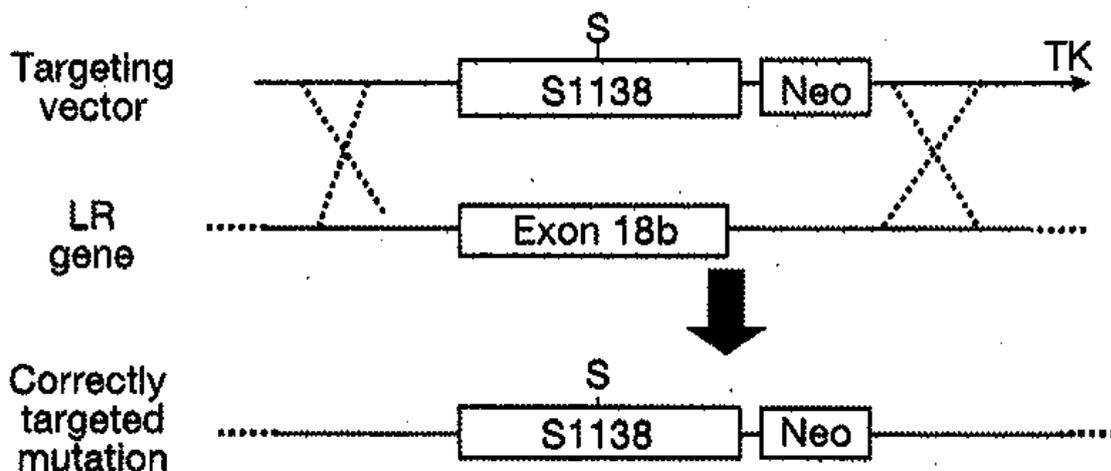


Abb. 3 Schematische Darstellung der Generierung der ObRs/s-Maus (Bates et al. 2003). Die Entwicklung eines Vektors diente dem Austausch des Tyrosinrestes durch einen Serinrest im Exon 18b des Zielgens. Des Weiteren wurde eine Neomycin-Kassette dem Exon 18b nachgeschaltet.

1.4 Ziel der Arbeit

Klinische und experimentelle Studien konnten zeigen, dass das im Fettgewebe produzierte Adipokin Leptin über seinen Rezeptor auf Thrombozyten die Plättchenaggregation verstärkt und die arterielle und venöse Thrombose fördert. Adipositas geht mit einer vermehrten Expression von Leptin im Fettgewebe und erhöhten Leptinspiegeln in der Zirkulation einher (*Maffei et al. 1995*) und man vermutet, dass die Hyperleptinämie eine Ursache des erhöhten kardiovaskulären Risikos bei Übergewicht darstellen könnte.

Vorarbeiten in Blutplättchen zeigen, dass die Bindung von Leptin an seinen Rezeptor die Signaltransduktionsmoleküle Jak2 und STAT3 aktiviert. Während die Funktion von Jak2 für die Aktivierung nachfolgender Signalwege nachgewiesen werden konnte, ist die Auswirkung der STAT3-Aktivierung bislang unklar.

Ziel der vorliegenden Arbeit war zu untersuchen, welche Bedeutung die STAT3-vermittelte Signaltransduktion für die Effekte von Leptin auf Thrombozyten und die Förderung der Plättchenadhäsion und -aktivierung hat. Um diese Fragestellung zu beantworten, wurden Mäuse verwendet, bei denen das Tyrosin 1138 im Leptinrezeptor durch ein Serin ersetzt worden war und somit eine Leptin-induzierte Bindung von STAT3 an den Leptinrezeptor und nachfolgende Aktivierung unmöglich wurde (*Bates et al. 2003*).

Nach Ausschluss grundlegender Störungen der Hämatopoese durch Anfertigung von Blutbildern wurden zunächst basale Thrombozytenfunktionstests durchgeführt. Mit dem hierfür angewendeten sog. „Tail Bleeding Assay“ sollten Unterschiede zwischen den Genotypen (WT- vs. ObRs/s-Maus) festgestellt bzw. ausgeschlossen werden. Mittels geeigneter Adhäsionsversuche und durchflusszytometrischer Analysen wurden Unterschiede zwischen beiden Genotypen hinsichtlich des Effekts von Leptin auf die Adhäsion von Thrombozyten an Fibrinogen, die Bindung von Fibrinogen sowie die Expression des (aktivierten) Fibrinogenrezeptors untersucht. Die über den Leptinrezeptor ablaufende Signaltransduktion wurde nach Stimulation aus dem

Vollblut von Mäusen isolierter Thrombozyten mit Leptin mithilfe von Western-Blot-Analysen untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Geräte und Materialien

2.1.1 Chemikalien

Sigma-Aldrich; München, Deutschland:

- Albumin aus Rinderserum (BSA)
- Aprotinin
- Apyrase (Grad VII, lyophilisiertes Puder)
- Ethylendiamintetraacetat (EDTA)
- Kalziumchlorid
- Leupeptin
- β -Mercaptoethanol
- Natriumchlorid (NaCl)
- Natriumdodecylsulfat (SDS)
- Natriumfluorid (NaF)
- Natriumorthovanadat (Na_3VO_4)
- Natriumzitat
- 2-Propanol
- Pepstatin A
- Phenylmethansulfonyl-Fluorid (PMSF)
- Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)
- Ponceau S
- Prostaglandin E (PGE)
- Triton® X-100 (Polyethylenglykol tert-octylphenyl Ether)
- Trizma® Base ($\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$)
- Trizma® Hydrochlorid ($\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3 - \text{ClH}$)
- Tween 20
- Zitronensäure

Merck; Darmstadt, Deutschland:

- D-Glukose (Dextrose)
- Ethanol
- Kaliumchlorid (KCl)
- Methanol
- Natriumdihydrogenphosphat (NaH_2PO_4)
- Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)
- Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3)
- Natriumcarbonat (Na_2CO_3)
- Natronlauge (NaOH)
- Magnesiumchlorid-Hexahydrat ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)

Roth; Karlsruhe, Deutschland:

- Glyzin
- Rotiphorese®Gel 40 37,5:1 (gasstabilisierte, wässrige 40% Acrylamid-, Bisacrylamid-Stamm-lösung im Verhältnis 37,5:1)
- TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin)

Sonstige:

- HEPES (Appli Chem; Darmstadt, Deutschland)
- Isofluran, 1-Chloro-2,2,2-Trifluoroethyl-Difluoromethylether (Abbott; Wiesbaden, Deutschland)
- Natriumchlorid (NaCl) 0,9% (Braun; Melsungen, Deutschland)
- Natriumphosphat, Monobasic, Monohydrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) (Calbiochem® über Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (PBS), kalzium- und magnesiumfrei (Invitrogen; Karlsruhe, Deutschland)

2.1.2 Geräte

Coulter®	Ac.T 5diff-Serie, Beckman Coulter; Krefeld, Deutschland
Durchflusszytometer	FACScan, FACSCalibur, Becton Dickinson; Heidelberg, Deutschland
Entwicklungsmaschine	SRX-101A, Konica Minolta; München, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop	Axiovert 200, Zeiss; Göttingen, Deutschland
Lichtmikroskop	Zeiss; Göttingen, Deutschland
Photometer	Bio-Tek; Bad Friedrichshall, Deutschland
Schüttler	SSL4, stuart® über Roth; Karlsruhe, Deutschland
Thermomixer	Eppendorf; Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Wärmeschrank	Memmert; Büchenbach, Deutschland
Zentrifugen	ROTANTA/S, Hettich-Zentrifugen; Tuttlingen, Deutschland Zentrifuge 5415D, Eppendorf; Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Vortex Genie® 2	Scientific Industries über Roth; Karlsruhe, Deutschland
Waagen	Sartorius; Göttingen, Deutschland Scout®, Ohaus; Gießen, Deutschland

2.1.3 Versuchstiere

Die für die Versuche notwendigen Wildtyp-Mäuse (C57Bl/6) stammten aus der Zucht der Zentralen Tierexperimentellen Einrichtungen (ZTE). Die ObRs/s-Mäuse (IeprS1138) wurden uns von Prof. Martin Myers Jr. (University of Ann Arbor, Michigan, USA) zur Verfügung gestellt (*Bates et al. 2003*) und dann ebenfalls in der ZTE weitergezüchtet, durch Verpaarung heterozygoter Nachkommen.

2.2 Methoden

2.2.1 Charakterisierung der Versuchstiere

2.2.1.1 Gewicht

Um den Verlauf der Gewichtszunahme und Unterschiede zwischen den Genotypen beurteilen zu können, wurden die Wildtyp- und die ObRs/s-Mäuse zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Geburt (2. Monat bis 12. Monat) gewogen.

2.2.1.2 Erstellung eines Blutbildes

Zum Ausschluss grundlegender Unterschiede in der Hämatopoese und der zellulären Zusammensetzung des Blutes wurden Blutbilder beider Maustypen angefertigt. Dazu wurde den Mäusen mithilfe heparinbeschichteter Kapillarröhrchen eine geringe Menge Blut (etwa 20 μ l) aus einem Venenplexus hinter dem Auge entnommen und dieses in einem Eppendorf-Cup (1,5 ml Fassungsvermögen) im Verhältnis 1:3 mit 0,9%iger Kochsalzlösung verdünnt. Ein Gesamtvolumen von etwa 45 μ l sollte vorhanden sein, damit das Gerät ein valides Ergebnis erzielen kann.

Auswertung

Das von der Maschine errechnete Ergebnis wurde infolge der anfangs vorgenommenen Blutverdünnung mit drei multipliziert. So erhielt man je nach Parameter (Leukozyten [$10^3/\mu$ l], Erythrozyten [$10^6/\mu$ l], Hämoglobin [g/dl], Hämatokrit [%]) das endgültige Ergebnis. Die maschinell errechnete Thrombozytenzahl war systembedingt, durch zu geringe Thrombozytengröße bei Mäusen, nicht verwertbar. Die Thrombozyten mussten daher manuell ausgezählt werden.

2.2.1.3 Thrombozytenzählung

Mittels einer Zählkammer nach Neubauer und einer sog. Zählflüssigkeit (*Thrombo Plus®*, Sarstedt; Neuss, Deutschland) wurden die Mausthrombozyten beider Genotypen manuell unter dem Lichtmikroskop bei 40facher Vergrößerung gezählt. Die Blutentnahme, 20 μ l wurden benötigt, erfolgte wieder mit einem heparinbeschichteten Kapillarröhrchen aus dem Venenplexus hinter dem Auge. Anschließend erfolgte das Durchmischen des Blutes und der Zählflüssigkeit im

Verhältnis 1:100 und Ruhen für fünf Minuten bei RT. Danach wurde erneut gut durchmischt und die Zählkammer befüllt. Es folgte eine fünf- bis zehnminütige Inkubation in einer feuchten Kammer. Dabei sedimentierten die Thrombozyten.

Auswertung

Die in den 5 Quadraten gezählten Thrombozyten wurden mit 5000 multipliziert. So erhielt man die Thrombozytenzahl pro μl . Diese wurde mit den Referenzwerten für Mäuse ($300-1000 \times 10^3 / \mu\text{l}$ Blut) verglichen.

2.2.2 Isolation von Blutplättchen

Basismaterial zahlreicher Versuche waren isolierte Thrombozyten. Zum Vergleich erfolgte die Isolation humaner (Blutentnahme von freiwilligen, gesunden Probanden) und muriner Blutplättchen.

2.2.2.1 Plättchenisolation aus Mausblut

Die Maus wurde mittels Isofluran anästhesiert und auf dem Rücken liegend fixiert. Anschließend erfolgte das Aufziehen von Acid-Citrate-Dextrose (ACD) (finale Verdünnung 1:5) in eine 1-ml-Spritze, um eine Koagulation des Blutes zu verhindern.

Acid-Citrate-Dextrose (ACD):

65 mM Zitronensäure

85 mM Natriumzitat

2% Dextrose

Auffüllen mit A. dest.

Danach wurde das Herz der Maus mit einer 25-G-Nadel punktiert und 1 ml Blut langsam, unter möglichst wenig Zug, entnommen, und in ein U-förmiges Plastikröhrchen, in dem sich 1 ml Tyrode-Puffer pH 6,5 befand, geträufelt. Vermengen durch Überkopf-Mischung. Die Aktivierung der Blutplättchen wurde durch vorsichtige Handhabung zu jedem Zeitpunkt versucht zu vermeiden.

Tyrode-Puffer:

1,37 M NaCl

26,8 mM KCl

9 mM NaH₂PO₄

50 mM Hepes

27,8 mM Dextrose

Auffüllen mit A. dest.

Anschließend erfolgte die Herstellung von plättchenreichem Plasma (PRP). Hierzu wurden die jeweiligen Röhrchen in eine Zentrifuge gestellt und bei Raumtemperatur für etwa 10 min bei 900 rpm zentrifugiert. Abpipettieren des gewonnenen PRP mittels Transferpipette in ein neues Röhrchen. Der blutzellreiche Rest wurde erneut für 10 min bei 900 rpm zentrifugiert und das PRP anschließend mit dem aus der ersten Zentrifugation gewonnenen gepoolt. Hinzugabe von 1 µM Prostaglandin E1 (PGE1 stock: 1 mM) und 1 U Apyrase (Apyrase stock: 1 U/ µl) pro ml PRP in jedes Röhrchen, um eine vorzeitige Aggregation der Plättchen zu verhindern. Nach fünfminütiger Inkubation bei RT erfolgte eine erneute Zentrifugation. Sie diente der Waschung der Plättchen und lief für 10 min bei 2500 rpm. Das entstandene Pellet wurde anschließend nach Verwerfen des Überstandes in 1 ml modifizierten Tyrode-Puffer pH 6,5 (+ 1 µM PGE1 und 1 U Apyrase/ml) resuspendiert. Es folgten zwei Minuten Inkubation und eine letzte Zentrifugation bei 2500 rpm für fünf Minuten. Der Überstand wurde wieder verworfen und das Pellet je nach Größe in 50-200 µl Tyrode-Puffer pH 7,4 resuspendiert (1 mM CaCl₂ enthaltend). Abschließend erfolgte je nach Protokoll eine Leptinstimulation (*rekombinantes Maus-Leptin 498-OB, R&D Systems; Wiesbaden, Deutschland*).

2.2.2.2 Plättchenisolation aus humanem Blut

Die Plättchenisolation aus Humanblut erfolgte mit einigen Abweichungen. Deshalb hier noch einmal eine kurze Darstellung zum Vergleich. Das Blut (ca. 10 ml) wurde unter möglichst wenig Stauung im Verhältnis 1:10 in 3,8%igem Natrium-Zitrat abgenommen, in ein U-förmiges Plastikröhrchen geträufelt und für 20 min bei 900 rpm zentrifugiert. Danach erfolgte das Überführen des gewonnenen PRPs in ein neues Röhrchen. Nachfolgend wurden 2 µM PGE1 hinzugegeben und erneut für 20

min bei jetzt 1700 rpm zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes erfolgte die Resuspension des Pellets in 2 ml Tyrode-Hepes-Puffer + 2 μ M PGE1. Wiederholung dieses Schrittes nach einer weiteren Zentrifugationsrunde bei 1700 rpm (18 min). Es folgte ein letztmaliges Abgießen des Überstandes und die Resuspension des Pellets in 207 μ l Tyrode-Hepes-Puffer. Anschließende Stimulation der Blutplättchen

2.2.3 Proteinlysate

2.2.3.1 Herstellung von Proteinlysaten

Die resuspendierten Pellets aus Abschnitt 2.2.2.1 und 2.2.2.2 wurden im Verhältnis 1:1 mit Lyse-Puffer und Zusatz von Proteaseinhibitoren lysiert und homogenisiert. Für Mausplättchen erwies sich ein zwei-fach konzentrierter Lyse-Puffer als besser geeignet.

Lyse-Puffer:

Triton-X-Puffer (nativ):

1% Triton-X

150 mM NaCl

50 mM Trizma® Hydrochlorid

5 mM EDTA pH 7,5

Proteaseinhibitoren:

1 mM PMSF

4 mM Aprotinin

4 mM Leupeptin

0,7 mM Pepstatin A

Phosphataseinhibitoren:

20 mM NaF

1 mM Na₃VO₄

Um eine maximale Ausbeute an Protein zu erhalten, wurden die Proteinlysate für eine Stunde auf Eis gestellt und anschließend bei -20°C über Nacht eingefroren.

2.2.3.2 Bicinchoninic Acid (BCA) Assay

Zur Bestimmung des Proteingehaltes wurden die Proben (Proteinlysate) aufgetaut und anschließend 1:10 in A. dest. verdünnt. Nach Herstelleranleitung erfolgte das Mischen von Reagenz A und Reagenz B (*beides BCA™ Protein Assay Reagent, Thermo Fisher Scientific; Schwerte, Deutschland*) im Verhältnis 1:50. Danach wurden

jeweils 200 µl pro Well einer 96-Well-Platte vorgelegt, 25 µl der Standard-Albumin-Verdünnungsreihe (aus *Albumin Standard, Fisher Thermo Scientific; Schwerte, Deutschland*) (2000-3,9 µg/ml) und 25 µl der Proben dazupipettiert und vermischt. Inkubation der Gemische für 30 min bei 37°C. Im Anschluss wurde der Proteingehalt bei 562 nm am Photometer gemessen und in µg/µl notiert.

2.2.4 Western-Blot-Analyse

2.2.4.1 SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese

Durch SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese wurden Proteine der Größe nach in einem elektrischen Feld aufgetrennt. Hierfür benötigte man zwei saubere Glasplatten, die nach Herstelleranleitung zusammengelegt und in einen dafür vorgesehenen Halter geklemmt wurden (*alles Bio-Rad; München, Deutschland*). Anschließend erfolgte das Zusammengeben der Trenngel-Substanzen. Diese wurden danach zwischen die Glasplatten pipettiert. Das Gel sollte die vordere kleinere Glasplatte zu 75% bedecken. Um Blasenfreiheit und eine gerade Gelkante zu erhalten, gab man etwas Isopropanol über das gegossene Gel. Nach Festigung des Gels wurde das Isopropanol abgeschüttet, die Gelkante mit destilliertem Wasser gereinigt und das frisch angesetzte Sammelgel aufgetragen.

Trenngel 8%ig

A.dest. steril 4,7 ml

Rotiphorese® 2,7 ml

1,5 M Tris-HCl pH 8,8 (2,5 ml)

10% w/v SDS (100µl)

10% APS (50µl)

TEMED (5µl)

Sammelgel 4%ig

A. dest. steril 6,1ml

Rotiphorese® 1,3 ml

1,5 M Tris-HCl pH 6,8 (2,5 ml)

10% w/v SDS (100 µl)

10% APS (50 µl)

TEMED (10 µl)

Dieses sollte den Zwischenraum bis zur Glasplattenkante auffüllen. Anschließend wurde der Kamm blasenfrei in das Sammelgel gesteckt und während der Zeit des Trocknens zu den Proben gleichen Proteingehalts PBS und Lämmli-Puffer hinzupipettiert. Dies diente zum Erhalt eines einheitlichen Endvolumens.

2X Lämmli-Puffer (sog. Blau-Puffer):

0,125 M Trizma® Base

4% Natrium-Dodecyl-Sulfat (SDS)

20% Glyzerol

0,01% Bromphenolblau

10% β -Mercaptoethanol

Auffüllen mit A. dest.

Danach wurden die Proben zur Denaturierung für fünf Minuten bei 100°C erhitzt. Vor dem Auftragen der Proben stellte man diese für eine Minute auf Eis und zentrifugierte noch einmal kurz. Es folgte die vorsichtige Entfernung des Kammes und das Ausspülen der Geltaschen mit A. dest., um alle Gelreste zu entfernen. Die Glasplatten mitsamt dem Gel wurden nun nach Herstelleranleitung in die vorgesehene Vorrichtung gesteckt und diese in eine Box gehängt. Nach Auffüllen des Puffertanks mit Laufpuffer erfolgte das Auftragen der Proben und des Markers (*Precision Plus Protein™, Dual Color Standards*) in die Geltaschen. Dies geschah mithilfe spezieller Pipettenspitzen (*alles Bio-Rad; München, Deutschland*).

5X Laufpuffer:

123 mM Trizma® Base

959 mM Glyzin

1 mM Natrium-Dodecyl-Sulfat (SDS)

Auffüllen mit A. dest.

Die Box wurde mit einem Deckel verschlossen, dessen Kabel mit dem Netzgerät verbunden waren. Die Elektrophorese begann bei einer Spannung von 140 Volt. Sobald alle Proben die Taschen verlassen und das Trenngel erreicht hatten, wurde auf 200 V gesteigert. Die Auftrennung der Proteine erfolgte so lange, bis die erwünschte Höhe (kDa) erreicht war. Nach Abschalten des Netzgerätes und Entfernung des Deckels wurden nun die Glasplatten aus der Vorrichtung genommen und vorsichtig voneinander getrennt.

2.2.4.2 Western Blot

Für den Blot musste das Trenngel vorsichtig mit einem Skalpell ausgeschnitten und in ein Schälchen mit 1X Transferpuffer gelegt werden. Ebenso wurden zwei Schwämme, Filterpapier und eine Nitrozellulose-Membran (*Protran®*, *Whatman*; *Dassel, Deutschland*) passender Größe in Transferpuffer getränkt. Der Halter für den Blot wurde anschließend in folgender Reihenfolge beladen: Schwamm, Filterpapier, Gel, Nitrozellulose-Membran, Filterpapier Schwamm. Es war darauf zu achten, dass zwischen dem Gel und der Membran keine Blasen entstanden. Nach Zuklappen des Halters wurde das „Sandwich“ zwischen die beiden Elektroden in die Blotbox gesteckt, über den Deckel eine Verbindung zum Netzgerät hergestellt und eine Spannung von 100 V angelegt. Nach einer Stunde wurde der Blot beendet und das „Sandwich“ vorsichtig auseinandergebaut.

Transferpuffer 10X

250 mM Trizma® Base
1,92 M Glycin
A. dest.

Transferpuffer 1X

100 ml 10x Transferpuffer
200 ml Methanol
700 ml A. dest.

2.2.4.3 Färbung der Nitrozellulose-Membran mit Ponceau S

Um festzustellen, ob der Transfer der Proteine aus dem Gel in die Membran erfolgreich war, wurde die Membran in Ponceau S gelegt. Sind Proteinbanden zu sehen und zudem noch gleichmäßig intensiv, scheint der Blot gelungen. Durch zweimaliges Waschen in TBS-T konnte die rote Färbung wieder entfernt werden.

TBS 10X:

1 M Trizma® Hydrochloride
1,54 M NaCl
Auffüllen mit A. dest.

TBS-T:

10X TBS im Verhältnis 1:10 mit A. dest. verdünnen
Tween 20 (im Verhältnis 1:1000 hinzugeben)
pH-Einstellung auf 7,5

2.2.4.4 Blocken und Bindung der Antikörper

Die gewaschene Membran wurde nun mit 1% BSA (in TBS-T) für mindestens zwei Stunden geblockt. Nach Abgießen des BSA wurde ein in angemessener Konzentration verdünnter Antikörper auf die Membran gegeben. Die Verdünnung wurde in vorangehenden Experimenten optimiert. Der Antikörper blieb, bis auf wenige Ausnahmen, bei 4°C über Nacht unter ständiger Bewegung (Schüttlereinstellung: 22 osc/min) auf der Membran. Nach der Inkubation wurde die Membran drei Mal mit 1% BSA (in TBS-T) gewaschen und nachfolgend der zweite Antikörper (zur Erkennung des 1. Antikörpers) in entsprechender Verdünnung (siehe unten) hinzugegeben. Es folgte eine zweistündige Inkubation bei RT und ein anschließendes dreimaliges Waschen der Membran mit TBS-T. Als nächster Schritt folgte die Entwicklung.

2.2.4.5 ECL-Entwicklung

Mit Hilfe eines Entwicklungskits (*SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate, Fisher Thermo Scientific; Schwerte, Deutschland*) wurde die antikörpermarkierte Membran in einer Dunkelkammer entwickelt. Hierzu wurden die in dem Kit enthaltenen Reagenzien im Verhältnis 1:1 kurz vor ihrer Verwendung gemischt und als Endkonzentration von 4 ml gleichmäßig auf die Membran gegeben. Nach Inkubation über fünf Minuten wurde die Membran in eine Klarsichtfolie gelegt und die restliche Flüssigkeit mittels eines saugfähigen Tuches herausgedrückt. In der Dunkelkammer wurden die Membran und ein Röntgenfilm (*SuperRX Fuji Films; Fuji Medical; Düsseldorf, Deutschland*) in eine Fotokassette gelegt und diese lichtundurchlässig verschlossen. Nach 1 Minute bzw. längerer Exponierung legte man den Film in eine Entwicklungsmaschine und wartete das Ergebnis ab. Die verschiedenen Exponierungszeiten halfen dabei die richtige Bandenstärke zu erhalten bzw. nicht zu verpassen.

Verwendete Antikörper:

- anti-Maus Phospho-Jak2* (*Tyr1007/1008, #3771*)
- anti-Maus Jak2* (*D2E12, #3230*)
- anti-Maus phospho-STAT3* (*Ser727, #9134*)
- anti-Maus STAT3* (*#9132*)

- anti-Maus GAPDH (*BT46-9995-55*); Biotrend; Köln, Deutschland
- anti-Maus SOCS-3 (*H-103; #G1505*); Santa Cruz Biotechnology; Heidelberg, Deutschland
- ECL™ Anti-Kaninchen IgG (#384927), GE Healthcare; München, Deutschland
- ECL™ Anti-Maus IgG (#371772), GE Healthcare; München, Deutschland

*alle Cell Signaling Technology® über New England Biolabs GmbH; Frankfurt a.M., Deutschland

Alle Antikörper bis auf GAPDH wurden im Verhältnis 1:1000 in 1% BSA verdünnt. GAPDH wurde 1:20 000 in 1% BSA verdünnt.

ECL™ Anti-Kaninchen IgG wurde im Verhältnis 1:3000, ECL™ Anti-Maus IgG im Verhältnis 1:20 000 in 1% BSA verdünnt.

Auswertung

Der entwickelte Film wurde zunächst deckungsgleich auf die Membran gelegt. Anhand des Markers war die Höhe der Bande zu ersehen und somit vergleichbar mit der vom Hersteller und in der Fachliteratur angegebenen Größe (kDa) des Antikörpers. Stimmt diese überein, ist das Vorhandensein des nachzuweisenden phosphorylierten Proteins wahrscheinlich. Der Abgleich erfolgte jeweils mit den unphosphorylierten Proteinen und GAPDH (als Kontrolle für eine gleiche Proteinbeladung). Durch eine densitometrische Ausmessung der Banden konnte nun der Phosphorylierungsgrad bestimmt werden. Der für das Programm GraphPad Prism 4.01 ermittelte Wert kam folgendermaßen zustande. Jedes Signal wurde zunächst gegen GAPDH abgeglichen, bevor die Ratio aus dem phosphorylierten und unphosphorylierten Protein gebildet und in Prozent der Kontrolle angegeben wurde.

2.2.5 Plättchenadhäsions-Assay

2.2.5.1 Beschichtung der Deckgläschen

Vor dem eigentlichen Adhäsions-Versuch wurden zunächst die Deckgläschen (*Menzel-Gläser, Thermo Scientific; Braunschweig, Deutschland*) beschichtet. Hierzu

wählte man Fibrinogen (*Tebu-Bio; Offenbach, Deutschland*) und als Negativkontrolle BSA. Die Deckgläschen (18 mm im Durchmesser) wurden in eine 12-Well-Platte (*Cellstar®, Greiner Bio-One; Frickenhausen, Deutschland*) gelegt, einige mit 100 µg/ml Fibrinogen beschichtet (Stock 15,66 mg/ml) und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Fibrinogen vorsichtig mit einer Plastik-Transferpipette abgesaugt und die Deckgläschen zwei Mal mit PBS gewaschen. Danach wurden alle Deckgläschen mit 1 ml 1% BSA (in PBS verdünnt) beschichtet und erneut für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Im Anschluss erfolgte wieder eine zweimalige Waschung mit PBS. Wenn das PRP bis zu diesem Zeitpunkt schon hergestellt war, konnte der Versuch sofort weitergehen. Ansonsten kam die 12-Well-Platte zur Überbrückung in den Kühlschrank.

2.2.5.2 Zugabe muriner Blutplättchen

Zunächst mussten die Maustrombozyten isoliert werden. Die Blutentnahme und die Herstellung des PRPs erfolgten wie in 2.2.2.1 beschrieben. Es bot sich an, dies während der Inkubationszeit der Deckgläschenbeschichtung durchzuführen. Auf den Waschschrift wurde bei diesem Versuch jedoch verzichtet. Nach fünfminütiger Inkubation mit 1 µM PGE1 und 1 U Apyrase/ml PRP wurde nur einmal bei 2500 rpm für 10-15 min zentrifugiert. Nach Dekantieren des Überstandes erfolgte die Resuspension des Pellets in 110 µl kalziumfreien Walsh-Puffer (pH 7,4).

Walsh stock 20X:

2,7 M NaCl

53,8 mM KCl

19,7 mM MgCl \cdot 6H $_2$ O

65,2 mM NaH $_2$ PO $_4$ \cdot H $_2$ O

0,4 M Hepes

Auffüllen mit A. dest.

Walsh Puffer:

5 ml 20x Walsh Puffer

1 ml 10% Dextrose

1750 µl 20% BSA

92,25ml A. dest.

pH soll zwischen 7,37 und 7,4

Nun wurde die Plättchenzahl pro ml bestimmt. Dazu verdünnte man das PRP 1:20 in A. dest. und bestimmte in einer 96-Well-Platte photometrisch die optische Dichte (OD) bei 800 nm. Zum Erhalt einer genaueren Zellzahl wurden Doppelbestimmungen

durchgeführt und der Mittelwert der OD800 in folgende Formel (*Walkowiak et al. 1997*) eingesetzt. Daraus ließ sich die Plättchenzahl pro ml errechnen.

Formel: $N [10^8/\text{ml}] = [6,23 / (2,016 - \text{OD}800) - 3,09] \times \text{Verdünnungsfaktor}$

Die Zellzahl wurde nun auf 4×10^6 Thrombozyten/ml durch Verdünnung des PRPs in Walsh-Puffer pH 7,4 eingestellt und eine Stimulation mit Leptin (*rekombinantes Maus-Leptin 498-OB, R&D Systems; Wiesbaden, Deutschland*) für 10 min in den Konzentrationen 1, 10 bzw. 100 ng/ml durchgeführt. Anschließend erfolgte das Abstoppen der Reaktion mit 300 µl Tyrode-Puffer pH 7,4. Das gesamte Volumen (PRP und Puffer) einer Probe wurde nun jeweils auf ein Deckgläschen gegeben, so dass sich letztendlich die gleichen Proben zum einen auf Fibrin- und zum anderen auf BSA-beschichteten Deckgläschen befanden. Als nächstes folgte eine einstündige Inkubation bei 37°C. Im Anschluss wurden die Wells einmal vorsichtig mit PBS gewaschen und die adhätierenden Thrombozyten für 20 min mit 2%igem Paraformaldehyd (250 µl) fixiert. Danach wurde erneut einmal mit PBS gewaschen und anschließend 200 µl eines Phalloidin-enthaltenden Permeabilisierungspuffer auf die Deckgläschen gegeben. Das Phalloidin diente der Anfärbung des Zytoskeletts (F-Aktin) und damit der Visualisierung der kernlosen Blutplättchen.

Permeabilisierungspuffer:

940 µl Tyrode-Puffer pH 7,4

37,5 µl BSA 20%

20 µl 5% Triton-X

ca. 6 µl Phalloidin (*Fluka® über Sigma-Aldrich; München, Deutschland*)

Nach 20-minütiger Inkubation im Dunkeln folgte ein letzter Waschschrift mit PBS. Danach wurde ein Tropfen Mounting Medium (*Vectashield®; Vector Laboratories über Linaris; Wertheim, Deutschland*) je Deckgläschen auf einen Objektträger aufgebracht, bevor die Deckgläschen vorsichtig mit einer Pinzette aus den Wells entfernt und mit der Oberfläche nach unten auf diese gelegt wurden. Dieser Schritt diente der Vorbereitung der Fluoreszenzmikroskopie. Im Anschluss konnten die adhätierenden Plättchen auf den verschiedenen Beschichtungen bei

unterschiedlichen Vergrößerungen (200x, 400x, 600x) angesehen und zur Auswertung fotografiert werden.

Auswertung

Mit dem Programm Image Pro Plus ließen sich die Anzahl adhärrierender Plättchen und deren Fläche erfassen. Die Auszählung erfolgte nach Erkennen der Objekte (Thrombozyten) automatisch. Für die Flächenbestimmung wurden die Thrombozyten automatisch umrandet und die Fläche innerhalb dieser Umrandung ausgemessen. Die Werte pro Foto wurden gemittelt. Pro Deckgläschen wurden fünf Fotos mit dem Fluoreszenzmikroskop in 200facher Vergrößerung gemacht und der Mittelwert errechnet.

2.2.6 Thrombozyten-Funktionstest

2.2.6.1 Blutungszeit (sog. „Tail Bleeding Assay“)

Vor dem eigentlichen Experiment mussten folgende Vorbereitungen getroffen werden: Pro Maus wurden ein 15 ml Falcon Tube mit 10 ml und ein 50 ml Falcon Tube mit 35 ml 0,9%iger Kochsalzlösung befüllt und auf eine Temperatur von 37°C erwärmt. Die Maus wurde mit Isofluran anästhesiert und auf einer wärmenden Unterlage fixiert. Von dem herabhängenden Schwanz wurden etwa 2 mm mit einer scharfen Schere abgeschnitten und das Ende für 30 sek in das 15 ml Tube gehalten (1. Messwert). Sofort danach tauchte man den Schwanz in das 50 ml Tube und stoppte die Zeit bis zum Sistieren der Blutung (2. Messwert). Trat das Sistieren nach 15 min nicht ein, wurde der Versuch an dieser Stelle unterbrochen.

Um Unterschiede in der Menge des Blutverlustes erfassen zu können, ging man wie folgt vor: Zunächst wurde eine Verdünnungsreihe (1,25; 2,5; 5; 10; 20; 40; 80; 160 µl Vollblut pro 10 ml 0,9%ige Kochsalzlösung) angesetzt. Anschließend wurde das in den 15 ml Tubes aufgefangene Blut mit 1 ml 1:4 in A. dest. verdünntes Triton X 100 lysiert. Danach pipettierte man jeweils 200 µl jeder Verdünnung, jeder Probe und als Leerwert 0,9% NaCl in eine 96-Well-Platte und bestimmte die optische Dichte bei 546 nm am Photometer.

Auswertung

Die durchschnittliche Blutungszeit ergab sich durch Bestimmung des Mittelwertes der einzelnen Blutungszeiten. Die verlorene Blutmenge [μl] erhielt man durch Einsetzen der gemessenen optischen Dichte bei 546 nm in eine mittels der Verdünnungsreihe aufgestellten Geradengleichung.

2.2.7 Durchflusszytometrie

2.2.7.1 Darstellung des Fibrinogenrezeptors

Das für dieses Experiment verwendete PRP wurde aus 3 ml Maus-Blut gewonnen. Die Blutentnahme erfolgte wie in 2.2.2.1 beschrieben direkt aus dem Herzen. Die Herstellung gewaschener Thrombozyten geschah wie folgt. Das antikoagulierte Mausblut wurde zunächst für vier Minuten bei 1000 rpm zentrifugiert, der Überstand (PRP) anschließend abpipettiert und das restliche Blut nach einmaligem Schwenken erneut unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Dieser Schritt diente dem Erhalt einer größeren Ausbeute PRP. Dieses wurde gepoolt und 2 μM PGE1 zur Prävention einer Plättchenaktivierung hinzugefügt. Anschließend wurde für acht Minuten bei 1300 rpm zentrifugiert, um auch die restlichen Erythrozyten aus dem PRP zu entfernen. Danach nahm man den Überstand und zentrifugierte diesen bei 2500 rpm für fünf Minuten. Es entstand ein Pellet. Das überbleibende plättchenarme Plasma wurde verworfen. Die Resuspension des Pellets erfolgte in 1 ml modifiziertem Tyrode Puffer (nach Zugabe von 0,02 U Apyrase und 2 μM PGE1). Danach inkubierte die Suspension für fünf Minuten bei 37°C. Die gewaschenen Plättchen wurden ein letztes Mal bei 2500 rpm (für drei Minuten) zentrifugiert, der Überstand dekantiert und das Pellet in 0,5 ml Tyrode-Puffer und 0,2 U /ml Apyrase gelöst. Nach einer Inkubation für 30 Minuten bei 37°C waren die gewaschenen Thrombozyten gebrauchsfertig für die nachfolgende durchflusszytometrische Analyse.

Während der Inkubation konnten bereits die U-förmigen Plastik-Röhrchen vorbereitet werden. Das Gesamtvolumen sollte 40 μl betragen. Zunächst wurde 1 mM CaCl_2 enthaltener Tyrode-Puffer vorgelegt. Anschließend wurden die gewünschten Antikörper (FITC- oder PE-gebunden) und ggf. Leptin (*rekombinantes Maus-Leptin 498-OB, R&D Systems; Wiesbaden, Deutschland*) zur Vorstimulation hinzugefügt. Die Plättchensuspension musste vor Zugabe in das Röhrchen 1:2 in Tyrode-Puffer

verdünnt werden. Aus dieser Verdünnung wurden 10 µl dazu pipettiert. Erst jetzt erfolgte die ADP-Stimulation. Durch Zugabe von 500 µl Puffer wurde die Vorbereitung zur Durchflusszytometrie abgeschlossen. Folgende Einstellungen wurden am Durchflusszytometer gewählt: Detectors: FSC E00 Log, SSC 440 Log, FL1 504 Log, FL2 530 Log, FL3 150 Lin; Treshold: FSC-H 180; Compensation 0.0. Die Thrombozyten wurden „gated“ und eine Gesamtzahl und 50 000 analysiert. Es wurden verschiedene ADP-Konzentrationen (0,1, 1, 10 µM), unterschiedliche Stimulationszeiten (2, 10 min) und verschiedene Leptinkonzentrationen (1, 10, 100 ng/ml) getestet.

2.2.7.2 FITC-Markierung von Fibrinogen

Um die Bindung von Fibrinogen an Blutplättchen durchflusszytometrisch darzustellen wurde dieses zunächst mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluoresceinisothiocyanat (FITC) markiert. An Tag 1 erfolgte zunächst die Herstellung eines 0,1 M Natriumbicarbonat-Puffers (NaHCO₃, Na₂CO₃, A. dest.) und einer FITC-Lösung (in DMSO). Später wurden 95,8 µl aus dem Fibrinogen stock (15,66 mg/ml) und 140 µl der FITC-Lösung in 750 µl Puffer pipettiert. Das Gemisch inkubierte bei 4°C über Nacht im Dunkeln. Am nächsten Tag wurde eine PD10-Säule mit kalziumfreien PBS äquilibriert, bevor der Fibrinogen-FITC-Ansatz komplett auf die Säule gegeben wurde. Nach einmaligem Spülen mit 1ml PBS, wurden 5 ml PBS auf die Säule pipettiert und anschließend 10 Fraktionen á 500 µl in Eppendorf Cups aufgefangen. Man bestimmte die optische Dichte aller Fraktionen bei einer Wellenlänge von 280 nm. Die drei Proben mit den höchsten Werten wurden erneut gemessen und die optische Dichte bei 280 und 495 nm notiert. Mit folgender Formel ließ sich nun die Konzentration errechnen (Xia et al. 1995).

$$c \text{ [mg/ml]} = (\text{OD}_{280} - 0,35 \times \text{OD}_{495}) / 1,51$$

Die Anzahl der FITC-Moleküle pro Fibrinogen-Molekül bestimmte man mithilfe dieser Formel (Xia et al. 1995). Das Ergebnis sollte zwischen 1 und 5 liegen.

$$F:P = 6,77 \times (\text{OD}_{495} / \text{OD}_{280} - 0,35 \times \text{OD}_{495})$$

Danach erfolgte eine Dialyse (mit PBS als Dialysat) der Suspension bei 4°C über Nacht im Dunkeln. Dafür benötigte man ein Dialyse-Schlauch der Größe 12000-14000 Dalton. Vor Benutzung sollte dieser einmal kurz in PBS erhitzt werden um aufzuweichen. Am Tag 3 wurde die dialysierte FITC-Fibrinogen-Suspension erneut gemessen und die optische Dichte bei 280 und 495 nm bestimmt. Wieder wurden die Konzentration und F:P berechnet. Bis zum Gebrauch lagerte das FITC-markierte Fibrinogen bei -20°C. Für die Versuche wurde frisches FITC-Fibrinogen (maximal 2 Wochen alt) verwendet.

2.2.7.3 Nachweis einer STAT3-Aktivierung

Die Herstellung der gewaschenen Plättchen erfolgte wie in 2.2.7.1 beschrieben. Diese wurden mit 1 mM CaCl₂ versetzt und mit Leptin (10 ng/ml) und/oder ADP (1 oder 5 µM) stimuliert. Danach wurden die Zellen mit 2% PFA für 15 min bei RT fixiert und anschließend mit Tyrode-Puffer gewaschen. Eine nachfolgende Permeabilisierung der Thrombozyten mit 0,05% Triton-X war notwendig, da sich p-STAT3 als Transkriptionsfaktor intrazellulär befindet. Nach erneutem Waschen wurde der Antikörper gegen p-STAT3 im Verhältnis 1:50 dazugegeben und inkubiert für 30 min bei 4°C. Der 1:250 verdünnte sekundäre Antikörper (*MFP 488 goat anti-Kaninchen IgG, Mobitec; Göttingen Deutschland*) wurde nach dem Waschen hinzupipettiert. Danach Inkubation für 30 min bei 4°C. Zuletzt erfolgte eine Verdünnung mit Tyrode-Puffer und das Messen am Durchflusszytometer mit den oben aufgeführten Settings (FSC, SSC und FL1).

Verwendete Antikörper/Substanzen:

- FITC Ratte anti-Maus CD62P monoclonaler Antikörper* (*BD-Pharmingen, 553744*)
- FITC Ratte IgG1, λ monoclonaler immunoglobulin isotype control* (*BD-Pharmingen, 553995*)
- PE Ratte anti-Maus Integrin αIIbβ3 monoklonaler Antikörper* (*emfret analytics, JON/A / Rat IgG2b, M023-2*)
- PE Ratte IgG polyklonaler Antikörper* (*emfret analytics, P190-2*)
- FITC-gebundenes Fibrinogen**, selbst markiert (*FITC: Isomer I, on Celite 10%, Cal biochem, 34323; Fibrinogen: Tebu-Bio; Offenbach, Deutschland*)

- anti-Maus Phospho-STAT3^{***} (Ser727, #9134) (Cell Signaling Technology®)

* Alle Antikörper (ausgenommen p-STAT3) wurden unverdünnt eingesetzt (jeweils 5 µl/Röhrchen).

** FITC-Fibrinogen wurde bei einer Konzentration zwischen 500 und 750 µg/ml unverdünnt eingesetzt (10 µl/ Röhrchen). Bei 900 µg/ml wurde das FITC-Fibrinogen 1:2 in Tyrode-Puffer verdünnt.

*** anti-Maus phospho-STAT3 wurde in einer Endkonzentration von 1:50 eingesetzt (hier 2 µl Antikörper pro 100 µl Tyrode-Puffer).

Auswertung

Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des Programmes MedWin, die graphische Darstellung in Form eines Balkendiagrammes (% positive Plättchen bzw. % p-STAT3-Expression) mit Graph Pad Prism 4.01.

2.2.8 Statistische Auswertung

Sämtliche Ergebnisse werden als Mittelwert \pm Standardfehler (SEM) dargestellt. Mittelwerte zweier Versuchsgruppen wurden mithilfe des unpaired Student`s t-test verglichen. Bei mehr als zwei Versuchsgruppen wurde der ANOVA-Test, gefolgt von Bonferroni`s Multiple Comparison Test verwendet. Ein P-Wert $<0,05$ galt als signifikant. Als Software für die statistischen Analysen wurde GraphPad Prism 4.01 benutzt.

3 Ergebnisse

Die Untersuchungen wurden an insgesamt 100 WT- und 48 ObRs/s-Mäuse durchgeführt. Wiederholtes Wiegen der Mäuse zu verschiedenen Lebenszeitpunkten zeigte wie erwartet einen deutlichen Gewichtsunterschied zwischen den beiden Genotypen ab dem zweiten Lebensmonat (im Durchschnitt $26,4 \pm 1,0$ g WT vs. $47,0 \pm 1,5$ g ObRs/s; $P= 0,0001$). Bis zum neunten Monat nahm dieser stetig zu ($32,6 \pm 1,3$ g vs. $60,7 \pm 1,3$ g; $P= 0,0001$). Der Gewichtsverlauf wurde vom ersten Lebensmonat bis zu einem Jahr beobachtet. Das Ergebnis dieser Gewichtsanalyse ließ sich auch optisch darstellen (*Abb. 4.*).

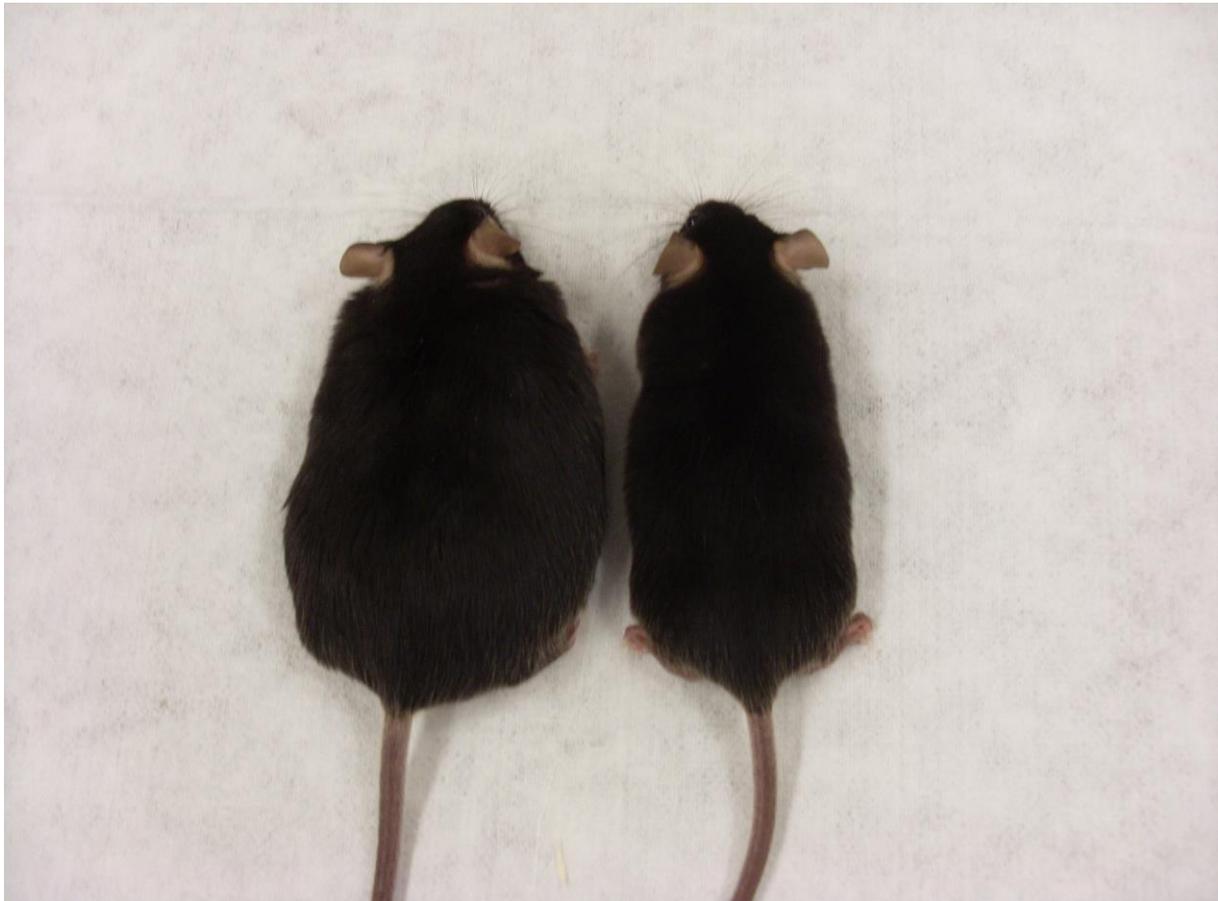


Abb. 4 Zwei 8 Monate alte Mäuse. Links eine ObRs/s-Maus, rechts eine Wildtyp-Maus (Foto selbst erstellt).

3.1 Blutbild und Plättchenfunktionstest

3.1.1 Blutbild

2002 konnten Kirito et al. zeigen, dass der Transkriptionsfaktor STAT3 eine wichtige Rolle in der frühen Phase der Megakaryopoese spielt, vermutlich durch die Expansion megakaryotscher Vorläuferzellen. Da der Leptinrezeptor auf allen hämatopoetischen Zellen exprimiert wird und Leptin die Hämatopoese beeinflusst (Cioffi et al. 1996), wurden zunächst Blutbilder von Mäusen beider Genotypen angefertigt. Eventuelle, mit der Mutation oder dem Übergewicht einhergehende, grundlegende Unterschiede in der Blutbildung und Zusammensetzung des Blutes sollten so vorab ausgeschlossen werden. Die Thrombozytenzahlen wurden aufgrund technischer Probleme, wie zuvor im Methodenteil erläutert, manuell erhoben. Die folgenden *Abbildungen 5a-e* zeigen, dass keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen bestanden. Alle Werte (*Abb. 5*) lagen innerhalb der für Mäuse beschriebenen Normbereiche (McGarry et al. 2009, Everds 2006).

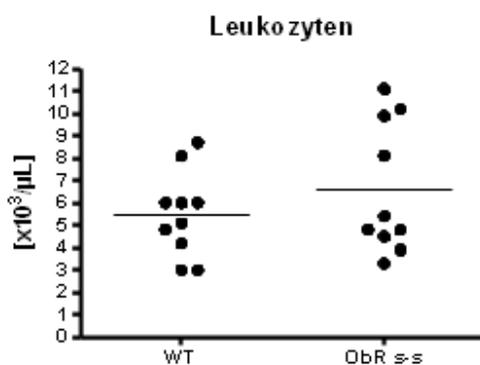


Abb. 5a

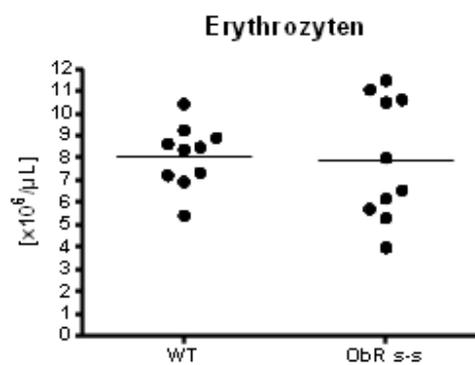


Abb. 5b

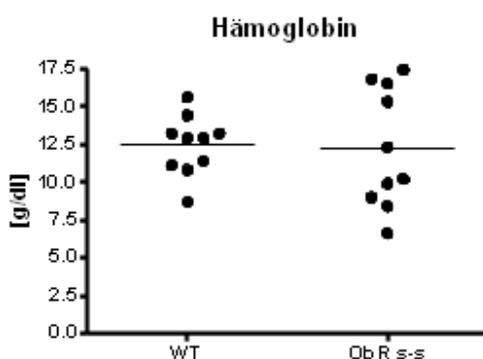


Abb. 5c

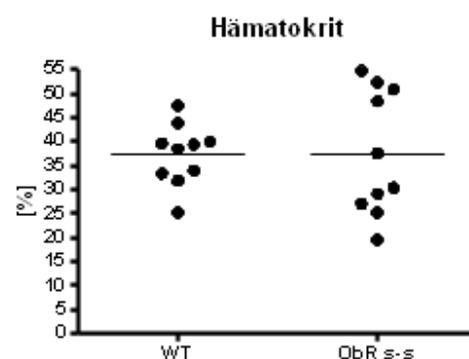


Abb. 5d

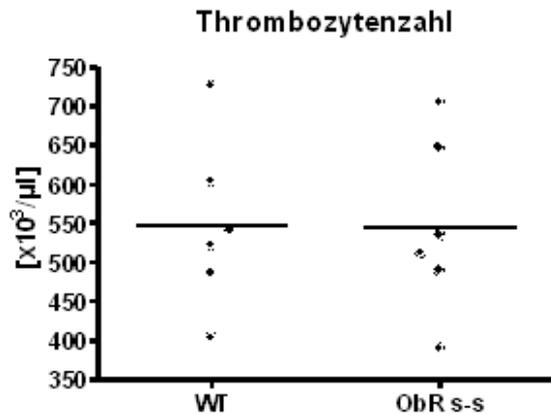


Abb. 5e

Abb. 5 Vergleich der Blutbildparameter bei WT- und ObRs/s-Mäusen.
a) Leukozytenzahl. WT: $5,5 \pm 0,6 \times 10^3/\mu\text{l}$ und ObRs/s: $6,6 \pm 0,9 \times 10^3/\mu\text{l}$ Leukozyten. Referenzbereich: $5-12 \times 10^3/\mu\text{l}$. **b) Erythrozytenzahl.** WT: $8,1 \pm 0,4 \times 10^6/\mu\text{l}$, ObRs/s: $7,1 \pm 0,9 \times 10^6/\mu\text{l}$ Erythrozyten. Referenzbereich: $7-10 \times 10^6/\mu\text{l}$. **c) Hämoglobin.** WT: $12,4 \pm 0,6 \text{ g/dl}$, ObRs/s: $12,2 \pm 1,3 \text{ g/dl}$. Referenzbereich: $10-17 \text{ g/dl}$. **d) Hämatokrit.** WT: $37,3 \pm 3,8\%$, ObRs/s: $37,4 \pm 2,6\%$. Referenzbereich: $35-52\%$. **e) Thrombozytenzahl.** Mittlere Thrombozytenzahl bei WT-Mäusen ($547 \pm 68 \times 10^3/\mu\text{l}$) und ObRs/s-Mäusen ($546 \pm 69 \times 10^3/\mu\text{l}$); Referenzbereich: $300-1000 \times 10^3/\mu\text{l}$. Die Messungen wurden in je 6 (Thrombozytenzahl) bzw. 10 Mäusen (alle anderen) jeden Genotyps erhoben. Die Statistische Auswertung erfolgte mittels des unpaired Student's t-test.

Quelle der Referenzwerte : Thrombozyten, Leukozyten (McGarry et al. 2009), Erythrozyten, Hämoglobin, Hämatokrit (Everds 2006)

Die ermittelten Werte lagen alle im Referenzbereich. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Mausgenotypen festgestellt werden. Auf die Anfertigung eines Differentialblutbildes wurde daher verzichtet.

3.1.2 Blutungszeit (sog. „Tail Bleeding Assay“)

Dieser Versuch diente dazu, Unterschiede in der Funktion der Blutplättchen zwischen den beiden Genotypen zu untersuchen. Hierbei wurde sowohl die Zeit bis zum Sistieren der Blutung, als auch die verlorene Blutmenge bestimmt. Insgesamt wurden für diesen Versuch jeweils 10 WT- und 10 ObRs/s-Mäuse getestet.

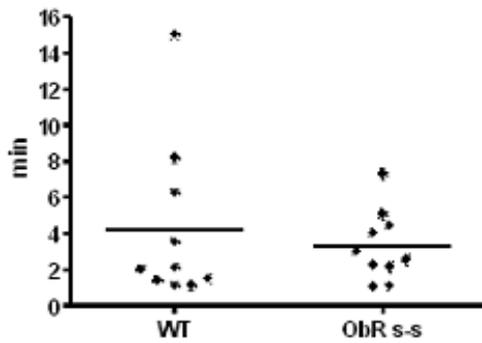


Abb. 6a

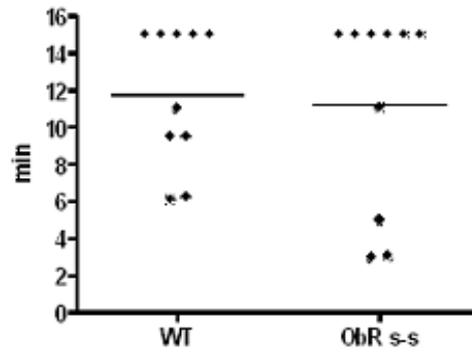


Abb. 6b

Abb. 6 Blutungszeit.

a) Erster Messwert: WT-Mäuse: 4,2 min, ObRs/s-Mäuse: 3,3 min. **b) Zweiter Messwert:** WT-Mäuse 12,2 min, ObRs/s-Mäuse 11,5 min. Die statistische Auswertung erfolgte mittels des unpaired Student's t-test.

Das Ergebnis dieses Versuches erbrachte keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Blutungszeit zwischen beiden Genotypen.

Die nach 30 Sekunden verlorene Blutmenge (Abb. 7) wurde, wie im Methodenteil beschrieben, mit Hilfe einer Standardkurve errechnet. Auch diese Analyse ergab keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich der Blutungszeit zwischen beiden Mausgenotypen.

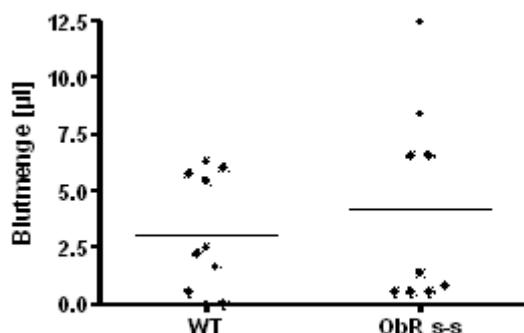


Abb. 7

Abb. 7 Photometrische Bestimmung des Blutverlustes. WT-Mäuse verloren durchschnittlich $3,0 \pm 2,6 \mu\text{l}$ Blut innerhalb von 30 sek, ObRs/s-Mäuse $4,2 \pm 4,4 \mu\text{l}$. Der Unterschied war nicht signifikant (Auswertung mit dem unpaired Student's t-test.).

Die in Abbildung 5 bis 7 dargestellten Ergebnisse über die zelluläre Zusammensetzung des Blutes und die Ergebnisse basaler Funktionstests verdeutlichen, dass es keine Unterschiede der Blutzusammensetzung, der Funktion der Blutplättchen und der Gerinnungseigenschaften bei WT- und ObRs/s-Mäusen

gab. In den nächsten Abschnitten wurde dann die Reaktivität von Plättchen nach Stimulation mit Leptin verglichen.

3.2 Plättchenadhäsion

Die Adhäsion von Blutplättchen an extrazelluläre Matrixmoleküle ist eine wichtige Funktion von Thrombozyten und Voraussetzung bzw. Vorstufe der Aggregation. Mit Hilfe des Plättchenadhäsionsversuches sollte herausgefunden werden, ob die Thrombozyten von ObRs/s-Mäusen auf Stimulation mit Leptin unterschiedlich stark im Vergleich zu denen der WT-Mäuse an Fibrinogen adhären. Die Adhäsion an BSA diene als Kontrolle zum Ausschluss unspezifischer Bindungen. In *Abbildung 8 bis 11* werden die Ergebnisse von n=3 unabhängigen Experimenten dargestellt.

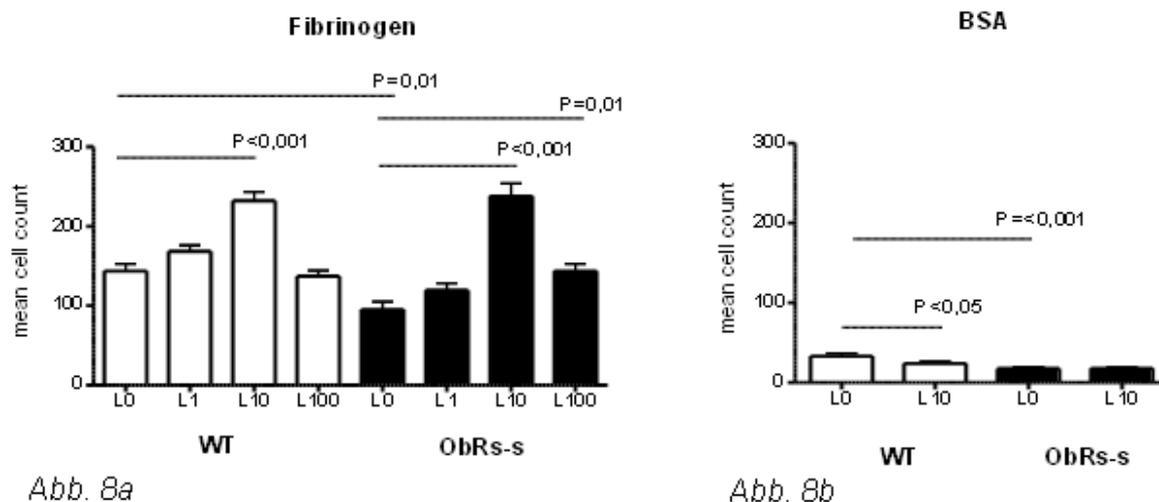


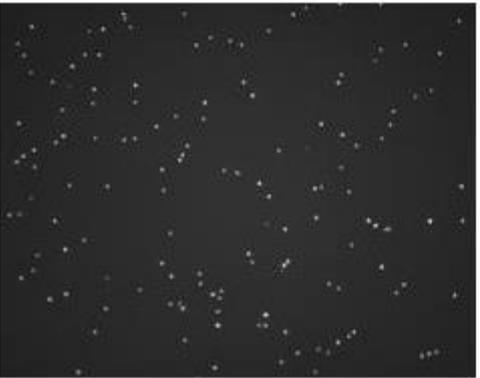
Abb. 8 Adhäsion von Thrombozyten an Fibrinogen. a) Adhäsion von 4×10^6 Thrombozyten/ml auf 100 μ l/ml Fibrinogen. Sowohl bei WT- als auch bei ObRs/s-Mäusen war ein signifikanter Anstieg der Zahl adhärenter Plättchen nach Stimulation mit 10 ng/ml Leptin erkennbar ($P < 0.001$; ANOVA-Test). Bei ObRs/s-Mäusen fand sich zusätzlich ein signifikanter Anstieg auch nach Stimulation mit 100 ng/ml Leptin ($P < 0,01$). b) Adhäsion von 4×10^6 Thrombozyten/ml auf 1% BSA als negative Kontrolle. Sowohl auf Fibrinogen als auch auf BSA signifikant weniger adhärende Plättchen. Weiße Balken= Wildtyp-, schwarze Balken= ObRs/s-Maus.

Abbildungen 8a-b veranschaulichen, dass die Leptin-induzierte Plättchenadhäsion fibrinogenspezifisch ist und Leptin dosisabhängig zu einem signifikanten Anstieg der adhärenenden Plättchen führt.

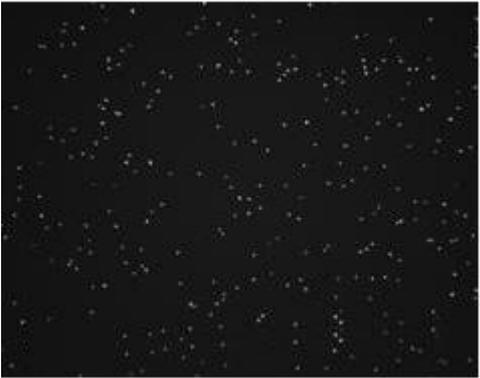
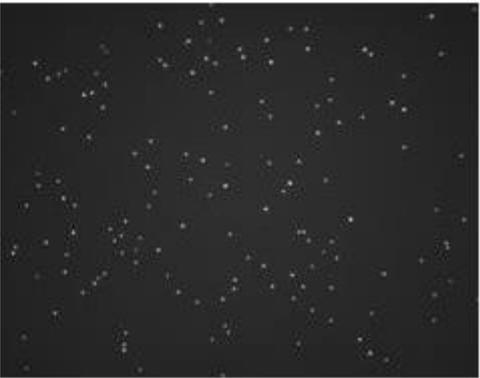
Die folgenden, an einem Fluoreszenzmikroskop angefertigten Fotos (Abb. 9), sollen einen optischen Eindruck der Plättchenadhäsion beider Genotypen vermitteln.



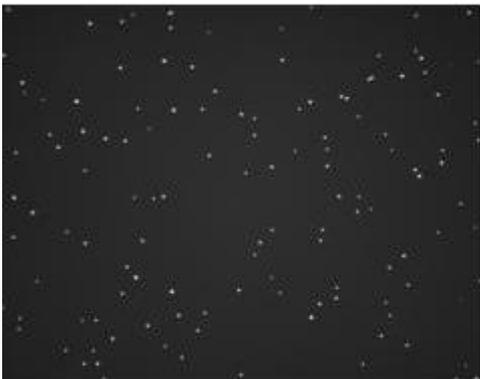
unstim.



L1



L10



L100



Abb. 9 Repräsentative Fotos aus drei unabhängigen Adhäsionsversuchen. Blutplättchen aus WT- (links)- und ObRs/s-Mäusen (rechts). Entsprechend den in Abb. 8 gezeigten Ergebnissen zeigt sich auch optisch eine Zunahme der Zahl adhätierender Plättchen nach Stimulation mit 10 ng/ml Leptin im Vergleich zu den jeweiligen unstimulierten Plättchen.

Aufgrund der basal niedrigeren Adhäsion von ObRs/s Plättchen auf Fibrinogen (und BSA) wurden die Ergebnisse auch noch einmal auf die jeweils unstimulierte Kontrolle normalisiert. Die nächste Abbildung zeigt den prozentualen Anstieg der adhätierenden Thrombozyten nach Leptinstimulation in Bezug auf unstimulierte Blutplättchen des jeweiligen Genotyps. Auch hier ergab sich bei beiden Genotypen der größte Anstieg der Plättchenadhäsion nach Stimulation mit 10 ng/ml Leptin.

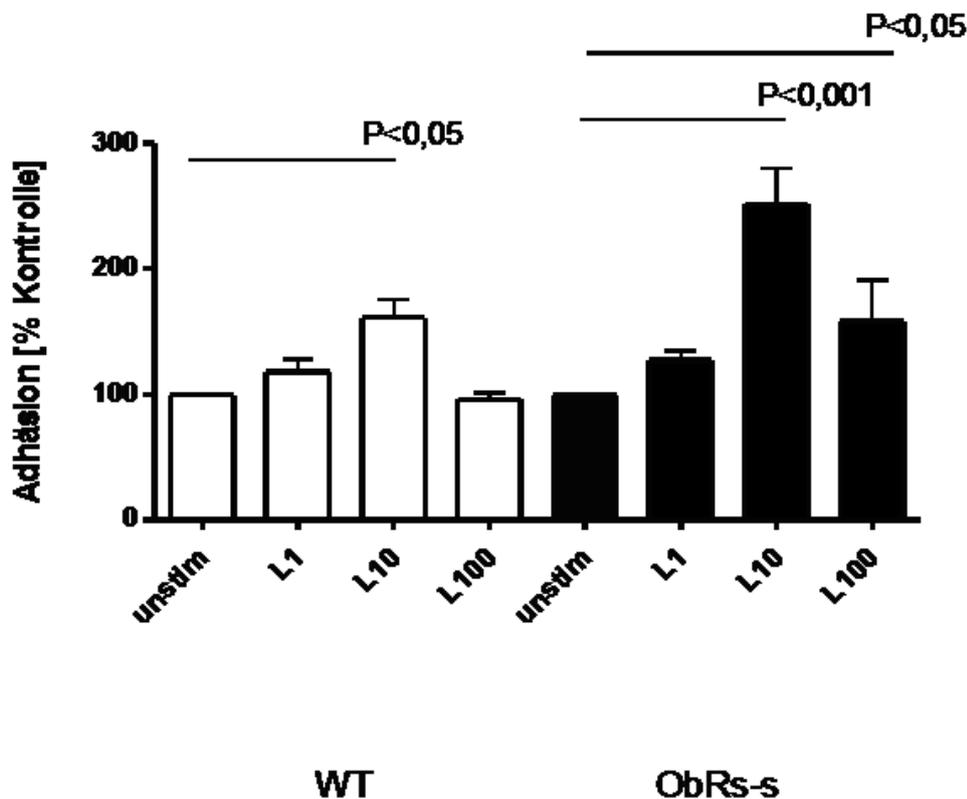


Abb. 10 Prozentualer Anstieg der fibrinogenspezifischen Plättchenadhäsion nach Leptinstimulation. Signifikante Zunahme der adhätierenden Thrombozyten nach Stimulation mit 10 ng/ml Leptin bei WT- und ObRs/s-Mäusen ($P < 0,05$ vs. $P < 0,001$; ANOVA-Test). Bei den ObRs/s-Mäusen ließ sich zusätzlich ein signifikanter Anstieg nach einer Stimulation mit nur 100 ng Leptin/ml erkennen ($P < 0,05$; ANOVA-Test). Weiße Balken= Wildtyp, schwarze Balken= ObRs/s-Maus.

Die oben abgebildeten Grafiken zeigen bei beiden Genotypen den ausgeprägtesten Leptineffekt bei einer Konzentration von 10 ng/ml, bei ObRs/s-Mäusen zudem auch

nach Stimulation mit 100 ng/ml. Deswegen folgte nun der Vergleich nicht nur innerhalb der jeweiligen Population, sondern auch miteinander.

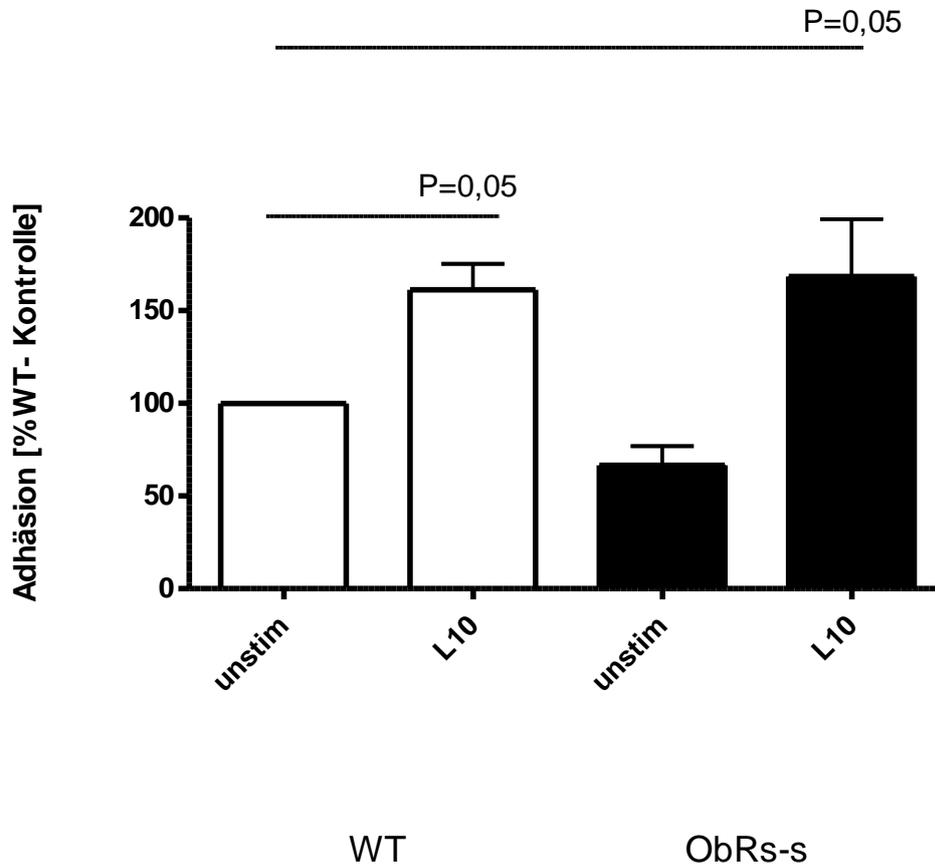


Abb. 11 Thrombozytenadhäsion in Bezug auf die unstimulierte WT-Kontrolle. Im Gegensatz zu dem Vergleich absoluter Zahlen (siehe Abb. 8), gibt es hier zwischen den adhärierenden, unstimulierten Plättchen beider Genotypen keinen signifikanten Unterschied. Jeweils signifikanter Anstieg der Plättchenadhäsion bei einer Leptinstimulation mit 10 ng/ml (beide Male $P=0,05$). Weiße Balken demonstrieren das Ergebnis der WT-, schwarze Balken das der ObRs/s-Mäuse. Auswertung mit ANOVA-Test.

Die Flächenzunahme (sog. „Spreading“) der Thrombozyten ist ebenfalls ein Teil der Aggregationskaskade. Nachdem bei humanen Plättchen gezeigt werden konnte, dass Leptin einen Einfluss auf die Thrombozytenfläche hat (Dellas et al. 2007), wurde dies nun auch bei Mäusen untersucht. Hierfür wurden die mit dem Fluoreszenzmikroskop erstellten Fotos der Adhäsion verwendet. Die Fläche der Thrombozyten ließ sich mit dem Programm Image Pro Plus bestimmen.

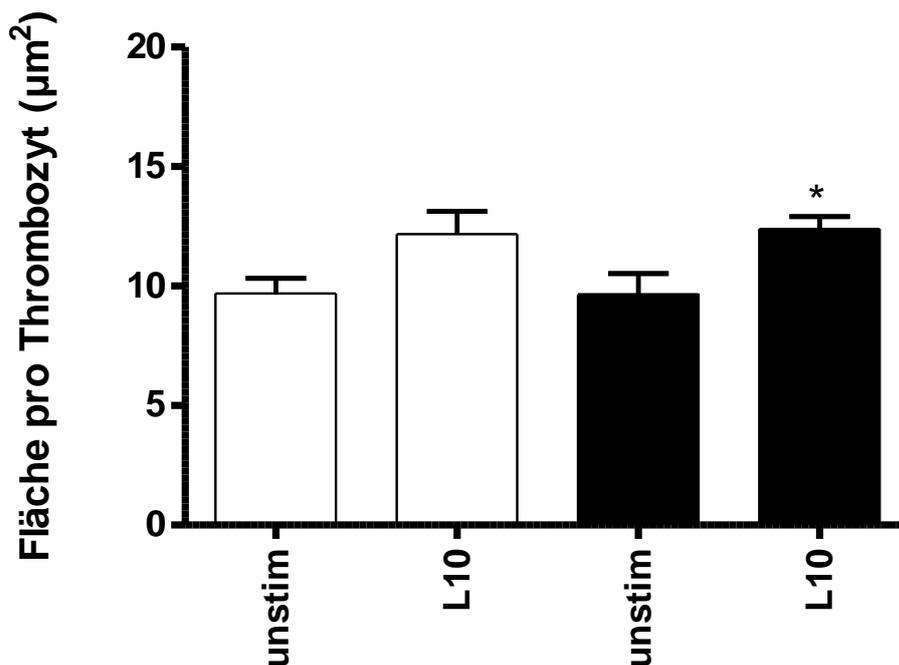


Abb. 12 Thrombozytenfläche. Signifikante Größenzunahme der Thrombozytenfläche nach Leptinstimulation bei ObRs/s-Mäusen (schwarze Balken). Eine Flächenzunahme ist auch bei den WT-Mäusen (weiße Balken) zu verzeichnen. Hier wurde jedoch eine Signifikanz knapp nicht erreicht ($P=0,058$). Auswertung mit t-test.

Die oben dargestellten Adhäsionsversuche demonstrierten, dass die Plättchenadhäsion fibrinogenspezifisch ist und dass unstimulierte Thrombozyten von ObRs/s-Mäusen weniger stark im Vergleich zu denen von WT-Mäusen an Fibrinogen anhaften (Abb. 8a). Auf Stimulation mit Leptin (stärkster Effekt bei 10 ng/ml) reagierten sowohl WT- als auch ObRs/s Mäuse gleichermaßen mit einer verstärkten Adhäsion an Fibrinogen. Bei den ObRs/s-Mäusen war zusätzlich eine verstärkte Thrombozytenadhäsion nach Stimulation mit 100 ng Leptin zu sehen. Eine Größenzunahme der Thrombozytenfläche ließ sich in beiden Populationen nachweisen, signifikant war diese jedoch nur bei den ObRs/s-Thrombozyten.

Auf die Durchführung von Plättchenaggregationsstudien zur Vervollständigung des Vergleichs der Responsivität von Blutplättchen beider Genotypen auf Leptin wurde aufgrund der Notwendigkeit großer Mengen Mausblutes (5 ml pro Versuch, entsprechend n=5 Mäusen) und fehlender Hinweise auf Unterschiede verzichtet.

3.3 Durchflusszytometrische Analysen

3.3.1 Expression des Fibrinogenrezeptors

Die Bindung von Fibrinogen an seinen Rezeptor ermöglicht eine Brückenbildung zwischen aktivierten Thrombozyten und ist somit Voraussetzung für eine Plättchenaggregation. Ob Leptin einen positiven Effekt auf die Aktivierung von Plättchen in Mäusen und somit auf den Fibrinogenrezeptor hat, sollte mit Hilfe dieses Versuches herausgefunden werden.

Vergleichend wurden gewaschene Thrombozyten von WT- und ObRs/s-Mäusen untersucht. Es gibt verschiedene Möglichkeiten, die Expression des Fibrinogenrezeptors bzw. die Plättchenaktivierung nachzuweisen. Zu diesen gehören der indirekte Nachweis der Fibrinogenbindung an den aktivierten Rezeptor und der direkte Nachweis mittels spezifischer Antikörper gegen den (aktivierten) Fibrinogenrezeptor. Zur Bestätigung der Plättchenaktivierung wurde auch die Expression von P-Selektin auf der Zelloberfläche ermittelt. Nachfolgend erscheinen nun die Resultate der verschiedenen Testungen.

Zunächst wurde die Bindung des FITC-gekoppelten Fibrinogens an Leptin- (10ng/ml, 100 ng/ml) bzw. ADP- (0,1µM, 1 µM 5µM) stimulierte Blutplättchen untersucht, um auf diese Weise indirekt die Expression des Fibrinogenrezeptors nachzuweisen.

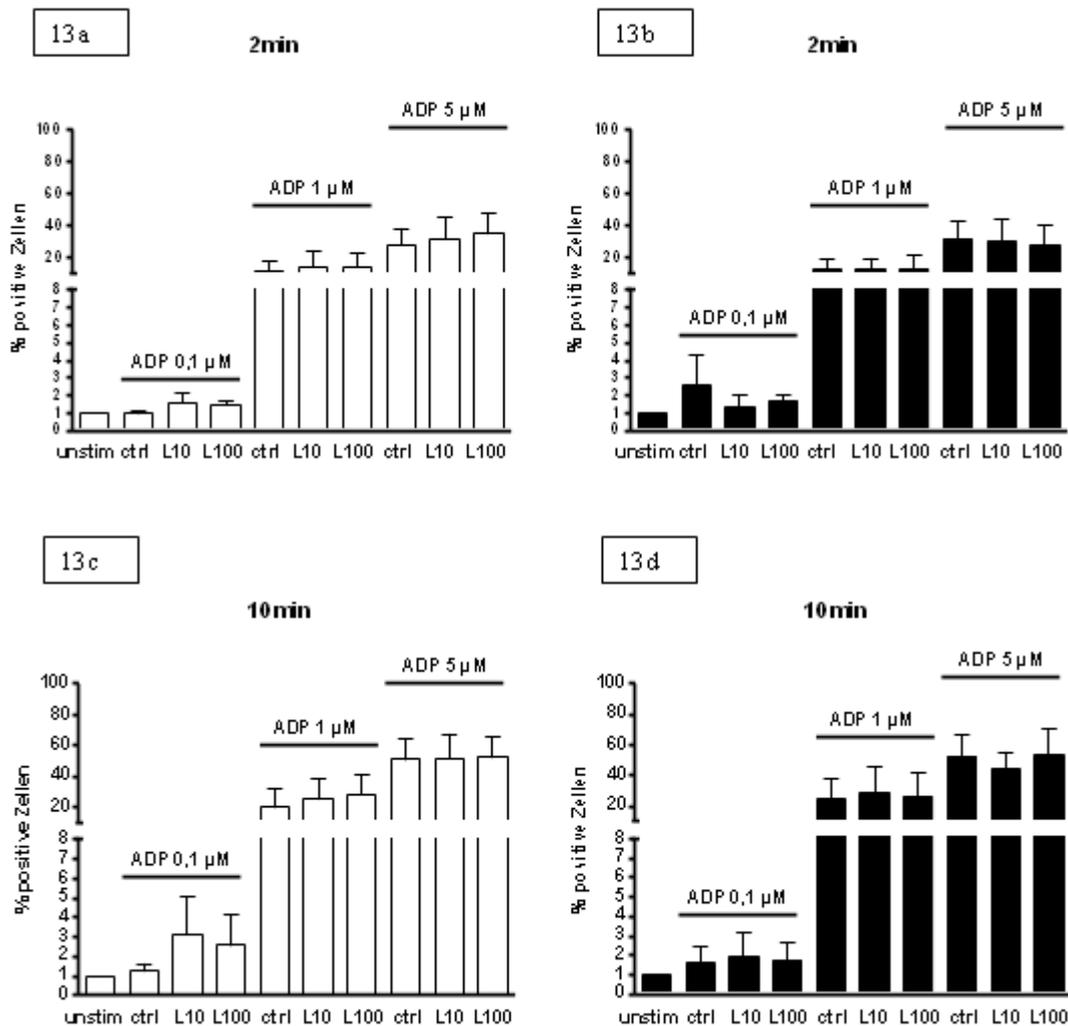


Abb. 13 Durchflusszytometrischer Nachweis der Bindung FITC-markierten Fibrinogens an Blutplättchen nach Vorstimulation mit Leptin und zeitabhängiger ADP-Stimulation. **a und b)** Nach zweiminütiger ADP-Stimulation. **c und d)** Nach zehninütiger ADP-Stimulation. Verschiedene ADP (0,1; 1; 5 μM)- und Leptinkonzentrationen (10 und 100 ng/ml) in Bezug auf die jeweilige Kontrolle. Weiße Balken= Wildtyp-Mäuse, schwarze Balken= ObRs/s-Mäuse. $n=3$.

Im Gegensatz zur Plättchenstimulation mit ADP, führte die alleinige Leptinstimulation (*nicht dargestellt*) nicht zu einer verstärkten Fibrinogenbindung. Auch die Stimulation mit ADP + Leptin zeigte keinen additiven Effekt zu der mit ADP alleine. Unterschiede zwischen Wildtyp- und ObRs/s-Mäusen wurden nicht festgestellt.

Nachdem der indirekte Nachweis der Fibrinogenrezeptoraktivierung zwar funktionierte, aber Leptin dabei keinen Effekt hatte, wurde anschließend der direkte Nachweis mit einem Fibrinogenrezeptor-Antikörper durchgeführt. Der an PE-gekoppelte monoklonale Antikörper (Klon JON/A) erkennt den murinen aktivierten

Fibrinogenrezeptor, Integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ (auch GPIIb/IIIa oder CD41/CD61). Dieses auf Thrombozyten exprimierte Integrin bindet vor allem Fibrinogen und vWF, aber auch Fibronektin und Vitronektin.

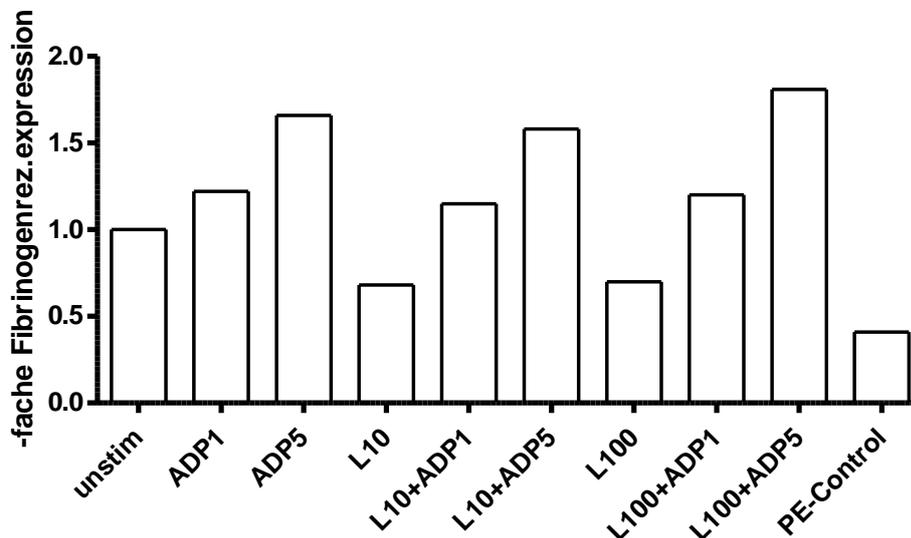


Abb. 14 Direkter Fibrinogenrezeptor-Nachweis in der Durchflusszyometrie. Repräsentatives Beispiel ($n=3$). Anwendung des PE-JON/A-Antikörper bei WT-Thrombozyten. Verschiedene Leptin- und ADP-Konzentrationen wurden getestet.

Nach ADP-Stimulation kam es wie erwartet zu einer verstärkten Expression des Fibrinogenrezeptors in Mausplättchen. Ebenso wie bei der Fibrinogenbindung (Abb. 13) hatte jedoch auch in diesem Experiment die Stimulation mit Leptin allein oder additiv zu ADP keinen Effekt.

Um zu untersuchen, ob die Ursache des Ausbleibens einer verstärkten Fibrinogenrezeptorexpression und der fehlenden Zunahme der Bindung FITC-markierten Fibrinogen auf murinen Plättchen nach Leptinstimulation in einer fehlenden Aktivierung der Plättchen liegt, wurde die Expression von P-Selektin auf der Thrombozytenoberfläche bestimmt. Der FITC-konjugierte Antikörper CD62P bindet an P-Selektin, welches nach Freisetzung aus α -Granula und somit nur auf aktivierten Thrombozyten exprimiert wird.

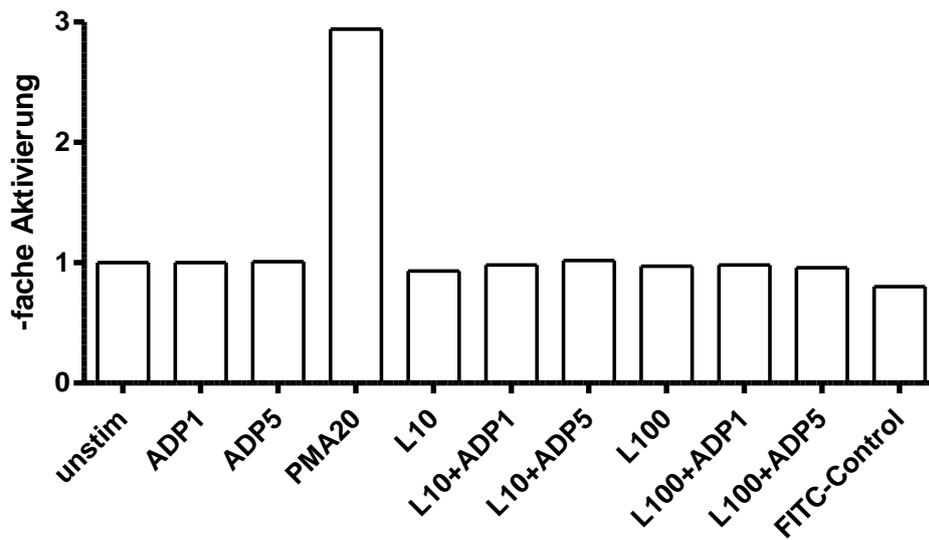


Abb. 15 Nachweis des Proteins P-Selektin in der Durchflusszytometrie. Durchführung ($n=1$) mit dem FITC-CD62P-Antikörper bei WT-Thrombozyten. Verschiedene Leptin-, ADP- und PMA-Konzentrationen wurden getestet. Aktivierung nur nach PMA-Stimulation.

Eine verstärkte Plättchenaktivierung nach Leptinstimulation war auf diese Weise nicht nachzuweisen. Auch der etwas stärkere, als Positivkontrolle dienende Agonist ADP zeigte keinen Effekt. Lediglich PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate) als sehr starker Agonist bewirkte eine gesteigerte Aktivierung, erkennbar an der Oberflächenexpression von P-Selektin.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Leptins schwach agonistische Wirkung durch diese Mausblut-Versuche nicht nachgewiesen werden konnte. Weder die alleinige noch die additive Stimulation zu ADP zeigte einen positiven Effekt. Die Agonisten ADP und PMA hingegen führten zu einer verstärkten Plättchenaktivierung.

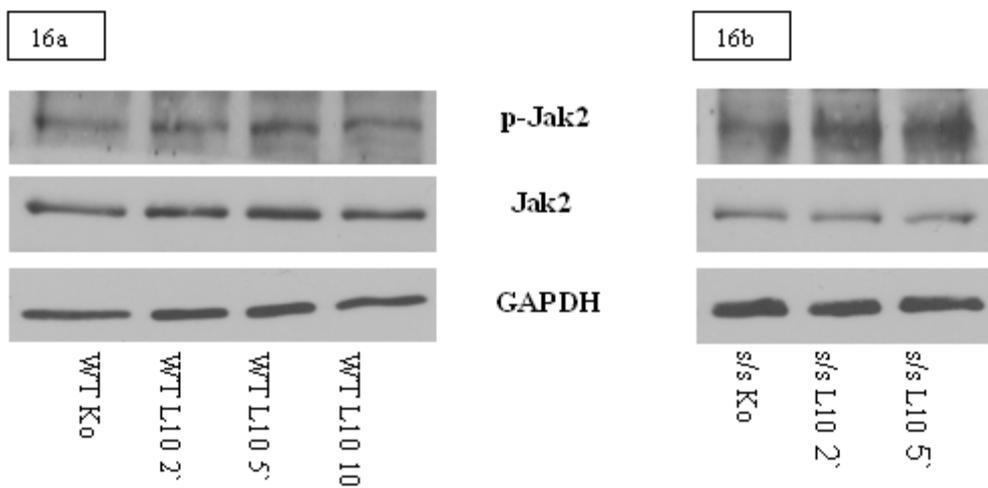
3.4 Aktivierung von Jak2-STAT3 nach Leptinstimulation

Die bisherigen Versuche zeigten, dass die Mutation der ObRs/s-Mäuse zu keinen gravierenden Unterschieden im Vergleich mit WT-Mäusen führt. Die durch den Tail Bleeding Assay überprüfte Thrombozytenfunktion fiel ähnlich aus und brachte somit eine gleiche Ausgangslage für weitere Versuche. Durch die Erstellung von Blutbildern konnten signifikante Differenzen hinsichtlich der Blutbildung ausgeschlossen werden. Die Untersuchung der Plättchenadhäsion beider Genotypen führte zu der Erkenntnis, dass unstimulierte Thrombozyten (absolute Zahl) von ObRs/s zwar weniger stark auf Fibrinogen haften, aber einer Leptinstimulation (10 ng/ml) in beiden Genotypen einen verstärkenden Effekt hat. Der Nachweis einer Fibrinogenrezeptoraktivierung als Teil der Thrombozytenadhäsion und –aktivierung funktionierte methodisch zwar, jedoch konnte Leptin als schwacher Agonist in beiden Genotypen keinen Effekt erzielen.

Aus diesen Experimenten konnten wir schließen, dass STAT3 in Thrombozyten keine bedeutende Rolle für die Adhäsion und Aktivierung zu spielen scheint. Mittels Western-Blot-Analyse und Durchflusszytometrie sollte nun die Signaltransduktion über den veränderten Leptinrezeptor untersucht werden.

3.4.1 Nachweis der Jak2-Aktivierung

3.4.1.1 Ergebnis der Western-Blot-Analyse



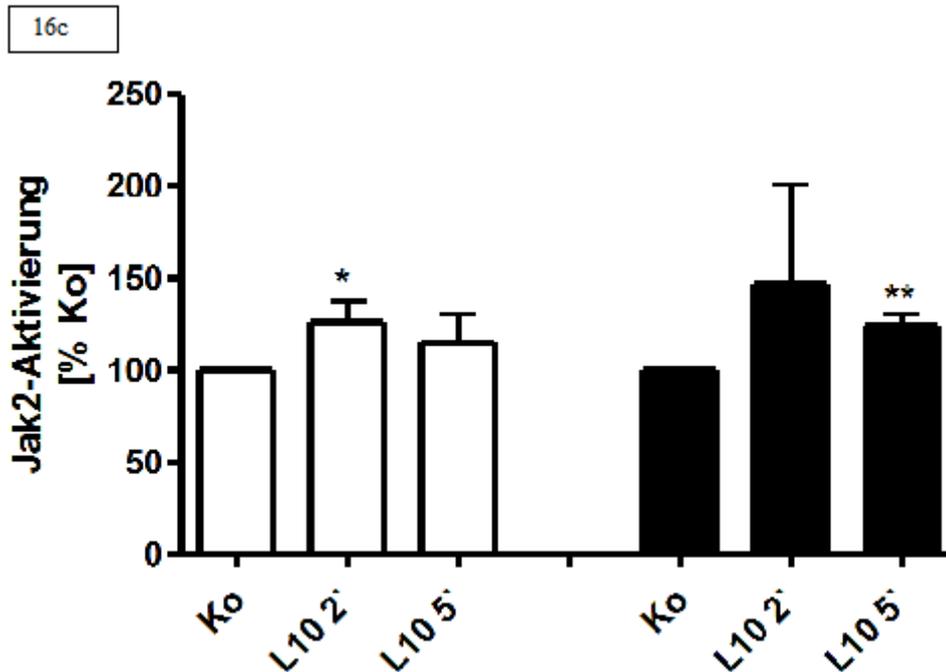


Abb. 16 Leptinstimulation von Mausthrombozyten führt zu einem zeitabhängigen Anstieg der Jak2-Phosphorylierung. a und b) Repräsentative Beispiele aus $n=5$ unabhängigen Versuchen. Leptinstimulation mit 10 ng/ml. c) Zusammenfassung der densitometrischen Auswertung in Bezug auf die jeweilige unstimulierte Kontrolle. Da sich bei der Auswertung mittels ANOVA-Test keine Signifikanz zeigte, optisch jedoch eine Zunahme der Phosphorylierung insbes. nach 2 min imponierte, erfolgte ergänzend der t-test. *= $P<0,05$, **= $P<0,01$

Eine Zunahme der Jak2-Phosphorylierung wurde nach zweiminütiger Leptinstimulation beobachtet und blieb auch nach fünfminütiger Stimulation in etwa konstant. Dieses annähernd gleiche Ergebnis bei WT- und ObRs/s-Mäusen ist nicht unerwartet, da die Jak2-Phosphorylierung unabhängig von dem in ObRs/s-Mäusen mutierten Leptinrezeptorteil abläuft.

Hinsichtlich der STAT3-Phosphorylierung könnten hingegen Unterschiede auftreten, da diese über Tyrosin1138 des Leptinrezeptors verläuft.

3.4.2 Nachweis der STAT3-Aktivierung

3.4.2.1 Ergebnis der Western-Blot-Analyse

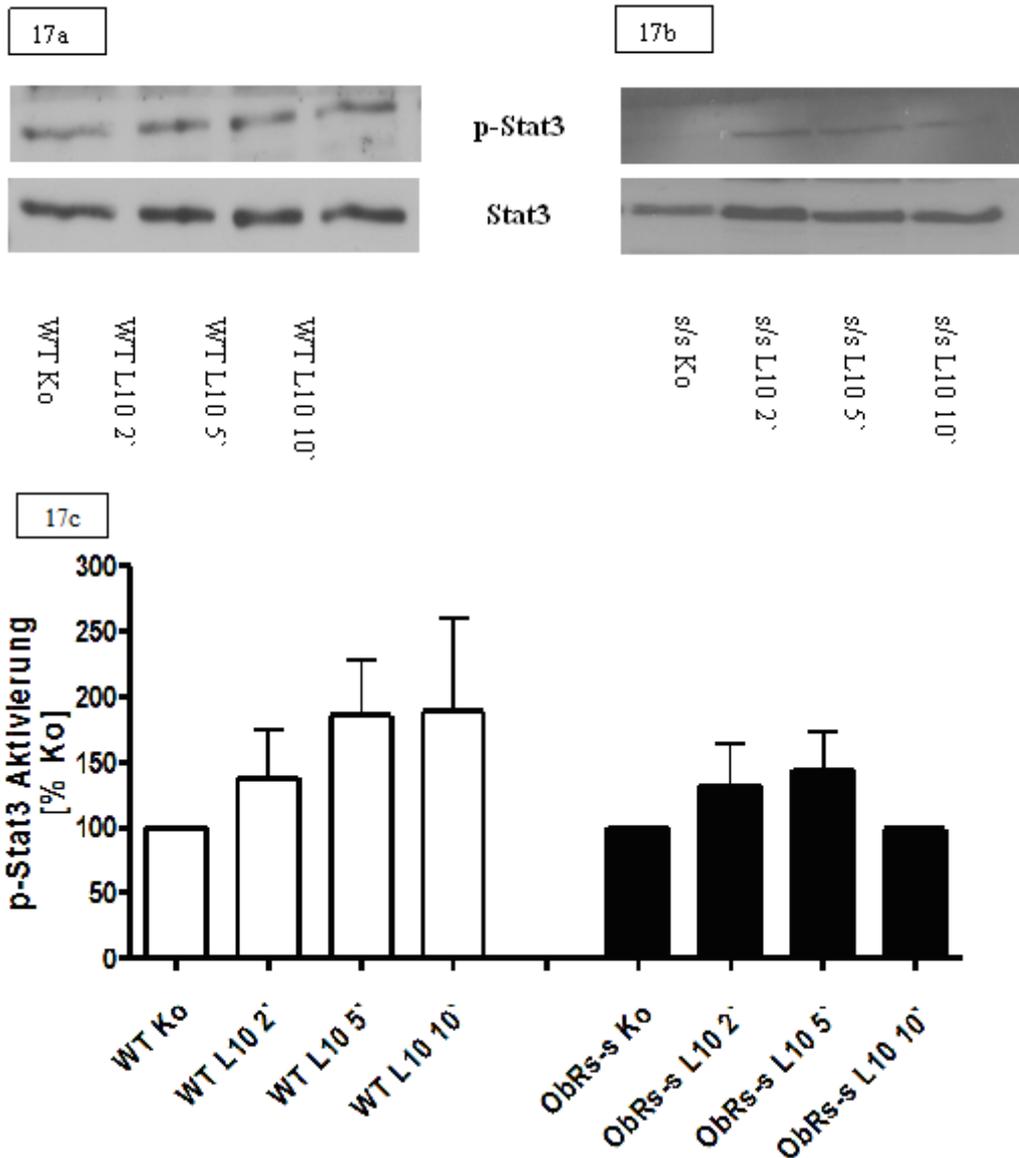


Abb. 17 Leptinstimulation von Mausthrombozyten führt zu einem zeitabhängigen Anstieg der STAT3-Phosphorylierung. a und b) Repräsentative Beispiele aus n=5 unabhängigen Versuchen. Leptinstimulation mit 10 ng/ml. c) Zusammenfassung der densitometrischen Auswertung in Bezug auf die jeweilige unstimulierte Kontrolle. Auch hier wurde nach ANOVA noch zusätzlich der t-test verwendet.

STAT3 wurde in beiden Mauspopulationen nach zeitabhängiger Leptinstimulation (10 ng/ml) phosphoryliert. In beiden Gruppen zeigte sich der ausgeprägte Effekt nach 5 Minuten. Insgesamt war der Stimulationseffekt in ObRs/s-Mäusen jedoch nicht nur weniger deutlich, sondern auch kürzer. Dies zeigt sich in der Grafik bei Vergleich der beiden Säulen nach 10-minütiger Stimulation. Die Western-Blot-Analyse führte

letztendlich zu folgendem Ergebnis. Die Signaltransduktion über Jak2 und STAT3 verlief oberflächlich betrachtet in WT- und ObRs/s-Mäusen gleich. Bei genauerem Hinsehen erkannte man jedoch eine stärkere STAT3-Aktivierung in WT-Thrombozyten. Es stellte sich die Frage, wie STAT3 überhaupt in den ObRs/s-Thrombozyten phosphoryliert werden konnte, wenn das Tyrosin1138 des Leptinrezeptors doch eigentlich Voraussetzung dafür ist.

Um zu sehen, ob sich dieses unerwartete Ergebnis der STAT3-Aktivierung in ObRs/s-Mäusen auch noch auf eine andere Art und Weise reproduzieren lässt, wurde die Methode der Durchflusszytometrie gewählt.

3.4.2.2 Ergebnis der Durchflusszytometrie

Neben dem Western Blot stellt auch die Durchflusszytometrie eine Möglichkeit dar, eine gegebenenfalls vorhandene STAT3-Aktivierung nach Leptinstimulation in Mausplättchen nachzuweisen.

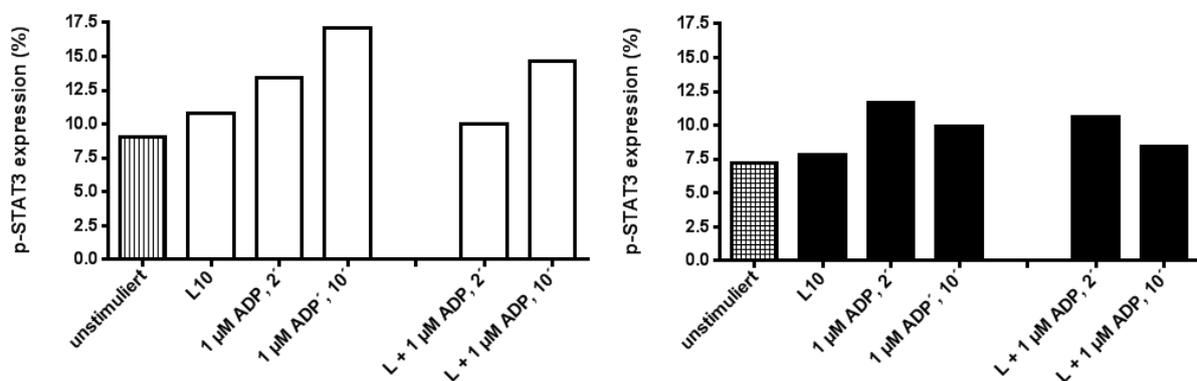


Abb. 18 STAT3-Aktivierung in WT- (links) und ObRs/s-Thrombozyten (rechts) nach zeit- und dosisabhängiger Leptin (L)- und ADP-Stimulation (n=1).

Diese Grafiken veranschaulichen, dass auch hier in WT- und in ObRs/s-Thrombozyten eine STAT3-Aktivierung nach Leptinstimulation stattfand. Wieder ist der Leptineffekt in den Thrombozyten von WT-Mäusen ausgeprägter.

4 Diskussion

Die Ergebnisse experimenteller (*Konstantinides et al. 2001, Bodary et al. 2002*) und klinischer (*Wallace et al. 2001, Wolk et al. 2004*) Studien führten zu der Annahme, dass eine Verbindung zwischen Adipositas-assoziiierter Hyperleptinämie und dem erhöhten Risiko einer vaskulären Thrombose und ischämischen Ereignissen besteht. Leptin führte bei Menschen und Mäusen zu einer Verstärkung der agonisten-induzierten Plättchenaggregation (z.B. *Nakata et al. 1999, Konstantinides et al. 2001a, Corsonello et al. 2003*). Die Hemmung des endogenen Leptins mit einem leptinneutralisierenden Antikörpers und Versuche mit Leptin-defizienten ob/ob-Mäusen demonstrierten, dass ein Leptinmangel oder das Ausschalten vorhandenen Leptins protektiv hinsichtlich der Entstehung venöser und arterieller Thrombosen wirkte (z.B. *Konstantinides 2001a, 2004*).

Ausgereifte Thrombozyten sind kernlos und deshalb dürfte STAT3 als Transkriptionsfaktor für sie eigentlich keinen Nutzen haben. Eine Studie aus dem Bereich der Leukämieforschung konnte jedoch zeigen, dass STAT3 auch unabhängig von einem Zellkern Funktionen hat. Die durch Thrombopoetin (TPO) aktivierten Plättchensignalwege nehmen vermutlich Einfluss auf die mitochondriale Transkription über eine STAT3-Aktivierung (*Vassilev et al. 2002*). Zu dieser Erkenntnis kamen Vassilev et al., nachdem sie die Wirkung des Transkriptioninhibitors Actinomycin D und des Hormons TPO auf Plättchen untersuchten. Actinomycin D hemmte die thrombopoetininduzierte Plättchenaktivierung, was zu der Annahme führte, dass die mitochondriale Transkription Teil dieser Aktivierung ist.

Diese Studie ist ein Beispiel dafür, dass ein Zellkern nicht für jede Funktion von STAT3 von Bedeutung ist. Somit könnte auch die durch Leptin vermittelte Aktivierung des STAT3-Proteins, abgesehen von der Funktion als Transkriptionsfaktor, auch noch andere Auswirkungen haben.

4.1 Einfluss von Leptin auf die Plättchenaktivierung

Leptin hat einen Einfluss auf die Plättchenaktivierung. Dies konnte schon von verschiedenen Arbeitsgruppen (z.B. *Nakata et al. 1999*, *Konstantinides et al. 2001*, *Dellas et al. 2007*) gezeigt werden. Ob sich dahingehend etwas aufgrund der Mutation der ObRs/s-Mäuse verändert, wurde im Rahmen dieser Studie untersucht

Vorab wurden zunächst die Thrombozytenfunktion und die Hämatopoese untersucht. Diese Tests dienten der Feststellung gegebenenfalls vorhandener Unterschiede zwischen den Genotypen, die die weiteren Experimente hätten beeinflussen können. Der Tail Bleeding Assay (*Abb.6*) spiegelte die Blutungszeit der beiden Genotypen wider. Hierbei wurden zwei Messpunkte (erstes und endgültiges Sistieren der Blutung) festgelegt. Des Weiteren wurde der innerhalb von 30 sek eintretende Blutverlust (WT: $3,0 \pm 2,6$ μ l vs. ObRs/s: $4,2 \pm 4,4$ μ l) verglichen (*Abb. 7*). Weder die Blutbilder noch die basalen Thrombozytenfunktionstests ließen signifikante Unterschiede zwischen den beiden Genotypen erkennen, so dass die folgenden Versuche nicht durch Unterschiede auf dieser Ebene beeinflusst worden wären.

In Hinblick auf die STAT3-Funktion in Plättchen wurden als nächstes Adhäsionsstudien durchgeführt. Zum einen sollte untersucht werden, ob sich die Ergebnisse der humanen Thrombozyten-Adhäsionsversuche (*Dellas et al. 2007*) bestätigen lassen und zum anderen, ob STAT3 für diese Aktion von Bedeutung ist und somit Unterschiede zwischen den Genotypen erkennbar sind. 2007 konnten *Dellas et al.* zeigen, dass auch Leptin allein fähig ist, Thrombozyten zu aktivieren. Dosisabhängig verstärkte Leptin die Plättchenadhäsion auf Fibrinogen und führte zu einer zytoskelettalen Reorganisation der adhärierenden Plättchen. Dies äußerte sich in einer Vergrößerung der Plättchenoberfläche. Auch in dieser Studie konnten einige dieser Erkenntnisse bestätigt werden. Bei ObRs/s-Mäusen und WT-Mäusen konnte unter Leptinstimulation eine signifikante Zunahme der an Fibrinogen adhärierenden Plättchen beobachtet werden. Betrachtet man nur die unstimulierten Plättchen (absolute Zahlen), so adhärten signifikant weniger ObRs/s-Plättchen im Vergleich zu WT-Plättchen (*Abb. 8a*). Verglich man die Adhärenz innerhalb eines Genotyps, zeigte sich eine dosisabhängige Zunahme der haftenden Thrombozyten in beiden

Gruppen (Abb. 8a, 10). Der stärkste Leptineffekt wurde jeweils bei einer Stimulation mit 10 ng/ml deutlich. Höhere Dosen (100 ng/ml) führten nur bei den ObRs/s-Maus-thrombozyten zu einer weiteren Zunahme dieses Effekts (Abb. 8a). Auch auf das sog. „Spreading“ als Teil der Aggregationskaskade nimmt Leptin nachweislich Einfluss. Dies ließ sich bei humanen Plättchen demonstrieren (Dellas et al. 2007). Aber auch die Oberfläche muriner Plättchen wird unter Leptinstimulation größer (Abb. 12). Die Größenzunahme der Fläche bei ObRs/s-Thrombozyten war signifikant, wohingegen eine signifikante Flächenzunahme bei WT-Plättchen nur knapp nicht erreicht wurde.

Da die Adhäsionsversuche keine gravierenden Unterschiede zwischen den Genotypen aufdeckten, wurde auf Aggregationsstudien verzichtet. Hinzukommend wären die dafür benötigten großen Blutmengen (5 ml= 5 Mäuse pro Versuch) kaum verfügbar gewesen.

Die schon erwähnten Versuchsergebnisse lassen vermuten, dass dem Transkriptionsfaktor STAT3 keine bedeutende Rolle hinsichtlich der Leptin-induzierten Plättchenadhäsion oder –aktivierung zukommt. Dennoch gibt es Studien, die Zusammenhänge zwischen Leptin, STAT3 und Integrinen belegen. Vorarbeiten der Arbeitsgruppe konnten zeigen, dass die Leptinbindung an seinen Rezeptor zu einer verstärkten Phosphorylierung des Integrins $\beta 5$ in CACs (circulating angiogenic cells) führt und das daran eine (zeitabhängige) Aktivierung der Janus-Kinase (Jak2) und der Src-Kinase beteiligt sind (Heida et al. 2010). Ebenso führt in Plättchen die Bindung von Leptin an seinen Rezeptor zu einer verstärkten Adhäsion/Aktivierung der Thrombozyten, welche eine Aktivierung des Fibrinogenrezeptors voraussetzt. Die Src-Kinase ermöglicht wiederum eine STAT3-Phosphorylierung (Yu et al. 1995, Cao et al. 1996). Eine vermehrte Expression des Integrins $\beta 5$ in CACs führt zu einer verstärkten Phosphorylierung dieses Integrins und der Src-Kinase, woraus eine STAT3-Aktivierung resultiert. Diese spielt sich jedoch downstream von Integrinen und der Src-Kinase ab und scheint deshalb nicht für die Aktivierung des Integrins selbst wichtig zu sein (Leifheit-Nestler et al. 2010). Eine Aktivierung des Fibrinogenrezeptors ist im Rahmen des inside-out signalings in Plättchen über Tyrosinkinasen wie Src und Syk möglich (Shattil et al. 1998). Zusammenfassend

scheint STAT3 im Gegensatz zur Src-Kinase bei der Aktivierung von Integrinen, insbesondere des Fibrinogenrezeptors, keine bedeutende Rolle zu spielen.

Die Bindung der Thrombozyten an Fibrinogen ist ein wichtiger Bestandteil der Adhäsion und späteren Thrombusbildung. Dieser Fibrinogenbindung geht eine agonisteninduzierte Konformationsänderung des Integrins $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ voraus (*Shattil et al. 1998*). Mithilfe durchflusszytometrischer Analysen der Plättchen beider Genotypen ließ sich dies bestätigen. Die Stimulation mit ADP führte zu einer dosis- und zeitabhängigen Zunahme der Fibrinogenbindung (*Abb 13*). In beiden Gruppen war der ADP-Effekt annähernd gleich. Die alleinige Stimulation mit Leptin hatte keinen Effekt (nicht dargestellt). Das entspricht früheren Untersuchungen, die zeigen, dass Leptin ein Ko-Faktor, aber kein eigenständiger Plättchenagonist ist. Die Kombination aus ADP und Leptin verstärkte die alleinige ADP-Wirkung nicht. Des Weiteren wurde versucht, die Leptin-induzierte Integrin- $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ -Aktivierung durch Verwendung des murinen Fibrinogenrezeptor-Antikörpers (Klon JON/A) zu bestätigen. In humanen Plättchen konnte dies 2007 durch die PAC-1-Antikörperbindung gezeigt werden. Effekte waren durch alleinige Leptinstimulation und additiv zu ADP zu sehen (*Dellas et al. 2007*). Bei den scheinbar schwieriger aktivierbaren Mausthrombozyten funktionierte erneut nur der Agonist ADP. Die alleinige Leptinstimulation zeigte keinen Effekt. Um zu sehen, ob eine fehlende Plättchenaktivierung der Grund für das Nichtreagieren des Fibrinogenrezeptors (keine Zunahme der FITC-Fibrinogenbindung, keine verstärkte Bindung des Fibrinogen-Antikörpers) war, wurde die Expression von P-Selektin auf den Plättchen untersucht. Dieses nur auf aktivierten Thrombozyten exprimierte Protein, sollte durch den CD62P-Antikörper erfasst werden. Bei diesem Aktivierungsnachweis funktionierte nur die Stimulation mit dem sehr starken Agonisten PMA. Die schwachen Agonisten Leptin und ADP zeigten keinen Aktivierungseffekt, d.h. es konnte keine vermehrte Bindung von CD62P nachgewiesen werden. Der Kontrollversuch mit humanen Plättchen (nicht dargestellt) funktionierte hingegen auch mit ADP. Um eine falsche Stimulationsdosis oder eine zu geringe/lange Stimulationszeit als Ursache für den nicht vorhandenen Leptineffekt bei Mäusen auszuschließen, wurden in dieser Studie (analog zu den Versuchen mit humanen Plättchen) verschiedene Leptindosen (1, 10 und 100 ng/ml) und Stimulationszeiten gewählt. Außerdem wurde speziell rekombinantes Maus-Leptin verwendet. Das Gesamtergebnis dieser Versuche ließ jedoch vermuten, dass

murine Plättchen im Vergleich zu humanen weniger sensitiv und deshalb schwerer aktivierbar sind. Leptin wäre somit ein zu schwacher Agonist. Dass Unterschiede hinsichtlich der Ansprechrate von Thrombozyten auf Leptin bestehen können, zeigte eine Studie aus dem Jahr 2005 (*Giandomenico et al. 2005*). Diese Erkenntnis basierte jedoch auf der Untersuchung humaner Thrombozyten. Die Expressionsdichte des Leptinrezeptors auf Thrombozyten sog. „Non-Responder“ war deutlich geringer im Vergleich zu der der „Responder“. Ligandenbindungs-Versuche unterstützten die Annahme unterschiedlicher Ansprechraten, indem festgestellt werden konnte, dass „Responder“ 2,5 Mal so viel Leptin binden können wie „Non-Responder“. Ob dieses Phänomen auch auf Mäuse bzw. unterschiedliche Maus-Genotypen zutrifft ist unbekannt.

Andererseits gibt es Studien, die Leptin einen aggregationsfördernden Effekt absprechen und behaupten, dass andere Faktoren für die verstärkte Plättchenaggregation bei hohen Leptinspiegeln verantwortlich sind (*Ozata et al. 2001*). Im Gegensatz zu den Ergebnissen schon genannter Arbeitsgruppen (z.B. *Nakata et al. 1999, Corsonello 2003, Dellas et al. 2007*), konnten Ozata et al. Leptin keinen verstärkenden Effekt auf die agonisteninduzierte Aggregation nachweisen, nicht einmal bei supraphysiologischen Leptindosen von 500 ng/ml. Mögliche Gründe für den nicht vorhandenen Leptineffekt bei dieser Studie könnten neben der oben erwähnten schlechten Ansprechrate bei „Non-Respondern“ auch eine zu starke basale Aktivierung der Plättchen gewesen sein. Diese würde die ohnehin relativ schwach ausgeprägte aggregationsfördernde Wirkung von Leptin verhindern. Die Analysen zur Expression von P-Selektin in unserer Studie zeigen, dass eine hohe basale Aktivierung nicht Ursache des fehlenden Ansprechens war.

Die Frage, warum die Stimulation der Thrombozyten mit Leptin einen verstärkenden Effekt auf die Adhäsion hat, durchflusszytometrisch aber keine verstärkte Fibrinogenbindung nachgewiesen werden konnte, lässt sich möglicherweise mit folgendem Ansatz erklären. Fibrinogen gibt es in verschiedenen Formen. Zum einen gibt es das „fixierte“ und zum anderen das „lösliche“ Fibrinogen. Die Adhäsionsversuche, durch die ein deutlicher Leptineffekt demonstriert werden konnte, wurden auf „fixiertem“ Fibrinogen vorgenommen. Die Durchflusszytometrie, mit der eine nach Leptinstimulaton verstärkte Bindung des Fibrinogens an den

Rezeptor misslang, wurde hingegen mit „löslichem“ Fibrinogen durchgeführt. Die Bindung an lösliches Fibrinogen setzt im Gegensatz zur Bindung an unbewegliches Fibrinogen eine Aktivierung des Rezeptors voraus (*Gibbins 2004*). Und da Leptin nur ein sehr schwacher Aktivator ist, reichte der Wirkeffekt hierfür möglicherweise nicht aus.

4.2 STAT3-Signaltransduktion in Plättchen

Bisherige Studien zur Signaltransduktion von Leptin konnten zeigen, dass STAT3 eine Art Schlüsselprotein ist und eine zentrale Rolle in der Regulierung der Nahrungsaufnahme im zentralen Nervensystem spielt (*Bates et al. 2003*). Auch die Signalweiterleitung über den thrombozytären Leptinrezeptor und die prothrombotischen Auswirkungen sind mittlerweile weitestgehend bekannt. Die Aktivierung von Jak2 spielt dabei eine zentrale Rolle. Zum einen folgt daraufhin die Phosphorylierung von PLC γ 2, PI3K und PKC. Diese Kaskade endet in der Aktivierung des Integrins α IIb β 3 und der damit verbundenen Zunahme der Fibrinogenbindung. Zum anderen wird über die Aktivierung des p38-MAP-Kinase-PLA2-Signalweges eine vermehrte Thromboxan-Bildung angeregt. Beide Wege resultieren in einer verstärkten Plättchenaggregation (*Dellas et al. 2007, Corsonello et al. 2005*). In Vorarbeiten wurde zudem herausgefunden, dass die Stimulation humaner Plättchen mit Leptin unter anderem zu einer Aktivierung / Phosphorylierung von STAT3 führt. Welche Auswirkung dies jedoch auf Thrombozyten hat, blieb bislang unklar und wurde somit Ziel der Untersuchungen dieser Arbeit. Da bei den mutierten ObRs/s-Mäusen das Tyrosin an der Stelle 1138 durch Serin ausgetauscht wurde, war anzunehmen, dass eine STAT3-Aktivierung durch Leptin nicht mehr möglich ist. Aufgrund dessen wurden Western-Blot-Analysen mit den Proteinlysaten der aus Vollblut isolierten Mausthrombozyten durchgeführt. Die Leptinstimulation erfolgte mit einer physiologischen Konzentration von 10 ng/ml und verschiedene Stimulationszeiten (2, 5, 10 min) wurden getestet. Die Western Blots ergaben zunächst, dass in den Plättchen beider Genotypen Jak2 zeitabhängig phosphoryliert wird. Da die Jak2-Phosphorylierung der STAT3-Aktivierung vorausgeht und unabhängig von dem Tyr1138 abläuft, war dieses Ergebnis auch das erwartete und bestätigte zudem noch das Ergebnis humaner Plättchenuntersuchungen (*Dellas et al. 2007*). Daraufhin wurde die STAT3-Aktivierung untersucht. Überraschenderweise zeigte sich auch hier eine zeitabhängige Phosphorylierung in beiden Genotypen. Wieder wurde nach zweiminütiger Leptinstimulation eine Zunahme der Aktivierung festgestellt. Im Gegensatz zur Jak2-Phosphorylierung blieb hier der Aktivierungsgrad nach längerer Leptinstimulation jedoch nicht gleich, sondern nahm bei WT-Mäusen bis zu der maximalen Stimulationszeit von 10 Minuten leicht zu. Auch in humanen

Plättchen nahm die Leptin-induzierte STAT3-Aktivierung bis zu einer Stimulationszeit von 10 min zu (*Dellas et al 2007*). Bei den ObRs/s-Mäusen hingegen zeigte sich eine zunehmende Aktivierung nur bis zu einer fünfminütigen Leptinstimulation. Nach 10 Minuten nahm die Phosphorylierung wieder ab. Insgesamt war die STAT3-Aktivierung in ObRs/s-Thrombozyten deutlich schwächer und verkürzt. Um ein methodenspezifisches Ergebnis auszuschließen, wurde die STAT3-Aktivierung noch zusätzlich in der Durchflusszytometrie untersucht. Auch hier ließ sich eine Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors in beiden Genotypen darstellen. Wieder schien die Aktivierung ausgeprägter bei WT-Mäusen. Diese Erkenntnisse legten die Vermutung nahe, dass Leptin zusätzlich über alternative Wege zu einer STAT3-Aktivierung führen könnte. Das deutlich schwächere STAT3-Aktivierungsergebnis ließ jedoch annehmen, dass dieser Alternativweg weniger effizient ist. Verschiedene Studien konnten zeigen, dass STAT3 auch unabhängig von Tyr1138 des Leptinrezeptors aktiviert werden kann, z.B. über Src-Kinasen, welche –ähnlich wie Jak2- an Tyr985 binden (z.B. *Yu et al. 1995, Cao et al. 1996, Leifheit-Nestler et al. 2010*). Die Leptinbindung an seinen Rezeptor induziert eine zeitabhängige Aktivierung von Jak2 und der Src-Kinase (*Heida et al. 2010*). Die Src-Kinase wiederum ist ein bekannter Aktivator von STAT3 (*Leifheit-Nestler et al. 2010*). Dieser Zusammenhang zwischen Leptin und Src-Kinasen könnte somit möglicherweise die beobachtete Tyr1138-unabhängige STAT3-Aktivierung in den Thrombozyten von ObRs/s-Mäusen erklären. Ob jedoch die zeitabhängige, Leptin-induzierte Src-Kinasen-Aktivierung auch für die zeitabhängige Verstärkung der STAT3-Phosphorylierung verantwortlich ist, konnte leider nicht untersucht werden.

4.3 STAT3 und Megakaryopoese

Der zu untersuchende Transkriptionsfaktor STAT3 spielt wichtige Rolle in der frühen Phase der Megakaryopoese. Dies geschieht vermutlich durch die Expansion megakaryotscher Vorläuferzellen (*Kirito et al. 2002*). Ob dieser Effekt auch Auswirkungen auf das „Endprodukt Thrombozyten“ hat, sollte mithilfe der Thrombozytenzählung ermittelt werden. Es resultierten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen. Auch lagen die jeweiligen Zahlen im Referenzbereich. Dennoch fanden sich hinsichtlich der Thrombozytenzahl sehr unterschiedliche Referenzwerte in der Literatur. Die Werte dieser Studie, erhoben durch eine manuelle Auszählung mithilfe einer Zählkammer nach Neubauer, bezogen sich auf den Referenzbereich von 300-1000 $\times 10^3/\mu\text{l}$ Blut (*McGarry et al. 2009*). Überwiegend findet man in der Literatur jedoch durchschnittliche Plättchenzahlen unbehandelter Mäuse, die über 1000 $\times 10^3/\mu\text{l}$ Blut liegen (z.B. *Levin und Ebbe 1994*, *Schmitt et al. 2001*). Die Erklärung für diese unterschiedlichen Angaben findet sich bei der Betrachtung der angewendeten Methoden zur Blutentnahme und Plättchenausählung (*Levin und Ebbe 1994*). Gängige Methoden zur Blutentnahme sind beispielsweise die Blutentnahme aus dem retroorbitalen Venenplexus oder die nach Phlebotomie aus der Schwanzvene. Die Auszählung erfolgt meistens maschinell. Hierbei ist jedoch zu beachten, dass murine Thrombozyten deutlich kleiner sind als humane und deshalb Ungenauigkeiten auftreten können. Abgesehen davon kann auch allein die Anwendung verschiedener Coulter unterschiedliche Ergebnisse erzielen. Dies kann man durch eine manuelle Auszählung der Plättchen (unter dem Lichtmikroskop) in einer Zählkammer nach Neubauer umgehen. Des Weiteren ist eine unbemerkte Thrombozytenaggregation eine mögliche weitere Fehlerquelle, die zu niedrigen Plättchenzahlen führen kann. Mit einem Blutausrich ließe sich dies kontrollieren bzw. ausschließen.

4.4 Limitationen der Studie

Einschränkungen dieser Studie betreffen das Fehlen einer Vergleichsgruppe adipöser Mäuse mit intakter Leptinrezeptorsignaltransduktion. Zusätzliche Plättchenuntersuchungen von db/db-Mäusen hätten Effekte, die nur durch Adipositas, nicht aber durch die Mutation der ObRs/s-Mäuse bedingt sind, aufdecken können. Da in dieser Studie jedoch keine gravierenden Unterschiede zwischen WT- und ObRs/s-Mäusen entdeckt werden konnten, schien die Hinzunahme von db/db-Mäusen nicht notwendig.

Ein weiterer Limitationspunkt dieser Studie ist das Fehlen von in-vivo-Analysen. Die Feststellung mutationsbedingter Unterschiede bei der Durchführung dieser meist sehr aufwendigen Experimente erachteten wir aufgrund der in-vitro-Datenlage jedoch als sehr gering und verzichteten deshalb darauf.

5 Zusammenfassung

Vorarbeiten zeigten, dass der Leptinrezeptor auch auf Thrombozyten exprimiert wird (*Nakata et al. 1999*) und dass Leptin dosisabhängig aggregationsfördernd wirkt. Aufbauend auf dieser Erkenntnis wurde in den letzten Jahren der Einfluss von Leptin auf die Thrombozyten genauer untersucht und zunächst festgestellt, dass nicht nur die Genese arterieller (z.B. *Konstantinides et al 2001a, Bodary et al. 2002*), sondern auch die venöser Thrombosen (*Konstantinides et al. 2004*) durch Leptin gefördert wird. Auch der Weg der intrazellulären Signaltransduktion, der für diese prothrombotischen Leptineffekte verantwortlich ist, wurde mittlerweile weitestgehend entschlüsselt. Das zentrale Signalmolekül ist hierbei Jak2. Über die Phosphorylierung unterschiedlicher Tyrosinreste im Leptinrezeptor und weiterer Signaltransduktionsproteine resultieren die vermehrte Bildung von Thromboxan und die verstärkte Aktivierung des Fibrinogenrezeptors (*Dellas et al. 2007*). Jak2 phosphoryliert außerdem den Transkriptionsfaktor STAT3. Welchen Effekt dies jedoch auf die Aktivierung bzw. Adhäsion von Blutplättchen hat, blieb bislang ungeklärt und war somit Ziel dieser Studie.

Zunächst erfolgten Untersuchungen der Hämatopoese und basale Thrombozytenfunktionstest, um grundlegende Unterschiede zwischen den WT-Mäusen und Mäusen, denen aufgrund einer Punktmutation in Tyr1138 des Leptinrezeptors die Fähigkeit zur Leptin-vermittelten STAT3-Aktivierung fehlte (ObRs/s-Mäusen), zu erfassen bzw. auszuschließen. Da keine signifikanten Unterschiede beim Vergleich der Blutbilder oder der Blutungszeit festgestellt wurden, kann davon ausgegangen werden, dass alle weiteren Versuche unter gleichen Ausgangsbedingungen abliefen. Als Teil der Aggregationskaskade wurde als nächstes die Adhäsion von Blutplättchen untersucht. Zusammenfassend zeigte sich hierbei, dass diese fibrinogenspezifisch ist und Leptin (stärkste Effekte bei einer Stimulation mit 10 ng/ml) bei beiden Genotypen zu einer Zunahme anhaftender Thrombozyten führt. Außerdem adhärten die unstimulierten Thrombozyten der ObRs/s-Mäuse im Vergleich zu denen der Wildtypen weniger stark. Ein signifikanter Unterschied ließ sich jedoch nur nach Auswertung absoluter Zahlen (*Abb. 8a*), nicht

jedoch prozentual in Bezug auf die unstimulierte WT-Kontrolle (*Abb. 11*) nachweisen. Die Vergrößerung der Plättchenfläche nach Leptinstimulation war in beiden Populationen erkennbar, jedoch nur bei den ObRs/s-Mäusen signifikant. Die Aggregationskaskade weiter verfolgend wurden anschließend Versuche zur Expression des Fibrinogenrezeptors, der Bindung löslichen Fibrinogens und der Plättchenaktivierung durchgeführt. Mithilfe durchflusszytometrischer Analysen gelangen sowohl der direkte (durch Verwendung eines spezifischen Fibrinogenrezeptorantikörpers) und der indirekte (über eine verstärkte Fibrinogenbindung) Nachweis der Rezeptoraktivierung. Die Ergebnisse der Adhäsionsversuche ließen annehmen, dass Leptin eine verstärkte Fibrinogenrezeptoraktivierung induziert. Diese Aktivierung erfolgte jedoch nur nach Stimulation mit ADP, während Leptin alleine oder in Kombination mit ADP keinen (zusätzlichen) Effekt zeigte. Da Leptin aber nur ein schwacher Agonist ist und auch schon bei humanen Thrombozyten nur geringe Effekte zeigte (*Dellas et al. 2007*), war dieses Ergebnis nicht überraschend. Die mit der Plättchenaktivierung einhergehende P-Selektin-Expression sollte durch die Verwendung eines spezifischen Antikörpers (CD62P) demonstriert werden. Auch hierbei erwies sich, wie erwartet, Leptins agonistische Wirkung als nicht ausreichend. Der schwache Plättchenagonist ADP führte ebenfalls zu keiner Aktivierungszunahme. Lediglich der sehr starke Agonist PMA konnte eine verstärkte Plättchenaktivierung hervorrufen. Betrachtet man isoliert diese Ergebnisse, hat Leptin demnach keinen Einfluss auf die Thrombozytenaktivierung in Mäusen, denn weder allein, noch additiv zu ADP, konnte ein positiver Effekt erzielt werden. Basierend auf den Ergebnissen der Adhäsionsversuche, ließe sich der nicht vorhandene Leptineffekt mit einer für diese Versuche zu schwachen agonistischen Wirkung oder einer im Vergleich zu humanen Plättchen höheren Aktivierungsschwelle der Mausthrombozyten erklären. Nachdem hinsichtlich Hämatopoese, Plättchenadhäsion und Expression des Fibrinogenrezeptors keine wesentlichen Unterschiede zwischen den Genotypen festgestellt werden konnten, wurde auf die Durchführung ursprünglich geplanter Aggregationsversuche verzichtet. Die für diese Experimente benötigte Menge an Mausblut hätte in keiner Relation zu dem erwarteten Ergebnis (kein Unterschied zwischen den Genotypen) gestanden.

Für die bisherigen untersuchten Vorgänge schien STAT3 nicht wichtig zu sein, aber

es blieb noch die Untersuchung der Signaltransduktion. Zunächst wurde in Thrombozyten beider Genotypen durch Western-Blot-Analysen die zu erwartende Jak2-Aktivierung nachgewiesen. Die Untersuchung des nächsten Aktivierungsschrittes ergab überraschenderweise, dass auch in den Thrombozyten der ObRs/s-Mäuse eine STAT3-Aktivierung stattfindet. Diese war im Vergleich zu den WT-Mäusen jedoch weniger ausgeprägt und verkürzt. Um ein methodenspezifisches Ergebnis auszuschließen, wurde die Durchflusszytometrie als weitere Methode zum Nachweis einer STAT3-Aktivierung gewählt. Auf diese Weise konnte die Leptin-induzierte STAT3-Phosphorylierung reproduziert werden. Dieser Nachweis führte letztendlich zu der Vermutung, dass die Leptin-induzierte STAT3-Aktivierung auch über alternative, Tyr1138-unabhängige, Wege ablaufen kann.

Zusammenfassend lässt sich durch die Ergebnisse dieser Studie schlussfolgern, dass die Leptinrezeptor-vermittelte Aktivierung des Transkriptionsfaktors STAT3 keine Auswirkung auf die Effekte von Leptin auf die Zahl und Funktion muriner Thrombozyten hat und keine herausragende Rolle für die Thrombozytenaktivierung und –adhäsion besitzt. Demnach ist die Leptin-induzierte STAT3-Aktivierung kein zusätzlicher Risikofaktor hinsichtlich der Thromboseentstehung.

Summary

Other studies have shown that the leptin receptor is also expressed on platelets (*Nakata et al. 1999*) and that leptin dose-dependent promotes platelet aggregation. According to these findings there have been many investigations of leptin and its influence to platelets. It was found out that leptin promotes both arterial (z.B. *Konstantinides et al. 2001a, Bodary et al. 2002*) and venous thrombosis (*Konstantinides et al. 2004*). Even the way of intracellular signal transduction, which is responsible for the prothrombotic effects of leptin, is almost decoded. The central signalling molecule is Jak2. Phosphorylation of leptin receptor's different tyrosine residues and other signal transduction proteins leads to thromboxane generation and increases activation of fibrinogen receptor (*Dellas et al. 2007*). Furthermore the transcription factor STAT3 is phosphorylated by Jak2. At least it remained to be answered whether STAT3 has an effect to activation respectively adhesion of blood platelets. That was the aim of this study.

At the beginning there have been investigations of hematopoiesis and platelet function to exclude basic differences between wild type mice and mice, which are based on a point mutation in tyrosine residue 1138 of the leptin receptor, unable to do a leptin-induced STAT3-activation. Because there were no significant differences regarding to blood count or bleeding time we had the same requirements for the following experiments. As a part of the aggregation cascade platelet adhesion was investigated next. In summary it could be shown that adhesion is fibrinogen-specific and leptin (strongest effect with 10 ng/ml) in both genotypes led to an increase of adhesion to immobilized fibrinogen. Furthermore unstimulated platelets of ObRs/s-mice were less adherend in comparison to wild type platelets. A leptin-induced increase in platelet surface area could be demonstrated in both populations, but only significant in ObRs/s mice. To pursue the aggregation cascade, experiments concerning the expression of $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$, binding of soluble fibrinogen an platelet activation followed. Using flow cytometry analysis the direct (using a specific fibrinogen receptor antibody) and indirect (about an increase of fibrinogen binding) activation of fibrinogen receptor were detectable. These results assumed that leptin induces an increase of fibrinogen receptor activation. But this activation only appeared after stimulation with ADP. Leptin alone or leptin combined with ADP had no (additional) effect. This result did not really surprise because it was already known

that leptin is just a weak agonist which even showed in human platelets only little effects (*Dellas et al. 2007*). The P-selectin-expression, which goes along with platelet activation, should be demonstrated by using a specific antibody (CD62P). Once again leptin alone had no effect. Only the very strong agonist pma generated an increase of platelet activation. Just observing these results leptin has no influence on platelet activation in mice. Based on the results of adhesion experiments there are two possible explanations for the lack of leptin effect on platelet activation. For instance leptin`s agonistic effect could be too weak for this experiment or mice platelets could have a higher threshold of activation than human platelets.

Because there were no essential differences concerning hematopoiesis, platelet adhesion and expression of fibrinogen receptor between both genotypes, the aggregation experiments were cancelled. The expected results (no differences) would be out of all proportion to the amount of blood we needed for these experiments.

So far STAT3 did not seem to be important for the investigated process but at least examination of signal transduction was left. At the beginning the expected Jak2 activation could be detected by using western blot analysis. The investigation of the next activation step surprisingly showed that even in ObRs/s mice there is STAT3 activation, which was in comparison to the wildtype mice less distinctive and shorter. To exclude a method specific result, the flow cytometry was chosen as another method. The leptin-induced STAT3 activation could be reproduced. This detection led to the assumption that leptin-induced STAT3 activation runs out an alternative, tyrosine 1138-independent way, as well.

In conclusion, the results of this study declare that the leptin receptor-induced STAT3 activation does not have any consequences of leptin`s effects regarding the amount and function of murine platelets and does not play an outstanding role for platelet activation and adhesion. So leptin-induced STAT3 activation does not seem to be another risk factor for thrombosis formation.

6 Abkürzungsverzeichnis

ACD	<u>A</u> cid- <u>C</u> itrate- <u>D</u> extrose
A. dest.	<u>A</u> qua <u>d</u> estillata, destilliertes Wasser
ADP	<u>A</u> denosin <u>d</u> iphosphat
AgRP	<u>A</u> gouti- <u>r</u> elated <u>p</u> eptide
APS	<u>A</u> mmonium <u>p</u> ersulfat
ATP	<u>A</u> denosin <u>t</u> riphosphat
BCA	<u>B</u> icinchoninic <u>a</u> cid
BMI	<u>B</u> ody <u>M</u> ass <u>I</u> ndex
BSA	<u>b</u> ovines <u>S</u> erum- <u>A</u> lbumin
CD	<u>C</u> luster of <u>d</u> ifferentiation
CRP	<u>C</u> - <u>r</u> eaktives <u>P</u> rotein
<i>db</i>	Leptinrezeptor (kodiert durch das <i>Diabetes</i> -Gen)
DMSO	<u>D</u> imethylsulf <u>o</u> xid
EDTA	<u>E</u> thylendiamintetra <u>a</u> acetat
ERK	<u>E</u> xtracellular signal <u>r</u> egulated <u>k</u> inases
FITC	<u>F</u> luorescein <u>i</u> sothi <u>c</u> yanat
GAPDH	<u>G</u> lyceraldehyd- 3- <u>P</u> hosphat- <u>D</u> ehydrogenase
GP	<u>G</u> lykoprotein
HCl	Salzsäure
HEPES	4-(2- <u>h</u> ydroxy <u>e</u> thyl)-1-piperazine <u>e</u> thanesulfonic acid
Jak2	<u>J</u> anus- <u>K</u> inase <u>2</u>
Ko	Kontrolle
L1/10/100	<u>L</u> eptin 1/10/10 ng/ml
LAMP1/2	<u>L</u> ysosomal- <u>a</u> ssociated <u>m</u> embrane <u>p</u> rotein
MAPK	<u>M</u> itogen- <u>a</u> ctivated <u>p</u> rotein <u>k</u> inase
α -MSH	α - <u>m</u> elanozyten <u>s</u> timulierendes- <u>H</u> ormon
NPY	<u>N</u> europeptide- <u>Y</u>
Ob, <i>ob</i>	Leptin, Produkt des <i>obesity</i> -Gens
Ob-Ra, b, c, d, e, f	Leptinrezeptor, verschiedene Isoformen
osc/min	<u>O</u> scillations per <u>m</u> inute (Schwankungen pro Minute)

PAF	platelet activating factor
PAI-1	Plasminogenaktivatorinhibitor-1
PBS	Phosphate-buffered saline
PDGF	Platelet-Derived-Growth-Factor
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
PGE	Prostaglandin E
PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PLA2	Phospholipase A2
PLC γ 2	Phospholipase C γ 2
PMA	phorbol 12-myristate 13-acetate
PMSF	Phenylmethansulfonyl-Fluorid
POMC	Proopiomelanocortin
PRP	plättchenreiches Plasma
PSGL-1	P-Selektin-Glykoprotein-Ligand-1
rpm	rounds per minute
s	Leptinrezeptor kodiert durch das Serin-Allel
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SEM	Standard error of the mean, Standardfehler
SHP-2	SH-containing tyrosine phosphatase 2
SOCS3	Suppressor of cytokine signaling 3
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3
TBS/TBS-T	Tris-buffered Saline/Tris-buffered Saline + Tween
TF	Tissue Factor
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
tPA	Tissue-Type Plasminogen Activator
TPO	Thrombopoetin
TXA2	Thromboxan A2
Tyr	Tyrosin
uPA	Urokinase Plasminogen Activator
vWF	von-Willebrand-Faktor
WT	Wildtyp

7 Literaturverzeichnis

Asch E, Podack E (1990): Vitronectin binds to activated human platelets and plays a role in platelet aggregation. *J Clin Invest* 85, 1372-1378

Bado A, Levasseur S, Attoub A, Kermorgant S, Laigneau JP, Bortoluzzi MN, Moizo L, Lehy T, Guerre-Millo M, Le Marchand-Brustel Y, Lewin MJ (1998): The stomach is a source of leptin. *Nature* 394, 790-793

Banks AS, Davis SM, Bate SH, Myer MG Jr (2000): Activation of downstream signals by the long form of the leptin receptor. *J Biol Chem* 275, 14563-14572

Banks WA (2004): The many lives of leptin. *Peptides* 25, 331-338

Bates SH, Stearns WH, Dundon TA, Schubert M, Tso AWK, Wang Y, Banks AS, Lavery HJ, Haq AK, Maratos-Flier E, Neel BG, Schwartz MW, Myers MG Jr (2003): STAT3 signaling is required for leptin regulation of energy balance but not reproduction. *Nature* 421, 856-859

Beumer S, Heijnen HF, Ijsseldijk MJ, Orlando E, de Groot PG, Sixma JJ (1995): Platelet adhesion to fibronectin in flow: the importance of von Willebrand factor and glycoprotein Ib. *Blood* 86, 3452-3460

Bjørbaek C, Kahn BB (2004): Leptin signaling in the central nervous system and the periphery. *Recent Prog Horm Res* 59, 305-331

Bjørbaek C, Lavery HJ, Bates SH, Olson RK, Davis SM, Flier JS, Myers MG Jr (2000): SOCS3 mediates feedback inhibition of the leptin receptor via Tyr985. *J Biol Chem* 275 (51), 40649-40657

Bjørbaek C, Buchholz RM, Davis SM, Bates SH, Pierroz DD, Gu H, Neel BG, Myers

MG Jr, Flier JS (2001): Divergent roles of SHP-2 in ERK activation by leptin receptors. *J Biol Chem* 276, 4747-4755

Bodary PF, Westrick RJ, Wickenheiser KJ, Shen Y, Eitzman DT (2002): Effect of leptin on arterial thrombosis following injury in mice. *JAMA* 287, 1706-1709

Bouloumie A, Marumo T, Lafontan M, Busse R, (1999): Leptin induces oxidative stress in human endothelial cells. *FASEB J* 13, 1231-1238

Boulpaep EL: Blood; in: *Medical Physiology*; hrsg. v. Boron WF, Boulpaep EL; Saunders/Elsevier, Philadelphia 2009, 448-466

Bruun JM, Lihn AS, Verdich C, Pedersen SB, Toubro S, Astrup A, Richelsen B (2003): Regulation of adiponectin by adipose tissue-derived cytokines: in vivo and in vitro investigations in humans, *Am J Physiol Endocrinol Metab* 285, E527-E533

Campfield LA, Smith FJ, Guisez Y, Devos R, Burn P (1995): Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. *Science* 269, 546-549

Cao X, Tay A, Guy GR, Tan YH (1996): Activation and association of Stat3 with Src in v-Src-transformed cell lines. *Mol Cell Biol* 16, 1595-1603

Chen K, Li F, Li J, Cai H, Strom S, Bisello A, Kelley DE, Friedman-Einat M, Skibinski GA, McCrory MA, Szalai AJ, Zhao AZ (2006): Induction of leptin resistance through direct interaction of C-reactive protein with leptin. *Nat Med* 12, 425-432

Chua SC Jr, Chung WK, Wu-Peng XS, Zhang Y, Liu SM, Tartaglia L, Leibel RL (1996): Phenotypes of mouse diabetes and rat fatty due to mutations in the OB (Leptin) receptor. *Science* 271, 994-996

Cioffi JA, Shafer AW, Zupancic TJ, Smith-Gbur J, Mikhail A, Platika D, Snodgrass HR (1996): Novel B219/OB receptor isoforms: possible role of leptin in hematopoiesis and reproduction. *Nat Med* 2, 585-589

Corsonello A, Perticone F, Malara A, De Domenico D, Loddo S, Buemi M, Ientile R, Corica F (2003): Leptin-dependent platelet aggregation in healthy, overweight and obese subjects. *Int J Obes Relat Metab Disord* 27, 566-573

Corsonello A, Malara A, De Domenico D, Perticone F, Valenti A, Buemi M, Ientile R, Corica F (2004): Identifying pathways involved in leptin-dependent aggregation of human platelets. *Int J Obes Relat Metab Disord* 28, 979-984

Couillard C, Lamarche B, Mauriège P, Cantin B, Dagenais GR, Moorjani S, Lupien PJ, Després JP (1998): Leptinemia is not a risk factor for ischemic heart disease in men. Prospective results from the Quebec Cardiovascular Study. *Diabetes Care* 21, 782-786

Deetjen P, Speckmann EJ, Hescheler J: Blutstillung, Blutgerinnung; in: Physiologie; hrsg. v. Deetjen P, Speckmann EJ, Hescheler J unter Mitarbeit namhafter Autoren; Urban & Fischer bei Elsevier, München-Jena 2005, 339-377

Dellas C, Schäfer K, Rohm IK, Lankeit M, Leifheit M, Loskutoff DJ, Hasenfuss G, Konstantinides SV (2007): Leptin signalling and leptin-mediated activation of human platelets: importance of JAK2 and the phospholipases Cgamma2 and A2. *Thromb Haemost* 98, 1063-1071

Dellas C, Schäfer K, Rohm I, Lankeit M, Ellrott T, Faustin V, Riggert J, Hasenfuss G, Konstantinides S (2008): Absence of leptin resistance in platelets from morbidly obese individuals may contribute to the increased thrombosis risk in obesity. *Thromb Haemost* 100, 1123-1129

Dieterle C, Landgraf R (2006): Folgeerkrankungen und Komplikationen der Adipositas. *Internist* 47, 141-149

Dunn SL, Björnholm M, Bates SH, Chen Z, Seifert M, Myers MG Jr (2005): Feedback inhibition of leptin receptor/Jak2 signaling via Tyr1138 of the leptin receptor and suppressor of cytokine signaling 3. *Mol Endocrinol* 19, 925-938

Eitzman DT, Ginsburg D (1997): Of mice and men. The function of plasminogen activator inhibitors (PAIs) in vivo. *Adv Exp Med Biol* 425, 131-141

Elias CF, Aschkenasi C, Lee C, Kelly J, Ahima RS, Bjørbaek C, Flier JS, Saper CB, Elmquist JK (1999): Leptin differentially regulates NPY and POMC neurons projecting to the lateral hypothalamic area. *Neuron* 23, 775-786

Elmquist JK, Maratos-Flier E, Saper CB, Flier JS (1998): Unraveling the central nervous system pathways underlying responses to leptin. *Nat Neurosci* 1, 445-449

Elmquist JK, Elias CF, Saper CB (1999): From lesions to leptin: hypothalamic control of food intake and body weight. *Neuron* 22, 221-232

Esmon CT (2004): Interactions between the innate immune and blood coagulation systems. *Trends Immunol* 25, 536-542

Everds NE: Hematology of the Laboratory Mouse; in: *The Mouse in Biomedical Research, Volume 3: Normative Biology, Husbandry and Models*; hrsg. v. Fox JG, Barthold SW u.a.; Academic Press, New York 2006, 133-170

Farrehi PM, Ozaki CK, Carmeliet P, Fay WP (1998): Regulation of arterial thrombolysis by plasminogen activator inhibitor-1 in mice. *Circulation* 97, 153-160

Friedman JM, Halaas JL (1998): Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* 395, 763-770

Frühbeck G (2006): Intracellular signalling pathways activated by leptin. *Biochem J* 393, 7-20

Frühbeck G, Jebb SA, Prentice AM (1998): Leptin: physiology and pathophysiology. *Clin Physiol* 18, 399-419

Giandomenico G, Dellas C, Czekay RP, Koschnick S, Loskutoff DJ (2005): The leptin receptor system of human platelets. *J Thromb Haemost* 3, 1042-1049

Gibbins JM: Ligand-Binding Assays; in: *Platelets and Megakaryocytes – Volume 2 Perspectives and Techniques*; hrsg. V. Gibbins JM, Mahaut-Smith MO; Humana Press, Totowa 2004, 125-139

Godyna S, Diaz-Ricart M, Argraves WS (1996): Fibulin-1 mediates platelet adhesion via a bridge of fibrinogen. *Blood* 88, 2569-2577

Halaas JL, Gajiwala KS, Maffei M, Cohen SL, Chait BT, Rabinowitz D, Lallone RL, Burley SK, Friedman JM (1995): Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science* 269, 543-546

Heida NM, Leifheit-Nestler M, Schroeter MR, Müller JP, Cheng IF, Henkel S, Limbourg A, Limbourg FP, Alves F, Quigley JP (2010): Leptin enhances the potency of circulating angiogenic cells via src kinase and integrin (alpha)vbeta5: implications for angiogenesis in human obesity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 30, 200-206

Hileman SM, Pierroz DD, Masuzaki H, Bjørbaek C, El-Haschimi K, Banks WA, Flier JS (2002): Characterization of short isoforms of the leptin receptor in rat cerebral microvessels and of brain uptake of leptin in mouse models of obesity. *Endocrinology* 143, 775-783

Hindriks G, Ijsseldijk MJW, Sonnenberg A, Sixma JJ, de Groot PG (1992): Platelet adhesion to laminin: role of Ca²⁺ and Mg²⁺ ions, shear rate, and platelet membrane glycoproteins. *Blood* 79, 928-935

Holtmann MH, Neurath MF (2004): Differential TNF-signaling in chronic inflammatory disorders. *Curr Mol Med* 4, 439-444

Hu E, Liang P, Spiegelman BM (1996): AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. *J Biol Chem* 271, 10697-10703

Ioffe E, Moon B, Connolly E, Friedman JM (1998): Abnormal regulation of the leptin gene in the pathogenesis of obesity. *Proc Natl Acad Sci* 95, 11852-11857

Junqueira LC, Carneiro J, Kelley RO: Blutplättchen; in: *Histologie*; hrsg. v. Gratzl M unter Mitarbeit namhafter Autoren; Springer, Berlin-Heidelberg-New York 2002, 205-209

Jurk K, Clemetson KJ, de Groot PG, Brodde MF, Steiner M, Savion N, Varon D, Sixma JJ, van Aken H, Kehrel BE (2003): Thrombospondin-1 mediates platelet adhesion at high shear via glycoprotein Ib (GPIb): an alternative/backup mechanism to von Willebrand factor. *FASEB J* 17, 1490-1492

Kato H, Kashiwagi H, Shiraga M, Tadokoro S, Kamae T, Ujiie H, Honda S, Miyata S, Ijiri Y, Yamamoto J (2006): Adiponectin acts as an endogenous antithrombotic factor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26, 224-230

Kirito K, Osawa M, Morita H, Shimizu R, Yamamoto M, Oda A, Fujita H, Tanaka M, Nakajima K, Miura Y (2002): A functional role of Stat3 in in vivo megakaryopoiesis. *Blood* 99, 3220-3227

Kloek C, Haq AK, Dunn SL, Lavery HJ, Banks AS, Myers MG Jr (2002): Regulation of Jak Kinases by Intracellular Leptin Receptor Sequences. *J Biol Chem* 277, 41547-41555

Knudson JD, Dincer UD, Zhang C, Swafford AN Jr, Koshida R, Picchi A, Focardi M, Dick GM, Tune JD (2005): Leptin receptors are expressed in coronary arteries, and hyperleptinemia causes significant coronary endothelial dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 289, H48-H56

Konstantinides S, Schäfer K, Koschnick S, Loskutoff DJ (2001a): Leptin-dependent platelet aggregation and arterial thrombosis suggests a mechanism for atherothrombotic disease in obesity. *J Clin Invest* 108, 1533-3302

Konstantinides S, Schäfer K, Thinnies T, Loskutoff DJ (2001b): Plasminogen activator inhibitor-1 and its cofactor vitronectin stabilize arterial thrombi after vascular injury in mice. *Circulation* 103, 576-583

Konstantinides S, Schäfer K, Neels JG, Dellas C, Loskutoff DJ (2004): Inhibition of endogenous leptin protects mice from arterial and venous thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24, 2196-2201

Lee GH, Proenca R, Montez JM, Carroll KM, Darvishzadeh JG, Lee JI, Friedman JM (1996): Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. *Nature* 379, 632-635

Leifheit-Nestler M, Conrad G, Heida NM, Limbourg A, Limbourg FP, Seidler T, Schroeter MR, Hasenfuss G, Konstantinides S, Schäfer K (2010): Overexpression of integrin $\beta 5$ enhances the paracrine properties of circulating angiogenic cells via Src Kinase-mediated activation of STAT3. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 30, 1398-1406

Levin J, Ebbe S (1994): Why are recently published platelet counts in normal mice so low? *Blood* 83, 3829-3831

Linß W, Fanghänel J: Histologie, 1. Auflage; De Gruyter, Berlin 1998

Maffei M, Halaas J, Ravussin E, Pratley RE, Lee GH, Zhang Y, Fei H, Kim S, Lallone R, Ranganathan S, et al. (1995): Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nat Med* 1, 1155-1161

Masuzaki H, Ogawa Y, Sagawa N, Hosoda K, Matsumoto T, Mise H, Nishimura H, Yoshimasa Y, Tanaka I, Mori T, Nakao K (1997): Nonadipose tissue production of leptin: leptin as a novel placenta-derived hormone in humans. *Nat Med* 3, 1029-1033

McGarry MP, Protheroe CA, Lee JJ: Counting Red Blood Cells, Platelets, and Viable Nucleated White Blood Cells; in: *Mouse hematology: A laboratory manual*, hrsg. v. Inglis J; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor 2009, 5-23

Morange PE, Alessi MC, Verdier M, Casanova D, Magalon G, Juhan-Vague I (1999): PAI-1 produced ex vivo by human adipose tissue is relevant to PAI-1 blood level. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19, 1361-1365

Morash B, Li A, Murphy PR, Wilkinson M, Ur E (1999): Leptin gene expression in the brain and pituitary gland. *Endocrinology* 140, 5995-5998

Münzberg H, Björnholm M, Bates SH, Myer MG Jr (2005): Leptin receptor action and mechanisms of leptin resistance. *Cell Mol Life Sci* 62, 642-652

Myers MG Jr (2004): Leptin receptor signaling and the regulation of the mammalian physiology. *Recent Prog Horm Res* 59, 287-304

Nakata M, Yada T, Soejima N, Maruyama I (1999): Leptin promotes aggregation of human platelets via the long form of its receptor. *Diabetes* 48, 426-429

Ozata M, Avcu F, Durmus O, Yilmaz I, Ozdemir IC, Yalcin A (2001): Leptin does not play a major role in platelet aggregation in obesity and leptin deficiency. *Obes Res* 9, 627-630

Qasim A, Mehta NN, Tadesse MG, Wolfe ML, Rhodes T, Girman C, Reilly MP (2008): Adipokines, insulin resistance, and coronary artery calcification. *J Am Coll Cardiol* 52, 231-236

Quinn M: Platelet Physiology; in: *Platelet Function – Assessment, Diagnosis, and Treatment*; hrsg. v. Quinn M, Fitzgerald D; Humana Press, Totowa 2005, 3-20

Rana JS, Nieuwdrop M, Jukema JW, Kastelein JJ (2007): Cardiovascular metabolic syndrome-an interplay of obesity, inflammation, diabetes and coronary heart disease. *Diabetes Obes Metab* 9, 218-238

Romo GM, Dong JF, Schade AJ, Gardiner EE, Kansas GS, Li CQ, McIntire LV,

Berndt MC, Lopez JA (1999): The glycoprotein Ib-IX-V complex is a platelet counterreceptor for P-selectin. *J Exp Med* 190, 803-814

Ruggeri ZM (2002): Platelets in atherothrombosis. *Nat Med* 8, 1227-1234

Ruggeri ZM, Mendolicchio L (2007): Adhesion Mechanisms in Platelet Function. *Circ Res* 100, 1673-1685

Samad F, Loskutoff DJ (1996a): Tissue distribution and regulation of plasminogen activator inhibitor-1 in obese mice. *Mol Med* 2, 568-582

Samad F, Yamamoto K, Loskutoff DJ (1996b): Distribution and regulation of plasminogen activator inhibitor-1 in murine adipose tissue in vivo. Induction by tumor necrosis factor-alpha and lipopolysaccharide (LPS). *J Clin Invest* 97, 37-46

Sasaki A, Yasukawa H, Suzuki A, Kamizono S, Syoda T, Kinjyo I, Sasaki M, Johnston JA, Yoshimura A (1999): Cytokine-inducible SH2 protein-3 (CIS-3/SOCS3) inhibits Janus tyrosine kinase by binding through the N-terminal kinase inhibitory region as well as SH2 domain. *Genes Cells* 4, 339-351

Savage B, Saldivar E, Ruggeri ZM (1996): Initiation of platelet adhesion by arrest onto fibrinogen or translocation on von Willebrand factor. *Cell* 84, 289-297

Savage B, Almus-Jacobs F, Ruggeri ZM (1998): Specific synergy of multiple substrate-receptor interactions in platelet thrombus formation under flow. *Cell* 94, 657-666

Schäfer K, Halle M, Goeschen C, Dellas C, Pynn M, Loskutoff DJ, Konstantinides S (2004): Leptin promotes vascular remodeling and neointimal growth in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24, 112-117

Schmitt A, Guichard J, Massé JM, Debili N, Cramer EM (2001): Of mice and men: Comparison of the ultrastructure of megakaryocytes and platelets. *Exp Hematol* 29, 1295-1302

Schwartz MW, Woods SC, Porte D Jr, Seeley RJ, Baskin DG (2000): Central nervous system control of food intake. *Nature* 404, 661-671

Shattil SJ, Kashiwagi H, Pampori N (1998): Integrin signalling: the platelet paradigm. *Blood* 91, 2645-2657

Söderberg S, Ahrén B, Jansson JH, Johnson O, Hallmans G, Asplund K, Olsson T (1999): Leptin is associated with increased risk of myocardial infarction. *J Intern Med* 246, 409-418

Tartaglia LA (1997): The leptin receptor. *J Biol Chem* 272, 6093-6096

Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, Deng N, Culpepper J, Devos R, Richards GJ, Campfield LA, Clark FT, Deeds J (1995): Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell* 83, 1263-1271

Vassilev AO, Lorenz DR, Tibbles HE, Uckun FM (2002): Role of the leukemia-associated transcription factor STAT3 in platelet physiology. *Leuk Lymphoma* 43, 1461-1467

Wagner DD, Burger BC (2003): Platelets in inflammation and thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23, 2131-2137

Walkowiak B, Kęsy A, Michalec L (1997): Microplate reader - A convenient tool in studies of blood coagulation. *Thromb Res* 87, 95-103

Wallace AM, McMahon AD, Packard CJ, Kelly A, Shepherd J, Gaw A, Sattar N (2001): Plasma leptin and the risk of cardiovascular disease in the West of Scotland Coronary Prevention Study (WOSCOPS). *Circulation* 104, 3052-3056

Wang MY, Zhou YT, Newgard CB, Unger RH (1998): A novel leptin receptor isoform in rat. *FEBS Lett.* 392, 87-90

White DW, Kuropatwinski KK, Devos R, Baumann H, Tartaglia LA (1997): Leptin receptor (OB-R) signaling. Cytoplasmic domain mutational analysis and evidence for receptor homo-oligomerization. *J Biol Chem* 272, 4065-4071

Wolk R, Berger P, Lennon RJ, Brillakis ES, Johnson BD, Somers VK (2004): Plasma leptin and prognosis in patients with established coronary atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol* 44, 1819-1824

Xia Z, Wong T, Liu Q, Kasirer-Friede A, Brown E, Frojmovic MM (1996): Optimally functional fluorescein isothiocyanate-labelled fibrinogen for quantitative studies of binding to activated platelets and platelet aggregation. *Br J Haematol* 93, 204-214

Yu CL, Meyer DJ, Campbell GS, Lerner AC, Carter-Su C, Schwartz J, Jove R (1995): Enhanced DNA-binding activity of a Stat3-related protein in cells transformed by the Src oncoprotein. *Science* 269, 81-81

Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM (1994): Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372, 425-432

Lebenslauf

Persönliche Daten

Am 30. Dezember 1983 wurde ich, Kristina Friederike Stroebe, als einzige Tochter der Krankenschwester Ellengard Stroebe, geb. Bach, und des Arztes Dr. med. Manfred Stroebe in Bremen geboren. Nachdem ich in Bremen aufgewachsen bin und die Schulzeit dort erlebte, absolvierte ich mein Studium in Göttingen. Nun lebe ich wieder in Bremen, bin ledig und habe keine Kinder.

Schulische Ausbildung

Meine schulische Ausbildung begann 1990 mit der Einschulung in die Grundschule an der Horner Heerstraße in Bremen. Von 1994-2000 verbrachte ich meine Schuljahre im Schulzentrum an der Ronzelenstraße in Bremen. Nach einer zweijährigen Orientierungsstufe, besuchte ich anschließend (ab 1996) das dortige Gymnasium. Im Jahr 2000 musste ich die Schule wechseln, weil das vorherige Schulzentrum nur eine gymnasiale Mittelstufe besaß. Die Oberstufe absolvierte ich aufgrund dessen am Gymnasium Horn in Bremen. Dort erlangte ich 2003 nach bestandener Abiturprüfung (Notendurchschnitt 1,8) die Allgemeine Hochschulreife.

Studium

Im Oktober 2003 begann ich an der Georg-August-Universität Göttingen mit dem Studium der Humanmedizin. Im Zuge dieser Ausbildung famulierte ich in der radiologischen Gemeinschaftspraxis Dres. Krtsch/Klengel/Samse/Leinweber in Göttingen, in der Abteilung für Innere Medizin des Klinikums Bremen-Mitte (Medizin III Nephrologie und Medizin II Gastroenterologie), sowie auf den Cook Inseln (seit 1965 Selbstverwaltung in freier Assoziierung mit Neuseeland), wo ich hauptsächlich in der Gynäkologie des Rarotonga Hospitals tätig war. Im Herbst 2007 begann ich mit Experimenten für meine Dissertation in der Arbeitsgruppe Vaskuläre Biologie und Atheroskleroseforschung in der Abteilung Kardiologie und Pneumologie bei Frau Prof. Dr. med. Katrin Schäfer an der Medizinischen Fakultät der Georg-August-Universität zu Göttingen. Die praktische Tätigkeit für diese Dissertation beendete ich im März 2010.

Das erste Tertial meines Praktischen Jahres absolvierte ich ab August 2008 in der Hautklinik der Universitätsmedizin Göttingen. Von Dezember 2008 bis März 2009 (zweites Tertial) ging ich nach Bremen in die Abteilung für Innere Medizin des Klinikums Bremen-Mitte. Das letzte Tertial (Ende März-Juli 2009) arbeitete ich in der allgemeinchirurgischen Abteilung des Krankenhaus Neu-Mariahilf in Göttingen.

Im November 2009 beendete ich nach bestandenen Examensprüfungen mein Studium (Notendurchschnitt 2,66) und erlangte im Dezember die Approbation als Ärztin. Seit Juni 2010 arbeite ich als Assistenzärztin in der Inneren Medizin im Krankenhaus St. Joseph Stift in Bremen.