

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

**Untersuchung des Einflusses von Leptin auf die Thrombozytenfunktion sowie Analyse der
Leptin-vermittelten Signalkaskade in Thrombozyten**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Ilonka Rohm

aus

Marburg (Lahn)

Göttingen 2014

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

I. Berichterstatterin: PD Dr. med. C. Dellas

II. Berichterstatter/in: Prof. Dr. Tobias Legler

III. Berichterstatter/in:

Tag der mündlichen Prüfung: 17.03.2015

Inhalt

Abkürzungsverzeichnis	1
Abbildungsverzeichnis	3
Tabellenverzeichnis	4
1 Einleitung	5
1.1 Epidemiologie der Adipositas	5
1.2 Das Adipokin Leptin und seine physiologische Funktion	7
1.2.1 Gewichtsregulatorische Wirkung	7
1.2.2 Periphere Wirkungen des Leptins	8
1.3 Leptin und Atherogenese	10
1.4 Leptinrezeptor und Leptinsignaling	12
1.5 Leptinresistenz	15
1.6 Thrombozyten	16
1.7 Aufgabenstellung	18
2 Material und Methoden	19
2.1 Materialien	19
2.1.1 Chemische Materialien	19
2.1.2 Antikörper	21
2.1.3 Utensilien und Geräte	22
2.2 Puffer und Lösungen	23
2.2.1 TBST	23
2.2.2 2x Sample Buffer (Ladepuffer)	23
2.2.3 2x Lysepuffer (für WB-Lysate)	23
2.2.4 1x Lysepuffer (für IP)	23
2.2.5 4x Laemmli-Puffer	23
2.2.6 Elektrophoresepuffer	24
2.2.7 Transferpuffer	24
2.2.8 Tyrode-Puffer	24
2.2.9 Walsh-Puffer	24
2.2.10 Permeabilisierungspuffer	24

2.3 Allgemeines zum Arbeiten mit Thrombozyten	25
2.4 Gewinnung von plättchenreichem Plasma (PRP)	25
2.5 Bestimmung der Thrombozytenzahl	25
2.6 Western Blot (Protein-Blot)	26
2.6.1 Herstellung von gewaschenen Thrombozyten.....	26
2.6.2 Stimulation sowie Inhibierung der Thrombozyten	26
2.6.3 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	27
2.6.4 Proteintransfer	28
2.6.5 Ponceau-S-Färbung	28
2.6.6 Blocken freier Bindungsstellen	28
2.6.7 Immunodetektion von spezifischen Proteinen.....	29
2.7 Immunpräzipitation	29
2.8 Durchflusszytometrie	30
2.9 Immunfluoreszenz-Färbung	31
2.10 Thrombozytenaggregationsphotometrie.....	32
2.11 Thromboxan B ₂ -ELISA.....	34
2.12 Software zum Erstellen von Diagrammen, Grafiken und Statistik.....	35
3 Ergebnisse	36
3.1 Untersuchung des Leptinsignalwegs in Thrombozyten	36
3.1.1 Leptin-induzierte Phosphorylierung von Tyrosinen.....	36
3.1.2 Leptin-induzierte Phosphorylierung der Signalmoleküle JAK2 und STAT3.....	37
3.1.3 Leptin-induzierte Phosphorylierung der Phosphatidylinositol-3-Kinase und Proteinkinase B (PKB, AKT) in Thrombozyten	41
3.1.4 Leptin-induzierte Phosphorylierung der Phospholipase C γ 2 und Proteinkinase C (PLC γ 2, PKC) in Thrombozyten	43
3.1.5 Leptin-induzierte Aktivierung des p38-MAP-Kinase-Phospholipase A ₂ (PLA ₂)- Signalwegs.....	45
3.1.6 Leptin-induzierte Phosphorylierung der MAP-Kinase p42/44 in Thrombozyten	47
3.2 Aktivierung des Fibrinogenrezeptors und Adhäsion der Thrombozyten auf immobilisiertem Fibrinogen	49
3.2.1 Leptin-induzierte Aktivierung des thrombozytären Fibrinogenrezeptors $\alpha_{IIb}\beta_3$	49
3.2.2 Leptin-induzierte Thrombozytenadhäsion an immobilisiertem Fibrinogen	50

3.2.3	Leptin-induzierte Adhäsion unter Verwendung des JAK2-Inhibitors AG490	53
3.2.4	Leptin-induzierte Adhäsion unter Verwendung des PI3K-Inhibitors Ly294002	54
3.2.5	Leptin-induzierte Adhäsion unter Verwendung des PLC-Inhibitors U73122	55
3.3	Leptin-vermittelte Thrombozytenaggregation	56
3.4	Thromboxanfreisetzung	59
4	Diskussion	61
4.1	Einfluss von Leptin auf humane Thrombozyten	61
4.2	Ausblicke: Mögliche therapeutische Ansätze zur Reduktion des kardiovaskulären Risikos bei Adipositas.....	66
5	Zusammenfassung.....	69
	Literaturverzeichnis.....	70

Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosin-5-diphosphat
Akt	PKB, Proteinkinase B
BSA	bovines Serumalbumin
cAMP	zyklisches Adenosin-5'-monophosphat
D	Dalton
DAG	Diazylglycerin
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	epithelial growth factor
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ERK	extracellular signal-regulated kinase
F-Aktin	filamentäres (polymerisiertes) Aktin
G-Aktin	monomeres Aktin
Gp	Glykoprotein
G-Protein	Guanylnukleotid-bindendes Protein
GPRP	H-Gly-Pro-Arg-Pro-OH
GRGDSP	H-Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-Pro-OH
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HRP	horseradish peroxidase
IL	Interleukin
IP	Immunpräzipitation
IP ₃	Inositol-1,4,5-Trisphosphat
JAK	Januskinase
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MEK	MAPK oder ERK-Kinase
Ob-R	Leptinrezeptor
OD	optische Dichte bei spezifischer Wellenlänge (Angabe im Index)
P	Phosphat
PAI-1	plasminogen-activator-inhibitor-1
PAP4	platelet-aggregations-profiler 4
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd

PI3-Kinase	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PLA	Phospholipase
PKA	Proteinkinase A
PKB	Proteinkinase B
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PPP	plättchenarmes Plasma (<i>platelet poor plasma</i>)
PRP	plättchenreiches Plasma (<i>platelet rich plasma</i>)
rpm	Umdrehungen per Minute (<i>rotations per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
Stat	signal transducers and activators of transcription
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
TF	tissue factor
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TXA ₂	Thromboxan A ₂
TXB ₂	Thromboxan B ₂
Tyr	Tyrosin
U	unit
UV	ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
vWF	Von-Willebrand-Faktor
WB	Western Blot
w/v	Masse pro Volumen

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Signalwege, die unter Einfluss von Leptin angestoßen werden	15
Abb. 2	Beispiel für eine Aggregationskurve eines Thrombozytenspenders	34
Abb. 3	Zeitabhängige Leptin-induzierte Phosphorylierung von Tyrosinkinasen und Suppression dieses Effekts durch den Tyrosinkinaseinhibitor Genistein	37
Abb. 4	Leptin-induzierte zeit- und dosisabhängige Aktivierung der Januskinase 2	39
Abb. 5	Phosphorylierung von STAT3 durch Leptinstimulation von Thrombozyten.....	41
Abb. 6	Leptin-induzierte Phosphorylierung von P85 α , der regulatorischen Untereinheit der PI3K	42
Abb. 7	Leptin-induzierte Phosphorylierung der Proteinkinase B/Akt	43
Abb. 8	Leptin-induzierte PLC γ 2-Phosphorylierung	44
Abb. 9	Leptin-induzierte Phosphorylierung der Proteinkinase C	44
Abb. 10	Leptin-induzierte Phosphorylierung von p38	46
Abb. 11	Leptin-induzierte Phosphorylierung der Phospholipase A ₂	46
Abb. 12	Leptin-induzierte p42/44-MAPK-Phosphorylierung	48
Abb. 13	Leptin-induzierte Aktivierung des Integrins $\alpha_{IIb}\beta_3$	50
Abb. 14	Leptin-induzierte Thrombozytenadhäsion an Fibrinogen	52
Abb. 15	Effekt des JAK2-Inhibitors AG490 auf den stimulatorischen Effekt Leptins auf die Adhäsion von Thrombozyten an immobilisiertem Fibrinogen	53
Abb. 16	Wirkung des PI3K-Inhibitors Ly294002 auf stimulatorischen Effekt Leptins auf die Adhäsion von Thrombozyten an immobilisiertem Fibrinogen	54
Abb. 17	Einfluss des PLC-Inhibitors U73122 auf die Leptin-induzierte Thrombozytenad- häsion an immobilisiertem Fibrinogen	55
Abb. 18	Statistische Darstellung der durch Leptin verursachten Verstärkung einer durch ADP Initiierten Aggregation	57
Abb. 19	Wirkung des JAK2-Inhibitors AG490 auf die Leptin-induzierte Thrombozytenaggregation	57
Abb. 20	Wirkung des PI3K-Inhibitors Ly294002 auf die Leptin-vermittelte Thrombozytenaggregation	58
Abb. 21	Wirkung des p38 MAPK-Inhibitors SB203580 auf die Leptin-induzierte Thrombozytenaggregation	58
Abb. 22	Einfluss von Leptin auf die thrombozytäre Thromboxan-B ₂ -Synthese	60
Abb. 23	Übersicht über die Leptin-vermittelte Signalkaskade in humanen Thrombozyten	66

Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Sammel- und Trenngel für Western Blot	27
--------	---	----

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie der Adipositas

In den letzten Jahren hat sich die Anzahl der fettleibigen Personen in den westlichen Ländern drastisch erhöht. Nach Definition der Weltgesundheitsorganisation (WHO) spricht man bei Erwachsenen von Normalgewicht bei einem Körpermasseindex, dem sog. Body-Mass-Index (BMI), zwischen 18,5 und 25 kg/m². Übergewicht besteht bei einem BMI ≥ 25 kg/m² und Fettsucht oder Adipositas bei einem BMI ≥ 30 kg/m². Von dem Problem der steigenden Adipositasprävalenz sind sowohl Erwachsene als auch Kinder und Jugendliche betroffen (Romero et al. 2012, Ng et al. 2014). Das Robert Koch-Institut (RKI) hat für Deutschland Untersuchungen zur Gesundheit Erwachsener in der DEGS-Studie (Göbwald et al. 2012) durchgeführt. Waren in den Jahren 1997-1999 noch 18,9 % der Männer adipös, so ergab die Studie in den Jahren 2008-2011 einen Anteil von rund 23,3 %. Bei Frauen ist der Anteil von 22,5% auf 23,9 % gestiegen. Zusammenfassend hat die Prävalenz von Adipositas gegenüber den Jahren 1997-1999 deutlich zugenommen. In den USA haben in den Jahren 2007/2008 bereits 32,2% der Männer und 35,5% der Frauen ab einem Alter von 20 Jahren einen BMI von mindestens 30 kg/m² (Flegal et al. 2010).

Obwohl in neueren epidemiologischen Studien gezeigt werden konnte, dass bei Übergewicht kein erhöhtes, wenn nicht gar ein reduziertes Morbiditäts- und Mortalitätsrisiko existiert (Lenz et al. 2009), ist für Adipositas eine signifikante Steigerung der Morbidität sowie der Mortalität nachgewiesen worden. Aus diesem Grund werden erhebliche Anstrengungen unternommen, durch Prävention und Therapie von Adipositas die Entwicklung von Folgeerkrankungen zu vermeiden. Vor allem das kardiovaskuläre System wird entscheidend durch die Fettleibigkeit beeinflusst: Bei adipösen Personen kann beispielsweise ein erhöhtes Auftreten von arterieller Hypertension (Tanamas et al. 2014) und Herzinsuffizienz (Ndumele 2014) beobachtet werden. Adipositas ist ein unabhängiger Risikofaktor für die Entwicklung kardiovaskulärer Erkrankungen wie beispielsweise der koronaren Herzerkrankung (Logue et al. 2011) und für das Auftreten thrombotischer Ereignisse (Torbicki et al. 2008). Diese Einflussnahme erklärt die stark erhöhte Prävalenz von Herzinfarkt, Schlaganfall und Lungenembolie bei adipösen Menschen (Labounty et al. 2012). Darüber hinaus begünstigt Adipositas die Entwicklung respiratorischer Erkrankungen, z.B. des obstruktiven Schlafapnoesyndroms sowie des M. Pickwick (Morris et al. 2008). Adipositas führt zudem zum verstärkten Auftreten einer Dyslipidämie sowie eines Diabetes mellitus Typ II (Hu et al. 2014), woraus deutlich wird, dass auch das endokrine System betroffen ist. Verschiedene Tumorerkrankungen, wie beispielsweise gastrointestinale Tumoren und

das Endometriumkarzinom der Frau sind ebenfalls mit Adipositas assoziiert (Bardou et al. 2013, Reeves et al. 2011).

Da kardiovaskuläre Erkrankungen die häufigste Todesursache in Industrieländern darstellen, erklären diese Zusammenhänge die mit Adipositas assoziierte signifikant gesteigerte Mortalität (Flegal et al. 2013). Die Mortalität von Personen mit einem BMI ≥ 30 kg/m² ist dreimal so hoch wie die von Personen mit einem BMI unter 25 kg/m². Abgesehen von den Konsequenzen für die Gesundheit des Einzelnen bedeuten die mit Adipositas assoziierten Erkrankungen eine enorme finanzielle Belastung für das Gesundheitssystem (Finkelstein et al. 2004). Diese Gesundheitskosten werden allein in den USA auf jährlich 100 Milliarden US-Dollar geschätzt (Daniels 2006) und machen 2-7% der gesamten Gesundheitskosten in den Industrieländern aus (Kopelman 2000).

Zunächst ging man davon aus, dass die Hyperinsulinämie zusammen mit der Insulinresistenz für sämtliche proatherogenen Effekte des metabolischen Syndroms und der Adipositas verantwortlich sei. Das Fettgewebe wurde lediglich als bloßer Speicher für Energie, Vitamine und Wasser angesehen. Heutzutage betrachtet man das Fettgewebe als ein dynamisches, neuroendokrines Organ. Es konnte gezeigt werden, dass der Adipozyt eine metabolisch aktive Zelle ist, die verschiedene Zytokin-ähnliche Hormone wie Leptin, Adiponectin und Resistin produziert und sezerniert (Ahima und Osei 2008).

Bereits in den 60er Jahren kam die Idee eines zirkulierenden Schlankheitsfaktors auf, dessen Ursprungsort jedoch unbekannt war. In Parabiose-Versuchen an genetisch adipösen Mäusen, den sogenannten *ob/ob*-Mäusen (von *obesity* [engl.] = Adipositas), konnte gezeigt werden (Coleman und Hummel 1969 und Hausberger 1959), dass im zentralen Nervensystem Signale aus der Peripherie empfangen werden, die zur Regulation des Körpergewichts führen. Sobald der Kreislauf dieser Mäuse mit dem gesunder Kontrolltiere verbunden wurde, kam es zu einer Gewichtsabnahme der adipösen Tiere. Aus dieser Beobachtung wurde die Existenz eines zirkulierenden Schlankheitsfaktors postuliert. Mittlerweile ist bekannt, dass in *ob/ob*-Mäusen aufgrund einer Genmutation eine Leptindefizienz vorliegt, sodass Leptin seine gewichtsregulierende Funktion nicht ausüben kann (siehe Kap. 1.2.1).

Das Fettgewebe übt über „Adipokine“ einen direkten Einfluss auf verschiedenste Regulationsmechanismen bei vaskulären, metabolischen und immunologischen Prozessen aus (Ahima und Osei 2008). Die Adipokine gewannen zunehmend an Bedeutung als Mediatoren zwischen Adipositas und kardiovaskulären Erkrankungen. Die übermäßige Zunahme des Fettgewebes stellt über diese Einflussnahme einen proinflammatorischen und proatherosklerotischen Zustand dar (Mangge et al. 2010).

1.2 Das Adipokin Leptin und seine physiologische Funktion

Leptin (leptos, griech.: dünn) konnte 1994 mittels *positional cloning* des *ob*-Gens identifiziert werden (Zhang et al. 1994). Es handelt sich um ein 16-kDa großes, aus 167 Aminosäuren bestehendes Polypeptid-Hormon, das vom weißen Fettgewebe produziert und sezerniert wird, ein sog. Adipokin. Leptin ist nicht nur für die Regulation des Körpergewichts verantwortlich, sondern besitzt pleiotrope Wirkungen auf verschiedene Organe, die im Weiteren näher erläutert werden.

1.2.1 Gewichtsregulatorische Wirkung

Leptin kontrolliert das Körpergewicht und den Appetit durch seine zentralnervöse Einflussnahme auf den Hypothalamus (Leininger 2011). Der Serumleptinspiegel korreliert direkt mit der vorhandenen Masse an weißem Fettgewebe (Gomez-Ambrosi et al. 2006). Bei Vorhandensein einer ausreichenden Menge an Fettgewebe vermittelt das Adipokin ein negatives Feedback an den Hypothalamus und führt in diesem Falle zu einer Reduktion der Nahrungsaufnahme und folglich des Körpergewichts. Beim Vorhandensein von wenig Fettgewebe gibt es im Blut wenig zirkulierendes Leptin und der Appetit sowie folglich die Nahrungsaufnahme steigen – dies wiederum führt zu einer Steigerung des Körpergewichts.

Diese Erkenntnisse lassen sich aus Beobachtungen aus dem Tiermodell ableiten: Bei Wildtyp-Mäusen mit adäquater Leptinproduktion funktioniert der beschriebene Regulationsmechanismus. Bei *ob/ob*-Mäusen liegt aufgrund einer Genmutation eine Leptindefizienz vor, was bei Zunahme der Fettgewebssmasse zu einem fehlenden negativen Feedback an den Hypothalamus führt - und als Folge hiervon zu krankhafter Adipositas (Zhang et al. 1994). Bei *db/db* Mäusen liegt eine Mutation im OB-Rb-Rezeptor vor – der langen Form des Leptinrezeptors, die verstärkt im Hypothalamus exprimiert wird (Chen et al. 1996). Dies führt zur Funktionslosigkeit dieser Leptinrezeptor-Isoform und resultiert durch komplette Leptinresistenz ebenfalls in einem Verlust des negativen Feedbacks. Auch diese Veränderung führt zu morbid Adipositas (Ghilardi et al. 1996).

Sowohl leptindefiziente (*ob/ob*) als auch leptinresistente (*db/db*) Mäuse werden hyperphagisch und haben einen reduzierten Energieverbrauch. Dies führt in beiden Fällen zu morbid Adipositas sowie Diabetes mellitus. Eine Substitution von Leptin führt bei *ob/ob*-Mäusen, nicht aber *db/db*-Mäusen zu einer Normalisierung der Stoffwechselstörung. Dies lässt schlussfolgern, dass Leptin eine gewichtsregulierende Wirkung via hypothalamischem Leptinrezeptor entfaltet (Halaas et al. 1995).

1.2.2 Periphere Wirkungen des Leptins

Leptinrezeptoren werden nicht nur im Hypothalamus exprimiert - sondern auch in multiplen peripheren Geweben (Fei et al. 1997). Diese Beobachtung legt nahe, dass Leptin neben seiner zentralnervösen Funktion auch auf Zellen peripherer Gewebe wirkt. Beim Menschen sind zwar nur wenige Fälle von Leptinrezeptor-Genmutationen oder erblicher Leptinresistenz beschrieben (Mazen et al. 2011), der aus homozygoten rezessiven Mutationen resultierende Phänotyp lässt jedoch bereits die Vielfältigkeit der Leptin-vermittelten Wirkungen erahnen. Betroffene Kinder zeichnen sich durch Hyperphagie, morbide Adipositas und Hyperinsulinämie aus (Montague et al. 1997). Ältere Betroffene zeigten einen Hypogonadismus, sie entwickelten kein Brustdrüsengewebe, keine bis wenig Schambehaarung und kaum Behaarung im Bereich der Achseln (Clement et al. 1998). Betroffene Frauen hatten darüber hinaus überdurchschnittlich lange eine Amenorrhoe. Darüber hinaus leiden die Patienten unter einer thyroidalen Dysfunktion mit latenter Hypothyreose (Clement et al. 1998). Verschiedene Forschungsarbeiten konnten diese klinische Beobachtung bestätigen und zeigen, dass das Adipokin in verschiedene Regulationsmechanismen involviert ist.

Der Nachweis der Expression des Leptinrezeptors auf Adipozyten weckte das Interesse zu erforschen, welche direkte Wirkung das Adipokin auf Fettzellen entfalten kann. Hierfür wurden *ex vivo* Experimente am weißen Fettgewebe von *ZDF* (*Zucker fatty diabetic*)-Ratten durchgeführt. Bei adipösen *ZDF*-Ratten liegt eine homozygote Punktmutation im *fa*-Gen vor. Eine Nukleotidsubstitution in Position 880 führt zu einem Austausch von Glutamin auf Prolin (AS 269) im extrazellulären Anteil des Leptinrezeptors, was zu einer funktionellen Leptinresistenz führt (Phillips et al. 1996, Iida et al. 1996). Bei schlanken *ZDF*-Ratten handelt es sich entweder um homozygote Wildtyp-Ratten (+/+) oder heterozygote Tiere (+/*fa*). Eine *Ex-Vivo*-Zufuhr von Leptin bewirkte am weißen Fettgewebe von schlanken *ZDF*-Ratten, nicht aber an dem Fettgewebe von adipösen *ZDF*-Ratten (*fa/fa*) einen signifikanten Anstieg der Lipolyse (Wang et al. 1999). Dies bestätigt, dass Leptin nicht nur mittels zentralnervöser Wirkung, sondern auch über eine direkte Leptinrezeptor-vermittelte Wirkung auf das Fettgewebe zu einer Gewichtsreduktion führt.

Leptin beeinflusst die Wundheilung. Die Beobachtung, dass *ob/ob*-Mäuse eine beeinträchtigte Wundheilung zeigen, führte zu der Frage, welchen Einfluss Leptin auf den Heilungsprozess von Verletzungen ausübt. Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass sowohl eine systemische als auch topische Substitution von Leptin in *ob/ob*-Mäuse eine Beschleunigung der Wundheilung bewirkt. Bei *db/db*-Mäusen wurde eine Beschleunigung der Wundheilung nicht festgestellt. Diese unterschiedliche Auswirkung lässt auf eine rezeptorvermittelte Wundheilungs-beschleunigende Wirkung des Leptins schließen (Ring et al. 2000).

Neben seiner Wirkung auf den Fettstoffwechsel spielt Leptin ebenfalls eine entscheidende Rolle in der Glukosehomöostase inklusive Insulinsekretion und -sensitivität: Der Leptinrezeptor OB-Rb konnte auf pankreatischen Betazellen nachgewiesen werden (Kieffer et al. 1996, Emilsson et al. 1997). Es konnte ein inhibitorischer Effekt von Leptin auf die Insulinsekretion festgestellt werden im Sinne eines „adipoinsulären Feedbacks“. Bei *In-Vivo*-Experimenten mit Ratten ließ sich durch einen physiologischen Anstieg des Serumleptins eine Reduktion der Insulinsekretion beobachten (Cases et al. 2001). Auch beim Menschen supprimiert Leptin die humane Insulinsekretion (Kieffer und Habener 2000). Zusätzlich zur Einflussnahme auf die Insulinsekretion wird durch Leptin ebenfalls die Insulinsensitivität verändert: Eine Leptinbehandlung von Leberzellen, auf denen ebenfalls Ob-Rb nachgewiesen wurde, verschlechtert *in vitro* die Insulinsensitivität der Zellen (Cohen et al. 1996).

Zusammengefasst beeinflusst Leptin die Insulinsensitivität und Glukosehomöostase über verschiedene Mechanismen: Durch Kontrollieren der Energiebalance und des Körperfetts (Körperfettleibigkeit führt zu Insulinresistenz), durch eine direkte Wirkung auf verschiedene periphere Zielgewebe und weiterhin durch einen komplexen Adipositas-unabhängigen Mechanismus über eine vom zentralen Nervensystem kontrollierte Glukosefreisetzung (Kamohara et al. 1997).

Auch das reproduktive System wird durch Leptin beeinflusst. Weibliche *ob/ob*-Mäuse sind infertil, wenn sie nicht mit Leptin therapiert werden. Erst sobald man diesen Mäusen Leptin substituiert, können sie trächtig werden und Nachkommen gebären (Chehab et al. 1996). Darüber hinaus führt selbst bei weiblichen Wildtyp-Mäusen eine Leptingabe zu einer beschleunigten Ausprägung der Reproduktionsfunktion (Chehab et al. 1997).

Adipogenese und Angiogenese stehen in einem engen Zusammenhang während der Zunahme der Fettgewebsmenge. Daher ist die Angiogenese ein interessanter Aspekt zur Betrachtung der Wirkung von Leptin. Die lange Form des Leptinrezeptors, OB-Rb, wird in Endothelzellen exprimiert. *In-Vitro*-sowie *In-Vivo*-Studien konnten zeigen, dass Leptin angiogenetische Effekte hat (Bouloumie et al. 1998). Im Tiermodell induziert Leptin *in vivo* eine Neovaskularisation in Corneas von Wildtyp-Ratten, nicht jedoch in Corneas von *fa/fa ZDF*-Ratten, bei denen eine funktionelle Leptinresistenz besteht (Sierra-Honigman et al. 1998). Diese Beobachtung spricht für einen rezeptorvermittelten, angiogenesefördernden Effekt des Adipokins.

Neben den beschriebenen Einflussnahmen auf verschiedene Stoffwechselfunktionen wirkt Leptin auch auf unterschiedliche Bereiche, die zur Atherogenese und Thrombogenese beitragen. Diese sollen im folgenden Abschnitt beleuchtet werden.

1.3 Leptin und Atherogenese

In klinischen Studien kam der Eindruck eines Zusammenhangs zwischen einer Hyperleptinämie und dem erhöhten Vorkommen von Atherosklerose auf. In der *West of Scotland Coronary Prevention Study*, einer prospektiven Studie zur Überprüfung der Effektivität von Pravastatin in der Primärprävention der ischämischen Herzerkrankung bei Männern mit moderater Hypercholesterinämie, zeigte sich eine Korrelation zwischen dem Serumleptinspiegel und dem Vorhandensein einer koronaren Herzerkrankung (Wallace et al. 2001). Es existiert weiterhin eine Assoziation zwischen der Serumleptinkonzentration und akuten kardiovaskulären Ereignissen wie Apoplex (Zeng et al. 2014) und Myokardinfarkt (Soderberg et al. 1999, Wolk et al. 2004, Wallerstedt et al. 2004). Ein erhöhter Plasmaleptinwert führt unabhängig vom BMI zu einem erhöhten Risiko für das Auftreten von kardiovaskulären Ereignissen (Ren 2004).

Auch im Tiermodell bestätigt sich die Beeinflussung der Atherogenese durch das Adipokin Leptin: Schäfer et al. (Schäfer et al. 2004) stellten ein Tiermodell auf, bei dem mit Eisenchlorid eine Verletzung der A. carotis induziert wurde und anschließend die Reaktion von Neointima und Media betrachtet wurden. *Wildtyp*-Mäuse, bei denen durch eine *high-fat*-Diät eine Hyperleptinämie bewirkt wurde, zeigten eine signifikant beschleunigte Verdickung von Neointima und Media nach der Gefäßverletzung. Im Gegensatz hierzu wiesen *ob/ob*-Mäuse mit genetisch determinierter Leptindefizienz, die einer *high-fat*-Diät ausgesetzt waren, keine gesteigerte Läsionsprogression auf. Dies legt nahe, dass die verstärkte Verdickung der Neointima und Media durch Leptin induziert ist. Dieses Tiermodell bestätigt die klinischen Beobachtungen einer Wirkung des Leptins auf die Atherosklerose und spricht für einen direkten Leptineffekt auf die Gefäßwand.

Zunächst wurde die Atherosklerose als ein rein degenerativer Vorgang mit passiver Akkumulation von Lipiden in die Gefäßwand verstanden. Heutzutage ist jedoch bekannt, dass die Atherosklerose eine chronisch inflammatorische Erkrankung der arteriellen Gefäßwand darstellt. Auch Leptin scheint an diesem entzündlichen Prozess beteiligt zu sein. Durch Herbeiführen eines proinflammatorischen Status trägt Leptin zur Atherogenese bei. Leptin korreliert direkt mit dem Serum-CRP - sowohl in Normalgewichtigen als auch in adipösen Personen (Shamsuzzaman et al. 2004, van Dielen et al. 2001). Eine Gewichtsabnahme wiederum führt zu einer Leptinreduktion sowie einem CRP-Abfall (Monzillo et al. 2003). Diese Beobachtungen sprechen für eine Korrelation des CRP mit dem Leptinspiegel und für einen Zusammenhang zwischen Hyperleptinämie und Inflammation.

Im Rahmen des Entzündungsprozesses der Atherogenese migrieren Monozyten in die Intima und differenzieren dort u. a. in Makrophagen, nehmen Lipoproteine auf und entwickeln sich zu Schaumzellen. Leptin bewirkt die Sekretion der atherogenen Lipoproteinlipase aus Makrophagen *in vitro*

(Maingrette und Renier 2003). Diese führt zu einer Akkumulation von Lipoproteinen im Subendothelialraum und ist somit proatherogen. Leptin erhöht darüber hinaus die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen durch T-Effektorzellen. Dies könnte zumindest teilweise die vorliegende beeinträchtigte T-Zell-Immunantwort bei *ob/ob*- und *db/db*-Mäusen erklären (Lord et al. 1998). Es ist plausibel, dass Leptin zu dem proinflammatorischen Status bei Adipositas beiträgt - und damit zur Atheroskleroseentwicklung.

Leptin führt neben seiner proinflammatorischen Wirkung zu einer Erhöhung des Sympthotonus. Dies wiederum führt zum Anstieg des Blutdrucks. (Hall et al. 2010). Auf der anderen Seite übt Leptin auch einen lokalen blutdrucksenkenden Effekt durch eine lokale NO-Freisetzung durch das Endothel aus (Fruhbeck 1999 und Lembo et al. 2000). Seine Einflussnahme auf den Vasotonus ist ein weiterer Mechanismus, über den Leptin an der Atherogenese beteiligt ist.

Außer seiner Wirkung auf verschiedene Entzündungszellen und ihre Mediatoren wirkt Leptin auch auf Thrombozyten und entfaltet hierüber eine prothrombotische Wirkung. Versuche im Tiermodell zeigen, dass Thromben, die von arteriellen Läsionen in leptindefizienten *ob/ob*-Mäusen stammen, im Vergleich zu denen von Kontroll-Tieren instabil sind. Sowohl in *ob/ob*- als auch *db/db*-Mäusen mit genetisch determiniertem fehlendem Leptineffekt ist die Thrombozytenaggregation im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen abgeschwächt. Die Beobachtung, dass eine Leptinsubstitution die Thrombenbildung und Thrombenaggregation in leptindefizienten *ob/ob*-Mäusen normalisiert, nicht aber in leptinresistenten *db/db*-Mäusen (Konstantinides et al. 2001), lässt auf die prothrombotische Wirkung von Leptin schließen. Auch bei humanen Thrombozyten konnte die prothrombotische Wirkung des Adipokins nachgewiesen werden: Leptin verstärkt eine Agonisten-induzierte Aggregation von humanen Thrombozyten: Nakata et al. (Nakata et al. 1999) zeigten erstmalig, dass die lange Form des Leptinrezeptors auch auf humanen Thrombozyten exprimiert wird. In Versuchen dieser Arbeitsgruppe, in denen die Thrombozytenaggregation beobachtet wurde, führte eine Leptinvorbehandlung von Thrombozyten zu einer Förderung der ADP-induzierten Aggregation - während sowohl die Leptinstimulation als auch die ADP-Zugabe in den gleichen Konzentrationen einzeln ineffektiv waren. Diese Ergebnisse wurden durch Giandomenico et al. 2005 und Corsonello et al. 2003 bestätigt.

Neben seinem Effekt auf Thrombozyten wirkt Leptin prothrombotisch, indem es das Fibrinolyse-System zugunsten überschießender Gerinnung verändert. Der Serumleptinspiegel korreliert mit der Plasmakonzentration von PAI-1 (*plasminogen activator inhibitor-1*), einem endogenen Inhibitor der Fibrinolyse (De Mitrio et al. 1999). Ebenfalls korreliert der Leptinspiegel invers mit den Gerinnungsinhibitoren Protein C und *tissue factor pathway inhibitor* (TFPI) (Malyszko et al. 2002).

Aus diesen Ausführungen wird ersichtlich, dass Leptin über verschiedenste Regulationsmechanismen multiple periphere Wirkungen mit atherogenem Potential entfaltet.

1.4 Leptinrezeptor und Leptinsignaling

Leptin entfaltet seine Wirkung auf Zielzellen via Zellmembranrezeptoren. Leptinrezeptoren gehören zur Familie der Zytokinrezeptoren Klasse I. Bei diesem Rezeptortyp wird eine Signaltransduktion ligandeninduziert über eine Phosphorylierung von löslichen Rezeptortyrosinkinasen bewirkt – beispielsweise von Tyrosinkinasen, die zur Januskinasenfamilie gehören (JAK). Diese Kinasen phosphorylieren ihrerseits erneut Tyrosinreste am Rezeptor, die als *docking sites* für SH2-Domänen enthaltende *downstream*-Signalmoleküle dienen. JAKs führen somit über eine Phosphorylierung des Rezeptors zur leptinvermittelten Aktivierung von *signal transducers and activators of transcription* (STAT) (Ghilardi und Skoda 1997, Vaisse et al. 1996). Phosphorylierte STAT-Proteine translozieren anschließend in den Nukleus, wo sie die Expression von bestimmten Genen regulieren.

Es existieren mindestens 6 Isoformen des Leptinrezeptors (Ob-Ra bis Ob-Rf) (Tartaglia 1997), alle werden durch ein einzelnes Gen codiert und die Rezeptorheterogenität resultiert aus alternativem Splicing eines mRNA-Moleküls (Ahima und Osei 2004). Somit verfügen alle Leptinrezeptoren über die gleiche extrazelluläre Domäne (800 AS) und (mit Ausnahme von Ob-Re) transmembrane Domäne (34 AS), unterscheiden sich jedoch in der Länge der intrazellulären Domäne (Anubhuti und Arora 2008).

Ob-Rb ist die "lange" Isoform des Leptinrezeptors, da er die längste intrazelluläre Domäne besitzt. Er wird stark exprimiert im Hypothalamus und ist für die Regulation der Nahrungsaufnahme verantwortlich. Ob-Rb enthält als einzige Isoform intrazelluläre Abschnitte, die für die Aktivierung des JAK-STAT-Signalwegs notwendig sind.

Die kurzen Isoformen des Leptinrezeptors werden in vielen peripheren Geweben exprimiert und sind im Gegensatz zu Ob-Rb nicht in der Lage, den JAK-STAT-Signalweg zu aktivieren. Sie können jedoch über die *mitogen activated protein kinase* (MAPK) und Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) Signale übermitteln. Ob-Ra wird im Gehirn, vor allem im Choroidplexus und in dortigen Mikrogefäßen, exprimiert (Tartaglia et al. 1995, Mercer et al. 1996, Bjorbaek et al. 1998). Dort spielt er möglicherweise eine Rolle in der Leptinaufnahme aus dem Liquor und dem rezeptorvermittelten Transport von Leptin über die Blut-Hirn-Schranke in das Gehirn (Tartaglia et al. 1995, Hileman et al. 2000).

Ob-Re besitzt keine intrazelluläre und transmembrane Domäne und wird als löslicher, zirkulierender Leptinrezeptor bezeichnet. Er scheint die biologische Aktivität von Leptin zu modulieren (Ge et al. 2002).

Am Leptinrezeptor Ob-Rb gibt es zwei zytoplasmatische Tyrosine (Aminosäuren-Position 985 und 1138 (muriner Ob-Rb) bzw. 1141 (humaner Ob-Rb)), die entscheidende Funktionen in der Leptin-induzierten Signalvermittlung besitzen. Die Bindung von Leptin an Ob-Rb führt zu einer Aktivierung der Rezeptor-assoziierten JAK2-Tyrosinkinase, was eine Autophosphorylierung von JAK2 sowie eine Phosphorylierung von Tyr985 und Tyr1138 bzw. Tyr1141 in der intrazellulären Domäne des Leptinrezeptors bewirkt (Kloek et al. 2002, White et al. 1997, Banks et al. 2000). Die Phosphorylierung von Tyr1138 bzw. Tyr1141 ist essentiell für eine Tyrosinphosphorylierung von STAT, sie führt zur Rekrutierung des Transkriptionsfaktors STAT3 zum OB-Rb-JAK2-Komplex und nachfolgend zu einer Translokation von STAT3 in den Nukleus, wo es aktivierend auf Gene wirkt, die wichtig für den Energiehaushalt sind (Banks et al. 2000). Interessanterweise führt eine Aktivierung des Leptinrezeptors neben der Phosphorylierung von STAT3 auch zur Aktivierung von STAT5 und STAT6, nicht aber von STAT1, STAT2 oder STAT4 (Sweeney 2002). STAT3 aktiviert unter anderem die Transkription des Neuropeptids POMC (Proopimelanocortin) und des Signalinginhibitors SOCS3 (*suppressor of cytokine signalling*) (Banks et al. 2000, Munzberg et al. 2003 und Bates et al. 2003). SOCS3 bindet an Tyr985 des Leptinrezeptors, um eine Inhibierung des vom Leptinrezeptor auf STAT3 vermittelten Signals im Sinne eines negativen Feedbacks zu bewirken (Bjorbaek et al. 2001). SOCS3 bindet ebenfalls an den Ob-Rb-JAK2-Komplex (Dunn et al. 2005).

Wie bereits erwähnt, können die kurzen Isoformen des Rezeptors zwar nicht die JAK-STAT-Signalkaskade stimulieren, sie vermitteln jedoch ihre Signale über andere Mediatoren, wie z.B. die PI3K. Eine Leptin-induzierte Aktivierung von JAK2 führt via Phosphorylierung von Insulinrezeptorsubstraten (IRS) 1/2 zu einer Stimulation der PI3K durch deren Assoziation mit der regulatorischen Untereinheit p85. Die Aktivierung von Insulinrezeptorsubstraten ist eine Schnittstelle zwischen dem Insulin- und Leptin-Signalweg (Zhao et al. 2000). PI3K und PI3K Produkte stimulieren typischer Weise Proteinkinasen wie z.B. die Proteinkinase B (Akt) und Proteinkinase C (PKC) (Sweeney 2002).

Ein weiterer Signalweg, der über eine Aktivierung des Leptinrezeptors angestoßen wird, ist der ERK/MAPK-Signalweg. Eine Phosphorylierung von Tyr985 rekrutiert die Tyrosinphosphatase SHP-2 (*src homology 2-containing tyrosine phosphatase*), die ERK/MAPK-Signalmoleküle aktiviert (Bjorbaek et al. 2001, Yang und Barouch 2007). Zu den MAP-Kinasen gehören neben ERK1/2 (*extracellular signal-regulated kinases*) auch die p38- und die p42/44- mitogenaktivierten Proteinkinasen. Für verschiedene Zelltypen konnte eine Aktivierung durch Leptin gezeigt werden (Najib und Sanchez-Margalet 2002). In Prekursoren der osteoblastischen Zelllinie konnte gezeigt werden, dass Leptin zur Apoptose über die Aktivierung von ERK1/2 und zytosolischer Phospholipase A führt (Fruhbeck 2006). Die Tyrosinphosphatase SHP2 kann durch Bindung eines Phosphotyrosins

der intrazellulären Ob-R-Domäne neben der Beeinflussung des ERK-Signalwegs außerdem eine STAT3-Aktivierung herunterregulieren (Fruhbeck 2006).

Nach Ligandenbindung werden Zytokinrezeptoren in die Zelle durch *clathrin-coated vesicles* aufgenommen. Anschließend werden sie in Endosomen entweder abgebaut oder recycelt zum Wiedereinsatz an der Zelloberfläche (Sweeney 2002). Schätzungsweise befinden sich unter normalen Bedingungen nur 5-25% der OB-R-Isoform an der Zelloberfläche, die Mehrheit ist intrazellulär lokalisiert (Barr et al. 1999).

Die aufgeführten Leptin-induzierten Signalwege sind für verschiedene Gewebearten beschrieben worden. Trotz der bekannten proatherogenen Wirkung des Leptins und des erfolgreichen Nachweises des Leptinrezeptors auf Thrombozyten (Nakata et al. 1999) sind die intrazellulären Mechanismen, über die das Adipokin auf Thrombozyten wirkt, bisher nur unvollständig verstanden. Bisher konnte ein Leptin-vermittelter Effekt auf die Aggregation und Kalziumfreisetzung unter Beteiligung der Signalmoleküle Phospholipase C, Proteinkinase C und Phospholipase A₂ gezeigt werden (Corsonello et al. 2004). Dies lässt darauf schließen, dass Leptin den Abbau der Membranphospholipide durch die Phospholipase C zu 1,2-Diacylglycerol (DAG) und Inositol 1,4,5-triphosphat (IP₃) stimuliert. 1,2-Diacylglycerol wiederum führt zur Aktivierung der Proteinkinase C und Inositol 1,4,5-triphosphat induziert die Kalziumfreisetzung aus intrazellulären Reserven. Eine Leptin-induzierte Aktivierung der thrombozytären Signalmoleküle Januskinase 2 (JAK2), Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K), Proteinkinase B (PKB/Akt) und die cAMP-spezifische Phosphodiesterase-3 (PDE3A) konnte ebenfalls für die Leptin-induzierte Aggregation nachgewiesen werden (Elbatarny und Maurice 2005).

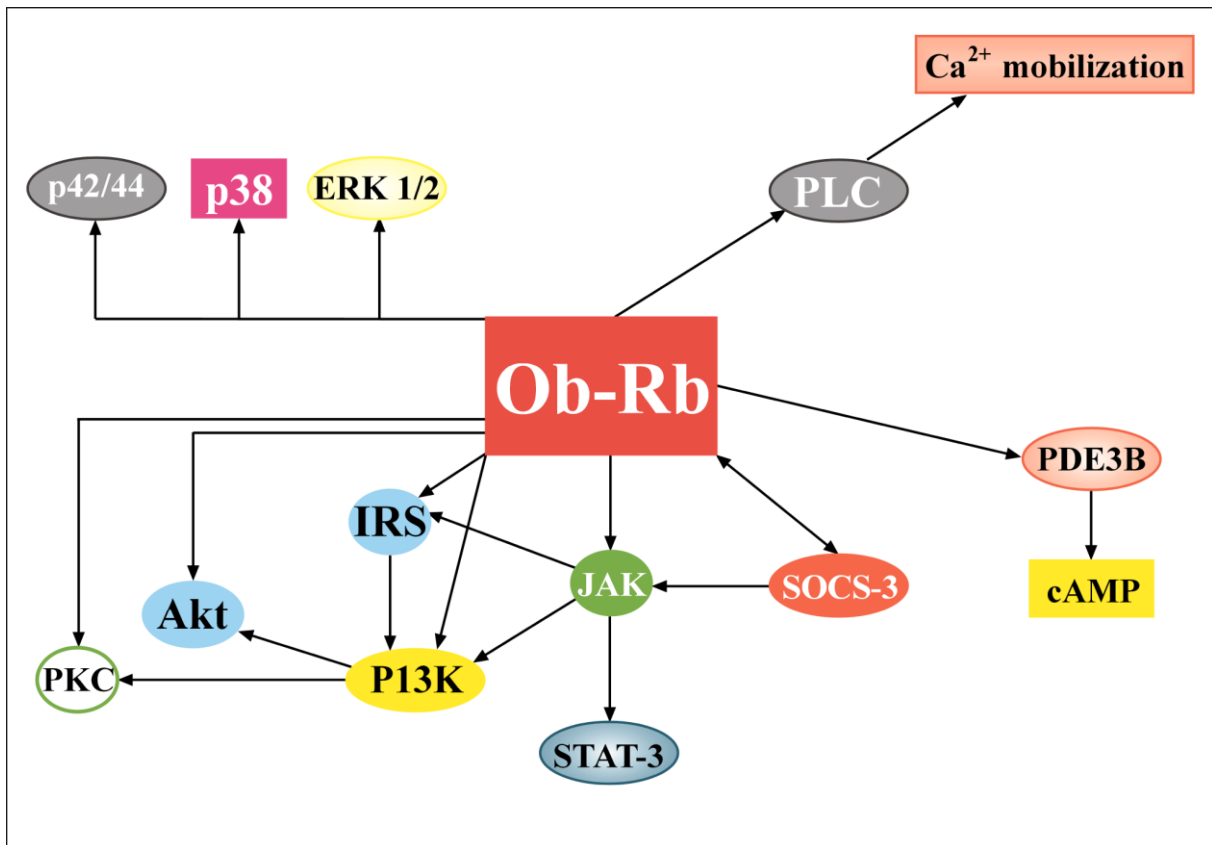


Abb. 1: Signalwege, die unter Einfluss von Leptin angestoßen werden. Abbildung modifiziert nach Fruhbeck 2006, S. 15. Dargestellt sind Leptin-vermittelte Signalwege, die in Kapitel 1.4 ausführlich diskutiert werden. Abkürzungen wurden im Text erläutert.

1.5 Leptinresistenz

Im Rahmen der Leptinresistenz wird zwischen verschiedenen Formen unterschieden. Zum Einen gibt es die **erbliche Leptinresistenz**. Beim Menschen sind hier nur wenige Fälle beschrieben (Mazen et al. 2011). In der Mehrzahl der Fälle ist eine **erworbene Leptinresistenz** sichtbar (Friedman 2009). Es finden sich bei Adipösen korrelierend mit der gesteigerten Fettgewebismenge deutlich erhöhte Plasmaleptinlevel. Offensichtlich sind bei adipösen Menschen diese erhöhten Leptinspiegel jedoch nicht in der Lage, eine Drosselung der Kalorienzufuhr zu bewirken. Diese Beobachtung legt die Vermutung nahe, dass es sich hierbei nicht um eine genetische Veränderung handelt, sondern um eine Störung, die durch kalorien- und fettreiche Ernährung erst hervorgerufen wird. Diese Theorie der Adipositas-induzierten **zentralen (hypothalamischen) Leptinresistenz** bestätigte sich im Tiermodell: Campfield et al. (Campfield et al. 1995) verglichen die Wirkung einer Leptinsubstitution auf *ob/ob*-Mäuse mit erblicher Leptindefizienz und auf *DIO*-Mäuse (*diet-induced obese*-Mäuse), bei denen keine erblich bedingte Adipositas, sondern eine rein Diät-induzierte Adipositas vorliegt. Hier zeigte sich, dass bei *ob/ob*-Mäusen nach Leptinsubstitution ein deutlicher Gewichtsverlust eintrat. Bei *DIO*-Mäusen führte die Leptingabe ebenfalls zu einer Gewichtsreduktion, jedoch benötigten diese Tiere

hierfür eine deutlich höhere Leptindosierung als *ob/ob*-Mäuse. Dies deutet auf ein gewisses Maß einer erworbenen Leptinresistenz hin. Auch beim Menschen verfestigte sich die Theorie der erworbenen Leptinresistenz durch die Beobachtung, dass die Zufuhr von exogenem Leptin bei Adipösen nicht zu einem adäquaten Gewichtsverlust führt (Heymsfield et al. 1999). Es werden verschiedene Mechanismen diskutiert, die zu einer zentralen Resistenz gegen das Adipokin Leptin beim Bestehen einer Adipositas führen könnten: Ursache einer Leptinresistenz könnte eine Beeinträchtigung des Leptintransports durch die Blut-Hirn-Schranke sein (Munzberg 2010, Caro et al. 1996, Schwartz et al. 1996). Nach dem Transport durch die Blut-Hirn-Schranke bindet Leptin an die lange Form des Leptinrezeptors, Ob-Rb, und aktiviert diesen im Hypothalamus. Auch hier können Ursachen für eine Leptinresistenz liegen: Ein mutierter Leptinrezeptor im Hypothalamus oder eine Inhibierung des Leptinsignalweges im Hypothalamus (Rahmouni et al. 2002) sind mögliche Gründe für eine Resistenz gegen das Adipokin.

Da jedoch auch beim Vorliegen von Adipositas trotz hypothalamischer Leptinresistenz das Adipokin weiterhin multiple periphere Wirkungen entfaltet, z. B. das Begünstigen einer arteriellen Hypertonie durch Aktivierung des Sympathotonus, wird gelegentlich von einer **selektiven Leptinresistenz** gesprochen: Leptin kann seinen anorektischen Effekt, der zur Gewichtsreduktion führt, aufgrund einer zentralen Leptinresistenz nicht entfalten - die peripheren Wirkungen jedoch werden beibehalten (Mark 2013, Rahmouni 2005).

1.6 Thrombozyten

Thrombozyten sind anukleäre Zellen, die durch Abschnürung von Megakaryozyten entstehen. Sie haben eine Lebenszeit von 7-10 Tagen und eine Größe von 1,5-3 μm . Trotz des Fehlens eines Zellkerns enthalten sie mRNA und haben die Möglichkeiten zur Translation und Proteinsynthese (George 2000). So können Thrombozyten eine de-novo-Synthese von verschiedenen Mediatoren betreiben, die bei der Regulation von Inflammation und Gerinnung beteiligt sind, z.B. Thromboxan A_2 , IL-1 β , PAI-1 und TF (Gawaz et al. 2005, Lindemann et al. 2007).

Thrombozyten bilden bei einer Gefäßverletzung durch Adhäsion an die subendotheliale Matrix, die durch verschiedene Kollagentypen sowie adhäsive Proteine, z.B. Von-Willebrand-Faktor (vWF), Fibronectin, Laminin etc. getriggert wird, einen fragilen Monolayer (Ruggeri und Mendolicchio 2007). Der Kontakt mit der subendothelialen Matrix führt zu einer Thrombozytenaktivierung mit Formveränderung aus einer rundlichen Form im nativen Zustand zur Ausbildung von Filopodien durch Aktinpolymerisation und Reorganisation des Zytoskeletts. Dies geht mit einer Oberflächenvergrößerung und Stabilisierung des gebildeten Aggregats einher (Yamada und Miyamoto 1995).

Die durch Kontakt mit der subendothelialen Matrix hervorgerufene Thrombozytenaktivierung führt ebenfalls zu einer Konformationsänderung des Glykoproteins (GP) IIB/IIIa, das nun durch eine Affinitätserhöhung in der Lage ist, vWF und Fibrinogen zu binden (Woodside et al. 2001). GP IIB/IIIa (Integrin $\alpha_{IIB} \beta_3$) ist der am häufigsten exprimierte Thrombozytenrezeptor: Es finden sich ca. 40.000-80.000 Kopien dieses Rezeptors pro Thrombozyt. Infolge einer Aktivierung kommt es neben einer Konformationsänderung auch zu einer Erhöhung der Oberflächendichte des funktionellen GP IIB/IIIa-Rezeptors um 30%-50% (Wagner et al. 1996, Niiya et al. 1987). Dieses Integrin besteht aus zwei Untereinheiten: α_{IIB} (CD41) und β_3 (CD61); jede ist das Produkt von separaten Genen des Chromosoms 17 (q21-22). Die beiden Untereinheiten sind nicht kovalent gebunden. Die Ligandenbindung an Glykoprotein IIB/IIIa ist notwendig für die Thrombozytenaggregation und Thrombusbildung. Durch seine Bindung an Fibrinogen führt dieser Rezeptor nicht nur zu einer Adhäsion an die subendotheliale Matrix, sondern zudem zu einer Verknüpfung der Thrombozyten untereinander.

Eine Thrombozytenaktivierung und Aggregation kann jedoch nicht nur durch Kontakt zu Bestandteilen der subendothelialen Matrix getriggert werden, sondern ebenfalls durch den Gerinnungsfaktor Thrombin (Crawley et al. 2007) sowie endogene, d.h. aus anderen aktivierten Thrombozyten freigesetzte Mediatoren wie Adenosin-5-diphosphat (ADP) und Thromboxan A_2 (TXA₂) (Nakahata 2008). Thromboxan A_2 ist ein mit den Prostaglandinen verwandtes Biomolekül. Es ist ein starker Thrombozytenagonist und hat eine tragende Funktion bei der Aggregation. Thromboxan A_2 entsteht aus Arachidonsäure und wird freigesetzt aus Membranphospholipiden durch die Phospholipase A_2 . Thromboxan A_2 ist labil und hat eine sehr kurze Halbwertszeit (ca. 30 sec). Es wird rasch hydrolysiert in inaktives Thromboxan B_2 . Thromboxan B_2 ist somit der stabile Metabolit des Thromboxan A_2 und dient als Thrombozytenaktivitätsmarker *in vivo*.

Neben der akuten Aktivierung nach einer Gefäßverletzung sind zirkulierende Thrombozyten auch in allen Phasen des atherogenen Prozesses beteiligt: von der atherosklerotischen Plaque über die Plaque-Inflammation sowie deren Ruptur (Ruggeri und Mendolicchio 2007, Davi und Patrono 2007, Ross 1999). Thrombozyten tragen somit entscheidend zu dem erhöhten atherothrombotischen Risiko bei Vorliegen von Adipositas bei.

1.7 Aufgabenstellung

Aufgrund der Bedeutung der Thrombozyten bei der Atherosklerose und der hierbei bisher unzureichend bekannten Funktion von Leptin soll in der vorliegenden Arbeit die Bedeutung von Leptin als Thrombozytenagonist untersucht werden. Ziel dieser Studie ist die Aufklärung des Signalwegs, über den Leptin die Thrombozyten aktiviert und die Aggregation und Adhäsion fördert, um Erkenntnisse zu gewinnen, über welche molekularen Mechanismen Leptin entscheidende Prozesse der Atherosklerose beeinflusst.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemische Materialien

Adenosine 5'-diphosphate sodium salt AG490	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim Calbiochem, Darmstadt
Albumin from bovine serum	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ammoniumpersulfat p.A.	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Apyrase from potato, Grade VI	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
BCA Protein Assay Reagent	Pierce Chemical Company, Rockford, IL, USA
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Calcium chloride Dihydrate	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Calciumhydroxid	Merck, Darmstadt
Calciumsulfat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
CHAPS, SigmaUltra	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Complete Mini (Protease inhibitor cocktail tablets)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Dimethyl sulfoxide	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ethanol	GeReSo mbH, Einbeck
Ethylenediamine tetraacetic acid	Serva, Heidelberg
Fibrinogen (human) Pg, vWF&Fn depleted	Enzyme Research, Swansea, UK
Genistein	Calbiochem, Darmstadt
D(+)-Glucose	Merck, Darmstadt
Glycerol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Glycin	AppliChem, Darmstadt
Glycine	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
H-Gly-Pro-Arg-Pro-OH (GPRP)	Calbiochem, Darmstadt
H-Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-Pro-OH (GRGDSP)	Calbiochem, Darmstadt
HEPES $\geq 99.5\%$	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Hydrochloric Acid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Instant Nonfat Drymilk	Kroger Co, Cincinnati, OH, USA
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumhydroxid Plätzchen	Merck, Darmstadt

Lauryl sulfate	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
rhLeptin (E.coli-derived)	R&D Systems Inc, Minneapolis, MN, USA
Ly 294002	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid	AppliChem, Darmstadt
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	Merck, Darmstadt
2-Mercaptoethanol >99.0%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
N,N'-Methylen-bis-acrylamid	Carl Roth GmbH&Co.KG, Karlsruhe
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH&Co.KG, Karlsruhe
tri-Natriumcitrat-2-hydrat	Merck, Darmstadt
Natronlauge (2N)	Merck, Darmstadt
Paraformaldehyde	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
PBS (10x)	Invitrogen, Paisley, UK
PD 98059	Merck, Darmstadt
Phalloidin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ponceau S solution	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Precision Plus Protein™ Standards	BioRad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA
Prestained Protein Marker Broad Range	New England Biolabs, Frankfurt
Prostaglandin E1	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
nProtein A Sepharose™ 4 Fast Flow	GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Schweden
Rotiphorese®Gel 40	Carl Roth GmbH&Co.KG, Karlsruhe
Salzsäure	Merck, Darmstadt
SB 203580	Calbiochem, Darmstadt
Sodium Chloride Dihydrate	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Sodium Citrate	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Sodium hydrogen carbonate	Merck, Darmstadt
SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate	Pierce Chemical Company, Rockford, IL, USA
TEMED p.a.	Carl Roth GmbH&Co.KG, Karlsruhe
Thrombin from human plasma	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Triton® X-100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Trizma® base	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Trizma® hydrochloride	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Tween® 20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Vectashield Mounting Medium for Fluorescence	Vector Laboratories, Inc., Peterborough, UK

2.1.2 Antikörper

Akt Antibody	Cell Signaling, Frankfurt
cPLA2 Antibody	Cell Signaling, Frankfurt
ECL™ Anti-mouse IgG, Horseradish Peroxidase linked whole antibody (from sheep)	Amersham Biociences, Little Chalfont Buckinghamshire, UK
ECL™ Anti-rabbit IgG, Horseradish Peroxidase linked whole antibody (from donkey)	GE Healthcare, Freiburg
JAK2 (24B11) Rabbit mAb	Cell Signaling, Frankfurt
JAK2 (HR-758) rabbit polyclonal IgG	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
Ob-R (B-3) mouse monoclonal IgG	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
Ob-R (H-300) rabbit polyclonal IgG	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
Ob-R (M-18) goat polyclonal IgG	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
Ob-R (N-20) goat polyclonal IgG	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
P38 MAPK Antibody	Cell Signaling, Frankfurt
P44/42 MAP Kinase Antibody	Cell Signaling, Frankfurt
PAC-1	BD Bioscience, San Jose, CA, USA
Phospho-Akt (Ser473) Antibody	Cell Signaling, Frankfurt
Phospho-cPLA2 (Ser 505) Antibody	Cell Signaling, Frankfurt
Phospho-JAK2 (Tyr1007/1008) Antibody	Cell Signaling, Frankfurt
Phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) Antibody	Cell Signaling, Frankfurt
Phospho-p44/42 MAPK (Thr202/Tyr204) Antibody	Cell Signaling, Frankfurt
Phospho-PKC (pan) (βII Ser660) Antibody	Cell Signaling, Frankfurt
Phospho-PLCγ2 (Tyr 1217) Antibody	Cell Signaling, Frankfurt
Phospho-Stat3 (Tyr705) Antibody	Cell Signaling, Frankfurt
PI3-Kinase p85 α (Z-8) rabbit polyclonal IgG	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
p-JAK2 (Tyr1007/Tyr1008)-R rabbit polyclonal IgG	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
PLCgamma2 Antibody	Cell Signaling, Frankfurt
p-Ob-R (Tyr 1141) P blocking peptide	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
p-Ob-R (Tyr 1141)-R rabbit polyclonal IgG	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
p-Ob-R (Tyr 985)-R rabbit polyclonal IgG	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
Polyclonal Rabbit Anti-Goat Immunoglobulins/HRP	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark
P-PI3-Kinase p85α(Tyr508) goat polyclonal IgG	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
p-Tyr (Py20) HRP mouse monoclonal IgG _{2a}	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA

p-Tyr (Py20) mouse monoclonal IgG
Stat3 Antibody

Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
Cell Signaling, Frankfurt

2.1.3 Utensilien und Geräte

PAP-4C Aggregometer	BioData Corporation, PA, USA
Centrifuge 5415R	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Deckgläser (Stärke 1, 18mm Drm.)	Menzel GmbH + Co KG, Braunschweig
Eppendorf-Gefäße	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
FACScan flow cytometer	Becton Dickinson Flow Cytometry Systems, San Jose, CA, USA
Falcon-Röhrchen	Beckton Dickinson, Darmstadt
Fuji Medical X-Ray Film Super RX	Fujifilm, Düsseldorf
Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell	BioRad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA
Mini-Protean® 3 Cell	BioRad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA
pH 720 ino lab	WTW, Weilheim
PowerPAC 300	BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA
Prospekthüllen	Leitz, Stuttgart
Protran® Nitrocellulose Transfer membrane	Whatman GmbH, Dassel
Rotanta/s	Hettich AG, Bäch, Schweiz
See-saw-rocker SSL4	Stuart, Asbach
SuperFrost®Plus Objektträger 25x75x1mm	Menzel GmbH + Co KG, Braunschweig
Thromboxane B ₂ Correlate EIA™	Assay Designs, Inc., Ann Arbor, MI, USA
Vortex Genie 2™	Bender&Hobein AG Zürich, Schweiz

2.2 Puffer und Lösungen

2.2.1 TBST

TrisHCl	100 mM
NaCl	153 mM
Tween20	0,1 %
pH 7,5	

2.2.2 2x Sample Buffer (Ladepuffer)

SDS	4 %
Tris HCl pH 7,5	200 mM
Glycerol	10 %
Betamercaptoethanol	1 %
Bromphenolblau	0,01 %

2.2.3 2x Lysepuffer (für WB-Lysate)

SDS	4 %
Tris HCl pH 7,5	200 mM
Glycerol	10 %
Betamercaptoethanol	1 %

2.2.4 1x Lysepuffer (für IP)

NaCl	150 mM
HEPES	20 mM
pH 7,5	
CHAPS	10 mM
Protease Inhibitor Cocktail (1 Tbl/10 ml)	

2.2.5 4x Laemmli-Puffer

SDS	2 %
TrisHCl	100 mM
Glycerol	5 %
Betamercaptoethanol	0,5 %
Bromphenolblau	0,02 %

2.2.6 Elektrophoresepuffer

TrisBase	25 mM
Glycin	192 mM
SDS	3,4 mM

2.2.7 Transferpuffer

TrisBase	25 mM
Glycin	192 mM

2.2.8 Tyrode-Puffer

NaCl	137 mM
NaHCO ₃	12 mM
KCl	2,6 mM
HEPES	10 mM
MgCl ₂	1 mM
pH 7,4	

2.2.9 Walsh-Puffer

NaCl	137 mM
KCl	2,7 mM
MgCl ₂	1 mM
NaH ₂ PO ₄	3,3 mM
HEPES	3,8 mM
pH 7,40	

2.2.10 Permeabilisierungspuffer

BSA	0,75 %
Triton X	0,1 %
Phalloidin	0,2 %
gelöst in Walsh Puffer	

2.3 Allgemeines zum Arbeiten mit Thrombozyten

Thrombozyten reagieren sehr empfindlich auf exogene Einflüsse. Um die Störanfälligkeit bei der Versuchsdurchführung zu minimieren, wurden folgende Vorsichtsmaßnahmen im Umgang mit den Blutzellen beachtet:

- Die Blutabnahme erfolgte ohne Stauung
- Die Zentrifugation wurde ohne den Einsatz der Bremsfunktion durchgeführt
- Beim Mischen und Pipettieren wurde darauf geachtet, dass die Probe zu den sie umgebenden Kunststoffmaterialien nur so gering wie möglich in Kontakt kam
- Um eine Gerinnung und somit die Aktivierung der Thrombozyten zu hemmen, wurden Antikoagulanzen verwendet
- Zur Vermeidung einer Aktivierung der Zellen sowie Abschwächung der im Versuch erwarteten Reaktion wurde schnelles Arbeiten bei der Versuchsdurchführung angestrebt

2.4 Gewinnung von plättchenreichem Plasma (PRP)

Das humane Vollblut, das in den Experimenten der Dissertation verwendet wurde, stammte von freiwilligen Spendern, bei denen weder eine Erkrankung noch Medikamenteneinnahme vorlag. Zu der vorliegenden Studie existiert ein positives Ethikvotum von der Ethik-Kommission Göttingen (Antragsnummer 18/4/05). Das abgenommene Blut wurde 10:1 in 3,8 % Trisodiumcitrat aufgenommen und das Gemisch in FACS-Röhrchen bei 900 rpm (500g) für 15 Min. zentrifugiert. Das so gewonnene in der oberen Phase befindliche plättchenreiche Plasma wurde abpipettiert und es wurden 1 μM Prostaglandin E1 sowie 0,1 U/ml Apyrase hinzugegeben, um eine Thrombozytenaktivierung zu verhindern. Die Thrombozyten wurden anschließend entsprechend des Folgeexperimentes weiterverarbeitet, zuvor jedoch wurden sie mindestens einmal in Walsh Puffer (s. 2.2.9 Puffer und Lösungen) mit 0,1 % Dextrose, 0,1 % BSA, 1 μM PGE1 und 0,1 U/ml Apyrase gewaschen.

2.5 Bestimmung der Thrombozytenzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde die Absorption des PRP bei einer Wellenlänge von 800 nm in einem Plattenphotometer gemessen. Neben dem Leerwert wurden zwei Verdünnungen im Verhältnis 1:20 und 1:50 angesetzt. Die Plättchenzahl wurde unter Verwendung des Mittelwertes der zwei

photometrisch bestimmten Zellzahlwerte unter Zuhilfenahme der Formel $N (10^8/\text{ml}) = (6,23 / (2,016 - \text{OD}800) - 3,09) \times \text{Verdünnungsfaktor}$ berechnet.

2.6 Western Blot (Protein-Blot)

Beim Western Blot erfolgt eine gelelektrophoretische Auftrennung eines Proteingemisches nach Größe und Ladung mit anschließendem Transfer aus einem Acrylamidgel auf eine feste Polymerschicht, z.B. eine Nitrozellulosemembran. Durch Zugabe eines primären Antikörpers wird ein spezifisches Antigen markiert. Dieser Komplex kann anschließend durch Bindung eines zweiten enzymkonjugierten Antikörpers durch Chemilumineszenz mittels Röntgenfilm detektiert werden. Nach digitaler Photographie können dann der Farbintensität einer Bande relative Zahlenwerte zugeordnet werden, um diese zu quantifizieren und vergleichbar zu machen.

2.6.1 Herstellung von gewaschenen Thrombozyten

Plättchenreiches Plasma mit 2 μM PGE1 wurde bei 1700 rpm 18 Min. lang zentrifugiert. Das dabei entstehende Pellet wurde anschließend in (je 3 ml) Tyrode-Hepes-Puffer mit 0,1% BSA, 0,1% Dextrose und 2 μM PGE1 resuspendiert. Dieser Waschschrift wurde noch zweimal wiederholt. Nach der dritten Zentrifugation wurde das gesamte Pellet in 300 μl Tyrode-Hepes-Puffer mit 0,1% BSA und 0,1% Dextrose ohne PGE1 aufgenommen. Zu diesem Zeitpunkt wurde auf die Hinzugabe des PGE1 verzichtet, da im Folgenden eine Thrombozytenaktivierung erwünscht war. Beim letzten Waschschrift wurde dem Puffer 1 mM CaCl_2 zugesetzt, um eine Aktivierung der gewaschenen Thrombozyten zu ermöglichen. Die Zellzahl wurde nach photometrischer Messung (s. 2.5) auf $11 \times 10^8/\text{ml}$ eingestellt.

2.6.2 Stimulation sowie Inhibierung der Thrombozyten

Zur Untersuchung der Signalkaskade, über die Leptin seine Wirkung auf humane Thrombozyten entfaltet, wurden die Thrombozytenlysate unterschiedlich stimuliert und/oder mittels verschiedener Tyrosinkinasehemmer behandelt. Für diesen Arbeitsschritt wurden je 30 μl Thrombozytenlösung in ein Eppendorf-Cup gegeben. Die Thrombozyten wurden für die durchgeführten Konzentrationsversuche mit verschiedenen Leptinkonzentrationen (von 0,1 bis 100 ng/ml) für 2 Minuten stimuliert. Für Zeitversuche wurden Thrombozyten mit 10 ng/ml Leptin über verschiedenen lange Zeiträume (10 Sekunden, 30 Sekunden, 2 Minuten, 10 Minuten) stimuliert. Wurden Inhibitoren verwendet, so erfolgte vor der Stimulation mit 10 ng/ml Leptin für 2 Minuten eine Präinkubation mit dem entsprechenden Inhibitor für jeweils 10 Minuten.

Alle Substanzen wurden als Stammlösungen angesetzt, aliquotiert und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert. Kurz vor der Verwendung wurden niedrigere Konzentrationen jeweils frisch durch Verdünnung mit Lösungsmittel (Leptin in PBS, Inhibitoren in DMSO) hergestellt. Hierbei erhielten die stimulierte Probe sowie die Kontrollprobe gleiche Mengen an Lösungsmitteln.

Die beschriebene Behandlung der Thrombozyten wurde mit 30 μl reduzierendem zweifach-Sample Puffer (s. 2.2.2) gestoppt. Darüber hinaus diente der Sample Puffer zur Beschwerung der Proteinlysate und zur Markierung der Lauffront während der Elektrophorese. Nach Denaturierung der Proteine durch fünfminütiges Kochen der Zellsuspension und erfolgtem Lysieren der Thrombozyten wurden die Proben bis zur elektrophoretischen Auftrennung bei -20°C eingefroren.

2.6.3 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Vor dem eigentlichen Western Blot erfolgte die gelelektrophoretische Auftrennung der Thrombozyten-Proteine nach ihrem Molekulargewicht mit dem Mini-Protean® 3 Cell (BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA). Hierzu wurden Trenngele zwischen 8 % und 10 % (pH-Wert 8,8) verwendet. Die Prozentigkeit wurde anhand der erwarteten Molekülgröße des nachzuweisenden Proteins gewählt. Um eine schärfere Bandentrennung zu erreichen, wurde ein Sammelgel von 4 % (pH 6,8) genutzt.

Tab. 1: Sammel- und Trenngel für Western Blot

	Sammelgel 4 %	Trenngel 8 %	Trenngel 10 %
DDI H ₂ O	6,1 ml	4,7 ml	4,1 ml
30% degassed Acrylamide (Bis)	1,3 ml	2,7 ml	3,3 ml
Gel buffer			
- 0,5M Tris- HCl pH=6,8	2,5 ml		
- 1,5M Tris-HCl pH=8,8		2,5 ml	2,5 ml
10% w/v SDS	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml
10% APS	50 μl	50 μl	50 μl
TEMED	10 μl	5 μl	5 μl

Diese Gele wurden nach 15-minütigem Entgasen unter dem Abzug zwischen zwei fett- und proteinfreie Glasplatten gegossen. Nach der durch APS und TEMED als Initiatoren bewirkten Polymerisation der Gele erfolgte das Einspannen der Platten in eine Gelelektrophoresekammer und Elektrophoresepuffer (s. 2.2.6) wurde hinzugegeben. Nach sorgsamem Ausspülen der Geltaschen wurden diese mit je 30 μl des Thrombozytenlysates in *Sample Buffer* (s. 2.2.2) bestückt. Als Längenstandard wurden 15 μl eines Proteinmarkers, Prestained Protein Marker Broad Range oder

Precision Plus Protein™ Standards (s. 2.1.1), nach fünfminütigem Kochen aufgetragen. Die Elektrophorese wurde initial mit einer Spannung von 100 V (im Sammelgel) gestartet. Sobald die Proben das Trenngel erreicht hatten, erfolgte die Elektrophorese mit 150 V. Sie wurde beendet, sobald eine optimale Auftrennung der Proteine mit entsprechendem Molekulargewicht erreicht war. Die Größenbestimmung der elektrophoretisch aufgetrennten Proteine erfolgte durch den Vergleich mit einem Proteinmarker.

2.6.4 Proteintransfer

Um die aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulosemembran zu übertragen, auf der eine spätere Immunodetektion der gesuchten Proteine erfolgen kann, wurde senkrecht zur ursprünglichen Laufrichtung unter ständiger Kühlung ein gerichtetes elektrisches Feld mittels Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell (BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA) angelegt. Der Anode angrenzend wurde ein Schwamm, ein Filterpapier, die Nitrozellulosemembran, dann das Polyacrylamidgel, ein erneutes Filterpapier sowie ein weiterer Schwamm platziert. Der Blot erfolgte in Transferpuffer (s. 2.2.7) über 2 Stunden bei 80 V oder alternativ als Übernacht-Transfer bei einer Umgebungstemperatur von 4° C und konstanten 150 mA.

2.6.5 Ponceau-S-Färbung

Zur Kontrolle der gleichmäßigen Proteinbeladung wurden die Proteine auf der Nitrozellulosemembran mit Ponceau-S rot angefärbt. Dieser Farbstoff bindet reversibel an positive Aminogruppen der transferierten Proteine und zeigt, dass ein Transfer auf die Nitrozellulosemembran erfolgreich war. Zum anschließenden Entfärben wurde die Membran in TBST (s. 2.2.1) mit 3% Milchanteil gewaschen, um die Membran für die Immunodetektion mit Antikörpern weiterzuverwenden.

2.6.6 Blocken freier Bindungsstellen

Das Blockieren freier Bindungsstellen fand durch zweistündiges Schütteln in TBST (s. 2.2.1) mit 3% Milchanteil statt, um eine spezifische Markierung des gesuchten Proteins zu ermöglichen. Diese sowie alle weiteren Wasch- und Inkubationsschritte der Nitrozellulosemembran erfolgten auf dem See-saw-rocker SSL4 (Stuart, Asbach).

2.6.7 Immunodetektion von spezifischen Proteinen

Die Membran wurde mit einem antigenspezifischen Primärantikörper (s. 2.1.2) in TBST (s. 2.2.1) mit 0,5% Milchanteil bei 4° C über Nacht geschüttelt. Unspezifisch gebundene Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen in 3 % Milch in TBST à 10 Min. wieder entfernt. Dann erfolgte eine zweistündige Inkubation bei Raumtemperatur mit dem Sekundärantikörper (s. 2.1.2), der gegen die jeweilige Spezies des Primärantikörpers gerichtet war. Die Konjugation des Zweitantikörpers mit HRP (Meerrettich-Peroxidase) ermöglichte die Detektion des gesuchten Proteins mit dem SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce Chemical Company, Rockford, IL, USA). HRP katalysiert die Oxidation von Luminol im alkalischen Milieu. Hierbei wird Licht frei, das auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht werden kann. Die Membran wurde nach dreimaligem Waschen in TBST für je 10 Min. mit dieser ECL-Mischung 5 Min. inkubiert und anschließend in Klarsichtfolie (Leitz, Stuttgart) verpackt. Die Entwicklung des Western Blots erfolgte mit einem Fuji Medical X-Ray Film Super RX (Fujifilm, Düsseldorf) zusammen in einer Röntgenfilmkassette. Je nach Intensität der Proteinexpression lag die Exposition (Belichtungszeit) zwischen 10 sec und 2 h.

Anschließend erfolgte eine densitometrische Auswertung der gesuchten Proteinbanden mittels ChemiImager 4400 v.5.1. Software (Alpha Innotech Corporation, San Leandro, CA, USA). Die Densitometrie der Bande des phosphorylierten Proteins wurde in ein Verhältnis mit dem densitometrischen Ergebnis der Bande des unphosphorylierten Proteins, die der Proteinbeladung entspricht, gesetzt.

Um nach dem Transfer mehrere Proteine detektieren zu können, wurden nach jeder Immunodetektion die gebundenen Antikörper durch das sog. *Stripping* entfernt. Dazu wurde die Nitrozellulosemembran 4 Minuten lang mit destilliertem Wasser, dann für 8 Minuten mit 0,2 M NaOH-Lösung und anschließend erneut für 4 Minuten mit Aqua_{dest} gewaschen. Nach dieser Prozedur konnte der nächste Primärantikörper auf die Membran gegeben werden. Wenn von einem Protein sowohl die phosphorylierte als auch die unphosphorylierte Form detektiert werden sollte, so erfolgte immer zuerst die Immunodetektion mit dem Primärantikörper gegen die phosphorylierte Form.

2.7 Immunpräzipitation

Bei der Immunpräzipitation wird mit Hilfe eines an Sepharosekügelchen gekoppelten Antikörpers ein bestimmtes Antigen aus einem Proteingemisch konzentriert. Die Immunpräzipitation wurde durchgeführt, um aus einer sehr Thrombozyten-reichen Probe, die sich aufgrund der großen Protein- und Probenmenge nicht für eine Western Blot-Analyse eignete, bestimmte Proteine zu isolieren. Beispielsweise wurden in den durchgeführten Versuchen phosphorylierte Proteine durch einen

spezifischen Antiphosphotyrosin-AK (PY20) präzipitiert. Nachfolgend wurden die entsprechenden aus dem Lysat präzipitierten Proteine per Western Blot nachgewiesen.

Für die Immunpräzipitation wurden gewaschene Thrombozyten (s. 2.4 und 2.5) (Gesamtzahl von 4×10^8 Thrombozyten pro Behandlung) mit 1 mM CaCl_2 versetzt und nachfolgend mit Leptin (10 ng/ml in PBS) stimuliert. Die Kontrollprobe erhielt das gleiche Volumen PBS. Die Inkubation erfolgte für 2 Min. bei RT. Anschließend erfolgte die sofortige Zugabe von 110 μl eiskaltem 5x Lysepuffer (s. 2.2.4). Nach zweistündigem Vortexen bei 4° C wurden die Proben für 10 Min. bei 13000 rpm und 4° C zentrifugiert. Zum *Preclearing*, d.h. der Reinigung von Immunglobulinen aus dem Proteingemisch, wurde zu dem gewonnenen Überstand je 20 μl Protein A Sepharose™ 4 Fast Flow (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Schweden) hinzugegeben. Die Protein-A-Beads waren 1:1 in Puffer (150 mM NaCl, 20 mM HEPES, pH 7,5) verdünnt. Nach 30-minütiger Rotation bei 4° C sowie Zentrifugation bei 4000 rpm für 2 Minuten wurde dem gewonnenen Überstand 2 μg PY20 (s. 2.1.2) hinzugegeben. Dabei handelt es sich um einen Antikörper, der an Phosphotyrosine bindet. Die Proben wurden über Nacht (ca. 10 Stunden) bei 4° C rotiert, wobei nach 2 Stunden die Zugabe von 20 μl Sepharosekügelchen erfolgte. Protein A, mit dem die verwendeten Beads beschichtet sind, bindet mit hoher Spezifität an die Fc-Region von Immunglobulinen, hier PY20. Dadurch konnten die am Tyrosinrest phosphorylierten Proteine aus dem Proteingemisch herausgezogen werden.

Nach Beendigung der Rotation wurden die Proben fünf Mal in 500 μl kaltem Lysepuffer (s. 2.2.4) mit anschließender Zentrifugation von jeweils 4000 rpm für 2 Minuten gewaschen. Die Beads wurden mit je 20 μl 2x *Sample Buffer* (s. 2.2.2) versetzt und das Gemisch 5 Minuten lang gekocht. Dieser Denaturierungsschritt bewirkte, dass sich die Proteine von den Beads lösten. Nach Zentrifugation wurde der Probenüberstand auf das SDS-Gel aufgetragen. Der Nachweis der Proteine erfolgte über Western Blot.

Abgesehen von der Verwendung des Antiphosphotyrosin-Antikörpers PY20 wurde die Immunpräzipitation auch mit JAK2 durchgeführt. So konnten sämtliche Januskinase 2-Proteine aus dem Gemisch gewonnen werden. Anschließend wurde mittels Western Blot der Anteil an phosphorylierter JAK2 bei Leptin-stimulierten Thrombozyten im Vergleich zu unstimulierten Thrombozyten ermittelt.

2.8 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie, auch als FACS (*fluorescence activated cell sorting*) bezeichnet, ist ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung von bestimmten Zellgruppen, die mittels verschiedener Fluoreszenzfarbstoff-markierter Antikörper gelabelt werden. Ein *sideward*- und ein *forward-Scatter* sorgen anhand der Streuung des von einem Laser stammenden Lichts für eine Auftrennung der Zellen anhand Größe und Granularität, weitere Detektoren messen zudem die von den Zellen emittierte

Fluoreszenz. Durch die unterschiedliche Größe der korpuskulären Blutbestandteile und insbesondere aufgrund der deutlich kleineren Größe von Thrombozyten im Vergleich zu den übrigen Blutzellen kann in der Durchflusszytometrie durch gezielte Scatter-Einstellung eine Analyse von Thrombozyten im Vollblut erfolgen, sodass zeit-intensive Waschschriffe, die immer ein Potenzial zur Thrombozytenaktivierung tragen, ausbleiben (Shattil et al. 1987). Humanes Vollblut wurde deshalb im Verhältnis 1:6 in Walsh Puffer (s. 2.2.9) verdünnt und anschließend mit 500 ng/ml Leptin für 10 Minuten lang inkubiert bzw. Puffer als Kontrollprobe hinzugefügt. Zum Nachweis einer Thrombozytenaktivierung, insbesondere einer Aktivierung des Fibrinogenrezeptors (GPIIb/IIIa: Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$), wurde der FITC-markierte (Fluorochrom Fluorescein-Isothiocyanat) anti-PAC1-Antikörper (BD Bioscience, San Jose, CA, USA) der Blutprobe zugegeben, der nur an die aktivierte Form des Rezeptors binden kann. Als Kontrolle diente FITC-markiertes IgM. Gleichzeitig erfolgte eine Aktivierung der Thrombozyten durch Zugabe von ADP. Die Proben wurden in Dunkelheit für 30 Minuten inkubiert. Die Stimulation wurde durch 30-fache Verdünnung in Walsh Puffer (s. 2.2.9) gestoppt. Nun fand unverzüglich eine durchflusszytometrische Analyse mittels *FACScan flow cytometer* (Becton Dickinson Flow Cytometry Systems, San Jose, CA, USA) statt. Es wurden 10.000 Events im voreingestellten Thrombozyten-Gate erfasst. Die Darstellung der Messungen in Histogrammen mit Angabe der mittleren Fluoreszenz-Intensität und deren Analyse erfolgte unter Verwendung der CellQuest-Software (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). Zur quantitativen Analyse wurde der prozentuale Anteil anti-PAC1-positiver Thrombozyten im Vergleich zu einem vordefinierten Anteil von 1% positiven Thrombozyten in der Kontrollprobe bestimmt.

2.9 Immunfluoreszenz-Färbung

Um die Bindung von Thrombozyten an immobilisiertes Fibrinogen zu untersuchen, wurden diese auf Fibrinogen beschichteten Deckgläsern ausplattiert. Hierfür wurden Deckgläser der Stärke 1, 18 mm Dm. (Menzel GmbH + Co KG, Braunschweig) in eine 12 Well-Platte gelegt und für 1 h bei 37° C mit 100 µg/ml Fibrinogen (Plasminogen-, Fibronectin- und Von-Willebrand Faktor-depletiert, Enzyme Research Laboratories, South Bend, IN, USA) in PBS beschichtet. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Deckgläser mit 1 % BSA in PBS für 1 Stunde bei 37° C inkubiert, um freie Bindungsstellen zu blockieren. Es erfolgte ein erneutes zweimaliges Waschen mit PBS.

Thrombozytenreiches Plasma (PRP) mit 2 µM PGE1 wurde 18 Minuten bei 1700 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in Walsh Puffer resuspendiert und die Zellzahl nach photometrischer Messung auf 6×10^6 /ml eingestellt.

In Eppendorf-Cups wurden je 100 µl gewaschene Thrombozyten gegeben. Die Thrombozyten wurden mit verschiedenen Leptinkonzentrationen (0,1, 1, 10, 100 und 500 ng/ml Leptin gelöst in PBS) für 10 Minuten stimuliert. Als Negativkontrolle dienten unstimulierte Thrombozyten, hier erfolgte die Zugabe von PBS. Als Positivkontrolle dienten mit Thrombin und 2 mM GPRP (Gly-Pro-Arg-Pro) stimulierte Thrombozyten.

Nach Zufügen der entsprechenden Leptin- bzw. Thrombinkonzentrationen wurden die Proben für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 300 µl Walsh Puffer in jedes Eppendorf-Cup zugefügt und das Gemisch gut resuspendiert. Jeder Probe wurden nun 100 µl entnommen und diese auf ein beschichtetes Deckgläschen gegeben. Nach 60 Minuten Inkubation bei 37° C wurden die Deckgläschen mit PBS gewaschen. Zur Fixierung wurden die Zellen für 20 Min. bei RT mit 100 µl 2% Paraformaldehyd inkubiert. Nach erneutem Waschen mit PBS erfolgte eine Phalloidin-färbung: Die Markierung von Zellen mit dem Rhodamin-gelabelten Farbstoff Phalloidin diente der Anfärbung von filamentösem Aktin und somit der Sichtbarmachung des Zytoskeletts. Hierzu wurde das Phalloidin 1:1000 in Permeabilisierungspuffer (s. 2.2.10) gelöst. Die Deckgläschen wurden mit 100 µl Puffer bei Raumtemperatur im Dunkeln 20 Minuten inkubiert und danach gewaschen. Nach Zugabe von Vectashield Mounting Medium und Auflegen von Objektträgern wurden die fixierten Thrombozyten, die sich durch die Aktinfärbung rot darstellten, unter Berücksichtigung der Abhängigkeit von ihrer Behandlung mittels Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 200, Carl Zeiss AG, Goettingen, Germany) betrachtet. Für jedes Deckgläschen wurden fünf verschiedene Regionen bezüglich der Zellzahl und Morphologie der adhärennten Thrombozyten analysiert, um einen aussagekräftigen Mittelwert dieser Angaben zu erhalten. Diese Auswertung geschah automatisch mit Hilfe der Software Image Pro Plus (Media Cybernetics, Incl, Silver Spring, MD, USA), wurde jedoch jeweils manuell verifiziert und bei Diskrepanz neu ausgewertet.

In Inhibitionsversuchen wurden verschiedene Kinaseinhibitoren (Merck Bioscience) jeweils 10 Minuten vor der Leptin-Stimulation der Thrombozytensuspension hinzugegeben. Der jeweiligen Kontrollprobe wurde dieselbe Menge der Substanz beigefügt, in der der Inhibitor gelöst war. Die verwendeten Konzentrationen sind im jeweiligen Ergebnisteil aufgeführt. Mit Hilfe dieser Experimente wurde untersucht, ob nach Hemmung einzelner Tyrosinkinase die Wirkung Leptins auf die Thrombozytenadhäsion unverändert oder aber abgeschwächt ist, was auf eine funktionelle Relevanz des Signalmoleküls für die Thrombozytenadhäsion schließen ließe.

2.10 Thrombozytenaggregationsphotometrie

Mit den durchgeführten Thrombozytenaggregationsversuchen wurde der Einfluss von Leptin auf die ADP-induzierte Aggregation untersucht. Der Frage, ob die Signalmoleküle, deren Beteiligung am

Leptinsignalweg in Thrombozyten mittels Western Blot und Immunpräzipitation dargestellt wurde, auch eine biologische Relevanz für die Leptin-induzierte Aggregation besitzen, wurde durch Verwendung verschiedener Kinaseinhibitoren nachgegangen.

Bei dem Aggregationsversuch wird mit Hilfe eines Aggregometers die Veränderung der Lichttransmission im thrombozytenreichen Plasma im Vergleich zum thrombozytenarmen Plasma kontinuierlich gemessen und aufgezeichnet. Durch die Verklumpung der Blutplättchen zu großen Aggregaten kommt es zu einer Trübungsabnahme des plättchenreichen Plasmas, da die Einzelzellen eine höhere Lichtstreuung als die gebildeten Agglomerate erzeugen. Dieses Prinzip ermöglicht eine quantitative Auswertung der erfolgten Aggregation.

Es erfolgte die Zentrifugation von Vollblut (s. 2.4). Die obere Phase, das PRP, wurde abgenommen und es wurde die darin enthaltene Thrombozytenzahl wie beschrieben (s. 2.5) ermittelt. Die verbliebene Flüssigkeit des ehemaligen Vollblutes, von dem bereits das PRP abgenommen wurde, wurde bei 3000 rpm zentrifugiert. Unter Nutzung des auf diese Weise gewonnenen plättchenarmen Plasmas (PPP) wurde die Zellzahl des PRP auf $2,5 \times 10^8$ Thrombozyten/ml Plasma eingestellt.

Zur Durchführung der Aggregation erfolgte zunächst die Eichung des PAP-4C Aggregometer (BioData Corporation, PA, USA): Dem PPP wurde der Messwert 100 % zugeordnet, da dies dem individuellen klarem Plasma entspricht und damit der maximal erreichbaren Aggregation. Unstimuliertem PRP wurde der Messwert 0% zugeordnet.

Um den eigentlichen Versuch, die Untersuchung des Einflusses von Leptin auf die ADP-ausgelöste Aggregation durchführen zu können, musste nun die von Spender zu Spender unterschiedliche benötigte ADP-Konzentration ermittelt werden, mit der eine reversible Aggregation von ca. 20-30% nach 5 Minuten erreicht werden konnte. Die verwendete ADP-Konzentration lag zwischen 0,5-8 μM , im Mittel bei $3 \pm 1,7 \mu\text{M}$. Grund dieser „Titrierung“ ist die Tatsache, dass bei zu starker als auch bei fehlender ADP-induzierter Aggregation Leptin die ADP-Wirkung nicht verstärken kann, sodass für jeden Spender die „optimale“ ADP-Konzentration bestimmt werden musste.

Das auf die Thrombozytenzahl von $2,5 \times 10^8$ /ml eingestellte PRP wurde mit PBS (Kontrolle) oder rekombinantem Leptin (500 ng/ml) für eine Dauer von 10 Minuten bei Raumtemperatur vorinkubiert.

Um, wie bereits erwähnt, die Relevanz der einzelnen an der Leptin-vermittelten Signalkaskade beteiligten Signalmoleküle für die durch Leptin initiierte Thrombozytenaggregation zu untersuchen, wurden Experimente unter Verwendung verschiedener Inhibitoren durchgeführt. Diese Inhibitoren wurden 10 Minuten vor Hinzugabe von Leptin der Probe zugefügt und bei Raumtemperatur inkubiert. Die Kontrollprobe wurde mit DMSO, der Lösungssubstanz des Inhibitors, versetzt, um eine eventuelle Beeinflussung des Aggregationsverhaltens der Probe durch die Lösungssubstanz zu demaskieren.

Die Aggregation wurde nun mit Beginn der ADP-Zugabe kontinuierlich über 5 Minuten aufgezeichnet. Nachfolgend wurde die nach 5 Minuten erreichte Aggregation unter Leptinvorbehandlung ausgemessen und verglichen mit der erreichten Aggregation unter der gleichen ADP-Konzentration ohne Leptinvorbehandlung.

Beispielhaft ist in der Abbildung 2 die Aggregationskurve von plättchenreichem Plasma nach Stimulation mit zwei verschiedenen ADP-Konzentrationen für jeweils eine Probe ohne Leptinstimulation sowie eine Probe nach Vorinkubation mit Leptin dargestellt. Erkennbar ist, dass durch eine Vorbehandlung mit Leptin die ADP-stimulierte Aggregation stärker ausfällt. Weitere Details zur Aggregometrie finden sich in Kapitel 3.3.

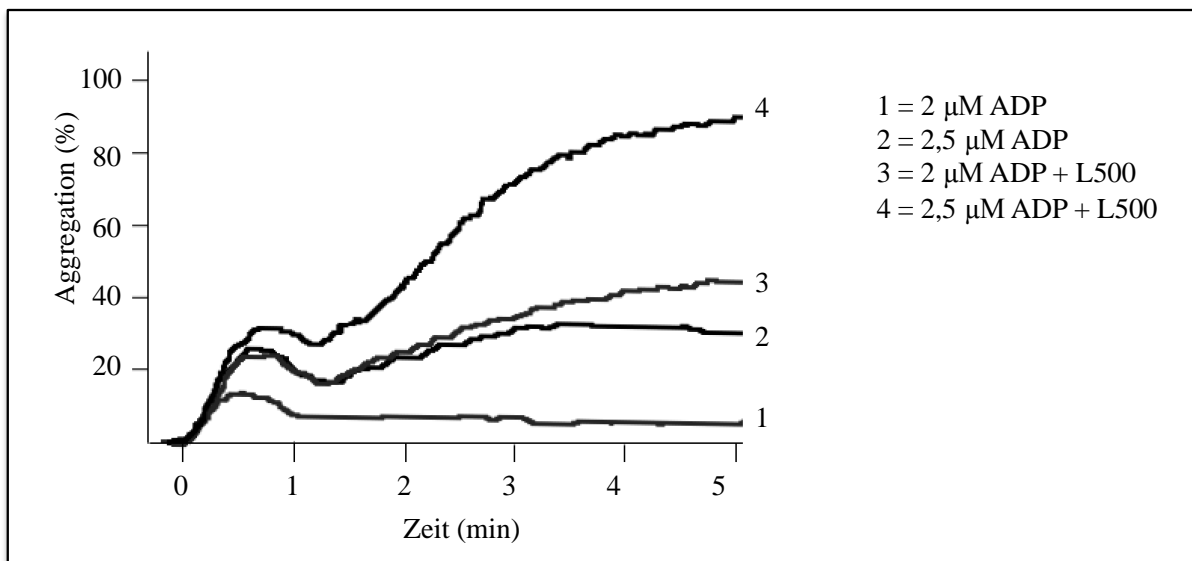


Abb. 2: Beispiel für eine Aggregationskurve eines Thrombozytenspenders. Aggregationskurve unter Einfluss von 2 μM ADP (1) und 2,5 μM ADP (2) sowie nach Vorinkubation mit 500 ng/ml Leptin (L500) und Stimulation mit 2 μM ADP (3) und 2,5 μM ADP (4).

2.11 Thromboxan B₂-ELISA

Der Assay Designs' Correlate-EIA™ Thromboxane B₂ kit ist ein kompetitiver Immunoassay zur quantitativen Bestimmung von Thromboxan B₂ in biologischen Flüssigkeiten: Es wird ein polyklonaler Antikörper genutzt, der kompetitiv an TXB₂ oder TXB₂, das kovalent an eine alkalische Phosphatase verknüpft ist, bindet. Der Nachweis basiert auf einer enzymatischen Farbreaktion. Die hervorgerufene gelbe Färbung wird durch einen *Microplate Reader* bei einer Wellenlänge von 405 nm bestimmt. Die Intensität der Farbe stellt sich umgekehrt proportional zu der TXB₂-Konzentration dar. Die gemessene optische Dichte der Proben wird genutzt, um die Konzentration von TXB₂ in der Probe zu bestimmen.

Die Bestimmung von Thromboxan B₂ mittels kompetitivem ELISA (competitive EIA Thromboxane B₂ Enzyme Immunoassay Kit, Assay Designs, Ann Arbor, MI, USA) erfolgte in plättchenreichem Plasma. Das PRP wurde in unserem Versuchsaufbau zunächst stimuliert: Die Proben wurden entweder für 10 Minuten mit Leptin (500 ng/ml) stimuliert bzw. als Kontrollprobe unstimuliert belassen, d.h. es wurde PBS als Trägersubstanz des Leptins der Vergleichsprobe hinzugegeben. Danach erfolgte eine Behandlung für 5 Minuten mit ADP oder PBS. Anschließend wurde dieses vorbehandelte PRP schockgefroren und der ELISA entsprechend der Anweisungen des Herstellers im Anschluss daran durchgeführt.

2.12 Software zum Erstellen von Diagrammen, Grafiken und Statistik

Die in der Dissertation präsentierten Statistiken sowie Diagramme wurden unter Verwendung des Programms Prism 4.01 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) angefertigt. Die statistische Signifikanz zwischen zwei Gruppen wurde anhand des Student's t-Tests für ungepaarte Stichproben überprüft. Der Vergleich von Mittelwerten aus Versuchen mit versus ohne Leptinbehandlung bei Proben desselben Spenders erfolgte durch den t-Test für gepaarte Stichproben. Eine Signifikanz wurde bei einem p-Wert von <0,05 ausgewiesen. Die dargestellten Daten werden als *Mittelwert ± SEM* präsentiert.

3 Ergebnisse

Die in dieser Dissertation dargestellten Ergebnisse wurden in der Arbeit:

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 $C\gamma 2$ and A_2 . *Thromb Haemost.* 98, 1063-1071.

publiziert.

Leptin bewirkt auf verschiedenen Ebenen eine Aktivierung von Thrombozyten. Dies wurde funktionell in der vorliegenden Arbeit untersucht anhand der Wirkung von Leptin

- auf die Adhäsion von Thrombozyten an immobilisiertes Fibrinogen (Kap. 3.2),
- auf die Aktivierung des Integrins $\alpha_{IIb}\beta_3$ (Kap. 3.2),
- auf die Aggregation (Kap. 3.3),
- auf die Thromboxansynthese (Kap. 3.4).

Zudem wurde auf molekularer Ebene die Leptin-induzierte Phosphorylierung bestimmter Signalmoleküle untersucht.

Da die Bedeutung der einzelnen Signalmoleküle für die Thrombozytenaktivierung in den funktionellen Tests untersucht wurde, wird zunächst in Kapitel 3.1 die Analyse des Leptinsignalwegs mittels Western Blot (WB)/Immunpräzipitation (IP) dargestellt und erst nachfolgend auf die o.g. Tests eingegangen.

3.1 Untersuchung des Leptinsignalwegs in Thrombozyten

3.1.1 Leptin-induzierte Phosphorylierung von Tyrosinen

Eine durch Leptin induzierte Phosphorylierung verschiedener Tyrosinkinasen konnte bereits in der Vergangenheit gezeigt werden (s. 1.4). Unzureichend untersucht ist bisher jedoch, welche Signalmoleküle in Thrombozyten unter Einfluss von Leptin aktiviert werden und welchen Einfluss die zeitliche Einwirkung und die Höhe der Dosis von Leptin auf die verschiedenen Signalmoleküle ausübt. Zunächst konnte in einem Vorversuch mittels Western-Blot-Verfahren bestätigt werden, dass Leptin verschiedene Phosphotyrosine aktiviert. In Abbildung 3 ist zu erkennen, dass mit zunehmender Einwirkungszeit eine Konzentration von 10 ng/ml Leptin eine Zunahme der Phosphorylierung verschiedener Tyrosine (siehe Pfeile in Abb. 3) bewirkt. Dieser in Abbildung 3 sichtbare

Stimulationseffekt unterblieb jedoch, als die Proben vor der Behandlung mit Leptin für 10 Minuten mit dem Tyrosinkinaseinhibitor Genistein (100 μ M) präinkubiert wurden (s. Abb. 3 Spur G).

Diese Beobachtungen zeigen, dass eine Behandlung von Leptin zu einer Phosphorylierung von verschiedenen Zellproteinen führt.

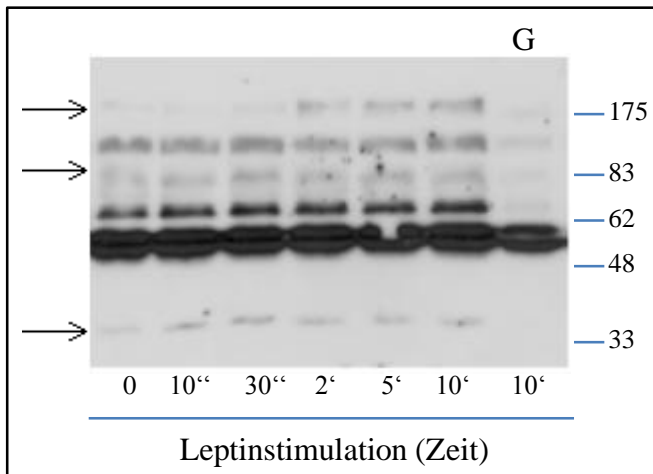


Abb. 3: Zeitabhängige Leptin-induzierte Phosphorylierung von Tyrosinkinasen und Suppression dieses Effekts durch den Tyrosinkinaseinhibitor Genistein.

Die Abbildung zeigt den mittels Western Blot untersuchten Effekt einer über unterschiedliche Zeiträume durchgeführten Leptinstimulation (10ng/ml) auf die Ausbildung von Phosphotyrosinen in Thrombozyten. Rechts dargestellt ist der Marker zur Bestimmung der Proteingröße (kDa). In Spur G wurden Thrombozyten aufgetragen, die mit 100 μ M Genistein für 10 Minuten versetzt und anschließend mit 10 ng/ml Leptin stimuliert wurden. Die Proteine, die durch Einwirkung von Leptin phosphoryliert wurden, sind mit Pfeilen dargestellt. (Abb. modifiziert nach Dellas et al. 2007)

In weiteren Versuchen sollte nun untersucht werden, welche Tyrosinkinasen an der Übermittlung des Leptineffektes in humanen Thrombozyten beteiligt sind. Hierfür erfolgte eine Quantifizierung der Densitometrie von Proteinblotten auf die phosphorylierte und unphosphorylierte Form des zu betrachtenden Zellproteins. Das Verhältnis von phosphorylierter Form zum Gesamtvorkommen des Proteins, welches die Proteinbeladung der Probenspur repräsentiert, reflektiert den Effekt von Leptin auf die Aktivierung dieses Signalmoleküls.

3.1.2 Leptin-induzierte Phosphorylierung der Signalmoleküle JAK2 und STAT3

Für andere Zielzellen wie beispielsweise humane B-Zellen ist eine Leptin-vermittelte Aktivierung des JAK2-STAT3 Signalwegs beschrieben (Agrawal S et al. 2011). Ob auch in Thrombozyten JAK2 und STAT3 im Leptinsignalweg eine Rolle spielen, wurde bis dato nicht umfassend untersucht. Dieser Frage widmet sich die vorliegende Arbeit, die durch die Methoden Immunpräzipitation und Western

Blot Aufschluss über deren Involvierung in der durch Leptin in Thrombozyten ausgelösten Signalkaskade geben soll.

Zum Nachweis eines aktivierenden Effekts von Leptin auf JAK2 in humanen Thrombozyten (Abb.4) fiel die Entscheidung auf die Methodik der Immununpräzipitation, da mit dieser Vorgehensweise im Vergleich zur Methodik des alleinigen Western Blots eine größere Proteinmenge in dem maximal möglichen untersuchbaren Probenvolumen analysiert werden kann (Abb. 4A und 4B). Hierfür wurden zwei Proben von aus Vollblut isolierten Thrombozyten vorbereitet. Eine der Proben wurde mit 10 ng/ml Leptin für 2 Minuten stimuliert, die andere als Kontrollprobe unstimuliert belassen und mit einer äquivalenten Menge an Lösungsmittel versetzt. Anschließend wurde beiden Proben der Antikörper PY20, der gegen Phosphotyrosine gerichtet ist, hinzugegeben, um die in den Thrombozytenproben enthaltenen Phosphotyrosine zu extrahieren. Die erhaltenen, phosphotyrosinreichen Proben wurden danach unter Einsatz des Primärantikörers JAK2 einem Western Blot unterzogen, um mit Hilfe dieses Proteinblots die phosphorylierte Form von JAK2 darzustellen. In der Abbildung 4A ist erkennbar, dass eine Behandlung der Thrombozyten mit Leptin (Spur +) zu einem erhöhten Vorkommen von phosphoryliertem JAK2 führt, folglich dass Leptin JAK2 in Thrombozyten aktiviert.

In einem weiteren Versuch erfolgte eine Immunpräzipitation der unbehandelten oder mit 10 ng/ml Leptin stimulierten gewaschenen Thrombozyten mit Hilfe des Antikörpers JAK2. Im Anschluss hieran wurden Western Blots sowohl auf Phospho-JAK2 als auch auf JAK2 durchgeführt, um sowohl die aktivierte Form der Tyrosinkinase als auch die Gesamtmenge dieser Kinase zu ermitteln (Abb. 4B). Im unteren Panel von Abb. 4B erkennt man JAK2, das aus den Thrombozytenlysaten präzipitiert wurde, wobei quantitativ in den Proben „mit (+)“ und „ohne (-)“ Leptinstimulation in etwa gleiche Proteinmengen (JAK2) erkennbar sind. Allerdings findet sich nur in der Leptin-stimulierten Probe eine deutliche Bande für phosphoryliertes JAK2. Somit konnte mittels IP und WB gezeigt werden, dass Leptin in einer Konzentration von 10 ng/ml zu einer Phosphorylierung von JAK2 führt.

Nachdem somit prinzipiell eine Phosphorylierung von JAK2 durch Leptin nachgewiesen werden konnte, erfolgte als nächstes die Betrachtung der zeit- und dosisabhängigen Wirkung des Proteohormons auf die JAK2-Phosphorylierung mittels Western-Blot-Analysen. Für Zeitversuche wurden gewaschene Thrombozyten (3×10^7) in ansteigender Dauer mit 10 ng/ml Leptin und für Dosisversuche mit ansteigender Leptinkonzentration für 2 Minuten stimuliert. Mit den Lysaten erfolgte danach jeweils zunächst ein Western Blot auf die phosphorylierte Form von JAK2 und dann ein Re-Blot auf Gesamt-JAK2. Dann wurde das Vorkommen von phosphoryliertem JAK2 mit der Gesamtproteinmenge von JAK2 in ein Verhältnis gesetzt und so die Leptin-vermittelte Proteinaktivierung densitometrisch quantifiziert. Wie in den Abbildungen 4C und 4D erkennbar ist,

konnte eine dosis- sowie zeitabhängige Zunahme der Phosphorylierung von JAK2 beobachtet werden. Dosisversuche ergaben, dass bei einer Stimulationsdauer von 2 Minuten Leptin in einer Dosierung von 10 ng/ml einen $2,49 \pm 0,6$ -fachen und bei Behandlung der Proben mit 100 ng/ml Leptin einen $2,77 \pm 0,7$ -fachen Anstieg der JAK2-Phosphorylierung bewirkte (p jeweils $<0,05$ im Vergleich zur unbehandelten Probe; $n=4$, Abb. 4C). In den durchgeführten Zeitversuchen stellte sich heraus, dass Leptin (10 ng/ml) nach einer Stimulationsdauer von 10 Sekunden einen $1,79 \pm 0,3$ -fachen, bei einer Stimulation von 30 Sekunden einen $1,97 \pm 0,2$ -fachen und bei einer Stimulation von 120 Sekunden einen $2,49 \pm 0,6$ -fachen Anstieg der JAK2-Phosphorylierung hervorrief ($p < 0,05$ für 10 und 30 Sekunden sowie $<0,01$ für 120 Sekunden im Vergleich zur unbehandelten Probe; $n=4$, Abb. 4D).

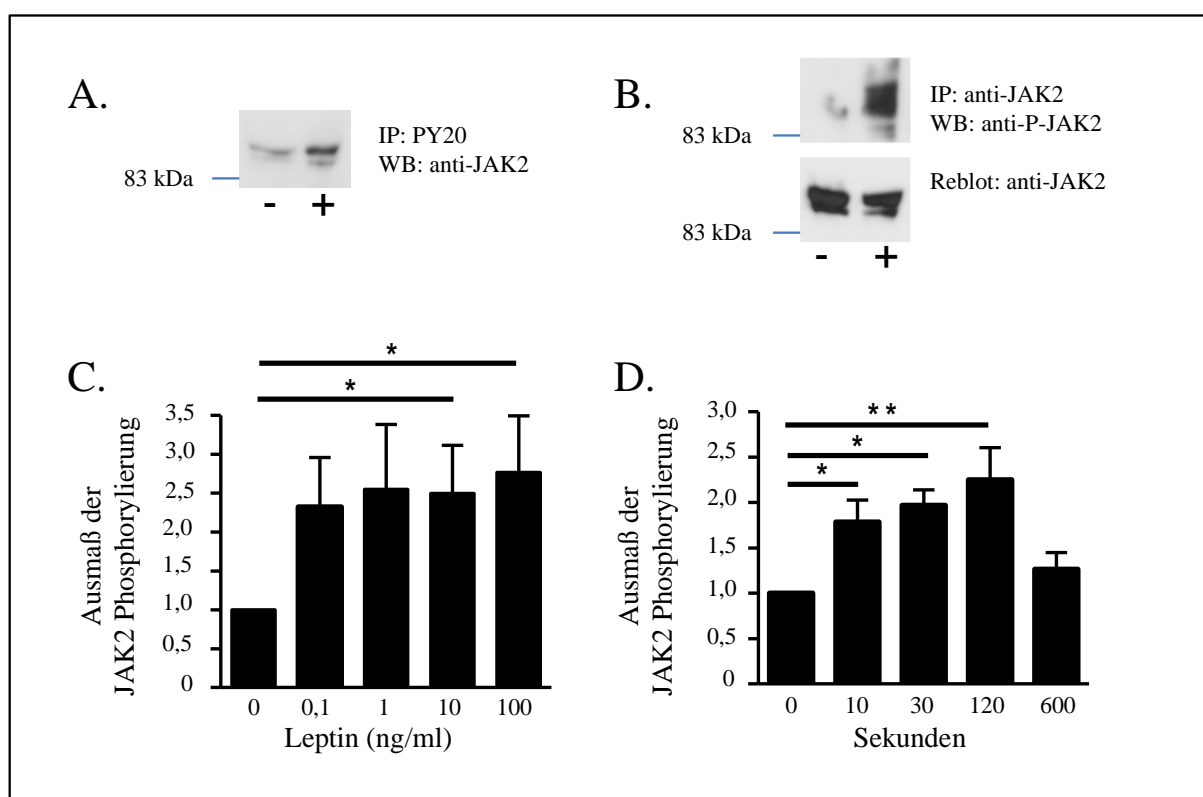


Abb. 4: Leptin-induzierte zeit- und dosisabhängige Aktivierung der Januskinase 2.

4A und 4B: Dargestellt ist der Effekt von Leptin auf die Phosphorylierung von JAK2. Hierfür wurde das Vorkommen von phosphoryliertem JAK2 in unstimulierten (-) und in mit Leptin-stimulierten (10 ng/ml, 2 Min.) (+) Thrombozyten verglichen. Einer Immunpräzipitation (IP) auf Phosphotyrosine (PY20) (A) bzw. JAK2 (B) folgte ein Western Blot (WB) auf JAK2 (A) bzw. Phospho-JAK2 (B). Zur Demonstration der gleichgroßen Proteinbeladung wurde in 4B noch ein Reblot auf Gesamt-JAK2 abgebildet. Als Referenz der Proteingröße wurde links der Marker für 83 kDa dargestellt.

4C: Statistisches Ergebnis der Auswirkung einer Leptinstimulation (2 Min.) mit unterschiedlichen Konzentrationen auf die Phosphorylierung von JAK2 ($n=4$ Western Blots) in Thrombozyten. Auf der x-Achse dargestellt sind die unterschiedlichen zur Probe hinzugegebenen Konzentrationen von Leptin, auf der y-Achse ist das Ausmaß der Proteinphosphorylierung abgebildet. Das dargestellte Ausmaß der Phosphorylierung (Mittelwert \pm SEM) bezieht sich dabei auf die unbehandelte Probe, der der Wert 1,0 zugeordnet wurde (* $p < 0,05$).

4D: Statistisches Ergebnis einer Leptinwirkung (10 ng/ml) unterschiedlicher Dauer auf die JAK2-Phosphorylierung ($n=4-8$ Western Blots) in Thrombozyten. Auf der x-Achse dargestellt sind die

unterschiedlichen Wirkdauern des Stimulanz Leptins, auf der y-Achse ist das Ausmaß der Proteinphosphorylierung abgebildet. Das Ausmaß der Phosphorylierung (Mittelwert \pm SEM) bezieht sich dabei auf die unbehandelte Probe, der der Wert 1,0 zugeordnet wurde (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$) (Abb. modifiziert nach Dellas et al. 2007).

Analog zu den Untersuchungen der JAK2-Phosphorylierung erfolgte zum Nachweis einer Leptin-induzierten Aktivierung von STAT3 eine Immunpräzipitation von 4×10^8 Thrombozyten, die entweder mit Leptin (2 Min., 10 ng/ml) stimuliert wurden oder aber unbehandelt blieben, d.h. eine äquivalente Menge an Lösungssubstanz erhielten. Anschließend wurden mittels Immunpräzipitation unter Verwendung des Antikörpers PY20 Phosphotyrosine präzipitiert, die dann auf STAT3 geblottet wurden. Wie in der Abbildung 5A erkennbar ist, konnte eine durch Leptin bewirkte Phosphorylierung von STAT3 nachgewiesen werden.

Zur detaillierteren Betrachtung dieses Ergebnisses wurden mittels eines Western Blot Verfahrens die Ausmaße der STAT3-Phosphorylierung in Thrombozyten (3×10^7) für verschiedene Leptinkonzentrationen sowie unterschiedliche Stimulationszeiten untersucht. Es erfolgte jeweils zunächst ein Western Blot auf die phosphorylierte Form von STAT3 und dann ein Re-Blot auf gesamt-STAT3. Dann wurde das Vorkommen von phosphoryliertem STAT3 mit der Proteinbeladung von STAT in ein Verhältnis gesetzt und so die Leptin-vermittelte Proteinaktivierung densitometrisch quantifiziert. In der Abbildung 5B ist beispielhaft ein Western Blot abgebildet, der die durch Leptin (10 ng/ml) induzierte Phosphorylierung von STAT3 in humanen Thrombozyten zeigt. Sichtbar ist eine mit längerer Stimulationszeit zunehmende STAT3-Phosphorylierung. Diese zeit-abhängige Zunahme der STAT3-Phosphorylierung ist ebenso wie eine dosis-abhängige Zunahme in den aus 5-10 Versuchen zusammengefassten densitometrischen Ergebnissen dargestellt (Abb. 5C-D). Es ergaben sich hierbei folgende signifikante Ergebnisse: Nach einer Stimulationsdauer von 2 Minuten konnte Leptin in einer Konzentration von 1 ng/ml einen Anstieg der Phosphorylierung von STAT3 auf das $1,74 \pm 0,3$ -fache erreichen, in einer Konzentration von 10 ng/ml auf das $1,7 \pm 0,2$ -fache und in einer Dosierung von 100 ng/ml auf das $1,7 \pm 0,2$ -fache ($p < 0,05$ für 1 und 100 ng/ml und $< 0,01$ für 10 ng/ml; $n = 5-10$, s. Abb. 5C). Für die zeitabhängigen Untersuchungen ergab sich ein Trend zur vermehrten Phosphorylierung von STAT3, die Ergebnisse erreichten jedoch nicht das Signifikanzniveau.

In einem Versuch, in dem eine mit Leptin stimulierte Thrombozytenprobe zunächst mit dem JAK2-Inhibitor AG490 vorinkubiert wurde, konnte im Vergleich zur unstimulierten Probe und im Vergleich zur Leptin stimulierten Thrombozytenprobe ohne Inhibitorenwirkung dargestellt werden, dass der Inhibitor AG490 die durch Leptin bewirkte Zunahme der STAT3-Phosphorylierung aufhebt (rechte Spur AG in Abb. 5B). Eine ausbleibende STAT3-Phosphorylierung durch Hemmung der Aktivität von JAK2 zeigt, dass STAT3 in der Leptin-Signalkaskade in Thrombozyten der JAK2-Aktivierung nachgeschaltet ist und die STAT3-Phosphorylierung hiervon abhängig geschieht.

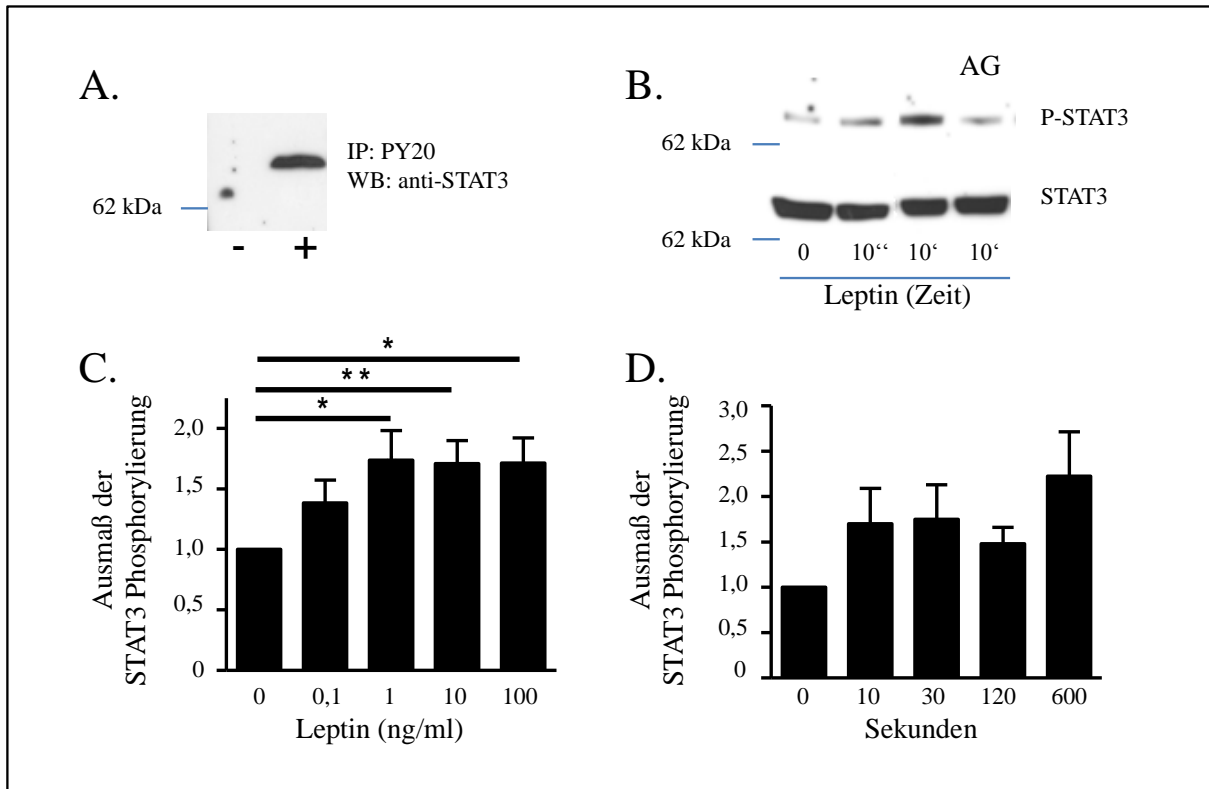


Abb. 5: Phosphorylierung von STAT3 durch Leptinstimulation von Thrombozyten.

5A: Zur Darstellung des Effektes einer Stimulation humaner Thrombozyten mit Leptin sind gewaschene, unbehandelte Thrombozyten mit (-) gekennzeichnet; stimulierte (Leptin 10 ng/ml, 2 Min.) Thrombozyten mit (+). Einer Immunpräzipitation auf Phosphotyrosine (PY20) folgte ein Western Blot auf STAT3. Als Referenz der Proteingröße wurde links der Marker für 62 kDa dargestellt. 5B: Gezeigt wird die STAT3 Phosphorylierung bei ansteigender Stimulationsdauer von humanen Thrombozyten mit Leptin. Die mit AG beschriftete Spur zeigt einen Inhibitionsversuch, bei dem die Thrombozyten vor Leptinstimulation mit 100 μ M AG490 vorinkubiert wurden. Als Referenz der Proteingröße wurde links der Marker für 62 kDa dargestellt.

5C und 5D: Dargestellt sind die statistischen Ergebnisse des stimulatorischen Effekts von Leptin auf die Phosphorylierung von STAT3 in Thrombozyten. 5C zeigt den Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen, 5D unterschiedlicher Stimulationsdauern von Leptin. Auf der x-Achse sind die verschiedenen Leptinkonzentrationen respektive Stimulationsdauern abgebildet, auf der y-Achse das Ausmaß der Proteinphosphorylierung (n=5-10, *p<0,05, **p<0,01). Das Ausmaß der Phosphorylierung (Mittelwert \pm SEM) bezieht sich dabei auf die unbehandelte Probe, der der Wert 1,0 zugeordnet wurde (Abb. modifiziert nach Dellas et al. 2007)

3.1.3 Leptin-induzierte Phosphorylierung der Phosphatidylinositol-3-Kinase und Proteinkinase B (PKB, AKT) in Thrombozyten

Wie in Abbildung 1 ersichtlich ist, kann eine Aktivierung von JAK2 die Phosphorylierung der PI3K und nachgeschaltet der PKB/AKT bewirken. Diese Achse sollte in der vorliegenden Studie für Thrombozyten überprüft werden.

Zur Untersuchung der Leptin-induzierten Aktivierung von P85 α , der regulatorischen Untereinheit der PI3K, wurden gewaschene Thrombozyten zunächst unstimuliert (-) belassen bzw. mit 10 ng/ml Leptin für 2 Minuten stimuliert (+). Anschließend wurden mit Hilfe des Antikörpers PY20 Phosphotyrosine

präzipitiert und ein Western Blot unter Verwendung des Antikörpers AntiP85 α durchgeführt, um so die phosphorylierte Form des Proteins sichtbar zu machen.

In Abb. 6 erkennt man, dass es durch die Behandlung der Thrombozyten mit 10 ng/ml Leptin zu einer Zunahme der Phosphorylierung von P85 α kommt (vgl. rechte Spur). Leptin induzierte ebenfalls die Phosphorylierung von AKT zeit- und dosisabhängig (Abb. 7). Gewaschene Thrombozyten wurden dosis- und zeitabhängig mit Leptin stimuliert und anschließend wurde ein Western Blot zunächst auf Phospho-AKT und dann auf Gesamt-AKT durchgeführt. In der densitometrischen Auswertung unter Berücksichtigung aller Versuche mit einer zehnmütigen Stimulation mit 10 ng/ml Leptin ergab sich eine signifikante Zunahme der Phosphorylierung von AKT um das $2,0 \pm 0,4$ -fache ($p < 0,016$; $n=6$) im Vergleich zur unstimulierten Probe. Weiteres statistisch signifikantes Ergebnis der Analyse einer Leptin-induzierten AKT-Aktivierung unter Einfluss Leptins zeigte unter Dosierung von 100 ng/ml einen $2,1 \pm 0,2$ -fachen Anstieg der AKT-Phosphorylierung ($p=0,002$). Eine Präinkubation mit dem JAK2-Inhibitor AG490 konnte eine Phosphorylierung von AKT verhindern (Abb. 7A; AG). Auch eine Präinkubation mit dem PI3K-Inhibitor Ly 294002 hob den Effekt von Leptin auf die Phosphorylierung von AKT auf (Abb. 7A; Ly). Dieses Ergebnis führt zu der Annahme, dass die Leptin-induzierte Phosphorylierung von AKT in der Signalkaskade JAK2 und PI3K nachgeschaltet ist. Im Gegensatz hierzu hatte der Mitogen-activated-protein-kinase (MEK)-Inhibitor PD98059 keinen Effekt auf die Leptin-induzierte AKT-Phosphorylierung (Abb. 7A, PD). Dies legt die Vermutung nahe, dass der Signalweg, der zu einer AKT-Aktivierung führt, unabhängig von der Aktivierung von MAP-Kinasen ist.

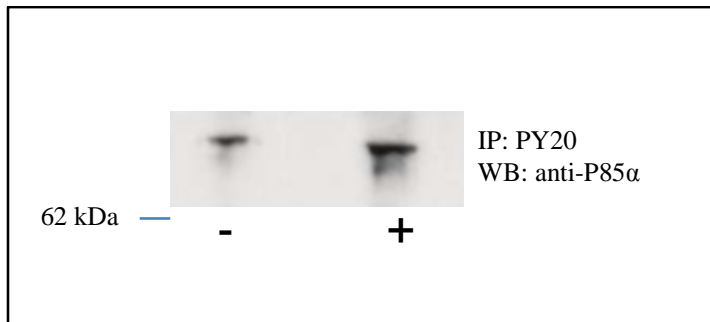


Abb. 6: Leptin-induzierte Phosphorylierung von P85 α , der regulatorischen Untereinheit der PI3K. Immunpräzipitation (IP) auf Phosphotyrosine (PY20) und anschließender Western Blot (WB) mittels des Antikörpers anti-P85 α von mit Leptin stimulierten (10 ng/ml, 2 Min) (+) und unbehandelten (-) Thrombozyten. Als Referenz der Proteingröße wurde links der Marker für 62 kDa dargestellt (Abb. modifiziert nach Dellas et al. 2007).

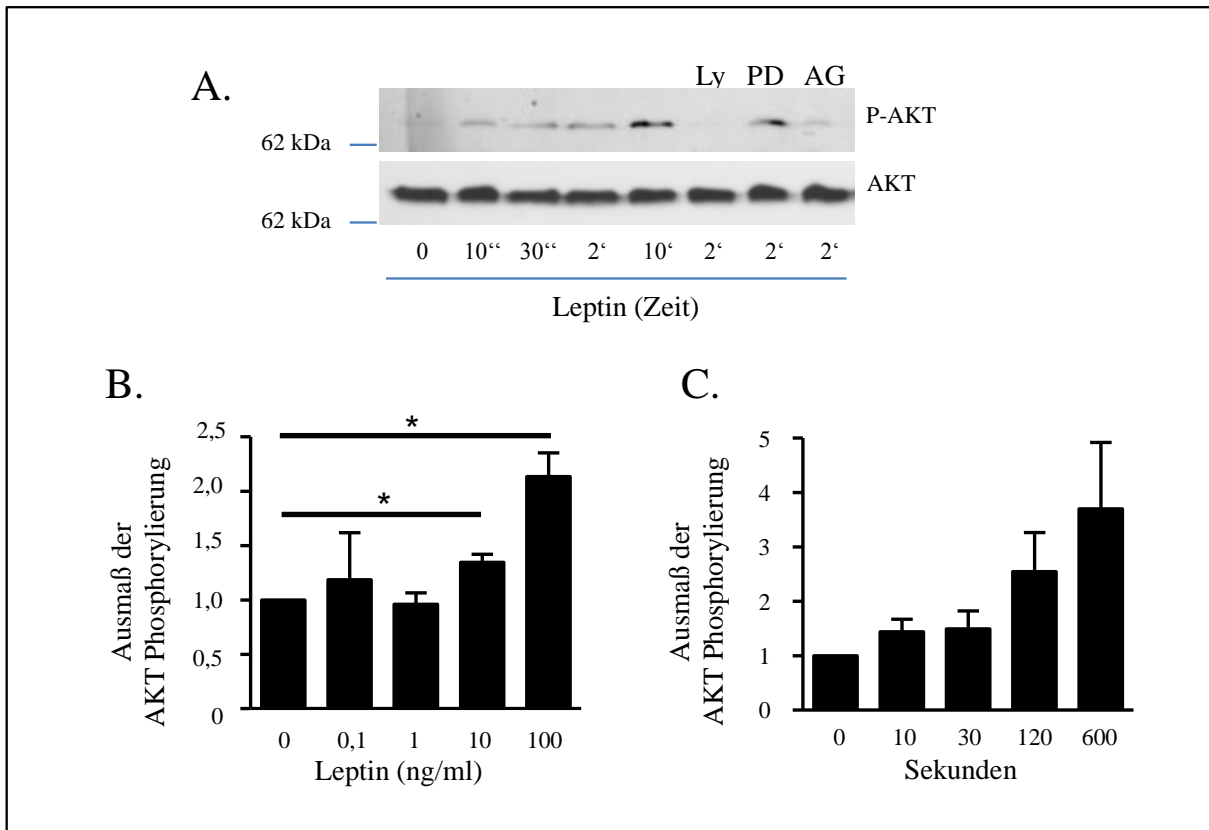


Abb. 7: Leptin-induzierte Phosphorylierung der Proteinkinase B/AKT

7A: Abgebildet ist ein exemplarischer Western Blot, der den Einfluss Leptins auf die Phosphorylierung von AKT darstellt. Oben ist der Western Blot auf Phospho-Akt, unten der Re-Blot auf Gesamt-AKT abgebildet. Die mit Ly, PD und AG beschrifteten Spuren zeigen Inhibitionsversuche, in denen Thrombozyten vor der zweiminütigen Leptinstimulation mit 50 μ M Ly294002 (Ly), 50 μ M PD98059 (PD) oder 100 μ M AG490 (AG) vorinkubiert wurden. Als Referenz der Proteingröße wurde links der Marker für 62 kDa dargestellt.

7B und 7C: Ergebnisse der dosisabhängigen Wirkung von Leptin nach 2-minütiger Stimulation auf die Phosphorylierung von AKT (7B) bzw. der zeitabhängigen Wirkung von 10 ng/ml Leptin (7C) (n=3-6, *p<0,05). Das dargestellte Ausmaß der Phosphorylierung (Mittelwert \pm SEM) bezieht sich dabei auf die unbehandelte Probe, der der Wert 1,0 zugeordnet wurde (Abb. modifiziert nach Dellas et al. 2007).

3.1.4 Leptin-induzierte Phosphorylierung der Phospholipase C γ 2 und Proteinkinase C (PLC γ 2, PKC) in Thrombozyten

Weitere an der Signaltransduktion unter Einfluss von Leptin für verschiedene Zellen dargestellte Signalmoleküle sind die Phospholipase C sowie die Proteinkinase C. Daher sollten auch für humane Thrombozyten ihre Beteiligung in der intrazellulären Signalantwort nach Einwirken von Leptin untersucht werden.

Mittels Western Blot konnte gezeigt werden, dass der Einfluss von Leptin zu einem Anstieg der Phosphorylierung und somit Aktivierung der Phospholipase C γ 2 (PLC γ 2) führt und dass dieser Effekt dosisabhängig ist, das bedeutet, dass Leptin in zunehmender Dosierung zu einer stärkeren PLC- γ 2 Phosphorylierung führt (Abb. 8). Eine Präinkubation der humanen Thrombozytenprobe mit dem

JAK2-Inhibitor AG490 konnte diesen aktivierenden Effekt auf die PLC- γ 2 verhindern. Diese Beobachtung lässt schlussfolgern, dass die PLC γ 2 dem Signalmolekül JAK2 in der Leptin-Signalkaskade nachgeschaltet ist und ihre Aktivierung JAK2-abhängig geschieht.

Darüber hinaus sollte der Effekt Leptins auf das intrathrombozytäre Molekül Proteinkinase C (PKC) untersucht werden. Es konnte im Western Blot eine Zunahme der PKC-Phosphorylierung unter Einfluss von Leptin in humanen Thrombozyten beobachtet werden (Abb. 9).

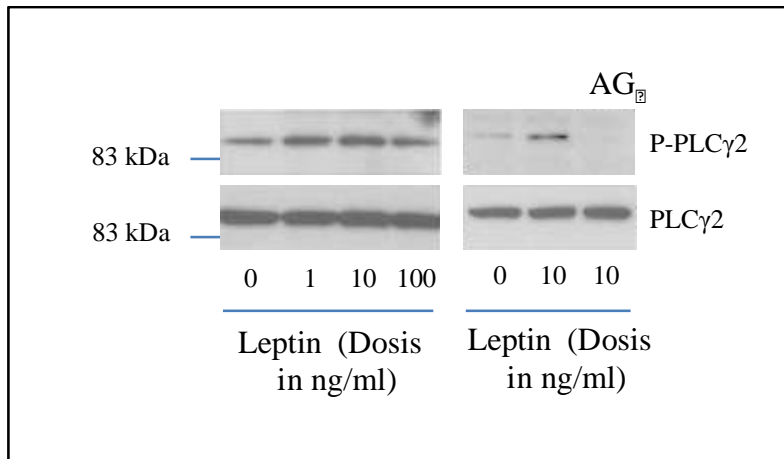


Abb. 8: Leptin-induzierte PLC γ 2-Phosphorylierung. Western Blot auf Phospho-PLC γ 2 (P- PLC γ 2, oben) sowie anschließender Re-Blot auf PLC γ 2 (darunter) von gewaschenen Thrombozyten, die mit Leptin für 2 Minuten in der angegebenen Dosierung stimuliert wurden. Rechts ist in der Spur AG ein Inhibitionsversuch dargestellt, in dem gewaschene Thrombozyten mit dem JAK2-Inhibitor AG490 (100 μ M) für 10 Minuten vor der 2-minütigen Leptinstimulation vorbehandelt wurden (Abb. modifiziert nach Dellas et al. 2007).

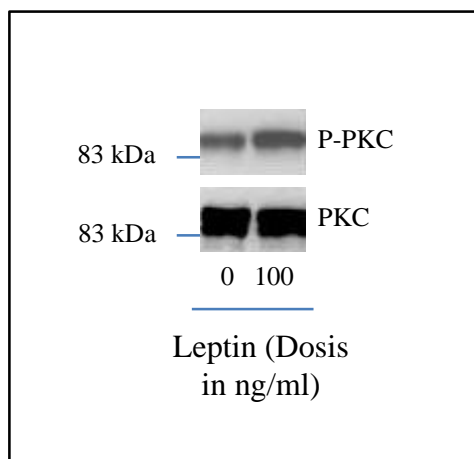


Abb. 9: Leptin-induzierte Phosphorylierung der Proteinkinase C. Western Blot auf Phospho-PKC (P-PKC, oben), Re-Blot auf PKC (darunter) von Thrombozyten, die unbehandelt blieben (-) bzw. mit Leptin (10 ng/ml, 2 Min.) (+) stimuliert wurden. (Abb. modifiziert nach Dellas et al. 2007).

3.1.5 Leptin-induzierte Aktivierung des p38-MAP-Kinase-Phospholipase A₂ (PLA₂)-Signalwegs

Die Leptin-vermittelte Phosphorylierung des Leptinrezeptors am Tyrosinrest 985 führt zur Stimulation des ERK/MAPK-Signalwegs (Agrawal et al. 2011). Für verschiedene Zelltypen konnte zudem eine Nachschaltung der Signalmoleküle ERK 1/2 und PLA gezeigt werden. Die Beteiligung dieser Tyrosine im Leptinsignalweg in Thrombozyten sollte in der vorliegenden Dissertation betrachtet werden.

Es konnte in den durchgeführten Versuchen, wie in der Abbildung 10 gezeigt, eine Leptin-vermittelte Steigerung der Phosphorylierung der p38-MAP-Kinase in humanen Thrombozyten beobachtet werden. Mittels Western Blot konnte eine zeit- und dosisabhängige Steigerung der p38-Phosphorylierung durch Leptin dargestellt werden (Abb. 10A). In der Abbildung 10B und 10C sind die Ergebnisse von vier Versuchen zur zeit- und dosisabhängigen Phosphorylierung von p38 durch Leptin zusammengefasst und statistisch ausgewertet.

Darüber hinaus konnte eine Leptin-induzierte zeit- und dosisabhängige Steigerung der Phosphorylierung der Phospholipase A₂ in humanen Thrombozyten beobachtet werden (Abb. 11). Diese Aktivierung wird scheinbar über die p38-MAP-Kinase vermittelt. Dies lässt sich aus der Beobachtung schlussfolgern, dass eine Präinkubation der Thrombozyten mit dem p38-MAP-Kinase-Inhibitor SB203580 den stimulierenden Effekt von Leptin auf die PLA₂-Phosphorylierung reduziert. Damit zeigte sich auch in Thrombozyten eine Leptin-induzierte Aktivierung der p38-PLA₂-Kaskade.

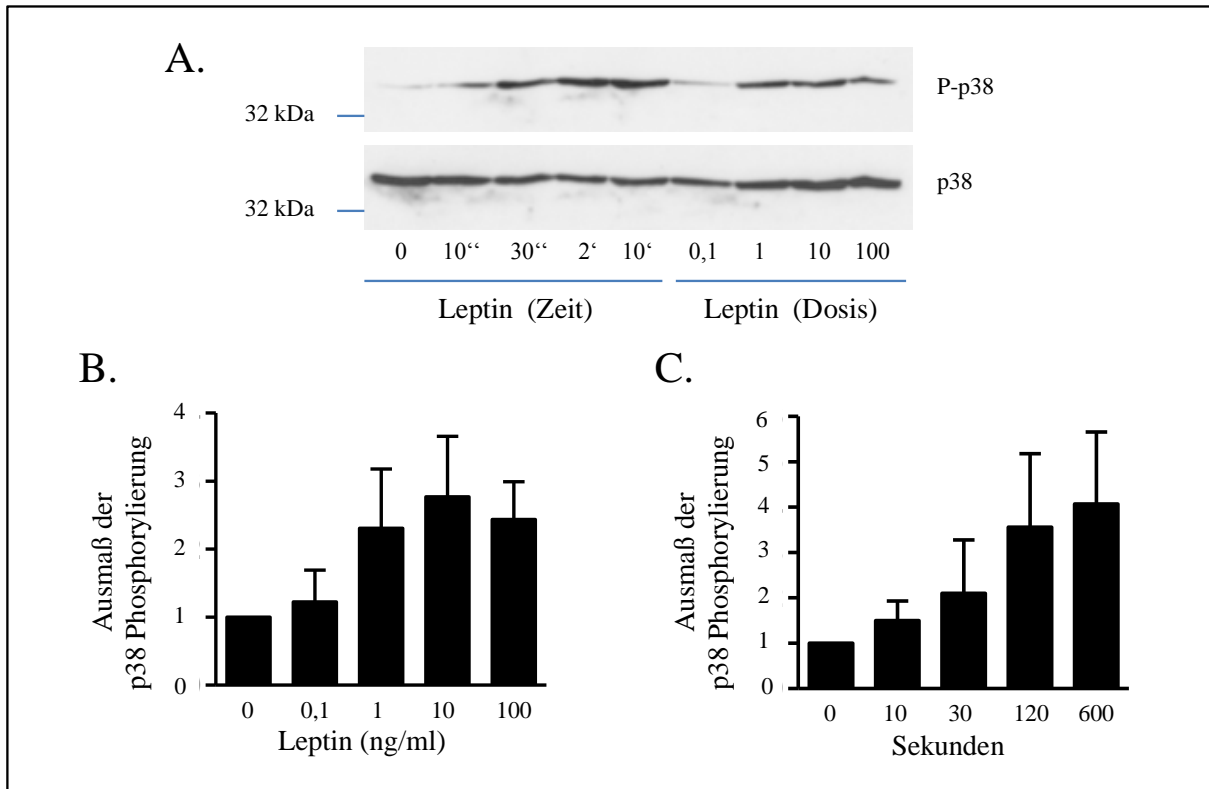


Abb. 10: Leptin-induzierte Phosphorylierung von p38

10A: Western Blot humaner Thrombozyten auf Phospho-p38 (P-p38, oben) sowie der dazugehörige Re-Blot auf Gesamt-p38 (p38, darunter) nach einer Stimulation mit 10 ng/ml Leptin über die angegebenen Zeiträume bzw. mit den angegebenen Dosierungen für jeweils 2 Minuten. Als Referenz der Proteingröße wurde links der Marker für 32 kDa dargestellt.

10B und 10C: Zusammenfassung der densitometrischen Analysen von 4 Western Blots auf die dosisabhängige (10B) und zeitabhängige (10C) Phosphorylierung von p38 in Thrombozyten. Die Proben wurden mit den angegebenen Konzentrationen (10B) von Leptin für 2 Minuten oder über die dargestellten Zeiträume (10C) mit 10 ng/ml Leptin stimuliert. Die Lysate wurden dann zunächst auf phosphoryliertes p38 und nachfolgend auf Gesamt-p38 geblottet. Das dargestellte Ausmaß der Phosphorylierung (Mittelwert \pm SEM) bezieht sich dabei auf die unbehandelte Probe, der der Wert 1,0 zugeordnet wurde (Abb. modifiziert nach Dellas et al. 2007).

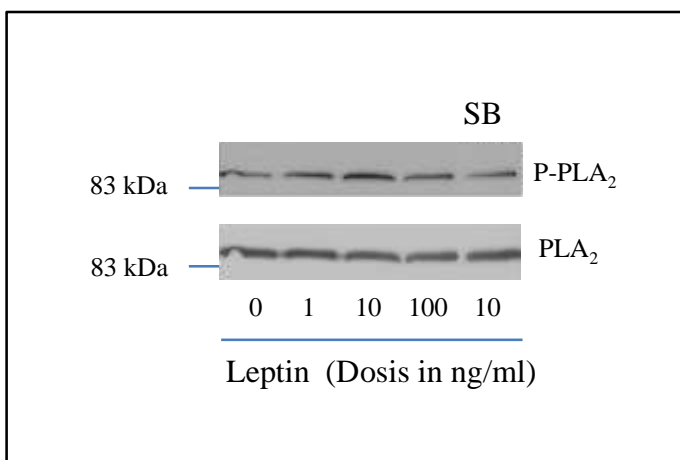


Abb. 11: Leptin-induzierte Phosphorylierung der Phospholipase A₂. Western Blot humaner Thrombozyten auf Phospho-PLA₂ (P-PLA₂, oben) sowie anschließender Re-Blot auf Gesamt-PLA₂ (direkt darunter) von gewaschenen Thrombozyten, die mit Leptin für 2 Minuten in der angegebenen

Dosierung stimuliert wurden. Die Probe der Spur SB wurde vor der Leptinstimulation für 10 Minuten mit dem Inhibitor SB203580 (20 μ M) vorinkubiert. Als Referenz der Proteingröße wurde links der Marker für 83 kDa dargestellt (Abb. modifiziert nach Dellas et al. 2007).

3.1.6 Leptin-induzierte Phosphorylierung der MAP-Kinase p42/44 in Thrombozyten

Im Rahmen der Untersuchung eines Leptin-vermittelten Effekts auf MAP-Kinasen in humanen Thrombozyten sollte auch die MAPK p42/44 betrachtet werden. Mittels Western Blot Analyse konnte eine zeit- sowie dosisabhängige Phosphorylierung der p42/44 MAP-Kinase dargestellt werden (Abb. 12A). Eine 10-minütige Präinkubation mit den Inhibitoren PD98059 (MAPK-ERK Kinase 1-Inhibitor) und AG490 (JAK2-Hemmer) vor der zweiminütigen Leptinsimulation konnte den steigernden Effekt des Adipokins auf die Phosphorylierung reduzieren (Abb. 12B). Dies stellt eine Abhängigkeit der p42/44-Phosphorylierung von den Tyrosinkinasen JAK2 und MEK1 dar.

In den Abbildungen 12C und 12D sind die densitometrischen Ergebnisse von 4-5 Experimenten dargestellt, die eine zeit- (Abb. 12C) und dosisabhängige (Abb. 12D) Leptin-induzierte Phosphorylierung der p42/44 MAP-Kinase zeigen. Leptin führte durch eine Stimulationsdauer von 30 s zu einem Anstieg der Phosphorylierung auf das $2,5\pm 0,5$ -fache, durch eine Stimulation über 120 s auf das $3,1\pm 0,7$ -fache und durch eine Stimulationsdauer von 600 s auf das $3,8\pm 0,7$ -fache (p jeweils $<0,05$ gegenüber der unbehandelten Probe). Leptin bewirkte durch eine 2-minütige Stimulation humaner Thrombozyten in einer Konzentration von 0,1 ng/ml in Dosisversuchen eine signifikante Zunahme der Phosphorylierung der p42/44 auf das $1,57\pm 0,1$ -fache, in einer Dosierung von 1 ng/ml eine Zunahme auf das $1,94\pm 0,2$ -fache und in einer Konzentration von 10 ng/ml eine Zunahme auf das $2,0\pm 0,3$ -fache (p jeweils $<0,05$ gegenüber der unbehandelten Probe).

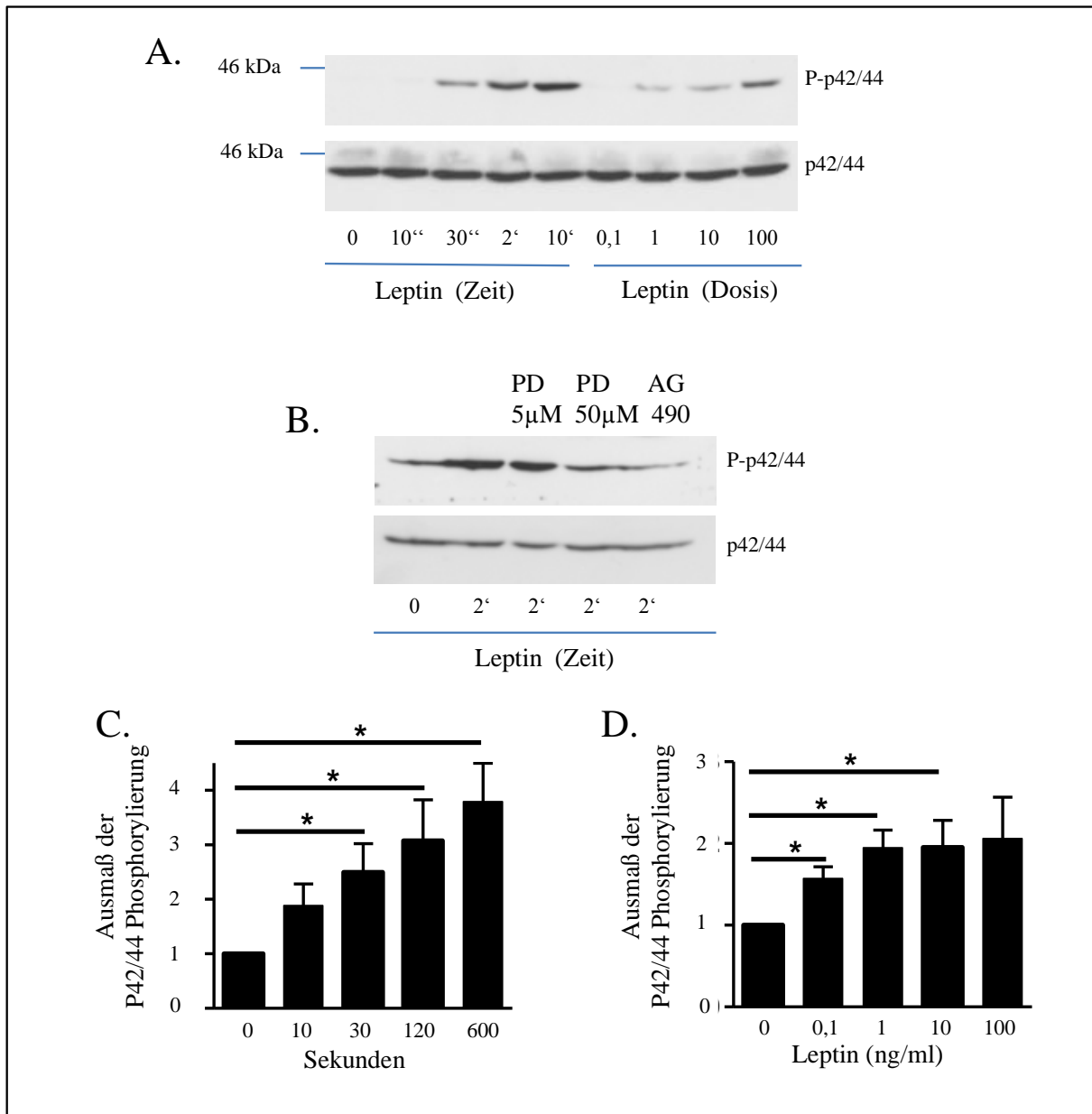


Abb. 12: Leptin-induzierte p42/44-MAPK-Phosphorylierung.

12A: Western Blot von unbehandelten (0) Thrombozyten bzw. zeitabhängige Stimulation mit 10 ng/ml Leptin (Zeit) oder dosisabhängige Stimulation mit Leptin für 2 Minuten (Dosis) auf Phospho-p42/44 (P-p42/44, oberes Panel), anschließend Re-Blot auf Gesamt p42/44 (p42/44, unteres Panel).

12B: Western Blot auf Phospho-p42/44 (P-p42/44, oben) und Reblot auf Gesamt-p42/44 (direkt darunter) von unbehandelten (0) und von mit 10 ng/ml Leptin (2 Minuten) behandelten Thrombozyten. Die Spuren PD und AG geben eine Präinkubation der Thrombozyten mit den Inhibitoren PD98059 (PD) in angegebener Konzentration und AG490 (100 μ M; AG) vor der Leptinstimulation an.

12C und D: Zusammenfassung der densitometrischen Ergebnisse für den zeit- (Stimulation mit 10 ng/ml Leptin) und dosisabhängigen (Stimulation für 2 Minuten) Effekt von Leptin auf die Phosphorylierung von p42/44 (n=4-5, *p<0,05). Das dargestellte Ausmaß der Phosphorylierung (Mittelwert \pm SEM) bezieht sich dabei auf die unbehandelte Probe, der der Wert 1,0 zugeordnet wurde.

3.2 Aktivierung des Fibrinogenrezeptors und Adhäsion der Thrombozyten auf immobilisiertem Fibrinogen

Nachdem eine durch Leptin bewirkte Aktivierung verschiedener Proteinkinasen in Thrombozyten nachgewiesen wurde (Kapitel 3.1), sollte als nächstes die funktionelle Bedeutung einer Leptinstimulation auf die Thrombozytenfunktion *in vitro* und die Beteiligung dieser Kinasen untersucht werden. Eine thrombozytäre Aktivierung resultiert letztendlich in einer gesteigerten Aggregation. Voraussetzung hierfür ist die Vernetzung über Fibrinogen – sowohl bei der Anheftung an die subendotheliale Matrix als auch für die Zell-Zell-Verknüpfung. Es wurde daher als nächstes untersucht, ob eine Aktivierung des wichtigsten thrombozytären Fibrinogenrezeptors $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ durch Stimulation mit Leptin nachgewiesen werden kann und ob dieses Proteohormon die Adhäsion von Thrombozyten auf immobilisiertem Fibrinogen bewirken kann.

3.2.1 Leptin-induzierte Aktivierung des thrombozytären Fibrinogenrezeptors $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$

Die Untersuchung der Auswirkung einer Leptinstimulation auf den Fibrinogenrezeptor $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ wurde mittels Durchflusszytometrie vorgenommen. Unter Einsatz des gegen aktiviertes $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ gerichteten Antikörpers PAC-1 zeigte sich in 4 Versuchen eine erhöhte Expression von aktiviertem $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ auf der Oberfläche von humanen Thrombozyten. Diese durch Inkubation mit Leptin hervorgerufene Wirkung war sowohl in Abwesenheit als auch in Anwesenheit von 0,1 μM ADP festzustellen. Abbildung 13 stellt die Expression des Integrins $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ bei unbehandelten Thrombozyten (mit 1% gleichgesetzt) im Vergleich zu mit Leptin inkubierten Thrombozyten dar. Nach Stimulation mit Leptin stieg die Expression von aktiviertem $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ auf das 10 ± 2 -fache ($p=0,006$). Auch bei zusätzlicher Stimulation mit ADP konnte Leptin weiterhin eine signifikante Steigerung der thrombozytären Fibrinogenrezeptoraktivierung um das $1,2 \pm 0,3$ -fache ($p=0,014$) bewirken.

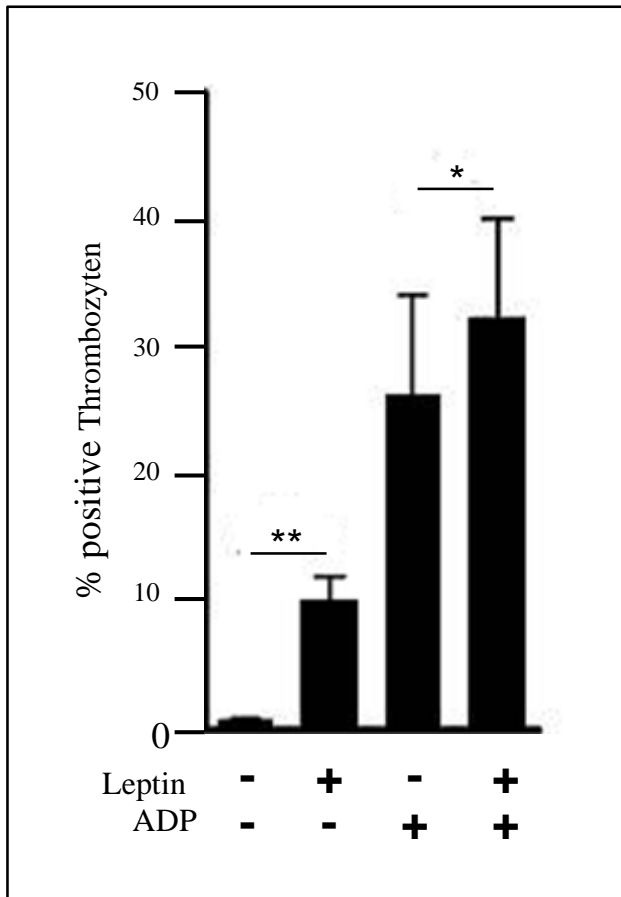


Abb. 13: Leptin-induzierte Aktivierung des Integrins $\alpha_{IIb}\beta_3$. Verdünntes Vollblut wurde unbehandelt belassen (Leptin -) oder mit 500 ng/ml Leptin für 10 Minuten stimuliert (Leptin +). Mittels Durchflusszytometrie wurde der Anteil der Thrombozyten bestimmt, der für die Expression des aktivierten $\alpha_{IIb}\beta_3$ positiv war. Dieser Effekt wurde sowohl ohne nachfolgende ADP-Zugabe (ADP -) als auch mit nachfolgender Zugabe von 0,1 μ M ADP (ADP +) betrachtet (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, $n = 4$) (Abb. modifiziert nach Dellas et al. 1007).

3.2.2 Leptin-induzierte Thrombozytenadhäsion an immobilisiertem Fibrinogen

Nachdem dargestellt werden konnte, dass Leptin den Fibrinogenrezeptor $\alpha_{IIb}\beta_3$ aktivieren kann, sollte die physiologische Relevanz der Leptin-vermittelten Aktivierung des Integrins detaillierter beleuchtet werden. Daher wurden Experimente durchgeführt, die Aufschluss über das Adhäsionsverhalten von Thrombozyten an immobilisiertem Fibrinogen geben sollten. Mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie konnte nachgewiesen werden, dass die Thrombozytenadhäsion an Fibrinogen-bedeckten Deckgläschen durch Leptin signifikant gesteigert wird (Abb. 14 und 15). Auch hier zeigte sich das Ergebnis in Abhängigkeit der verwendeten Dosis. Für diesen Nachweis wurden zunächst gewaschene Thrombozyten (6×10^6 /ml) mit Leptin, Thrombin (1 U/ml, als positive Kontrolle) oder PBS (als negative Kontrolle) behandelt. Eine Färbung mit Rhodamin-markiertem Phalloidin stellt in der Fluoreszenzmikroskopie Aktin-reiche Zellareale dar. Es erfolgte eine Analyse des Einflusses von Leptin unter Betrachtung der Anzahl der adhärenen Zellen sowie der durchschnittlichen Oberfläche

eines Thrombozyten. In Abbildung 14 sind fluoreszenzmikroskopisch gewonnene Bilder von Thrombozyten nach Behandlung mit PBS, Leptin und Thrombin dargestellt. Sichtbar ist eine Leptin-induzierte Steigerung der Thrombozytenadhäsion an Fibrinogen. Bei Stimulation mit 0,1 ng/ml Leptin zeigte sich ein 4,6-facher, bei Stimulation mit 1 ng/ml Leptin ein 9,5-facher und bei Stimulation mit 10 ng/ml ein 17,2-facher Anstieg der Anzahl adhärenter Thrombozyten (p jeweils $<0,0005$). Als Kontrolle für eine spezifische Bindung der Thrombozyten an Fibrinogen wurden nur BSA-beschichtete Deckgläschen verwendet. Dabei zeigte sich kein signifikanter Anstieg der Thrombozytenadhäsion nach Stimulation mit Leptin.

Neben der Wirkung einer Leptinstimulation auf die Adhäsion untersuchten wir den Einfluss Leptins auf die Zellgröße der an Fibrinogen-adhärenenten Thrombozyten, da ein *shape change*, also die Formveränderung der Thrombozyten, ein frühes Ereignis bei der Thrombozytenaktivierung darstellt. Die automatisch durch die verwendete Software ausgewertete Zelloberfläche von unstimulierten adhärenenten Thrombozyten wurde mit der Oberfläche von Leptin-stimulierten (10 ng/ml) Thrombozyten verglichen. Es zeigte sich, dass die Stimulation mit Leptin die durchschnittliche Oberfläche signifikant um das $1,4 \pm 0,2$ -fache erhöhte ($p < 0,05$, $n=3$) verglichen mit unbehandelten Thrombozyten.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass Leptin

- 1) Als frühes Zeichen einer Thrombozytenaktivierung Formveränderungen hervorruft und somit zu einer Reorganisation des Zytoskeletts führt.
- 2) Eine Aktivierung des Integrins $\alpha_{IIb}\beta_3$, also dem Rezeptor, der für die Fibrinogenbindung notwendig ist, bewirkt und
- 3) Die Adhäsion von Thrombozyten an immobilisiertes Fibrinogen fördert.

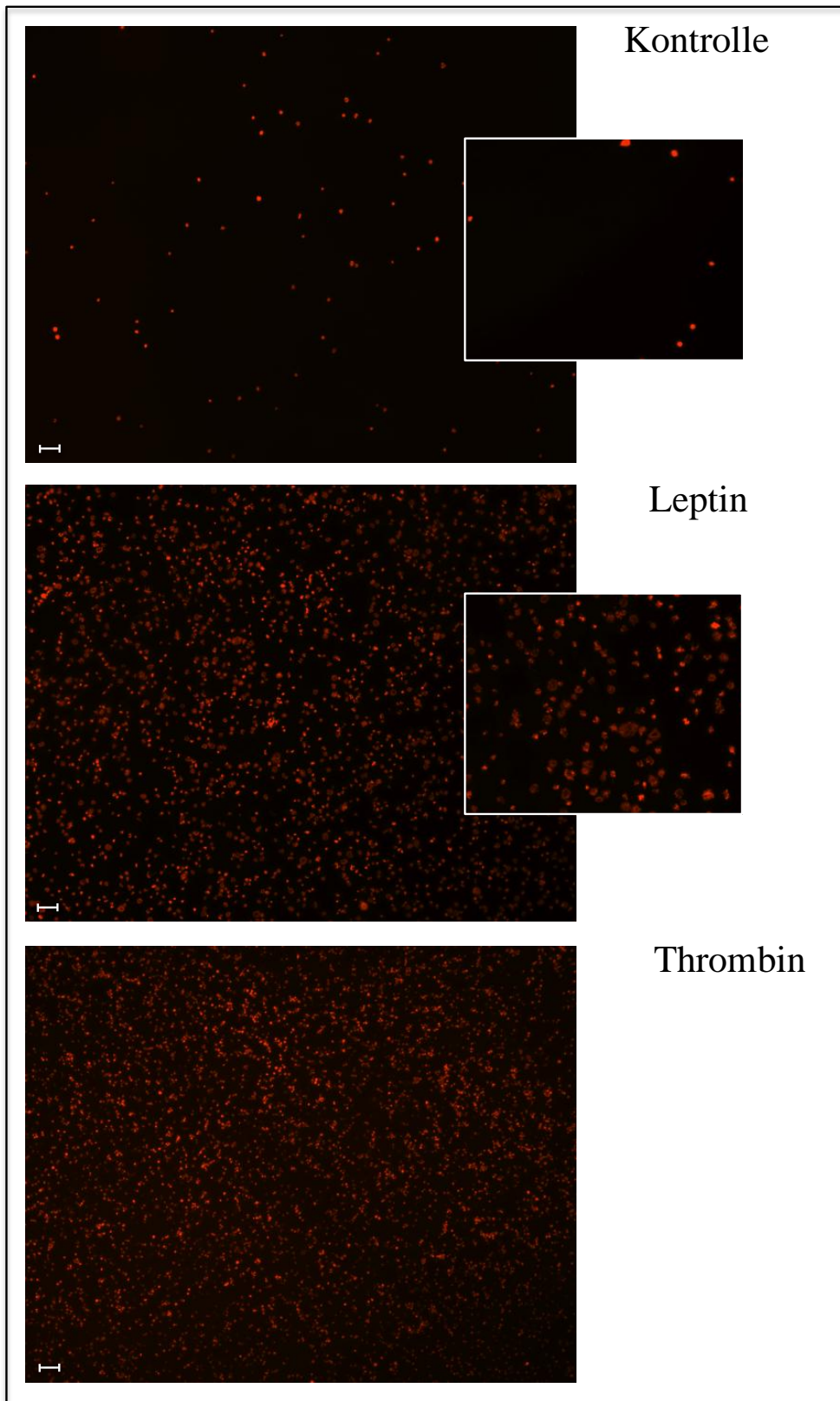


Abb. 14: Leptin-induzierte Thrombozytenadhäsion an Fibrinogen. Fluoreszenzmikroskopie von gewaschenen Thrombozyten, die mit PBS (Negativkontrolle, oben), Leptin (10 ng/ml, Mitte) und Thrombin (1 U/ml, Positivkontrolle, unten) behandelt, auf Fibrinogen-beschichteten Deckgläschen inkubiert und anschließend nach Färbung der Aktin-reichen Zellareale mit Rhodamin-markiertem Phalloidin dargestellt wurden. (Vergrößerung 20x, kleiner Ausschnitt 40x. Maßstab in linker unterer Ecke: Angabe = 20 μ m) (Abb. modifiziert nach Dellas et al. 2007).

Darüber hinaus erfolgten verschiedene Adhäsionsversuche unter Nutzung von Inhibitoren der Kinasen, für die eine Leptin-induzierte Aktivierung in den vorangegangenen Versuchen (Kap. 3.1) festgestellt wurde. Hierfür wurden vor eine Leptinbehandlung die Inhibitoren für 10 Minuten zu den Thrombozyten gegeben. Anschließend fand eine Behandlung mit Leptin (10 ng/ml) statt. Als negative Kontrolle diente PBS.

3.2.3 Leptin-induzierte Adhäsion unter Verwendung des JAK2-Inhibitors AG490

Die für die vorliegende Dissertation durchgeführten Experimente konnten demonstrieren, dass eine Vorinkubation der Thrombozytenproben mit AG490 vor Stimulation mit Leptin den steigenden Effekt des Adipokins auf die Thrombozytenadhäsion an Fibrinogen verhindern kann (Abb. 15). Eine Hinzugabe von Leptin zu den Thrombozyten bewirkte eine $1,9 \pm 0,4$ -fache Zunahme der Adhäsion, der Inhibitor AG490 hat diesen Effekt aufgehoben ($n=2$). Dieser Effekt erschien spezifisch, da der Inhibitor selbst keinen Effekt auf die Adhäsion von nicht mit Leptin-behandelten Thrombozyten hatte.

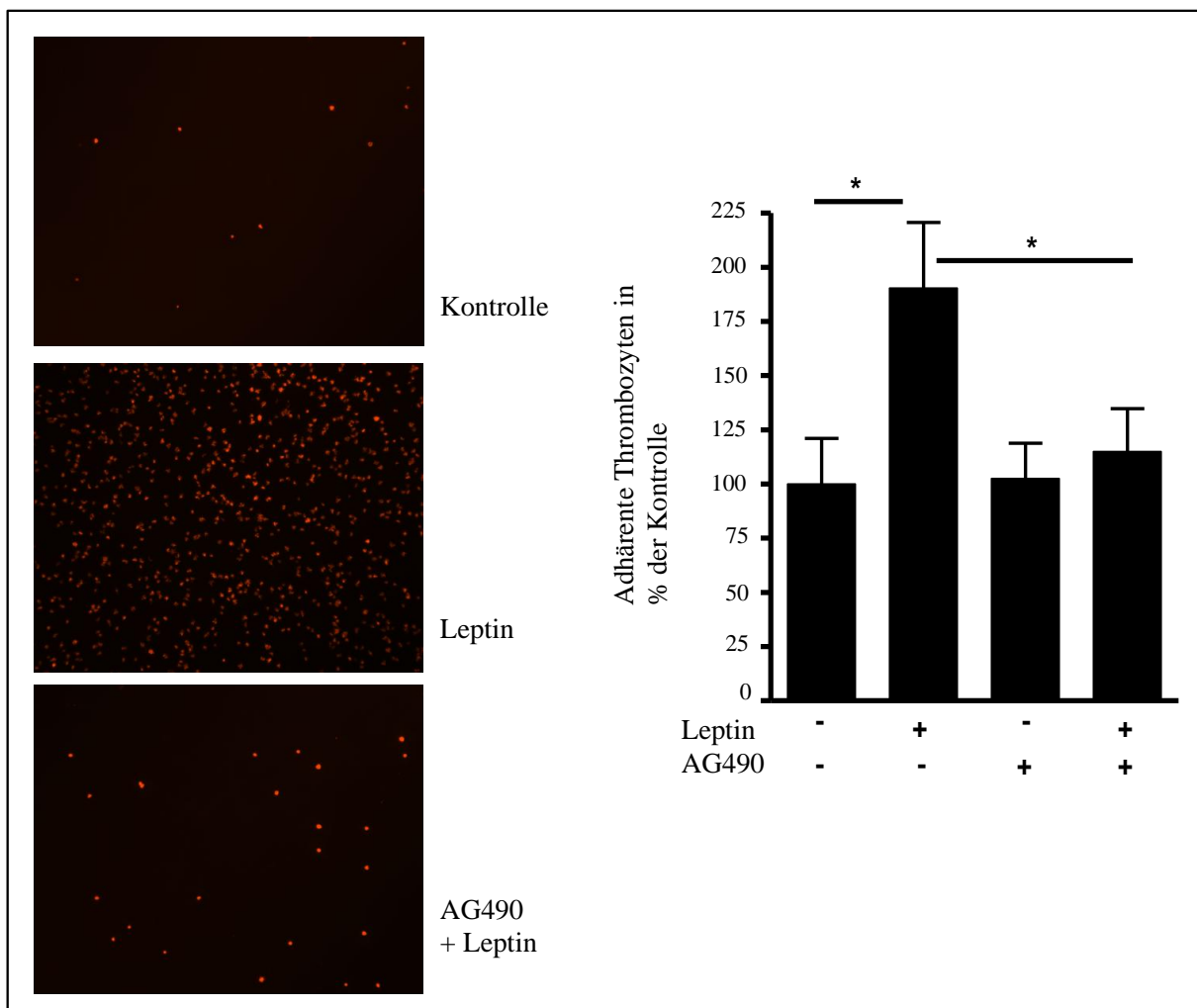


Abb. 15: Effekt des JAK2-Inhibitors AG490 auf den stimulatorischen Effekt Leptins auf die Adhäsion von Thrombozyten an immobilisiertem Fibrinogen. Links sind

fluoreszenzmikroskopische Fotos abgebildet, die die Adhäsion von Thrombozyten an Fibrinogen darstellen (Vergrößerung 40x). Abgebildet sind unstimulierte Thrombozyten, mit Leptin (10 ng/ml) behandelte Thrombozyten sowie mit Leptin stimulierte Thrombozyten, die zuvor mit AG490 vorherbehandelt wurden. Rechts abgebildet ist die statistische Auswertung der Fluoreszenzmikroskopie (n=2 mit Auswertung jeweils 5 mikroskopischer Felder, *p<0,05) (Abb. modifiziert nach Dellas et al. 2007)

3.2.4 Leptin-induzierte Adhäsion unter Verwendung des PI3K-Inhibitors Ly294002

Eine Leptinstimulation bewirkt einen 2,5-fachen Anstieg der Adhäsion ($p=0,003$) von Thrombozyten an immobilisiertem Fibrinogen im Vergleich zur Kontrolle. Verglichen mit der Kontrolle wurde der stimulatorische Effekt von Leptin komplett durch den PI3K Inhibitor Ly294002 aufgehoben (Abb. 16). Auch in diesem Fall war der Effekt spezifisch, da der Inhibitor keine Wirkung auf die Adhäsion von nicht mit Leptin-behandelten Thrombozyten hatte.

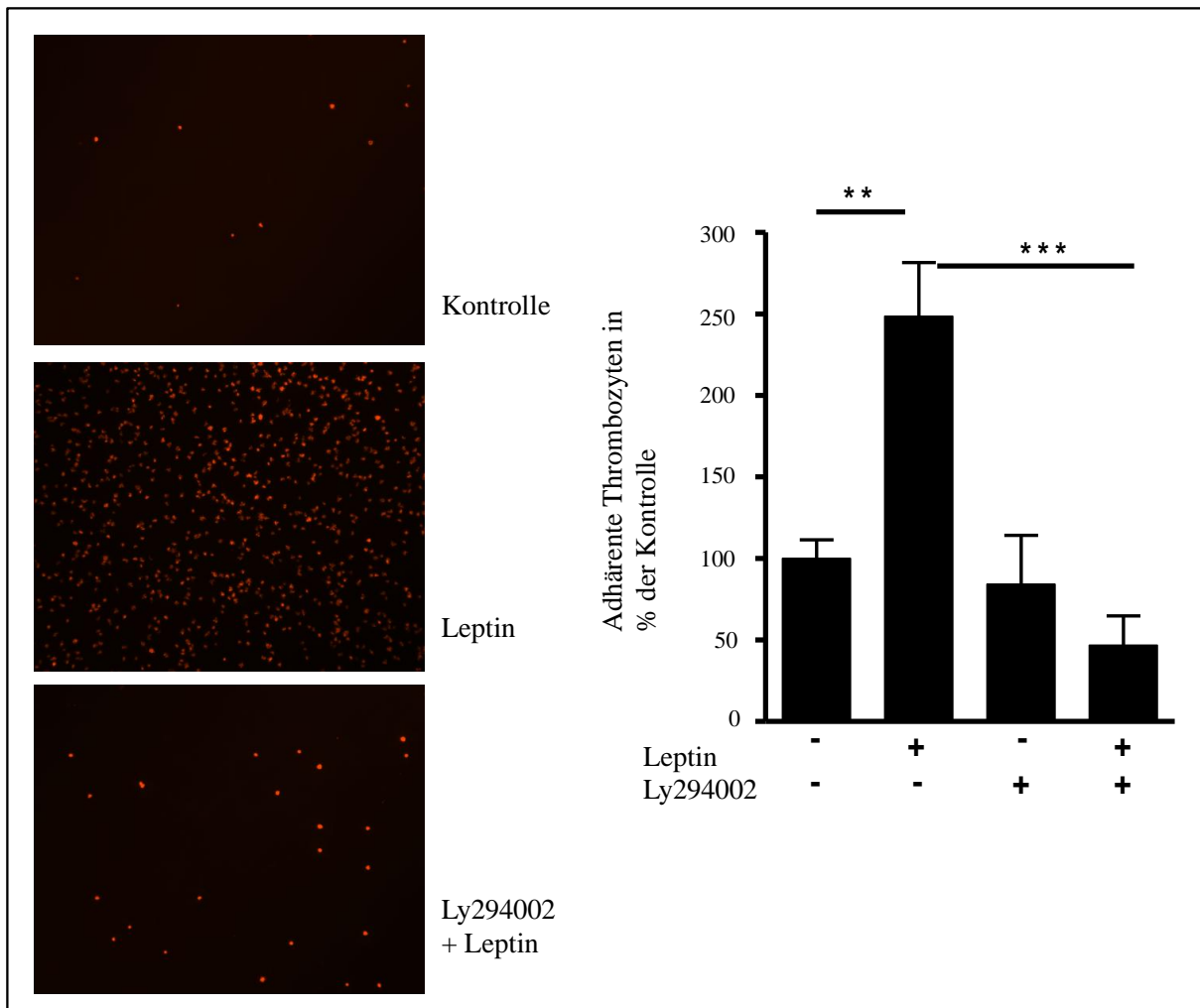


Abb. 16: Wirkung des PI3K-Inhibitors Ly294002 auf den stimulatorischen Effekt Leptins auf die Adhäsion von Thrombozyten an immobilisiertem Fibrinogen.

Links abgebildet sind Fotos (Vergrößerung 40x) von adhärenen Thrombozyten ohne bzw. mit alleiniger Leptinstimulation (10 ng/ml) und nach zusätzlicher vorhergehender Präinkubation mit

Ly294002. Rechts abgebildet ist die statistische Evaluation der Fluoreszenzmikroskopie (n=2, jeweils 5 mikroskopische Felder, *p<0,05) (Abb. modifiziert nach Dellas et al. 2007).

3.2.5 Leptin-induzierte Adhäsion unter Verwendung des PLC-Inhibitors U73122

Eine Präinkubation der Blutplättchen mit dem PLC-Inhibitor U73122 verhinderte den adhäsionsfördernden Effekt von Leptin auf die Thrombozytenadhäsion an Fibrinogen (n=4). Der signifikante Anstieg der Adhäsion durch Stimulation mit 10 ng/ml Leptin auf das 7-fache (p<0,0001) wurde durch Präinkubation mit dem Inhibitor U73122 dosisabhängig gesenkt. Unter 1µM U73112 konnte der Effekt von Leptin bereits drastisch reduziert werden auf einen lediglich 3-fachen Leptin-induzierten Anstieg der Thrombozytenadhäsion (p=0,046) und unter dem Einfluss von 25µM U73112 schließlich ganz aufgehoben werden (Abb. 17).

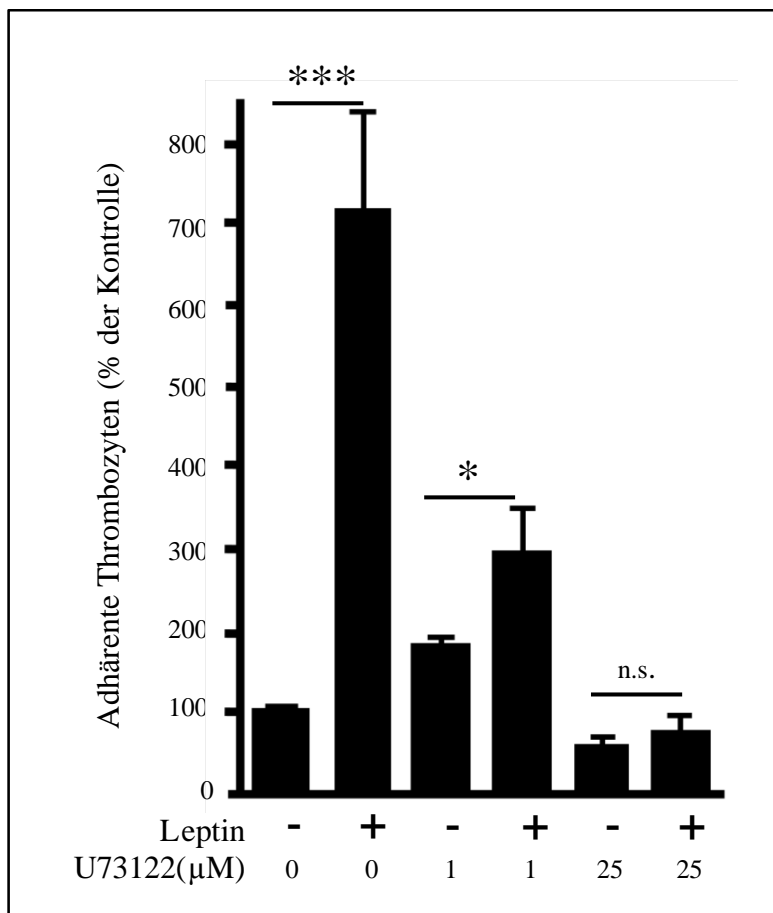


Abb. 17: Einfluss des PLC-Inhibitors U73122 auf die Leptin-induzierte Thrombozytenadhäsion an immobilisiertem Fibrinogen. Gewaschene Thrombozyten wurden ohne (U73122: 0) oder nach Präinkubation mit dem Inhibitor U73122 (1µM oder 25µM) mit Leptin stimuliert (Leptin +) oder unstimuliert belassen (Leptin -). Anschließend wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie die Thrombozytenadhäsion an immobilisiertem Fibrinogen unter Betrachtung von jeweils 5 mikroskopischen Feldern analysiert. Dargestellt sind die Ergebnisse von vier Experimenten (**p<0,0001, *p<0,05) (Abb. modifiziert nach Dellas et al. 2007)

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Signalmoleküle JAK2, PI3K und PLC eine wichtige Rolle bei der Leptin-induzierten Thrombozytenadhäsion spielen.

3.3 Leptin-vermittelte Thrombozytenaggregation

Um die agonistische Wirkung von Leptin auf Thrombozyten zu betrachten, wurde weiterhin die Leptin-vermittelte Thrombozytenaggregation untersucht. In Aggregationsversuchen wurde plättchenreiches Plasma mit 500 ng/ml Leptin bzw. Puffer als Kontrolle für 10 Minuten inkubiert. Anschließend erfolgte eine Stimulation mit dem Thrombozytenagonisten ADP. In diesen Versuchen ließ sich eine durch Leptin verstärkte ADP-induzierte Thrombozytenaggregation beobachten. Exemplarische Aggregationskurven sind in der Abb. 2 (Methodik) gezeigt. Bei Zusammenfassung aller Aggregationsversuche (n=34) zeigte sich, dass Leptin signifikant die ADP-induzierte Aggregation um das 1,6-fache verstärkt ($p < 0,0001$; Abb. 18).

Um die Bedeutung der Signalmoleküle bei der durch Leptin verstärkten Aggregation zu untersuchen, führten wir verschiedene Versuche unter Verwendung von Tyrosinkinaseinhibitoren durch. Hierfür wurden die Thrombozyten mit den folgenden Inhibitoren JAK2-Inhibitor AG490 (n=9), PI3K-Inhibitor Ly294002 (n=3) und p38 MAPK-Inhibitor SB203580 (n=6) für 10 Minuten vor Stimulation mit dem Adipokin vorinkubiert. Es konnte gezeigt werden, dass diese Präinkubation den Thrombozyteaggregations-fördernden Effekt von Leptin aufgehoben hat (Abb 19, 20 und 21).

Diese Beobachtungen zeigen, dass Leptin die ADP-induzierte Thrombozytenaggregation verstärkt. Die durchgeführten Inhibitionsversuche sprechen zudem für die Beteiligung der Signalmoleküle JAK2, PI3K und p38 bei der Leptin-induzierten Thrombozytenaggregation und zeigen die biologische Relevanz dieser Tyrosinkinasen unter dem Einfluss des Adipokins.

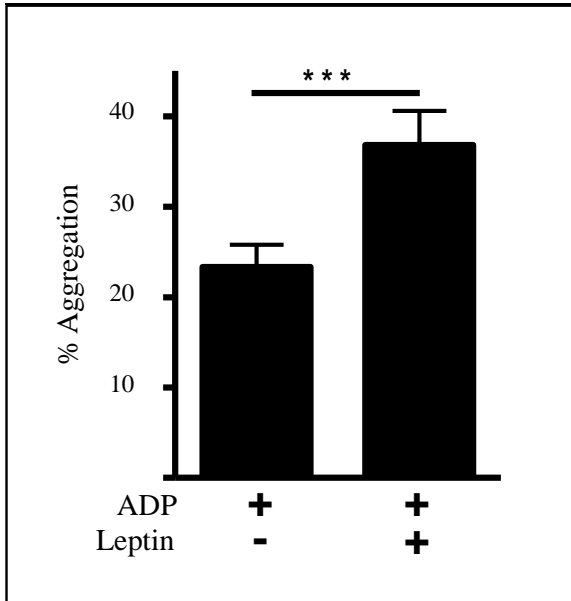


Abb. 18: Statistische Darstellung der durch Leptin verursachten Verstärkung einer durch ADP initiierten Aggregation.

Dargestellt ist das Ausmaß der Aggregation in % nach 5-minütiger ADP-Stimulation im Aggregometer von plättchenreichem Plasma, das zuvor Leptin (500 ng/ml, 10 Min.) vorbehandelt wurde (+) oder unbehandelt belassen wurde (** $p < 0,0001$, $n=34$) (Abb. modifiziert nach Dellas et al.).

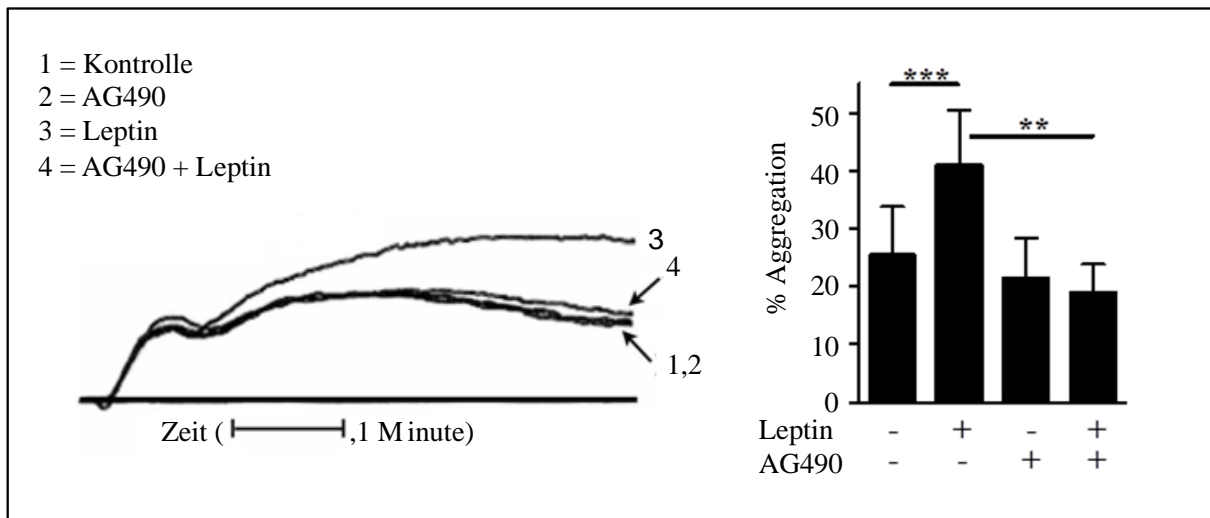


Abb. 19: Wirkung des JAK2-Inhibitors AG490 auf die Leptin-induzierte Thrombozytenaggregation. Dargestellt sind links die Aggregationskurven eines Spenders unter ADP-Stimulation über 5 Minuten von plättchenreichem Plasma, das mit Leptin (500 ng/ml) vorbehandelt wurde (Kurve 3) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Kurve 1) sowie die Auswirkungen des JAK2-Inhibitors AG490 (20 μ M) in Anwesenheit (Kurve 4) bzw. Abwesenheit (Kurve 2) von Leptin. Rechts dargestellt ist die Zusammenfassung von 9 Aggregationsversuchen mit Angabe der Aggregation in % nach 5-minütiger ADP-Stimulation von plättchenreichem Plasma, das zuvor mit dem Inhibitor AG490 (+) bzw. mit Leptin (+) vorbehandelt wurde (** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$) (Abb. modifiziert nach Dellas et al. 2007).

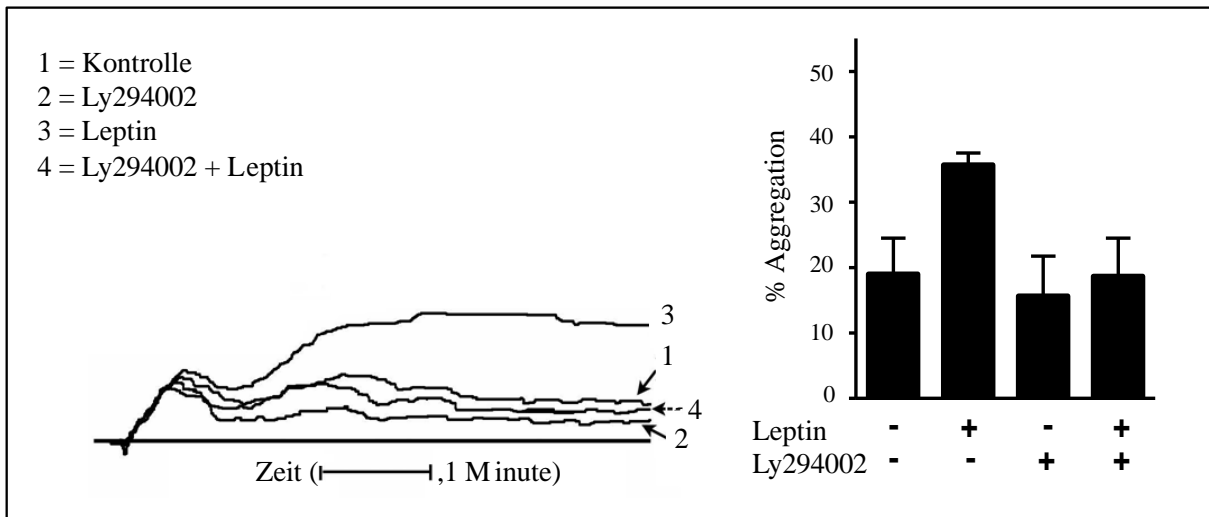


Abb. 20: Wirkung des PI3K-Inhibitors Ly294002 auf die Leptin-vermittelte Thrombozytenaggregation. Links dargestellt sind die Aggregationskurven eines Spenders unter ADP-Simulation über 5 Minuten von plättchenreichem Plasma, das mit Leptin (500 ng/ml) vorbehandelt wurde (Kurve 3) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Kurve 1) sowie die Auswirkung des PI3K-Inhibitors in Anwesenheit (Kurve 4) bzw. Abwesenheit (Kurve 2) von Leptin. Rechts dargestellt ist die Zusammenfassung von 3 Aggregationsversuchen mit Angabe der Aggregation in % nach 5-minütiger ADP-Stimulation von plättchenreichem Plasma, das zuvor mit dem Inhibitor Ly294002 (+) bzw. mit Leptin (+) vorbehandelt wurde (Abb. modifiziert nach Dellas et al. 2007)

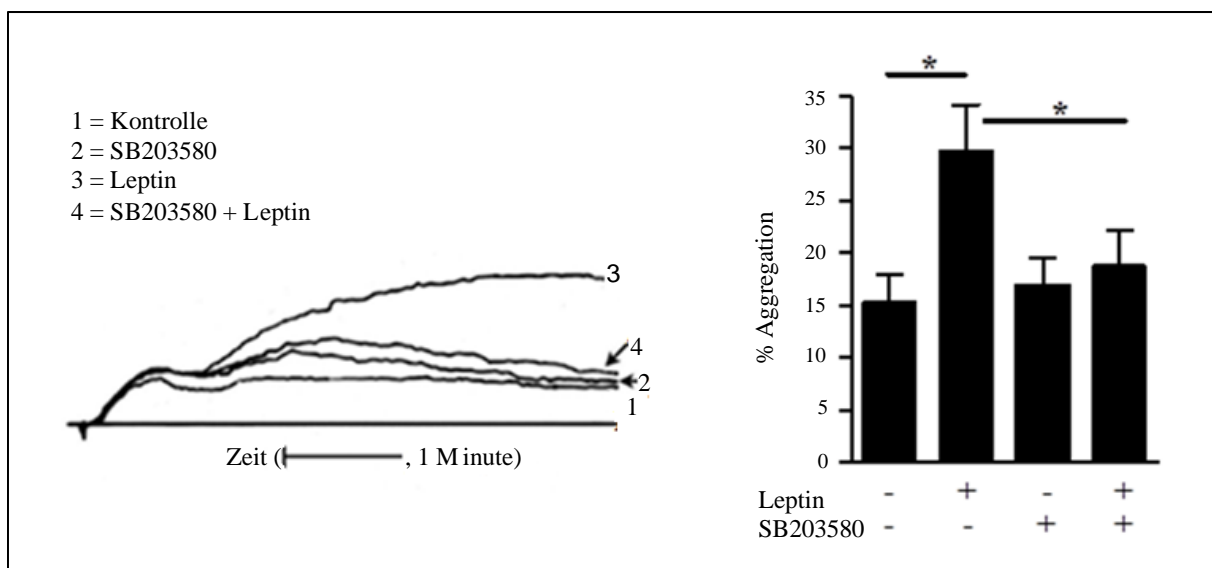


Abb. 21.: Wirkung des p38 MAPK-Inhibitors SB203580 auf die Leptin-induzierte Thrombozytenaggregation. Dargestellt sind links die Aggregationskurven eines Spenders unter ADP-Stimulation über 5 Minuten von plättchenreichem Plasma, das mit Leptin (500 ng/ml) vorbehandelt wurde (Kurve 3) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Kurve 1) sowie die Auswirkungen des MAPK-Inhibitors SB203580 in Anwesenheit (Kurve 4) bzw. Abwesenheit (Kurve 2) von Leptin. Rechts dargestellt ist die Zusammenfassung von 6 Aggregationsversuchen mit Angabe der Aggregation in % nach 5-minütiger ADP-Stimulation von plättchenreichem Plasma, das zuvor mit dem Inhibitor SB203580 (+) bzw. mit Leptin (+) vorbehandelt wurde (* $p < 0,05$) (Abb. modifiziert nach Dellas et al.).

3.4 Thromboxanfreisetzung

Um weitere Nachweise für die durch Leptin bewirkte Thrombozytenaktivierung vorlegen zu können, erfolgte eine Analyse des Effektes von Leptin auf die Thromboxanfreisetzung durch Thrombozyten. Bei dem entsprechenden Versuchsaufbau wurde eine Probe des plättchenreichen Plasmas mit 500 ng/ml Leptin stimuliert, eine andere mit dem entsprechenden Trägerpuffer versetzt, um einen Einfluss dieses Puffers auf das Ergebnis auszuschließen. Diese Behandlung der Proben erfolgte teils mit Zusatz des Thrombozytenagonisten ADP (siehe Abb. 22). Hierbei entsprach die genutzte ADP-Konzentration derjenigen aus den Aggregationsversuchen (s. Kap. 2.10).

Mittels ELISA wurden dann die Thromboxan B₂-Konzentrationen bestimmt. Es zeigten sich in diesen Versuchen signifikante Leptin-vermittelte Anstiege der Thromboxan-B₂-Synthese sowohl in Anwesenheit von ADP als auch in dessen Abwesenheit: Ohne Einfluss von ADP zeigte sich ein Leptin-induzierter 1,2-facher Anstieg der Thromboxan-B₂-Konzentration (von 1447±656 auf 1793±903 pg/ml, n=18, p=0,035). Eine ADP-Behandlung der Thrombozyten steigerte erwartungsgemäß die Thromboxansynthese, Leptin führte zu einem weiteren Anstieg in Anwesenheit von ADP um das 1,5-fache (von 15765±8575 auf 24287±14533 pg/ml, n=17, p=0,0002). Diese Ergebnisse zeigen, dass eine Leptinstimulation zu einer Steigerung der Thromboxanfreisetzung aus Thrombozyten führt und dies auch unabhängig von dem Vorhandensein eines weiteren Thrombozytenagonisten geschieht.

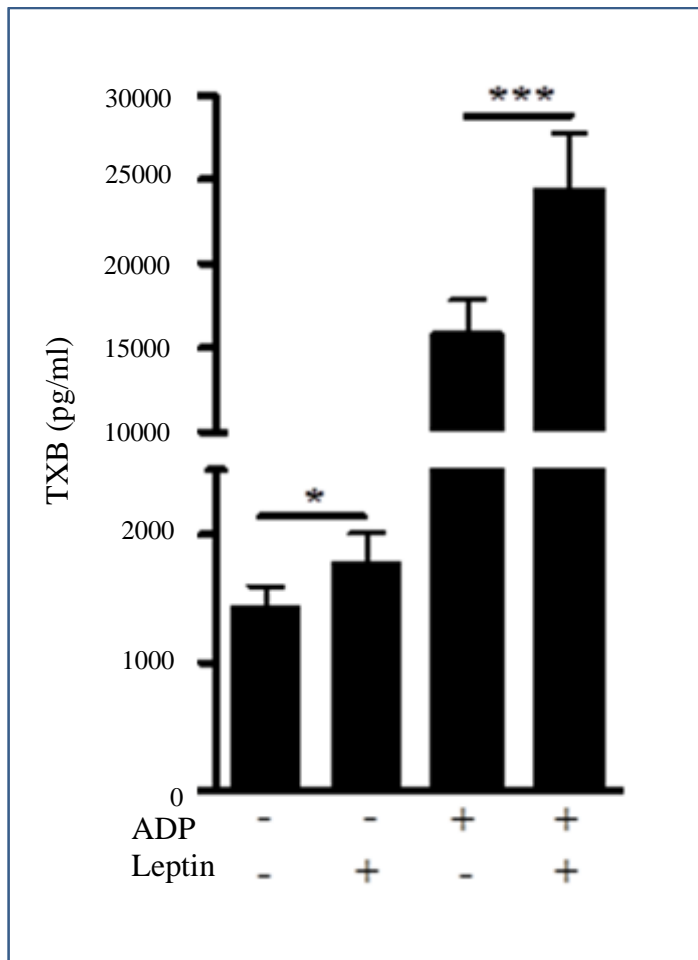


Abb. 22: Einfluss von Leptin auf die thrombozytäre Thromboxan-B₂-Synthese. Dargestellt ist die mittels ELISA gemessene Thromboxan-B₂-(TXB₂)-Konzentration (in pg/ml) von Thrombozyten, die mit Leptin (500 ng/ml, +) und/oder ADP (Konzentration entsprechend des jeweiligen Aggregationsversuches, +) behandelt wurden oder unbehandelt blieben (-) (*p<0,05, ***p<0,001, n=17-18).

4 Diskussion

4.1 Einfluss von Leptin auf humane Thrombozyten

Adipositas und das sogenannte „metabolische Syndrom“, das neben der Adipositas durch Dyslipidämie, arterielle Hypertension sowie Insulinresistenz gekennzeichnet ist, wirkt prädisponierend für die Entstehung von kardiovaskulären Erkrankungen (Jung et al. 2014). Im Blut von fettleibigen Personen konnten in den allermeisten Fällen erhöhte Leptinwerte im Sinne einer Hyperleptinämie nachgewiesen werden (Grethen et al. 2012). Leptin ist bekanntlich für eine Vielzahl von physiologischen Effekten verantwortlich (Kelesidis et al. 2010), sein Einfluss auf das kardiovaskuläre System ist jedoch nicht vollends erschlossen. Die bei Adipösen auftretende Hyperleptinämie mit der im Hinblick auf kardiovaskuläre Erkrankungen gesteigerten Morbidität und Mortalität wecken daher besonders großes Interesse daran, herauszufinden, welche Effekte Leptin auf das kardiovaskuläre System auslöst. Diesem Thema widmete sich daher auch die vorliegende Arbeit.

Erhöhten Leptinspiegeln wird nachgesagt, zu einem erhöhten Risiko für das Auftreten kardiovaskulärer Erkrankungen zu führen wie der Atherosklerose und folglich Myokardinfarkt sowie Schlaganfall (Hasan-Ali 2011). In humanem myokardialem Gewebe konnte zudem bei akuten Herzversagen eine gesteigerte Expression von Leptin und dem Leptinrezeptor gezeigt werden (McGaffin et al. 2009). Dennoch gibt es eine Reihe von Veröffentlichungen, die diese Wirkung Leptins in Frage stellt. Beispielsweise wurde durch Ku et al. veröffentlicht, dass nicht hohe, sondern niedrige Leptinspiegel mit dem gehäuften Auftreten von kardiovaskulären Ereignissen bei Patienten mit stabiler koronarer Herzerkrankung assoziiert sind (Ku et al. 2011). In der Literatur wurde kürzlich beschrieben, dass Leptin in Abwesenheit einer koronaren Herzerkrankung signifikant mit dem Auftreten einer Herzinsuffizienz korreliert, bei Personen mit einer vorbestehenden koronaren Herzerkrankung jedoch führte zwar das Vorliegen von Adipositas zu einem erhöhten Risiko für Herzinsuffizienz, allerdings geschah dies Leptin-unabhängig (Wannamethee et al. 2011). Ein weiterer interessanter Aspekt zur Betrachtung des prothrombotischen Einflusses von Leptin ist darüber hinaus der autokrine oder parakrine Effekt des Adipokins. Beispielsweise produzieren und sezernieren das epikardiale und paravaskuläre Fettgewebe ebenfalls Leptin. Interessanterweise kann im epikardialen Fettgewebe von Patienten mit koronarer Herzerkrankung ein höheres Leptinlevel nachgewiesen werden als bei Patienten ohne KHK (Cheng et al. 2008). Es wird davon ausgegangen, dass diese auto- bzw. parakrine Wirkung des Adipokins vermutlich bei seiner pro-aggregatorischen Wirkung unterschätzt wird (Sweeney 2010). Diese Ergebnisse zeigen, dass die Wirkung Leptins auf dem Gebiet der kardiovaskulären Forschung noch nicht ausreichend geklärt wurde und Parameter wie der Alterungsprozess, Ko-Morbiditäten sowie die Ausmaße einer Hyperleptinämie in die Leptinforschung

mit einbezogen werden müssen (Abel und Sweeney 2012). Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich daher mit der Untersuchung, wie sich Leptin auf die Thrombozytenfunktion gesunder, normalgewichtiger Spender auswirkt. Im Ergebnis konnte auf verschiedenen Ebenen eine Aktivierung von Thrombozyten durch Leptin nachgewiesen werden.

Zur Beantwortung der für die aktuelle Forschungsarbeit gestellten Fragen zur Betrachtung des Einflusses von Leptin auf die Thrombozytenfunktion wurden verschiedene Versuchsaufbauten gewählt. Zunächst sollte der Einfluss von Leptin auf die thrombozytäre Adhäsion untersucht werden. Sowohl für die Anheftung von Thrombozyten an die subendotheliale Matrix beim Auftreten einer Gefäßverletzung als auch für die Vernetzung von Thrombozyten untereinander im Rahmen der Thrombozytenaggregation ist die Adhäsion an Fibrinogen ein essentieller Schritt. Die Bindung an Fibrinogen ist abhängig von einer Agonisten-induzierten Konformationsänderung des thrombozytären Fibrinogenrezeptors $\alpha_{IIb}\beta_3$ (GPIIb/IIIa). Er ist das am häufigsten exprimierte Integrin auf Thrombozyten (Bledzka et al. 2013). Eine Konformationsänderung dieses Integrins bewirkt eine Steigerung der Affinität des Rezeptors für Liganden mit der Erkennungssequenz Arginin-Glycin-Asparaginsäure (RGD), die in Fibrinogen, Fibronectin etc. enthalten ist. In der aktuellen Studie konnte gezeigt werden, dass Leptin zur Steigerung der Expression von aktiviertem Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$, dem Fibrinogenrezeptor, auf Thrombozyten führt. Dieser Effekt Leptins war sowohl in Anwesenheit als auch ohne ADP zu beobachten. Darüber hinaus konnten die durchgeführten Experimente zeigen, dass durch Leptin die thrombozytäre Adhäsion an immobilisiertes Fibrinogen gefördert wird. Beide Beobachtungen sprechen dafür, dass dieses Hormon eine Aktivierung der Thrombozyten hervorruft.

Als weitere Ebene einer Thrombozytenaktivierung wurde der Einfluss Leptins auf die Thrombozytenaggregation betrachtet. Hier konnten Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen bestätigt werden, die zeigten, dass Leptin eine verstärkende Wirkung auf die agonisteninduzierte Thrombozytenaggregation ausübt (Nakata et al. 1999, Konstantinides et al. 2001, Giandomenico et al. 2005). An dieser Stelle sei allerdings kritisch angemerkt, dass dieser Effekt in der Literatur weiterhin umstritten ist (Ozata et al. 2001). Die Arbeitsgruppe um Ozata et al. konnte keinen Leptin-vermittelten Effekt auf die ADP-induzierte Aggregation beobachten. Eine Ursache für diese Diskrepanz könnte in der Erkenntnis um Responder und Non-Responder bezüglich des Leptineinflusses liegen: Im Jahr 2005 wurde von Giandomenico et al. publiziert, dass die Leptin-induzierte Thrombozytenaggregation starken inter-individuellen Schwankungen unterliegt: Es wurde dargestellt, dass bei der ADP-induzierten Aggregation die Thrombozyten von ca. 40% der Spender wiederholt auf Leptin reagierten (Responder), die Thrombozyten von 60% der Spender jedoch nicht durch Leptin aktiviert wurden (Non-Responder). Durch den Einsatz der rt-PCR zeigte sich, dass die Thrombozyten von Leptin-Respondern eine verstärkte Leptinrezeptorexpression im Vergleich zu denen von Non-Respondern aufweisen (Giandomenico et al. 2005). Die Ursache für diesen Unterschied in der Leptinrezeptorexpression ist bisher ungeklärt. Auch in weiteren Studien wurde eine interindividuell unterschiedlich ausgeprägte Responsibilität auf Leptin bei der Thrombozytenaggregation bestätigt.

Kontrovers ist allerdings die Datenlage hinsichtlich des Einflusses einer Adipositas. Während eine gewisse Leptinresistenz von Thrombozyten bei Adipositas beschrieben wurde (Corica et al. 2007), konnte in einer weiteren Studie kein Zusammenhang der Leptinresponsivität zum Körpergewicht, einer endogenen Hyperleptinämie oder metabolischen Veränderungen im Rahmen der Adipositas nachgewiesen werden (Dellas et al. 2008). Daher ist der Terminus „selektive Leptinresistenz“ (Mark 2013) weiterhin umstritten. Damit wird beschrieben, dass einige physiologischerweise durch Leptin vermittelte Effekte bei Adipositas aufgehoben sind, z.B. die im ZNS-gesteuerte Reduktion des Appetits und folglich der Nahrungsaufnahme (sog. zentrale Leptinresistenz), jedoch andere, wie beispielsweise die Beeinflussung des Sympathotonus bleiben unbeeinträchtigt (Belin de Chantemele et al. 2011 und Enriori 2011). Für Thrombozyten gibt es wie bereits erwähnt keine eindeutige Datenlage, ob sich oder ob sich nicht eine Resistenz entwickelt. Dass eventuell das Herz als Teil des kardiovaskulären Systems von einer Resistenz bei Adipositas betroffen sein könnte, lassen Arbeiten im Rattenmodell vermuten, in denen eine durch eine *high fat* Diät hervorgerufene Reduktion der Expression des Leptinrezeptors im Herzen demonstriert wurde (Nascimento et al. 2011).

In der vorliegenden Arbeit sollte in Ergänzung zur Untersuchung der Beeinflussung der thrombozytären Funktion durch Leptin die durch das Adipokin vermittelte Signalkaskade und die Relevanz der einzelnen Signalmoleküle analysiert werden. Es sind verschiedene Isoformen des Leptinrezeptors (Ob-Ra - Ob-Re) bekannt, die sich in der Länge ihrer intrazellulären Domänen unterscheiden (Harris 2014): Ob-Ra, Ob-Rc und Ob-Rd besitzen kurze intrazelluläre Domänen und ihre Funktion wird vor allem in dem Transport von Leptin über die Blut-Hirn-Schranke vermutet. Ob-Re ist der zirkulierende Leptinrezeptor, der durch Abspaltung der extrazellulären Domänen der anderen Leptinrezeptor Isoformen entsteht und die Bioverfügbarkeit Leptins reguliert (Schaab et al. 2012). Ob-Rb, die lange Form des Leptinrezeptors, ist die einzige Isoform, die in der Lage ist, den Signalmechanismus JAK/STAT zu aktivieren. In der vorliegenden Untersuchung konnte dargestellt werden, dass Leptin zeit- sowie dosisabhängig JAK2 und STAT3 in Thrombozyten aktivieren kann. Dies legt den Schluss nahe, dass Leptin auf humanen Thrombozyten die lange Form des Leptinrezeptors aktiviert und intrazellulär zur Aktivierung dieses Signalwegs führt. Mittels JAK2-Inhibitor AG490 konnte darüber hinaus in Thrombozyten eine Nachschaltung von STAT3 nach JAK2 demonstriert werden. Für STAT3 ist in verschiedenen Zielzellen bekannt, dass es nach seiner Leptin-vermittelten Aktivierung in den Zellkern transloziert, um die Transkription verschiedener Gene zu regulieren und so verschiedene physiologische Funktionen auszuüben (Myers 2010). Wie bekannt ist, besitzen Thrombozyten keinen eigentlichen Nukleus. Interessanterweise konnte mittels Inhibitionsversuchen gezeigt werden, dass JAK2 eine Relevanz sowohl für die Leptin-induzierte Adhäsion als auch Aggregation besitzt. Für STAT3 blieb die Relevanz seiner Aktivierung für die prothrombotische Wirkung des Leptins jedoch auch nach Abschluss der aktuellen Experimente ungeklärt. Hier herrscht intensiver Forschungsbedarf, um der Frage nachzugehen, inwieweit dieses

Signalmolekül auch in kernlosen Thrombozyten für die physiologische Funktion entscheidend ist. Interessanterweise wurde in aktuellen Veröffentlichungen das Vorhandensein von Transkriptionsfaktoren wie z.B. nuclear factor κ B in Thrombozyten beschrieben, die vermutlich in nicht-genomische Prozesse involviert sind und für die Regulation der Thrombozytenfunktion eine wichtige Rolle spielen (Spinelli et al. 2010). Eventuell besitzt auch STAT3 eine vom Zellkern unabhängige Funktion in Thrombozyten.

Ein weiterer für Leptin beschriebener intrazellulärer Signalweg ist die Aktivierung von p38-*mitogen-activated protein (MAP) kinase*. Eine solche intrazelluläre Aktivierung ist beispielsweise in humanen B-Zellen beschrieben worden (Agrawal et al. 2011). Auch für Kardiomyozyten ist eine Beteiligung der p38-MAPK bei der Leptin-vermittelten Hypertrophie demonstriert worden (Zeidan et al. 2008). In der vorliegenden Arbeit konnte ebenfalls eine Beteiligung des Signalmoleküls p38-MAPK und der ihr nachgeschalteten Phospholipase A₂ an der thrombozytären Signalübermittlung nach Einfluss von Leptin demonstriert werden. Mittels Inhibitorenversuchen konnte die aktuelle Arbeit eine Relevanz der Leptin-vermittelten p38-MAPK-Aktivierung für die thrombozytäre Aggregation aufzeigen. Es ist bekannt, dass eine Aktivierung der p38-MAPK über die zytosolische Phospholipase A₂, die in diesem Prozess für die Freisetzung der Arachidonsäure aus Membranphospholipiden verantwortlich ist, eine Steigerung der Sekretion des pro-aggregatorischen Arachidonsäuremetaboliten Thromboxan A₂ in Thrombozyten bewirken kann (Signorello MG et al. 2011). In der vorliegenden Studie sollte betrachtet werden, ob diese Kaskade auch unter Einfluss von Leptin aktiviert wird. Die gewonnenen Ergebnisse zeigen neben der Leptin-vermittelten Aktivierung der p38 und der PLA₂ auch eine Leptin-induzierte Thromboxansynthese, was nahelegt, dass die Phosphorylierung der PLA₂ auch in der in der Leptin-vermittelten Signalübermittlung tatsächlich funktionell relevant ist.

Für verschiedene Zellen konnte gezeigt werden, dass Leptin neben seiner Aktivierung der p38 MAPK auch die p42/44 MAPK aktivieren kann (Thompson et al. 2011). Die aktuelle Studie zeigt, dass auch in Thrombozyten Leptin zeit- und dosisabhängig zur Phosphorylierung und somit Stimulierung dieser Kinase führt. Mittels MAPK-ERK1-Inhibitor PD98059 sowie JAK2-Inhibitor AG490 konnte darüber hinaus eine Nachschaltung von p42/44 nach den Tyrosinkinase JAK2 sowie MAPK-ERK1 dargestellt werden.

In verschiedenen Zellen, vorrangig dem ZNS, konnte eine Aktivierung der PI3-Kinase durch Leptin nachgewiesen werden. Beispielsweise führt Leptin im Hypothalamus zu einer PI3K-abhängigen Depolarisation von Proopiomelanocortin Neuronen (Hill et al. 2008). Eine Studie aus dem Jahr 2010 demonstriert im Tiermodell die Relevanz der PI3K für den Leptin-vermittelten Effekt auf den Energiehaushalt: Mäuse mit einer Reduktion in der PI3K Aktivität in Neuronen des ventromedialen Hypothalamus wiesen eine Resistenz gegenüber den anorektischen Effekten des Adipokins auf. Die

Folge waren ein niedrigerer Energieverbrauch sowie eine gesteigerte Anfälligkeit für eine Diät-induzierte Adipositas (Xu et al. 2010). Es ist bekannt, dass eine Aktivierung der PI3K zu einer Phosphorylierung und somit Aktivierung von AKT führen kann (Yi et al. 2014). Die Beeinflussung des Signalmoleküls AKT ist aus Publikationen über verschiedene Zellen bekannt. Interessanterweise ist seine Aktivierung unter anderem für die Leptin-vermittelte Induktion der NO Synthase nachgewiesen. Unter physiologischen Bedingungen führt Leptin durch die Aktivierung der NO Synthase zu einer NO-bedingten Vasorelaxation. Hingegen ist beim Vorliegen von Adipositas der Leptin-bedingte NO-medierte vasodilatatorische Effekt jedoch beeinträchtigt (Beltowski 2012). Die endotheliale NO/ONOO- Imbalance ist charakteristisch für die endotheliale Dysfunktion und involviert in den Prozess der Atherogenese (Procopio et al. 2009). Dieses Wissen ließ die Frage aufkommen, ob die Signalmoleküle PI3K und AKT auch in Thrombozyten durch Leptin aktiviert werden. In der vorliegenden Arbeit konnte eine Leptin-induzierte Phosphorylierung der PI3K, genauer gesagt der P85 α , der regulatorischen Untereinheit der PI3K, auch für menschliche Thrombozyten gezeigt werden. Experimente mit verschiedenen Kinaseinhibitoren konnten zudem eine Abhängigkeit der Phosphorylierung von AKT von den Signalmolekülen JAK2 und PI3K, nicht jedoch von MAPK zeigen. Darüber hinaus konnte die physiologische Relevanz des PI3K/AKT-Signalwegs für die Leptin-vermittelte Aggregation sowie thrombozytäre Adhäsion dargestellt werden.

In der vorliegenden Dissertation konnte eine Leptin-vermittelte Aktivierung der PLC γ 2 (JAK2-vermittelt) sowie der PKC mittels Western Blot demonstriert werden. Die Phospholipase C hydrolysiert Phosphatidylinositol 4,5-diphosphat (PIP2) und produziert so den *second messenger* Inositol 1,4,5-triphosphat (IP3) und 1,2-Diacylglycerol (DAG). Diese führen anschließend zur Freisetzung intrazellulärer Kalziumvorräte und Aktivierung der Proteinkinase C (Li Z et al. 2010). Die Relevanz der PLC-Aktivierung für die thrombozytäre Adhäsion an Fibrinogen konnten Inhibitorenversuche der aktuellen Arbeit bestätigen.

Im Ergebnis zeigen die Versuche dieser Arbeit, dass die Wirkung von Leptin auf humane Thrombozyten zur Phosphorylierung von JAK2 führt. Dies wiederum ruft eine Phosphorylierung der Signalkaskaden-abwärts gelegenen PLC γ 2 hervor. Dieser Schritt involviert möglicherweise die Aktivierung der PI3K. Die PI3K wiederum trägt möglicherweise zur Aktivierung von AKT und der PKC bei. Neben diesem Signalweg scheint Leptin in menschlichen Thrombozyten zu einer Phosphorylierung der MAP-Kinasen p42/44 und p38 zu führen. Über die Aktivierung der MAP-Kinase p38 kann dann wiederum die Phosphorylierung der PLA₂ hervorgerufen werden, die zur Thromboxanfreisetzung führt.

Inwiefern Leptin *in vivo* über o.g. Mechanismen fördernd auf thrombotische Ereignisse wirkt, kann von diesen Ergebnissen nicht direkt abgeleitet werden. Neben der Thrombozytenfunktion, bei der sich *in vitro* eine proaggregatorische Wirkung für Leptin zeigte, müssen auch die Wirkungen des Hormons

auf weitere Regulationsmechanismen des kardiovaskulären Systems betrachtet werden, unter anderem seien an dieser Stelle die Wirkung auf den Sympathotonus oder die endotheliale Funktion genannt (Wang et al. 2014). Eine abschließende Beurteilung des Leptineffekts bedarf einer Analyse sämtlicher Wirkungen des Adipokins auf alle das kardiovaskuläre System beeinflussenden Regulationen. Ein isoliertes Betrachten eines einzelnen Mechanismus unter Einfluss von Leptin reicht dafür nicht aus. Immerhin gibt es Mausversuche, in denen eine proaggregatorische Einfluss von Leptin auf die Bildung thrombozytenreicher Thromben in der Halsschlagader, aber auch bei der Ausbildung von Lungenembolien gezeigt wurde (Konstantinides et al. 2001, Konstantinides et al. 2004).

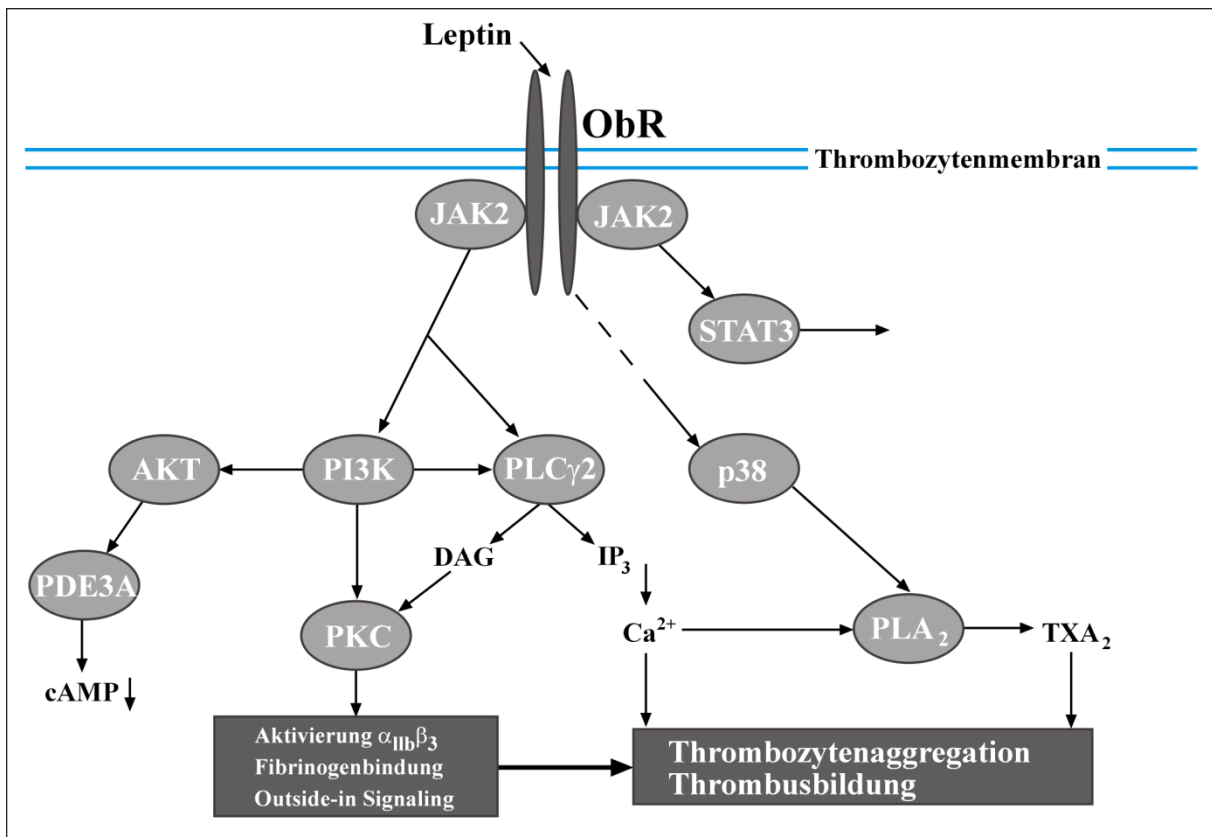


Abb. 23: Übersicht über die Leptin-vermittelte Signalkaskade in humanen Thrombozyten. In Anlehnung an die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, der Studie von Corsonello et al. 2004 und Elbatarny et al. 2005.

4.2 Ausblicke: Mögliche therapeutische Ansätze zur Reduktion des kardiovaskulären Risikos bei Adipositas

Wie bereits dargelegt, ist Adipositas mit einem signifikant erhöhten Risiko zur Entwicklung kardiovaskulärer Erkrankungen verbunden. Um hier zu intervenieren, lassen sich zwei Strategien

verfolgen. Zum Einen gilt es, die Entwicklung von Adipositas zu verhindern bzw. beim Vorliegen von Adipositas eine Gewichtsreduktion zu bewirken. Zum Anderen ist es erstrebenswert, beim Vorliegen von Adipositas das Auftreten von kardiovaskulären Ereignissen zu verhindern.

Zunächst lag große Hoffnung in Leptin als Medikament, das über seinen appetithemmenden Effekt zu einer Gewichtsreduktion führen sollte. Aktuell ist auf dem pharmazeutischen Markt eine Form von Leptin erhältlich: das Metreleptin, ein rekombinantes Methionyl Leptin. Obwohl die Leptingabe tatsächlich beeindruckende Gewichtsverluste bei Patienten mit Mutationen im Leptin-Gen erreichen kann (Paz-Filho et al. 2014), spielt Metreleptin in der Behandlung der konventionellen Adipositas nur eine marginale Rolle, da in den allermeisten Fällen eine Hyperleptinämie sowie selektive Leptinresistenz vorliegen und folglich der gewichtsreduzierende Effekt des Hormons ausbleibt. Stattdessen werden negative Wirkungen wie eine arterielle Hypertension etc. hervorgerufen (Paz-Filho et al. 2014). Es bleibt offen, ob Leptin-Sensibilisierungsstudien mit Substanzen wie *Exendin-4* und *Fibroblast growth factor 21* beim Menschen erfolgreich sein werden (Müller et al. 2012). In diesem Fall könnte Metreleptin auch bei der konventionellen Adipositas-therapie an Bedeutung gewinnen.

Alternativ sollte beim Vorliegen von Adipositas und damit verbundener Hyperleptinämie erwogen werden, das therapeutische Ziel in der Verhinderung kardiovaskulärer Ereignisse zu sehen. Hier können möglicherweise die neuen Einblicke in den thrombozytären Signalweg unter Einfluss von Leptin bei der Entwicklung eines neuen Therapeutikums helfen, um eine Adipositas-assoziierte Thrombozytenaktivierung zu verhindern und so zur Reduktion der kardiovaskulären Morbidität von Adipösen beizutragen. Die Tatsache der pleiotropen Wirkungen des Hormons erlaubt jedoch nur eine verhaltene Einschätzung. Es dürfte sich äußerst schwierig gestalten, eine selektive Hemmung des Hormons in der Weise zu erreichen, dass sie nicht zu einer Suppression von positiven, erwünschten Effekten führt.

Neben einer zweifelsohne notwendigen Forschungsarbeit zum Thema Leptin zur Reduktion des Risikos von Adipositas-bedingten kardiovaskulären Erkrankungen sollten jedoch auch andere, Leptin-unabhängige therapeutische Strategien intensiv verfolgt werden, um die Adipositas zu bekämpfen.

Zum Einen ist eine Prävention der Entstehung von Adipositas durch Gesundheitsaufklärung und Ernährungsberatung notwendig. Zum Anderen ist jedoch für diejenigen, die bereits an Adipositas leiden, eine Prävention nicht mehr ausreichend und sie benötigen eine adäquate Therapie.

Trotz der unbestrittenen Wichtigkeit einer solchen Therapie sind die Optionen bisher sehr limitiert. Lifestyle Veränderungen in Form von Diät oder sportlicher Betätigung führen nicht generell zu einer nachhaltigen, signifikanten Gewichtsabnahme (LeBlanc et al. 2011). Psychologische Interventionen, wie die Verhaltenstherapie, sind für die breite Masse der Bevölkerung nicht anwendbar und haben ebenfalls enttäuschende Langzeit-Ergebnisse (Wirth et al. 2014). Im Gegensatz hierzu sind chirurgische magenverkleinernde Maßnahmen, wie beispielsweise der Roux-en-Y Bypass oder ein Magenband deutlich effektiver im Hinblick auf eine Gewichtsabnahme, die Reduktion von

Komorbiditäten und eine Mortalitätsreduktion (Kral und Naslund 2007, Sjostrom et al. 2007). Wegen der perioperativen Mortalität sowie möglicher chirurgischer Komplikationen sollte eine operative Therapie nur den ausgeprägten Formen der Adipositas als Alternative vorbehalten bleiben (Field et al. 2009).

Eine Alternative zur operativen Behandlung der Fettleibigkeit ist die Entwicklung von Medikamenten, die durch die Reduktion der Nahrungszufuhr, der Nahrungsabsorption oder Steigerung des Energieumsatzes (Sargent und Moore 2009) eine Gewichtsreduktion bewirken. Das ideale Medikament gegen die Adipositas würde zu einem effektiven Gewichtsverlust mit minimalen Nebenwirkungen führen. Alle bisherigen Versuche zur Entwicklung des optimalen gewichtsreduzierenden Medikaments sind gescheitert. In der Vergangenheit fanden Substanzen aus verschiedenen Medikamentengruppen ihren Einsatz in der Bekämpfung der Adipositas: zentralwirksame Sympathomimetika, Cannabinoidrezeptorantagonisten, 5HT-Re-uptake-Inhibitoren und in Studien auch Leptin. Jedoch viele Therapeutika, die passager als die suffiziente Antwort für das Adipositas-Problem angesehen wurden, wurden wegen inakzeptabler Nebenwirkungen (v.a. kardiovaskuläre Effekte, Suchtpotential, paradoxe Effekte, psychiatrische Probleme wie beispielsweise Depression etc.) frühzeitig wieder vom Markt genommen (Rodgers et al. 2012). Aktuell ist das einzige gewichtsreduzierende Medikament, dass in Europa für eine Langzeit-Anwendung zugelassen ist, Orlistat. Orlistat inhibiert gastrointestinale Lipasen, was zu einer Reduktion der gastrointestinalen Fettabsorption führt. Dies führt jedoch nur zu einer Gewichtsreduktion von im Durchschnitt 1,8 kg in 12 Monaten (Dombrowski et al. 2014).

Zusammenfassend besteht auch zukünftig ein dringender Bedarf an weiterer Forschung zur Entwicklung von therapeutischen Strategien gegen Adipositas, gegen die Hyperleptinämie und gegen hiermit assoziierte kardiovaskuläre Ereignisse. Die vorliegende Arbeit soll das bisherige Verständnis der Assoziation von Hyperleptinämie und Thrombozytenaktivierung erweitern und kann bei der Entwicklung solcher Strategien als Hilfestellung dienen.

5 Zusammenfassung

Die Adipositasprävalenz hat in den letzten Jahren in den Industrieländern signifikant zugenommen. Fettleibigkeit ist ein unabhängiger Risikofaktor für das Auftreten verschiedener Erkrankungen wie Schlaganfall, Lungenembolie, Myokardinfarkt und verschiedene Tumoren. Da kardiovaskuläre Erkrankungen in Industrieländern die häufigste Todesursache darstellen, stellt die Adipositas ein wachsendes Gesundheitsproblem dar und sollte Schwerpunkt intensiver Forschungsarbeit sein.

Da die Adipositas in der Mehrzahl der Fälle von einer Hyperleptinämie begleitet ist, war das Ziel der vorliegenden Arbeit, die mögliche Rolle von Leptin als Thrombozytenagonist auf verschiedenen Ebenen zu analysieren. Die durchgeführten Experimente konnten eine Leptin-induzierte Aktivierung des Integrins $\alpha_{IIb}\beta_3$, dem thrombozytären Fibrinogenrezeptor, und eine Steigerung der Adhäsion von Thrombozyten an immobilisiertem Fibrinogen zeigen. Leptin ist weiterhin in der Lage, die ADP-induzierte Thrombozytenaggregation signifikant zu steigern. Das Adipokin führt ebenfalls zu einer Steigerung der Thromboxan-B₂-Freisetzung aus Thrombozyten.

Neben der Untersuchung des Einflusses von Leptin auf die Thrombozytenfunktion sollte in der vorliegenden Studie ebenfalls die thrombozytäre Signalkaskade unter Wirkung des Proteohormons beleuchtet werden. Zentrales Molekül in diesem Signalweg ist JAK2. Für diese Tyrosinkinase konnte eine biologische Relevanz mit Hilfe von *in vitro* Versuchen zu Adhäsion und Aggregation von Thrombozyten unter Einfluss von Leptin demonstriert werden. Auch STAT3 wird zeit- und dosisabhängig durch Leptinstimulation in Thrombozyten phosphoryliert, wobei seine Bedeutung für die Thrombozytenaktivierung noch ungeklärt ist. Weitere an der Signaltransduktion in Thrombozyten unter Wirkung von Leptin beteiligte Kinasen sind die Phosphatidylinositol-3-Kinase, AKT, Phospholipase C γ 2 und Proteinkinase C sowie die p42/44-MAP-Kinase, die p38 MAP-Kinase und die Phospholipase A₂. Für die Aktivierung von PLC γ 2, AKT und der p42/44-MPAK konnte eine Abhängigkeit von der Tyrosinkinase JAK2 gezeigt werden. Für diese intrazellulären Mediatoren konnte ebenfalls unter Verwendung von verschiedenen Tyrosinkinase-Inhibitoren die Bedeutung bei der Thrombozytenadhäsion an immobilisiertem Fibrinogen bzw. der Aggregation nachgewiesen werden. Die in dieser Studie aufgedeckten Kaskaden zeigen somit biologisch relevante Leptin-vermittelte Signalwege in Thrombozyten auf und sollen zu einem besseren Verständnis des Zusammenhangs von Hyperleptinämie und erhöhtem Thromboserisiko bei Adipositas beitragen.

Literaturverzeichnis

- Abel ED, Sweeney G (2012): Modulation of the cardiovascular system by leptin. *Biochimie* 94, 2097-2103
- Agrawal S, Gollapudi S, Su H, Gupta S (2011): Leptin activates human B cells to secrete TNF-alpha, IL-6, and IL-10 via JAK2/STAT3 and p38MAPK/ERK1/2 signaling pathway. *J Clin Immunol* 31, 472-478
- Ahima RS, Osei SY (2004): Leptin signaling. *Physiol Behav* 81, 223-241
- Ahima RS, Osei SY (2008): Adipokines in obesity. *Front Horm Res* 36, 182-197
- Anubhuti, Arora S (2008): Leptin and its metabolic interactions: An update. *Diabetes Obes Metab* 10, 973-993
- Banks AS, Davis SM, Bates SH, Myers MG, Jr (2000): Activation of downstream signals by the long form of the leptin receptor. *J Biol Chem* 275, 14563-14572
- Bardou M, Barkun AN, Martel M (2013): Obesity and colorectal cancer. *Gut* 62(6), 933-47
- Barr VA, Lane K, Taylor SI (1999). Subcellular localization and internalization of the four human leptin receptor isoforms. *J Biol Chem* 274, 21416-21424
- Bates SH, Stearns WH, Dundon TA, Schubert M, Tso AW, Wang Y, Banks AS, Lavery HJ, Haq AK, Maratos-Flier E, Neel BG, Schwartz MW, Myers MG, Jr (2003): Stat3 signalling is required for leptin regulation of energy balance but not reproduction. *Nature* 421, 856-859
- Belin de Chantemele EJ, Mintz JD, Rainey WE, Stepp DW (2011): Impact of leptin-mediated sympatho-activation on cardiovascular function in obese mice. *Hypertension* 58, 271-279
- Beltowski J (2012): Leptin and the regulation of endothelial function in physiological and pathological conditions. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 39, 168-178
- Bjorbaek C, Elmquist JK, Michl P, Ahima RS, van Bueren A, McCall AL, Flier JS (1998): Expression of leptin receptor isoforms in rat brain microvessels. *Endocrinology* 139, 3485-3491
- Bjorbaek 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
- Bledzka K, Smyth SS, Plow EF (2013): Integrin alphaIIb beta3: from discovery to efficacious therapeutic target. *Circ Res* 112, 1189-1200
- Bouloumie A, Drexler HC, Lafontan M, Busse R (1998): Leptin, the product of ob gene, promotes angiogenesis. *Circ Res* 83, 1059-1066
- 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
- Caro JF, Kolaczynski JW, Nyce MR, Ohannesian JP, Opentanova I, Goldman WH, Lynn RB, Zhang PL, Sinha MK, Considine RV (1996): Decreased cerebrospinal-fluid/serum leptin ratio in obesity: A possible mechanism for leptin resistance. *Lancet* 348, 159-161

- Cases JA, Gabriely I, Ma XH, Yang XM, Michaeli T, Fleischer N, Rossetti L, Barzilai N (2001): Physiological increase in plasma leptin markedly inhibits insulin secretion in vivo. *Diabetes* 50, 348-352
- Chehab FF, Lim ME, Lu R (1996): Correction of the sterility defect in homozygous obese female mice by treatment with the human recombinant leptin. *Nat Genet* 12, 318-320
- Chehab FF, Mounzih K, Lu R, Lim ME (1997): Early onset of reproductive function in normal female mice treated with leptin. *Science*. 275, 88-90
- Chen H, Charlat O, Tartaglia LA, Woolf EA, Weng X, Ellis SJ, Lakey ND, Culpepper J, Moore KJ, Breitbart RE, Duyk GM, Tepper RI, Morgenstern JP (1996): Evidence that the diabetes gene encodes the leptin receptor: Identification of a mutation in the leptin receptor gene in db/db mice. *Cell* 84, 491-495
- Cheng KH, Chu CS, Lee KT, Lin TH, Hsieh CC, Chiu CC, Voon WC, Sheu SH, Lai WT (2008): Adipocytokines and proinflammatory mediators from abdominal and epicardial adipose tissue in patients with coronary artery disease. *Int J Obes (Lond)* 32, 268-274
- Clement K, Vaisse C, Lahlou N, Cabrol S, Pelloux V, Cassuto D, Gormelen M, Dina C, Chambaz J, Lacorte JM, Basdevant A, Bougneres P, Lehoucq Y, Froguel P, Guy-Grand B (1998): A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction. *Nature* 392, 398-401
- Cohen B, Novick D, Rubinstein M (1996): Modulation of insulin activities by leptin. *Science* 274, 1185-1188
- Coleman DL, Hummel KP (1969): Effects of parabiosis of normal with genetically diabetic mice. *Am J Physiol* 217, 1298-1304
- Corica F, Corsonello A, Lucchetti M, Malara A, De Domenico D, Cannavo L, Foti S, Valenti A, Ientile R, Saitta A (2007): Relationship between metabolic syndrome and platelet-responsiveness to leptin in overweight and obese patients. *Int J Obes (Lond)* 31, 842-849
- 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
- Crawley JT, Zanardelli S, Chion CK, Lane DA (2007). The central role of thrombin in hemostasis. *J Thromb Haemost* 5 Suppl 1, 95-101
- Daniels J (2006): Obesity: America's epidemic. *Am J Nurs* 106, 40-49, quiz 49-50
- Davi G, Patrono C (2007): Platelet activation and atherothrombosis. *N Engl J Med* 357, 2482-2494
- De Mitrio V, De Pergola G, Vettor R, Marino R, Sciaraffia M, Pagano C, Scaraggi FA, Di Lorenzo L, Giorgino R (1999): Plasma plasminogen activator inhibitor-i is associated with plasma leptin irrespective of body mass index, body fat mass, and plasma insulin and metabolic parameters in premenopausal women. *Metabolism* 48, 960-964
- Dellas C, Schafer 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

- Dellas C, Schafer K, Rohm KI 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 C γ 2 and A $_2$. *Thromb Haemost* 98, 1063-1071
- Dombrowski SU, Knittle K, Avenell A, Araujo-Soares V, Sniehotta FF (2014): Long term maintenance of weight loss with non-surgical interventions in obese adults: systematic review and meta-analyses of randomized controlled trials. *BMJ* 348, 2646
- Dunn SL, Bjornholm 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
- Elbatarny HS, Maurice DH (2005): Leptin-mediated activation of human platelets: Involvement of a leptin receptor and phosphodiesterase 3a-containing cellular signaling complex. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 289, E695-702
- Emilsson V, Liu YL, Cawthorne MA, Morton NM, Davenport M (1997): Expression of the functional leptin receptor mrna in pancreatic islets and direct inhibitory action of leptin on insulin secretion. *Diabetes* 46, 313-316
- Enriori PJ, Sinnayah P, Simonds SEM Garcia Rudaz C, Cowley MA (2011): Leptin action in the dorsomedial hypothalamus increases sympathetic tone to brown adipose tissue in spite of systemic leptin resistance. *J Neurosci* 31, 12189-12197
- Fei H, Okano HJ, Li C, Lee GH, Zhao C, Darnell R, Friedman JM (1997): Anatomic localization of alternatively spliced leptin receptors (ob-r) in mouse brain and other tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 7001-7005
- Field BC, Chaudhri OB, Bloom SR (2009): Obesity treatment: novel peripheral targets. *Br J Clin Pharmacol* 68, 830-843
- Finkelstein EA, Fiebelkorn IC, Wang G (2004): State-level estimates of annual medical expenditures attributable to obesity. *Obes Res* 12, 18-24
- Flegal KM, Carroll MD, Ogden CL, Curtin LR (2010): Prevalence and trends in obesity among us adults, 1999-2008. *JAMA* 303, 235-241
- Flegal KM, Kit BK, Orpana H, Graubard BI (2013): Association of all-cause mortality with overweight and obesity using standard body mass index categories: a systematic review and meta-analysis. *JAMA* 309, 71-82
- Friedman JM (2009): Leptin at 14 y of age: An ongoing story. *Am J Clin Nutr* 89, 973S-979S
- Fruhbeck G (1999): Pivotal role of nitric oxide in the control of blood pressure after leptin administration. *Diabetes* 48, 903-908
- Fruhbeck G (2006): Intracellular signalling pathways activated by leptin. *Biochem J* 393, 7-20
- Gawaz M, Langer H, May AE (2005): Platelets in inflammation and atherogenesis. *J Clin Invest* 115, 3378-84
- Ge H, Huang L, Pourbahrami T, Li C (2002): Generation of soluble leptin receptor by ectodomain shedding of membrane-spanning receptors in vitro and in vivo. *J Biol Chem*. 277, 45898-45903
- George JN (2000): Platelets. *Lancet* 355, 1531-1539
- Ghilardi N, Skoda RC (1997): The leptin receptor activates janus kinase 2 and signals for proliferation in a factor-dependent cell line. *Mol Endocrinol* 11, 393-399

- Ghilardi N, Ziegler S, Wiestner A, Stoffel R, Heim MH, Skoda RC (1996): Defective stat signaling by the leptin receptor in diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 6231-6235
- Giandomenico G, Dellas C, Czekay RP, Koschnick S, Loskutoff DJ (2005): The leptin receptor system of human platelets. *J Thromb Haemost* 3, 1042-1049
- Gomez-Ambrosi J, Salvador J, Silva C, Pastor C, Rotellar F, Gil MJ, Cienfuegos JA, Fruhbeck G (2006): Increased cardiovascular risk markers in obesity are associated with body adiposity: Role of leptin. *Thromb Haemost* 95, 991-996
- Gößwald A, Lange M, Kamtsiuris P, Kurth BM (2012): DEGS: German Health Interview and Examination Survey for Adults. A nationwide cross-sectional and longitudinal study within the framework of health monitoring conducted by the Robert Koch Institute. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* 55:775-780
- Grethen E, Hill KM, Jones R, Cacucci BM, Gupta CE, Acton A, Considine RV, Peacock M (2012): Serum leptin, parathyroid hormone, 1,25-dihydroxyvitamin D, fibroblast growth factor 23, bone alkaline phosphatase, and sclerostin relationships in obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 97, 1655-1662
- 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
- Hall JE, da Silva AA, do Carmo JM, Dubinion J, Hamza S, Munusamy S, Smith G, Stec DE (2010): Obesity-induced hypertension: role of sympathetic nervous system, leptin and melanocortins. *J Biol Chem* 285, 17271-17276
- Harris RB (2014): Direct and indirect effects of leptin on adipocyte metabolism. *Biochim Biophys Acta* 1842, 414-423
- Hasan-Ali H, Abd El-Mottaleb NA, Hamed HB, Abd Elsayed A (2011): Serum Adiponectin and leptin as predictors of the presence and degree of coronary atherosclerosis. *Coron Artery Dis* 22, 264-269
- Hausberger FX (1959): Behavior of transplanted adipose tissue of hereditarily obese mice. *Anat Rec* 135, 109-113
- Heysmsfield SB, Greenberg AS, Fujioka K, Dixon RM, Kushner R, Hunt T, Lubina JA, Patane J, Self B, Hunt P, McCamish M (1999): Recombinant leptin for weight loss in obese and lean adults: A randomized, controlled, dose-escalation trial. *JAMA* 282, 1568-1575
- Hileman SM, Tornoe J, Flier JS, Bjorbaek C (2000): Transcellular transport of leptin by the short leptin receptor isoform obra in madin-darby canine kidney cells. *Endocrinology* 141, 1955-1961
- Hill JW, Williams KW, Ye C, Luo J, Balthasar N, Coppari R, Cowley MA, Cantley LC, Lowell BB, Elmquist JK (2008): Acute effects of leptin require PI3K signaling in hypothalamic proopiomelanocortin neurons in mice. *J Clin Invest* 118, 1796-1805
- Hu Y, Bhupathiraju SN, de Koning L, Hu FB (2014): Duration of obesity and overweight and risk of type 2 diabetes among US women. *Obesity (Silver Spring)* 22, 2267-2273
- Iida M, Murakami T, Ishida K, Mizuno A, Kuwajima M, Shima K (1996): Substitution at codon 269 (glutamine --> proline) of the leptin receptor (ob-r) cDNA is the only mutation found in the Zucker fatty (fa/fa) rat. *Biochem Biophys Res Commun* 224, 597-604

- Jung JM, Young Kwon D, Han C, Park MH (2014): Metabolic syndrome and early carotid atherosclerosis in the elderly. *J Atheroscler Thromb* 21, 435-444
- Kamohara S, Burcelin R, Halaas JL, Friedman JM, Charron MJ (1997): Acute stimulation of glucose metabolism in mice by leptin treatment. *Nature* 389, 374-377
- Kelesidis T, Kelesidis I, Chou S, Mantzoros CS (2010): Narrative review: the role of leptin in human physiology: emerging clinical applications. *Ann Intern Med* 152, 93-100
- Kieffer TJ, Habener JF (2000): The adipoinsular axis: Effects of leptin on pancreatic beta-cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 278, E1-E14
- Kieffer TJ, Heller RS, Habener JF (1996): Leptin receptors expressed on pancreatic beta-cells. *Biochem Biophys Res Commun* 224, 522-527
- 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
- Konstantinides S, Schafer K, Koschnick S, Loskutoff DJ (2001): Leptin-dependent platelet aggregation and arterial thrombosis suggests a mechanism for atherothrombotic disease in obesity. *J Clin Invest* 108, 1533-1540
- Konstantinides S, Schafer 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
- Kopelman PG (2000): Obesity as a medical problem. *Nature* 404, 635-643
- Kral JG, Naslund E (2007): Surgical treatment of obesity. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 3, 574-583
- Ku IA, Karzaneh-Far R, Vittinghoff E, Zhang MH, Na B, Whooley MA (2011): Association of low leptin with cardiovascular events and mortality in patients with stable coronary artery disease: the Heart and Soul Study. *Atherosclerosis* 217, 503-508
- Labounty TM, Gomez MJ, Achenbach S, Al-Mallah M, Berman DS, Budoff MJ, Cademartiri F, Callister TQ, Chang HJ, Cheng V, Chinnaiyan KM, Chow B, Cury R, Delago A, Dunning A, Feuchtner G, Hadamitzky M, Hausleiter J, Kaufmann P, Kim YJ, Leipsic J, Lin FY, Maffei E, Raff G, Shaw LJ, Villines TC, Min JK (2012): Body mass index and the prevalence, severity, and risk of coronary artery disease: An international multicentre study of 13 874 patients. *Eur Heart J Cardiovasc Imaging* 14, 456-463
- Leblanc ES, O'Connor E, Whitlock EP, Patnode CD, Kapka T (2011): Effectiveness of primary care-relevant treatments for obesity in adults: a systematic evidence review for the U.S. Preventive Services Task Force. *Ann Intern Med* 155, 434-447
- Leininger GM (2011): Lateral thinking about leptin: a review of leptin action via the lateral hypothalamus. *Physiol Behav* 104, 572-581
- Lembo G, Vecchione C, Fratta L, Marino G, Trimarco V, d'Amati G, Trimarco B (2000): Leptin induces direct vasodilation through distinct endothelial mechanisms. *Diabetes* 49, 293-297
- Lenz M, Richter T, Muhlhauser I (2009): The morbidity and mortality associated with overweight and obesity in adulthood: A systematic review. *Dtsch Arztebl Int* 106, 641-648
- Li Z, Delaney MK, O'Brien KA, Du X (2010): Signaling during platelet adhesion and activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 30, 2341-2349
- Lindemann S, Kramer B, Seizer P, Gawaz M (2007): Platelets, inflammation and atherosclerosis. *J Thromb Haemost* 5 Suppl 1, 203-211

- Logue J, Murray HM, Welsh P, Shepherd J, Packard C, Macfarlane P, Cobbe S, Ford I, Sattar N (2011): Obesity is associated with fatal coronary heart disease independently of traditional risk factors and deprivation. *Heart* 97, 564-568
- Lord GM, Matarese G, Howard JK, Baker RJ, Bloom SR, Lechler RI (1998): Leptin modulates the t-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression. *Nature* 394, 897-901
- Maingrette F, Renier G (2003): Leptin increases lipoprotein lipase secretion by macrophages: Involvement of oxidative stress and protein kinase c. *Diabetes* 52, 2121-2128
- Malyszko J, Wolczynski S, Mysliwiec M (2002): Leptin correlates with some hemostatic parameters in CAPD patients. *Nephron* 92, 721-724
- Mangge H, Almer G, Truschnig-Wilders M, Schmidt A, Gasser R, Fuchs D (2010): Inflammation, Adiponectin, obesity and cardiovascular risk. *Curr Med Chem* 17, 5411-5420
- Mark AL (2013): Selective leptin resistance revisited. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 305, 566-581
- Mazen I, El-Gammal M, Abdel-Hamid M, Farooqi IS, Arm K (2011): Homozygosity for a novel missense mutation in the leptin receptor gene (P316T) in two Egyptian cousins with severe early onset obesity. *Mol Genet Metab* 102, 461-464
- McGaffin KR, Moravec CS, McTiernan CF (2009): Leptin signaling in the falling and mechanically unloaded human heart. *Circ Heart Fail* 2, 676-683
- Mercer JG, Hoggard N, Williams LM, Lawrence CB, Hannah LT, Trayhurn P (1996): Localization of leptin receptor mrna and the long form splice variant (ob-rb) in mouse hypothalamus and adjacent brain regions by in situ hybridization. *FEBS Lett* 387, 113-116
- Montague CT, Farooqi IS, Whitehead JP, Soos MA, Rau H, Wareham NJ, Sewter CP, Digby JE, Mohammed SN, Hurst JA, Cheetham CH, Earley AR, Barnett AH, Prins JB, O'Rahilly S (1997): Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. *Nature* 387, 903-908
- Monzillo LU, Hamdy O, Horton ES, Ledbury S, Mulooly C, Jarema C, Porter S, Ovalle K, Moussa A, Mantzoros CS (2003): Effect of lifestyle modification on adipokine levels in obese subjects with insulin resistance. *Obes Res* 11, 1048-1054
- Morris LG, Kleinberger A, Lee KC, Liberatore LA, Burschtin O (2008): Rapid risk stratification for obstructive sleep apnea, based on snoring severity and body mass index. *Otolaryngol Head Neck Surg* 139, 615-618
- Munzberg H (2010): Leptin-signaling pathways and leptin resistance. *Formu Nutr* 63, 123-132
- Munzberg H, Huo L, Nillni EA, Hollenberg AN, Bjorbaek C (2003): Role of signal transducer and activator of transcription 3 in regulation of hypothalamic proopiomelanocortin gene expression by leptin. *Endocrinology* 144, 2121-2131
- Müller TD, Sullivan LM, Habegger K, Xi CX, Kabra D, Grant E, Ottaway N, Krishna R, Holland J, Hembree J, Perez-Tilve D, Pfluger PT, DeGuzman MJ, Siladi ME, Kraynov VS, Axelrod DW, DiMarchi R, Pinkstaff JK, Tschöp MH (2012): Restoration of leptin responsiveness in diet-induced obese mice using an optimized leptin analog in combination with exendin-4 or FGF21. *J Pept Sci* 18, 383-393
- Myers MG, Jr (2010): Outstanding Scientific Achievement Award Lecture 2010: deconstructing leptin: from signals to circuits. *Diabetes* 59, 2708-2714

- Najib S, Sanchez-Margalet V (2002): Human leptin promotes survival of human circulating blood monocytes prone to apoptosis by activation of p42/44 MAPK pathway. *Cell Immunol* 220(2), 143-0
- Nakahata N (2008): Thromboxane a2: Physiology/pathophysiology, cellular signal transduction and pharmacology. *Pharmacol Ther* 118, 18-35
- 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
- Nascimento AF, Luvizotto RA, Leopoldo AS, Lima-Leopoldo AP, Seiva FR, Justulin LA Jr, Silva MD, Okoshi K, Wang XD, Cicogna AC (2011): Long-term high-fat diet-induced obesity decreases the cardiac leptin receptor without apparent lipotoxicity. *Life Sci* 88, 1031-1038
- Ndumele CE, Coresh J, Lazo M, Hoogeveen RC, Blumenthal RS, Folsom AR, Selvin E, Ballantyne CM, Nambi V (2014): Obesity, subclinical myocardial injury, and incident heart failure. *JACC Heart Fail* 2, 600-607
- Ng M, Fleming T, Robinson M, Thomson B, Graetz N, Margono C, Mullany EC et al. (2014): Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980-2013: a systematic analysis for the Global Burden of a Disease Study 2013, *Lancet* 384, 766-781
- Niiya K, Hodson E, Bader R, Byers-Ward V, Koziol JA, Plow EF, Ruggeri ZM (1987): Increased surface expression of the membrane glycoprotein iib/iiia complex induced by platelet activation. Relationship to the binding of fibrinogen and platelet aggregation. *Blood* 70, 475-483
- 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
- Paz-Filho G, Mastronardi CA, Licinio J (2014): Leptin treatment: Facts and expectations. *Metabolism* [Epub ahead of print]
- Phillips MS, Liu Q, Hammond HA, Dugan V, Hey PJ, Caskey CJ, Hess JF (1996): Leptin receptor missense mutation in the fatty Zucker rat. *Nat Genet*, 13:18-19
- Procopio C, Andreozzi F, Laratta E, Casses A, Beguinot F, Arturi F, Hribal ML, Perticone F, Sesti G (2009): Leptin-stimulated endothelial nitric-oxide synthase via an adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase/Akt signaling pathway is attenuated by interaction with C-reactive protein. *Endocrinology* 150, 3584-3593
- Rahmouni K, Haynes WG, Morgan DA, Mark AL (2002): Selective resistance to central neural administration of leptin in agouti obese mice. *Hypertension* 39, 486-490
- Rahmouni K, Morgan DA, Morgan GM, Mark AL, Haynes WG (2005): Role of selective leptin resistance in diet-induced obesity hypertension. *Diabetes* 54, 2012-2018
- Reeves KW, Carter GC, Rodabough RJ, Lane D, McNeeley SG, Stefanick ML, Paskett ED (2011): Obesity in relation to endometrial cancer risk and disease characteristics in the Women's Health Initiative. *Gynecol Oncol* 121, 376-382
- Ring BD, Scully S, Davis CR, Baker MB, Cullen MJ, Pelleymounter MA, Danilenko DM (2000): Systemically and topically administered leptin both accelerate wound healing in diabetic ob/ob mice. *Endocrinology* 141, 446-449

- Romero CX, Romero TE, Shlay JC, Ogden LG, Dabelea D (2012): Changing trends in the prevalence and disparities of obesity and other cardiovascular disease risk factors in three racial/ethnic groups of USA adults. *Adv Prev Med* 2012, 172423
- Ross R (1999): Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* 340, 115-126
- Ruggeri ZM, Mendolicchio GL (2007): Adhesion mechanisms in platelet function. *Circ Res* 100, 1673-1685
- Sargent BJ, Moore NA (2009): New central targets for the treatment of obesity. *Br J Clin Pharmacol* 68, 852-860
- Schaab M, Kausch H, Klammt J, Nowicki M, Anderegg U, Gebhardt R, Rose-John S, Scheller J, Thiery J, Kratzsch J (2012): Novel regulatory mechanisms for generation of the soluble leptin receptor: implications for leptin action. *PLoS One* 7, e34787
- Signorello MG, Giacobbe E, Leoncini G (2011): Activation by 2-arachidonoylglycerol of platelet p38MAPK/cPLA2 pathway. *J Cell Biochem* 112, 2794-2802
- Sjostrom L, Narbro K, Sjostrom CD, Karason K, Larsson B, Weder H, Lystig T, Sullivan M, Bouchard C, Carlsson B, Bengtsson C, Dahlgren S et al. (2007): Effects of bariatric surgery on mortality in Swedish obese subjects. *N Engl J Med* 357, 741-752
- Schafer 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
- Schwartz MW, Peskind E, Raskind M, Boyko EJ, Porte D, Jr (1996): Cerebrospinal fluid leptin levels: Relationship to plasma levels and to adiposity in humans. *Nat Med* 2, 589-593
- Shamsuzzaman AS, Winnicki M, Wolk R, Svatikova A, Phillips BG, Davison DE, Berger PB, Somers VK (2004): Independent association between plasma leptin and c-reactive protein in healthy humans. *Circulation* 109, 2181-2185
- Shattil SJ, Cunningham M, Hoxie JA (1987): Detection of activated platelets in whole blood using activation-dependent monoclonal antibodies and flow cytometry. *Blood* 70, 307-315
- Sierra-Honigmann MR, Nath AK, Murakami C, Garcia-Cardena G, Papapetropoulos A, Sessa WC, Madge LA, Schechner JS, Schwabb MB, Polverini PJ, Flores-Riveros JR (1998): Biological action of leptin as an angiogenic factor. *Science* 281, 1683-1686
- Soderberg S, Ahren 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
- Spinelli SL, Maggirwar SB, Blumberg N, Phipps RP (2010): Nuclear emancipation: a platelet tour de force. *Sci Signal* 3, pe37
- Sweeney G (2002): Leptin signalling. *Cell Signal* 14, 655-663
- Sweeney G (2010): Cardiovascular effects of leptin. *Nat Rev Cardiol* 7, 22-29
- Tanamas SK, Wong E, Backholer K, Abdullah A, Wolfe R, Barendregt J, Peeters A (2014): Duration of obesity and incident hypertension in adults from the Framingham Heart Study. *J Hypertens* [Epub ahead of print]
- 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, Muir C, Sanker S, Moriarty A, Moore KJ, Smutko JS, Mays GG, Wool

- EA, Monroe CA, Tepper RI (1995): Identification and expression cloning of a leptin receptor, ob-r. *Cell* 83, 1263-1271
- Thompson KJ, Lau KN, Johnson S, Martinie JB, Iannitti DA, McKillop IH, Sindram D (2011): Leptin inhibits hepatocellular carcinoma proliferation via p38-MAPK dependent signaling. *HPB (Oxford)* 13, 225-233
- Torbicki A, Perrier A, Konstantinides S, Agnelli G, Galie N, Pruszczyk P, Bengel F, Brady AJB, Ferreira D, Janssens U, Klepetko W, Mayer E, Remy-Jardin M, Bassand JP (2008): Guidelines on diagnosis and management of acute pulmonary embolism. Task force on pulmonary embolism, european society of cardiology. *Eur Heart J* 29, 2276-2315
- Vaisse C, Halaas JL, Horvath CM, Darnell JE, Jr., Stoffel M, Friedman JM (1996): Leptin activation of stat3 in the hypothalamus of wild-type and ob/ob mice but not db/db mice. *Nat Genet* 14, 95-97
- van Dielen FM, van't Veer C, Schols AM, Soeters PB, Buurman WA, Greve JW (2001): Increased leptin concentrations correlate with increased concentrations of inflammatory markers in morbidly obese individuals. *Int J Obes Relat Metab Disord* 25, 1759-1766
- Wagner CL, Mascelli MA, Neblock DS, Weisman HF, Coller BS, Jordan RE (1996): Analysis of gpiib/iiiA receptor number by quantification of 7e3 binding to human platelets. *Blood* 88, 907-914
- Wallace AM, McMahan 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
- Wallerstedt SM, Eriksson AL, Niklason A, Ohlsson C, Hedner T (2004): Serum leptin and myocardial infarction in hypertension. *Blood Press* 13, 243-246
- Wang MY, Lee Y, Unger RH (1999). Novel form of lipolysis induced by leptin. *J Biol Chem* 274, 17541-17544
- Wang H, Luo W, Eitzman DT (2014): Leptin in thrombosis and atherosclerosis. *Curr Pharm Des* 20, 641-645
- Wannamethee SG, Shaper AG, Whincup PH, Lennon L, Sattar N (2011): Obesity and risk of incident heart failure in older men with and without pre-existing coronary heart disease: does leptin have a role?. *J Am Coll Cardiol* 58, 1870-1877
- 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
- Wirth A, Wabitsch M, Hauner H (2014): The Prevention and Treatment of Obesity. *Dtsch Arztebl Int* 111, 705-713
- Wolk R, Berger P, Lennon RJ, Brilakis ES, Johnson BD, Somers VK (2004): Plasma leptin and prognosis in patients with established coronary atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol* 44, 1819-1824
- Woodside DG, Liu S, Ginsberg MH (2001): Integrin activation. *Thromb Haemost* 86, 316-323
- Xu Y, Hill JW, Fukuda M, Gautron L, Sohn JW, Kim KW, Lee CE, Choi MJ, Lauzon DA, Dhillon H, Lowell BB, Zigman JM, Zhao JJ, Elmquist JK (2010): PI3K-signaling in the ventromedial hypothalamic nucleus is required for normal energy homeostasis. *Cell Metab* 12, 88-95

- Yamada KM, Miyamoto S (1995). Integrin transmembrane signaling and cytoskeletal control. *Curr Opin Cell Biol* 7, 681-689
- Yang R, Barouch LA (2007): Leptin signaling and obesity: Cardiovascular consequences. *Circ Res* 101, 545-559
- Yi W, Li Q, Shen J, Ren L, Liu X, Wang Q, He S, Wu Q, Hu H, Mao X, Zhu L (2014): Modulation of platelet activation and thrombus formation using a pan-PI3K Inhibitor S14161. *PLoS One* 9, e102394
- Zeidan A, Javadov S, Chakrabarti S, Karmazyn M (2008): Leptin-induced cardiomyocyte hypertrophy involves selective caveolae and RhoA/ROCK-dependent p38 MAPK translocation to nuclei. *Cardiovasc Res* 77, 64-72
- Zeng R, Xu CH, Xu YN, Wang YL, Wang M (2014): Association of leptin levels with pathogenetic risk of coronary heart disease and stroke: a meta-analysis. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 58, 817-823
- 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
- Zhao AZ, Shinohara MM, Huang D, Shimizu M, Eldar-Finkelman H, Krebs EG, Beavo JA, Bornfeldt KE (2000): Leptin induces insulin-like signaling that antagonizes camp elevation by glucagon in hepatocytes. *J Biol Chem* 275, 11348-11354

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meiner Betreuerin Frau PD Dr. med. Claudia Dellas für die hervorragende Unterstützung und Förderung meiner Arbeit. Sie lehrte mich mit viel Geduld, wissenschaftlich zu arbeiten und zu denken. Auch über eine zuletzt weite Entfernung war sie für mich stets erreichbar und jederzeit engagiert in der Fertigstellung meiner Dissertation.

Zudem möchte ich mich ganz herzlich bei Prof. Dr. med Stavros Konstantinides sowie Frau Prof. Dr. med. Kathrin Schäfer bedanken für die Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe und die angenehme Zusammenarbeit. Durch ihr interessantes Forschungsthema weckten sie mein Interesse an der Kardiologie.

Frau S. Minne danke ich für ihre Hilfsbereitschaft im Labor.

Allen voran möchte ich meinen Eltern, Ute und Helmut, von Herzen danken, die mich nicht nur bei der Entstehung dieser Arbeit, sondern in meinem gesamten bisherigen Leben stets bedingungslos unterstützt und begleitet haben. Ihnen sei diese Arbeit gewidmet.

Eigene Publikationen auf der Basis dieser Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden in folgenden Publikationen veröffentlicht:

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 C γ 2 and A $_2$. *Thromb Haemost.* 98, 1063-1071.

Schroeter MR, Leifheit M, Sudholt P, Heida NM, Dellas C, **Rohm I**, Alves F, Zientkowska M, Rafail S, Puls M, Hasenfuss G, Konstantinides S, Schäfer K (2008): Leptin enhances the recruitment of endothelial progenitor cells into neointimal lesions after vascular injury by promoting integrin-mediated adhesion. *Circ Res.* 103, 536-544.

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