

Aus der Klinik für Kardiologie und Pneumologie  
(Prof. Dr. med. G. Hasenfuß)

im Zentrum Innere Medizin  
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

# **Der Einfluß von Leptin auf die Freisetzung endothelialer Vorläuferzellen aus dem Knochenmark**

INAUGURAL- DISSERTATION

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

vorgelegt von

Susanne Stein

aus

Worms

Göttingen 2013

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

1. Berichterstatterin: Prof. Dr. med. K. Schäfer

2. Berichterstatter/in: Prof. Dr. T. Legler

Tag der mündlichen Prüfung: 08.07.2014

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1	ANGIOGENESE – DIE FORMATION NEUER BLUTGEFÄßE .....	1
1.2	ENDOTHELIALE PROGENITORZELLEN .....	2
1.2.1	<i>Knochenmarkstammzellen .....</i>	2
1.2.2	<i>Die Geschichte der endothelialen Progenitorzellen .....</i>	3
1.3	DAS ADIPOZYTENHORMON LEPTIN .....	4
1.3.1	<i>Das obese-Gen .....</i>	6
1.3.2	<i>Leptin als Modulator des Blutes .....</i>	7
1.4	DAS KNOCHENMARK .....	8
1.4.1	<i>Green Fluorescent Protein als biologischer Zellmarker.....</i>	9
1.5	MOBILISATION VON STAMMZELLEN .....	10
1.6	ZIELSETZUNG DER ARBEIT .....	12
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>14</b>
2.1	IN-VIVO-VERSUCHE .....	14
2.1.1	<i>Versuchstiere .....</i>	14
2.1.2	<i>Gruppeneinteilung.....</i>	14
2.2	VORBEREITUNG DER DURCHFLUSSZYTOMETRIE .....	15
2.2.1	<i>Liste der Antikörper für Durchflusszytometrie .....</i>	16
2.3	IN-VITRO ZELLKULTUR .....	16
2.3.1	<i>Isolierung und Kultivierung endothelialer Progenitorzellen aus peripherem humanem Blut</i>	16
2.3.2	<i>Isolation und Kultivierung endothelialer Progenitorzellen .....</i>	17
2.3.3	<i>Markierung von endothelialen Progenitorzellen und Lösen der Zellen von der Platte .....</i>	18
2.3.4	<i>Kultivierung von humanen Endothelzellen aus der Vena umbilicalis.....</i>	18
2.4	IN-VITRO-ANGIOGENESE-VERSUCHE .....	19
2.4.1	<i>Matrigel-Angiogenese-Assay.....</i>	19
2.4.2	<i>Sphäroid-Angiogenese- Assay.....</i>	20
2.5	MURINES HINTERLAUFISCHÄMIE-MODELL.....	21
2.5.1	<i>Induktion der Ischämie im Maushinterlauf.....</i>	22
2.6	CHARAKTERISIERUNG VON ENDOTHELIALEN PROGENITOR-ZELLEN .....	22
2.6.1	<i>Fluoreszenzfärbung .....</i>	22
2.7	IN-VIVO-FIXATION DES MUSCULUS GASTROCNEMIUS .....	23
2.8	KNOCHENMARKGEWINNUNG .....	24
2.8.1	<i>RNA-Isolation.....</i>	24
2.8.2	<i>Reverse Transkription .....</i>	25
2.8.3	<i>Polymerase-Kettenreaktion .....</i>	25

2.8.4	<i>Liste der Primer</i> .....	27
2.9	STATISTIK .....	27
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>28</b>
3.1	LEPTIN VERBESSERT DIE MOBILISATION DER FLK 1 <sup>+</sup> PROGENITORZELLEN AUS DEM KNOCHENMARK .....	28
3.2	AUSWIRKUNG NACH SYSTEMISCHER INJEKTION .....	30
3.2.1	<i>Gewichtsabnahme</i> .....	30
3.2.2	<i>Leukozytenanzahl im Blut</i> .....	31
3.3	DER EFFEKT VON LEPTIN AUF DIE MOBILISATION VON ENDOTHELIALEN VORLÄUFERZELLEN .....	32
3.3.1	<i>Die Auswirkung von Leptin auf das Knochenmark</i> .....	32
3.4	DIE KAPAZITÄT VON ENDOTHELIALEN PROGENITORZELLEN IM <i>IN-VIVO</i> -MAUSMODELL DER HINTERLAUF-ISCHÄMIE .....	34
3.4.1	<i>Kapillardichte im Musculus gastrocnemius nach Injektion von Leptin</i> .....	34
3.4.2	<i>Nachweis von GFP- positiven Zellen nach Knochenmarktransplantation im Musculus gastrocnemius</i> .....	35
3.5	LEPTIN FÖRDERT DAS ANGIOGENETISCHE VERHALTEN VON ENDOTHELIALEN PROGENITORZELLEN <i>IN-VITRO</i> .....	39
3.5.1	<i>Ergebnisse des Matrigel-Angiogenese-Assay</i> .....	39
3.5.2	<i>Ergebnisse des Sphäroid-Angiogenese-Assay</i> .....	41
3.5.3	<i>Der Effekt von Leptin auf endotheliale Progenitorzellen nach Knochenmarktransplantation im Matrigel-Angiogenese-Assay</i> .....	43
3.5.4	<i>Der Effekt von Leptin auf endotheliale Progenitorzellen nach Knochenmarktransplantation im Sphäroid-Angiogenese-Assay</i> .....	45
3.5.5	<i>Die Wirkung von Leptin nach Knochenmarktransplantation</i> .....	46
3.5.6	<i>Der Effekt von Leptin nach Knochenmarktransplantation</i> .....	47
3.5.7	<i>Leptin fördert die Expression von NOX2 und MMP9 innerhalb des Knochenmarks</i> .....	49
3.6	BESTIMMUNG VON ENDOTHELIALEN PROGENITORZELLEN .....	50
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>53</b>
4.1	CHARAKTERISIERUNG VON ENDOTHELIALEN PROGENITORZELLEN .....	53
4.2	WIRKUNG VON LEPTIN AUF DIE ANGIOGENETISCHEN EIGENSCHAFTEN VON ENDOTHELIALEN PROGENITORZELLEN <i>IN VITRO</i> .....	55
4.2.1	<i>Matrigel-Angiogenese-Assay</i> .....	56
4.2.2	<i>Sphäroid-Angiogenese-Assay</i> .....	57
4.3	FÖRDERUNG DER NEOVASKULARISATION DURCH LEPTIN NACH DEM <i>IN- VIVO</i> -MAUSMODELL DER HINTERLAUFISCHÄMIE .....	58
4.4	WIRKUNG VON LEPTIN AUF DAS KNOCHENMARK .....	59
4.4.1	<i>Progenitorzellmobilisierung aus dem Knochenmark und Rekrutierung</i> .....	60
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>63</b>

6	LITERATUR .....	65
---	-----------------	----

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Aa.	Arterien
acLDL	<i>acetylated low density lipoprotein</i> , acetyliertes Lipoprotein mit geringer Dichte
Ak	Antikörper
bFGF	<i>basic fibroblast growth factor</i> , Fibroblasten-Wachstumsfaktor
Bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
CD	<i>cluster of differentiation</i> , Unterscheidungsgruppen
cDNA	<i>complementary desoxyribonucleid acid</i> , komplementäre Desoxyribonucleinsäure
DAPI	4, 6- Diamidin-2-phenylindol-dihydrochlorid
db	Leptin-Rezeptor (kodiert durch das Diabetes-Gen)
EC	Endothelzellen
ECM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	<i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>
eNOS	endothelial Nitric Oxide Synthase, NO- Synthetase III
et al.	et alii , und andere
EPC	Endotheliale Progenitorzellen
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i> , fluoreszenzaktivierter Zellen-Sortierer
FBS	<i>fetal bovine serum</i> , Fetales Rinderserum
FCS	<i>fetal calf serum</i> , Fetales Kalbserum
g	Gramm
G-CSF	<i>granulocyte–colony stimulating factor</i> , Granulozyten- stimulierender Faktor
GFP	<i>green fluorescent protein</i> , grün-fluoreszierendes Protein
HUVEC	<i>human umbilical vein endothelial cells</i> , humane umbilikale venöse Endothelzellen
Jak 2	Januskinase 2
kg	Kilogramm
LDL	<i>low density lipoprotein</i> , Lipoprotein niedriger Dichte
MMP	Matrix- Metalloprotein
MNC	<i>mononuclear cells</i> , mononukleäre Zellen

N	<i>number</i> , Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	<i>nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i> , Nicotin Adenin Dinucleotid Phosphat
NOX 2	NADPH Oxidase 2
Nm	Nanometer
Ob	Leptin (Produkt des Obesity-Gens)
ObR	Leptin-Rezeptor
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , Phosphatpuffersalzlösung
PFA	Paraformaldehyd
U/min.	Umdrehungen pro Minute
RT	Reverse Transkriptase
Sca 1	<i>stem cell antigen 1</i> , Stammzellantigen 1
SDF-1 $\alpha$	<i>stromal cell-derived factor-1<math>\alpha</math></i> , Stromazellen-abgeleiteter Faktor $\alpha$
SEM	<i>standard error of the mean</i> , Standardfehler des Mittelwertes
s. o.	siehe oben
STAT 3	<i>signal transducer and activator of transcription 3</i> , Signaltransduktor und Aktivator der Transkription 3
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
Tyr	Thyrosinrest
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i> , Gefäßwachstumsfaktor
WT	Wildtyp

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 ANGIOGENESE – DIE FORMATION NEUER BLUTGEFÄßE

Blut (lat. *sanguis*, altgriech. αἷμα *haima*) erfüllt viele Transport- und Regulationsfunktionen und erreicht über das Gefäßsystem nahezu alle Bereiche des menschlichen Körpers. Demzufolge ist ein funktionierendes Gefäßsystem für den Körper beziehungsweise das Gewebe zwingend notwendig, um Wachstum, Reparaturen und Entgiftung gewährleisten zu können. Das Gefäßsystem gliedert sich in Blutgefäße und Lymphgefäße.

Blutgefäße bestehen aus drei Wandschichten: Tunica interna, Tunica media und Tunica adventitia. Die Tunica interna ist gekennzeichnet durch eine Schicht aus Endothelzellen. Die Endothelzellen regulieren die Zufuhr von Nährstoffen sowie das Übertreten von weißen Blutkörperchen aus dem Blut individuell nach den Bedürfnissen der angrenzenden Zellen.

Um bei den täglichen Um- und Ausbauprozessen genügend Blut bereitzustellen, ist es wichtig, dass der Körper neue Gefäße bilden kann. Dabei unterscheidet man zwischen Vaskulogenese und Angiogenese. Vaskulogenese (von lat. *vas*, Gefäß und gr. γένεσις, Genese, Geburt, Entstehung, Bildung) findet vor allem in der Embryoanentwicklung statt. Die Vaskulogenese zeichnet sich dadurch aus, dass durch Zytokine wie zum Beispiel Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) endotheliale Vorläuferzellen aus dem Knochenmark angelockt werden. Sie verbinden sich dann mit Vorläuferzellen des Endothels (Angioblasten). So entsteht ein Gefäßsystem (Joussen et al. 2003). Angiogenese (gr. *angeion*, Gefäß und s.o.) beschreibt im Gegensatz zur Vaskulogenese die Entstehung von Blutgefäßen aus bereits vorhandenen Kapillaren – dies findet vor allem im adulten Körper statt. Physiologisch ist die Angiogenese zum Beispiel bei der Wundheilung und der Uterusschleimhaut. Aber auch pathologische Prozesse im Körper, wie etwa Tumore und diabetische Retinopathie, nutzen dieses Prinzip. Kommt es zu einer Minderversorgung der Organe oder des Gewebes mit Blut und somit Nährstoffen spricht man von Ischämie (von altgriechisch ἴσχειν/ἔχει, *is-chein/echein*, „zurückhalten“ sowie ἡμα, *haima*, „Blut“). Bei einer Minderversorgung mit Nährstoffen sucht sich das Blut Kollateralgefäße und nutzt diese, um die Ischämie zu umgehen. Dieses Prinzip wurde in Form des Hinterlaufischämie-Modells in dieser Arbeit angewandt.



Bei der Angiogenese laufen komplexe Prozesse ab – es handelt sich um ein Zusammenspiel vieler Faktoren. Durch verschiedene angiogenetische Wachstumsfaktoren wie zum Beispiel VEGF und *basic Fibroblastic Growth Factor* (bFGF) werden für die Aussprossung notwendige Zellen aktiviert, die von antiangiogenetischen Faktoren wie Endostatin, Angiostatin und Thrombospondin gehemmt werden. Überwiegen nun die angiogenetischen Faktoren, bilden sich mindestens vier Stadien aus:

Produktion von Proteasen, die die Basalmembran der adulten Kapillare lysieren

Einwanderung in das Gewebe, unterstützt durch das aktivierte Signal

Proliferation

Formation von Röhren (*tubes*) und anschließende Differenzierung, eventuell Ausbildung von funktionierenden Kapillaren und Gefäßen mit Anschluss an die Blutbahn

(Alberts et al. 2002).

## **1.2 ENDOTHELIALE PROGENITORZELLEN**

### **1.2.1 KNOCHENMARKSTAMMZELLEN**

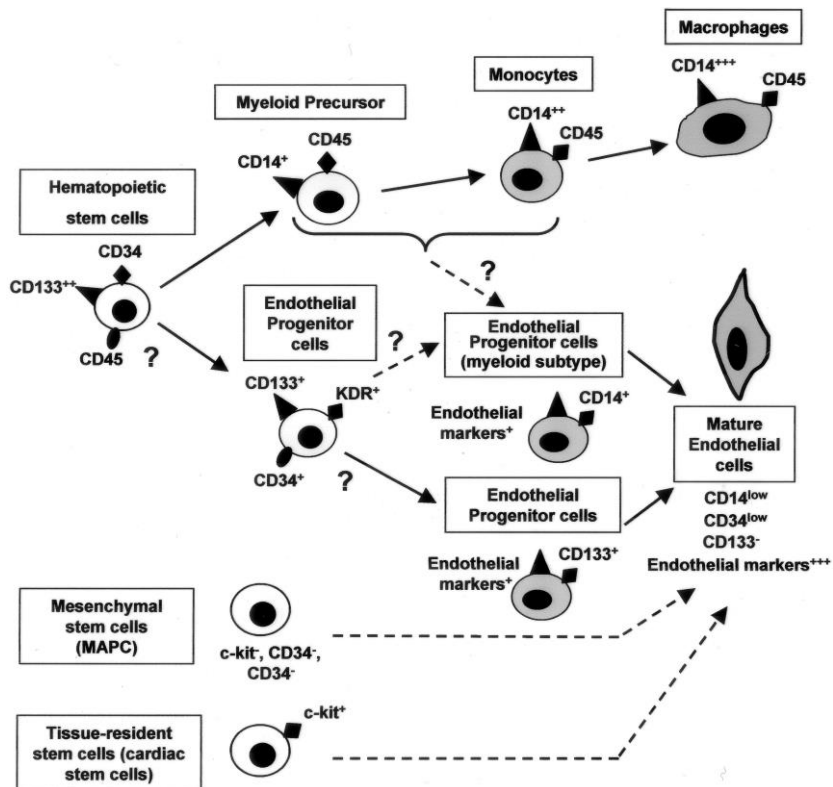
Aus Stamm- und Vorläuferzellen des Knochenmarks werden die Zellen des Blutes immer wieder neu gebildet. Sogenannte hämatopoetische Stammzellen sind undifferenziert und unerschöpflich in der Zellteilung. Vorläuferzellen (Progenitorzellen) hingegen sind Zellen mit einem niedrigen Potential zur Zellteilung, die bereits irreversibel und unipotent differenziert sind. Sie stehen am Anfang einer Zellreihe, zum Beispiel als myeloische Vorläuferzellen (Bayrhuber und Knull, 1998).

Schon im 19. Jahrhundert beschäftigte man sich mit der Idee, dass nicht nur das Blut aus Knochenmarkstammzellen gebildet wird, sondern auch Gewebe (Wohlrab und Henloch 1988). In den 1970er Jahren wurde durch Friedenstein zum ersten Mal beschrieben, dass auch die Differenzierung von Zellen der mesenchymalen Entwicklungsreihe von adulten Knochenmarkzellen abstammt (Friedenstein et al. 1976). Inzwischen ist die Differenzierung von Stammzellen aus dem Knochenmark in unterschiedliche Gewebe, wie zum Beispiel in Kardiomyozyten, Neuronen und Muskelzellen, möglich (Jiang et al. 2002; Subramanian et al. 2010).

## 1.2.2 DIE GESCHICHTE DER ENDOTHELIALEN PROGENITORZELLEN

Bis 1997 verstand man unter postnataler Angiogenese das Ergebnis von Proliferation, Migration und Umstrukturierung von differenzierten ortsständigen Endothelzellen. Zu dieser Zeit entdeckte die Arbeitsgruppe um Asahara eine Subpopulation zirkulierender Zellen im adulten Organismus. Diese Subpopulation exprimierte den hämatopoetischen Stammzellmarker CD34 und Endothelialzell-Marker, wie zum Beispiel CD31 (auch bekannt unter *platelet endothelial cell adhesion molecule-1* [PECAM-1]), *vascular endothelial growth factor receptor-2* (VEGFR-2), den Angiopoetin-Rezeptor und E-Selectin (Asahara et al. 1997). Diese Zellen nahmen nach sieben Tage eine spindelförmige Form an und bildeten Kolonien, wie es von hämatopoetischen Vorläuferzellen bekannt ist. Der endotheliale Phänotyp konnte von Asahara nachgewiesen werden durch die Aufnahme von fluoreszenzmarkiertem acLDL, die Möglichkeit zur Einfärbung mit einem endothelspezifischen Lectin, der Expression von NO-Synthetase III (eNos) sowie dem von-Willebrand-Faktor (vWF).

Nach *In-vivo*-Versuchen bei Versuchstieren mit künstlich induzierter Ischämie der Extremitäten wurde das Vorhandensein der Zellen in den Kapillaren der Neovaskularisationszone nachgewiesen. Damit galt es als wahrscheinlich, daß diese Zellen an der Regeneration des Endothels beteiligt waren. Nachdem Asahara zeigen konnte, dass vom Knochenmark abstammende zirkulierende Zellen an der Gefäßneubildung im adulten Organismus beteiligt sind, änderte sich das traditionelle „Konzept der postnatalen Angiogenese“. Über die Jahre wurden viele Versuche zum Thema endotheliale Vorläuferzellen (EPC) durchgeführt. Man muss davon ausgehen, dass man unter dem Begriff EPC viele verschiedene Zelltypen erfasst, die jeweils teilweise die Fähigkeit zur endothelialen Differenzierung aufweisen, da es keinen einheitlichen Marker für EPC gibt. (Schatteman et al. 2007; Hirschi et al. 2008).



**Schema 1:** Die Herkunft und Unterscheidung von EPCs. Die schematische Darstellung zeigt die potenzielle Herkunft und die Differenzierung von EPCs aus Stammzellen und nicht-hämatopoetischen Zellen (Urbich und Dimmeler 2004, S.345)

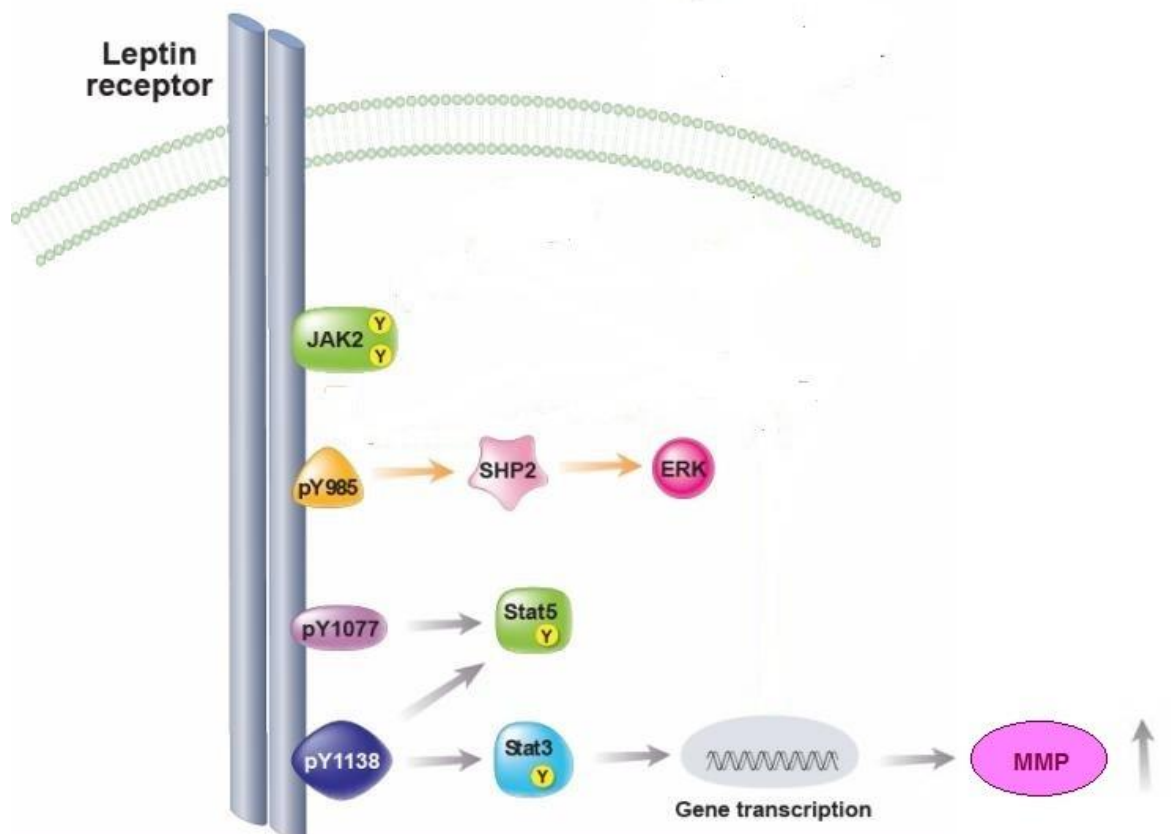
### 1.3 DAS ADIPOZYTENHORMON LEPTIN

Fettgewebe ist kein passives Gewebe, es dient nicht nur als Speicher von überschüssigen Triglyzeriden, sondern auch als hormonproduzierendes Gewebe. Seine Hormone bezeichnet man auch als Adipokine – zu ihnen gehört das Hormon Leptin. Das Adipozytenhormon Leptin (gr.: λεπτός, *leptos* = „dünn“) ist ein Proteohormon, welches 1994 von der Arbeitsgruppe Zhang entdeckt wurde (Zhang et al. 1994). Leptin greift in viele regulatorische Kreisläufe des menschlichen Körpers ein. So signalisiert es zum Beispiel über den Leptin-Rezeptor (Erklärung siehe unten) im Hypothalamus den Anteil an Fettgewebe in der Peripherie und senkt damit den Appetit, reguliert den Energieverbrauch und die Nahrungsaufnahme (Hirsch-Kaufmann 2004). Steigt nun der Anteil an Fettgewebe, so steigt auch der Leptinspiegel im Plasma. Auf diese Weise reguliert Leptin langfristig den Gehalt des Fettgewebes (Mechanismus siehe Seite 7). In unserer immer adipöser werdenden Gesellschaft

wollte man nun testen, ob eine Leptingabe bei Übergewicht eine Reduktion des Körpergewichtes zur Folge hat.

Zunächst substituierte man Leptin bei übergewichtigen Mäusen mit genetischem Leptinmangel. Gemäß der These führte die Gabe von Leptin zum Gewichtsverlust (Friedman und Halaas 1998; Friedman 2002). Leider zeigte die Gabe von Leptin bei übergewichtigen Menschen keinen wesentlichen Effekt auf die Gewichtsreduktion, außer beim äußerst selten vorkommenden genetischen Leptinmangel (Caro et al. 1996). Es konnte abgeleitet werden, dass bei übergewichtigen Personen zwar der Plasmaleptinspiegel erhöht ist, aber sich eine Resistenz gegenüber der gewichtsreduzierenden Wirkung des Hormons entwickelt. Die Resistenz kann durch unterschiedliche Einflüsse begründet sein, wie zum Beispiel einer Störung im intrazellulären Signalweg, einer Störung der Blut-Hirn-Schranke oder einer Erhöhung leptinbindender Proteine (Myers 2004; Yang et al. 2007; Enriori et al. 2006; Caro et al. 1996; Friedman und Halaas 1998; Kelesidis 2010). Des Weiteren ist noch zu klären, ob Leptin neben Gefäßneubildung und Gewichtsverlust bei genetischem Leptinmangel andere Effekte erzielen kann.

Auf molekularer Ebene besitzt nur die lange Form des Leptinrezeptors Domänen, um aktiviert zu werden. Sie verfügt über eine zelluläre ligandenbindende Domäne, eine transmembranöse Domäne und eine zytoplasmatisch signalisierte Domäne. Nach der Bindung von Leptin an seinen Rezeptor wird die Tyrosinkinase Januskinase 2 (JAK2) durch die Phosphorylierung von drei Tyrosinresten (Tyr 985, Tyr 1077, Tyr 1138) des Leptinrezeptors aktiviert. Die aktivierte Jak2 wiederum rekrutiert und aktiviert verschiedene Signalproteine. Durch die Phosphorylierung von Tyr 1138 wird der Signaltransduktor und Aktivator der Transkription 3 (STAT 3) rekrutiert. Die Phosphorylierung sorgt dafür, dass STAT 3 dimerisiert und sich in den Zellkern bewegt, wo es als Transkriptionsfaktor dient (Morton und Schwartz 2011). Durch die Gentranskription werden vermehrt Matrix-Metalloproteinasen (MMP) gebildet. Der Mechanismus ist in **Schema 2** abgebildet.



**Schema 2:** Die Aktivierung des Leptin-Rezeptors durch Leptin. Wird der Leptin-Rezeptor aktiviert, kommt es über Phosphorylierung zu einer Aktivierung der Jak2. Über phosphoryliertes STAT3 kommt es zu einer vermehrten Produktion von MMP (Schema modifiziert nach Morton und Schwartz 2011).

### 1.3.1 DAS OBESE-GEN

Das *ob*-Gen (ob steht für *obese*), welches als „Fettsucht-Gen“ bezeichnet wird, wurde wie sein Genprodukt Leptin 1994 von der Arbeitsgruppe Zhang isoliert (Zhang et al. 1994). Das *ob*-Gen kodiert 167 Aminosäuren. Diese Aminosäuren, welche vor allem von Adipozyten in die Blutbahn abgegeben werden, nennt man Leptin (Frederich et al. 1995). Studien haben gezeigt, dass eine rezessive Mutation des *ob*-Gens assoziiert ist mit massivem Übergewicht bei homozygoten *ob/ob*-Mäusen. Ein identischer Phänotyp wie bei den *ob/ob*-Mäusen konnte bei Mäusen mit einer Mutation auf einem anderen Gen, dem *db*-Gen (diabetes), nachgewiesen werden.

In früheren Arbeiten wurde sogar vermutet, dass eine Substanz in der Zirkulation des Blutstroms der *db/db*-Mäuse den normalen Phänotyp der *ob/ob*-Mäuse wiederherstellt,

während das Blut der *ob/ob*-Mäuse keinen Effekt auf die Adipozyten der *db/db*-Mäuse hat (Coleman 1978). Darauf aufbauend fand man heraus, dass das Produkt des *db*-Gens den Leptin-Rezeptor (ObR) verschlüsselt (Tartaglia et al. 1995).

Der Leptin-Rezeptor wird in verschiedenen gespleißten Formen gebildet, die man als ObRa, ObRb, ObRc, ObRd, ObRe und ObRf, bezeichnet (Lee et al. 1996; Wang et al. 1996). Alle diese Isoformen haben eine extrazelluläre Domäne mit über 800 Aminosäuren und eine transmembrane Domäne mit 34 Aminosäuren gemeinsam, aber eine variable intrazelluläre Domäne, die eine Klassifizierung in drei Gruppen zulässt: kurz, lang und sekretiert. Zu der kurzen Form des Rezeptors gehören ObRa, ObRc, ObRd und ObRf. Diese kurzen Formen haben übereinstimmend 30-40 zytoplasmatische Reste, während der ObRe-Form der zytoplasmatische Rest fehlt. Das läßt darauf schließen, dass ObRe wahrscheinlich die lösliche Form des Rezeptors ist. Die lange Form des Rezeptors wird als ObRb bezeichnet. ObRb verfügt über annähernd 300 zytoplasmatische Anteile, die verschiedene Varianten für die Interaktion mit anderen Proteinen und mit dem danach folgenden Signalweg besitzen. Es wurde gezeigt, dass ein Fehlen des ObRb für einen übergewichtigen Phänotyp der *db/db*-Mäuse verantwortlich ist (Chen et al. 1996; Chua et al. 1996). Damit übereinstimmend haben Mäuse mit der *db*-Mutation erhöhte zirkulierende Leptinplasmaspiegel (Maffei et al. 1995), und die Injektion von recombinantem Leptin bedingt eine Gewichtsabnahme der *ob/ob*-Mäuse, aber nicht der *db/db*-Mäuse (Halaas et al. 1995). Der Leptin-Rezeptor ObR wird überwiegend im Zentralnervensystem exprimiert, und viele Effekte von Leptin werden seiner Wirkung im Hypothalamus zugeschrieben. In einigen Populationen von Nerven stimuliert Leptin die Expression von anti-orexigenen (Appetit unterdrückenden) Neuropeptiden, während die orexigenen (Appetit stimulierenden) Neuropeptide unterdrückt werden (Cowley et al. 2001; Schwartz et al. 2000). Während der Gewichtszunahme steigen die Plasmaleptinspiegel an und vermitteln eine Reduktion der Nahrungsaufnahme, was zu einer negativen Energiebilanz führt. Im Gegensatz dazu sinkt beim Hungern der Leptinspiegel. Dieses sorgt somit für die Aktivierung von bestimmten Verhaltensweisen, Hormonen und metabolischen Rückmeldungen und für eine Erhöhung der Nahrungsaufnahme (Campfield et al. 1995; Ioffe et al. 1998; White et al. 2010).

### **1.3.2 LEPTIN ALS MODULATOR DES BLUTES**

Nach der Entdeckung von Leptin und seinem Rezeptor deuteten viele Studien darauf hin, dass es zusätzlich zur Wirkung auf das zentrale Nervensystem weiter physiologische Effekte

auf verschiedene Zellen und Gewebe geben könnte. Neben der Bedeutung von Leptin für die Fertilität (Burks et al. 2000) und die Immunantwort (Lord et al. 1998) fördert Leptin die Proliferation, Differentiation und funktionelle Aktivität von hämatopoetischen Zellen (Gainsford et al. 1996). Des Weiteren begünstigt Leptin die Plättchenaggregation ebenso wie die Formation arterieller und venöser Thrombosen *in vivo* (Bodary et al. 2002; Konstantinides et al. 2001; Konstantinides et al. 2004). Mittlerweile ist gezeigt worden, dass der Leptin-Rezeptor auf verschiedenen Zelltypen des Gefäßsystems vorhanden ist. Zu diesen Zellen zählen zum Beispiel Endothelzellen (Bouloumie et al. 1998), Monozyten (Zarkesh-Esfahani et al. 2001), vaskuläre glatte Muskelzellen (VSMC) (Oda et al. 2001) und wahrscheinlich Thrombozyten (Dellas et al. 2007; Giandomenico et al. 2005; Nakata et al. 1999).

Man fand eine erhöhte Leptin-Rezeptor-Dichte in experimentell induzierten Gefäßverletzungen bei Mäusen (Schroeter et al. 2007), aber auch in symptomatisch gewordenen arteriosklerotischen Plaques in der A. carotis interna bei symptomatisch gewordenen Patienten nach Endarteriektomie (Schneiderman et al. 2008). Außerdem sind sowohl endogene Hyperleptinämie, die bei Übergewicht auftritt, als auch exogene Hyperleptinämie verknüpft mit Endotheldysfunktion, Arteriosklerose und Neointimahyperplasie (Antic et al. 2003; Bodary et al. 2005; Schäfer et al. 2004). Im Gegensatz dazu konnte gezeigt werden, dass die Abwesenheit des Leptin-Signalweges wie in db/db-Mäusen einen protektiven Effekt auf die Neointimahyperplasie hat (Stephenson et al. 2003).

Zu den proatherosklerotischen und prothrombotischen Eigenschaften von Leptin gibt es Studien, die dem Hormon auch potenziell positive Eigenschaften auf das kardiovaskuläre System zuschreiben. So wurde 1998 bereits ein angiogenetischer Effekt beschrieben (Bouloumie et al. 1998; Sierra-Honigmann et al. 1998). Man fand, dass der Leptin-Rezeptor auf humanen Endothelzellen der Vena umbilicalis (HUVEC) exprimiert wird und dass physiologische Leptinkonzentrationen die Endothelzellproliferation sowie das Formen kapillarer Aussprossungen fördert (Heida et al. 2010). Die Effekte waren bei gleicher Konzentration vergleichbar mit denen des angiogenetischen Zytokins VEGF.

## 1.4 DAS KNOCHENMARK

Knochenmark (lat. *medulla ossium*) ist das im Zentrum großer Knochen befindliche spezialisierte Binde- und Stammgewebe, das auch der Bildung von Blutzellen dient. Man unterscheidet beim Knochenmark das gelbe und das rote Knochenmark.

Das gelbe Knochenmark (lat. *medulla ossium flava*) wird wegen seines hohen Fettanteils auch Fettmark genannt. Dieses Fett wird vermehrt von Retikulumzellen gespeichert. Es kommt vor allem in der Diaphyse der Röhrenknochen vor. Es besitzt keine pluripotenten Stammzellen und nimmt somit nicht an der Blutbildung teil.

Im roten Knochenmark (lat. *medulla ossium rubra*) befinden sich Stammzellen und Vorläuferzellen der Erythropoese, der Monozyten, der Granulozyten und der Thrombozyten. Im Gegensatz zum Säugling, der in allen Knochen rotes Knochenmark hat, besitzt der Erwachsene nur noch rotes Knochenmark in den Platten- bzw. kurzen Knochen, wie zum Beispiel Sternum, Rippen und Wirbelkörper. In den langen Röhrenknochen wird das rote Knochenmark zunehmend von gelbem Knochenmark ersetzt.

#### **1.4.1 GREEN FLUORESCENT PROTEIN ALS BIOLOGISCHER ZELLMARKER**

Bei dem „Green Fluorescent Protein“ (GFP) handelt es sich um ein fluoreszierendes Protein, das in der Natur in der pazifischen Qualle *Aequoria victoria* vorkommt. Bei Anregung mit blauem oder ultraviolettem Licht fluoresziert GFP grün. In der Qualle stammt die Anregungsenergie aus einem strahlungsfreien Energietransfer des Photoproteins Aequorin. Dies wurde 1962 erstmalig von Osamu beschrieben, der dafür 2008 den Nobelpreis für Chemie erhielt.

Seit 1992 besteht die Möglichkeit der klonalen Expression des GFP-Gens (Prasher et al. 1992). Um es verwenden zu können, muss GFP optisch angeregt werden. Das unmodifizierte, natürlich vorkommende GFP hat zwei Anregungsmaxima. Die erste Wellenlänge, bei der GFP angeregt wird, liegt bei 395 nm, die zweite bei 475 nm. Die Emissionswellenlänge liegt bei 509 nm.

Nach 1992 wurde intensiv an der Verwendung von GFP geforscht. Heute ist es möglich, beliebige genspezifische Proteine mit GFP zu markieren und sie somit sichtbar zu machen. Dies ist von Bedeutung, wenn man die Zellrekrutierung bestimmen möchte (Swearingen et al. 2010). Die Zellrekrutierung wurde in dieser Arbeit benutzt, um zu untersuchen, ob die EPC angelockt werden. Auch wurden GFP benutzt, um zu klären, ob die angelockten EPC aus dem Knochenmark stammen.

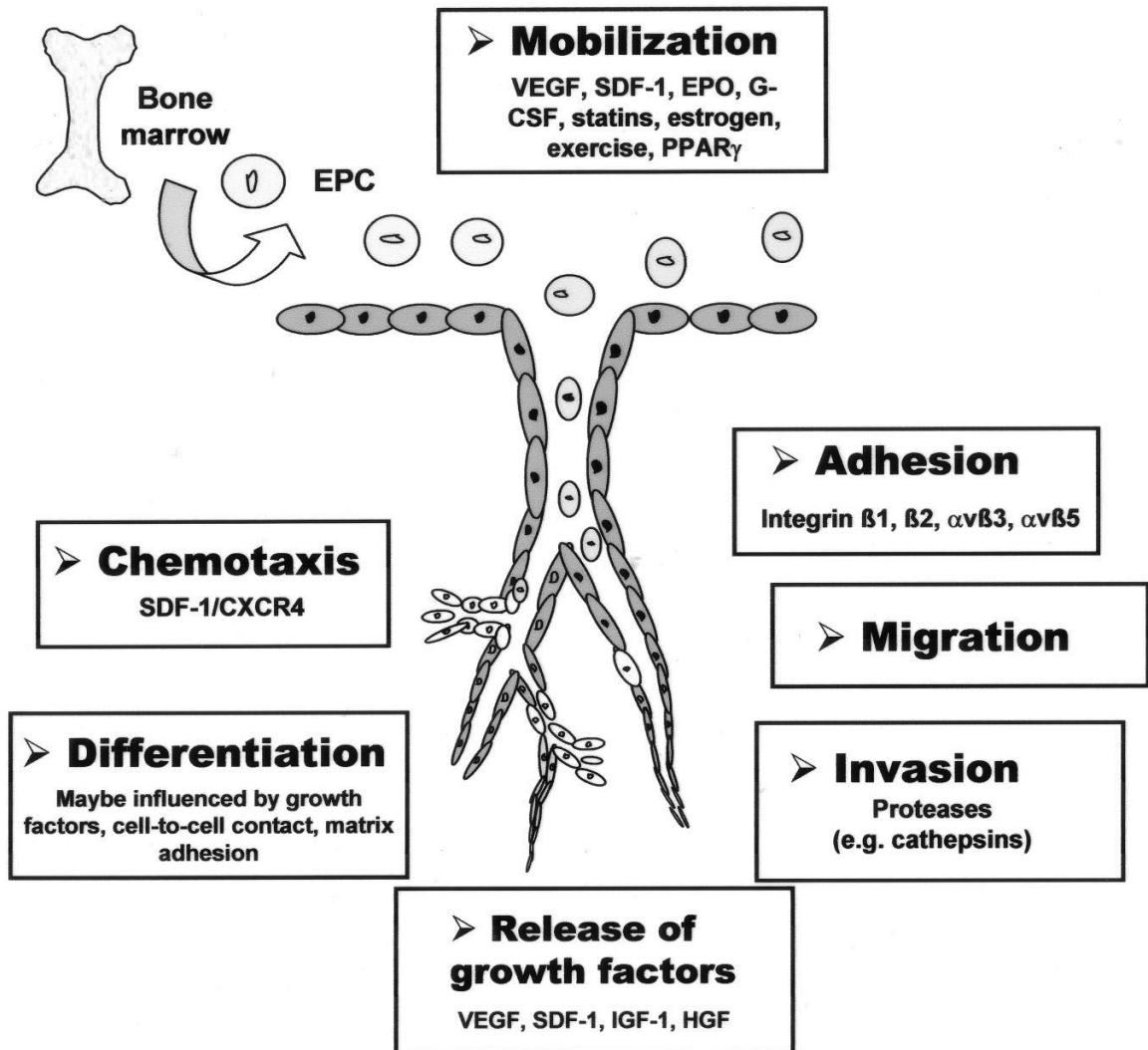


## 1.5 MOBILISATION VON STAMMZELLEN

Um vaskuläre protektive Eigenschaften ausüben zu können, müssen EPC in das betroffene Gewebe einwandern. Während der Rekrutierung (*homing*) adhären EPC an Molekülen, die von dem verletzten Gewebe, extrazellulären Matrixproteinen oder Endothelzellen freigesetzt werden. Darauf folgt die transendotheliale Migration auf die Seite der Verletzung oder der Ischämie (Chavakis et al. 2008). Diese Schritte des EPC-*homings* sind vermittelt durch Adhäsionsrezeptoren auf den EPC. Zu diesen zählen insbesondere Integrine, Cadherine, Zelladhäsionsmoleküle und Selektine (Evans und Calderwood. 2007).

Die Mobilisation von Stammzellen aus dem Knochenmark beginnt mit dem Sistieren der Interaktion zwischen Stammzellen und Stroma durch Mobilisierungszytokine. Dies sorgt dafür, dass die Stammzellen durch transendotheliale Migration das Knochenmark verlassen. Um die Migration aus dem Knochenmark möglich zu machen, werden Proteinase wie Elastase, Cathepsin und Matrix-Metalloproteinase (MMP) aktiviert – sie trennen Bindungen an den Stromazellen. Die freien Bindungen interagieren dann mit Integrinen an den hämatopoetischen Stammzellen (Urbich und Dimmeler 2004). Durch MMP-9 wird zusätzlich die Bindung von membranständigem Kit Ligand (mKitL) gelöst und dadurch der Anteil von löslichem KitL erhöht. Der lösliche KitL ist auch als Stammzellfaktor (SCF) bekannt (Heissig et al. 2002). Außer einer Ischämie gibt es noch weitere Faktoren, die die Freisetzung von EPC aus dem Knochenmark fördern. Der Granulozyten-Kolonie-stimulierende Faktor (G-CSF), der zum Beispiel bei Patienten mit Leukämie therapeutisch eingesetzt wird, erhöht die Menge von zirkulierenden EPC. Das Erythropoetin (EPO), das bei Anämie eingesetzt wird, erhöht die EPC-Zahl im peripheren Blut (Bahlmann et al. 2004)

Der Mechanismus des EPC-*homings* und der Differenzierung ist in **Schema 3** dargestellt.



**Schema 3:** Mechanismus des EPC-homings und der Differenzierung. Rekrutierung und Einbau von EPC in ischämisches Gewebe erfordert einen koordinierten, mehrstufigen Prozess einschließlich Mobilisierung, Chemotaxis, Adhäsion, Transmigration, Migration, Gewebeeinvasion und *in-situ*-Differenzierung (Urbich und Dimmeler, 2004, S. 349).

## 1.6 ZIELSETZUNG DER ARBEIT

Bisher vorliegende Arbeiten zeigen im Tiermodell einen Einfluss des Adipozytenhormons Leptin nach Hinterlaufischämie. Weitere experimentelle Arbeiten weisen nach, dass vaskuläre Progenitorzellen an der Angiogenese beteiligt sind und die Angiogenese fördern. Um die Wirkung von Leptin und die Herkunft der vaskulären Progenitorzellen bei Ischämie genauer zu betrachten, wurde die Hypothese getestet, dass die von Leptin mobilisierten EPC aus dem Knochenmark stammen.

Im Rahmen dieser Forschung wurde untersucht:

1. ob Leptin die angiogenetischen Eigenschaften von Endothelvorläuferzellen fördert;
2. ob und über welchen Mechanismus Leptin die Mobilisierung von Progenitorzellen aus dem Knochenmark in das zirkulierende Blut fördert;
3. ob die leptininduzierte Progenitorzellmobilisation aus dem Knochenmark und deren Mechanismen für die Angiogenese *in-vivo* nach Hinterlaufischämie von Bedeutung sind

**ad 1.:** Der Einfluss von Leptin auf die Angiogenese wurde in der vorliegenden Arbeit mit *in-vitro*-Zellkulturversuchen untersucht. Murine vaskuläre Progenitorzellen aus fünf Tagen *in-vitro* stimulierten Milzen mit Leptin, G-CSF oder 0,9%-iger Natriumchlorid (NaCl)-Lösung wurden über sieben Tage in speziellen Medien kultiviert. Anschließend wurden sie fluoreszenzmarkiert und analysiert. Des Weiteren wurden spezifische Angiogenese-Assays *in-vitro* durchgeführt. *In-vivo* wurde das Hinterlaufischämie-Modell eingesetzt zur Überprüfung der Hypothese, dass Leptin *in-vivo* die Angiogenese fördert.

**ad 2.:** Der Einfluss von Leptin auf vaskuläre Progenitorzellen aus dem Knochenmark wurde mit *in-vivo*-Versuchen untersucht. Dafür wurde frisches murines Vollblut von Mäusen, die fünf Tage mit Leptin, G-CSF oder 0,9%-iger NaCl-Lösung behandelt worden waren, mit verschiedenen Antikörpern markiert und einer Durchflusszytometrie unterzogen. Zum Nachweis einer mRNA-Regulation im Knochenmark wurden Polymerase-Kettenreaktionen (PCR) durchgeführt.

**ad 3.:** Der Einfluss von Leptin auf die Durchblutung nach einer Ischämie wurde mittels eines *in-vivo*-Mausmodells untersucht. Für diesen Zweck wurde bei den Mäusen eine

Hinterlaufischämie induziert. Die Mäuse wurden drei Tage vor der Operation sowie zwei Tage nach der Verletzung mit Leptin, G-CSF oder einer 0,9%-igen NaCl-Lösung behandelt. Zehn Tage nach der Verletzung wurden die Musculi gastrocnemi der beiden Beine entnommen. Endothelzellen wurden mittels fluoreszenz-markiertem CD31- Antikörper gefärbt und die Anzahl der Zellen pro Muskelfaser analysiert. Zur Überprüfung des Mechanismus und zum Nachweis der Beteiligung von Leptin wurden Wildtypmäuse letal bestrahlt und Knochenmark unterschiedlicher Genmutationen (GFP+; db/db, NOX2 Knockout) transplantiert.

## **2 MATERIAL UND METHODEN**

### **2.1 *IN-VIVO*-VERSUCHE**

#### **2.1.1 VERSUCHSTIERE**

Die vorliegende Studie wurde an verschiedenen Mausstämmen durchgeführt. Es wurden männliche Wildtypmäuse (Stamm C57B6/J) sowie Mäuse des Stammes C57BL/6J-Lep<sup>ob</sup> (ob/ob-Mäuse), Mäuse des Stammes C57BL/6J-m +/+ Lep<sup>ob</sup> (db/db-Mäuse) und GFP-transgene Mäuse für die nachfolgenden Versuche verwendet. Die verschiedenen Mausstämme wurden für unterschiedliche Versuche eingesetzt, da man anhand ihrer spezifischen Eigenschaften – wie zum Beispiel der „grünen Fluoreszenz“ der GFP-positiven Mäuse, die man unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar machen kann – die Mobilisation von endothelialen Progenitorzellen besser beurteilen kann. Zu diesem Zweck wurden Wildtypmäuse mit einer letalen Dosis bestrahlt und danach mit GFP-positiven Knochenmark transplantiert.

#### **2.1.2 GRUPPENEINTEILUNG**

Es wurden insgesamt 200 Mäuse untersucht, die in vier Hauptgruppen gegliedert wurden:

- 1.: Wildtyp mit Behandlung
- 2.: GFP-positive Mäuse mit Behandlung
- 3.: Wildmäuse mit Knochenmarktransplantation von GFP-positiven Mäusen und Behandlung
- 4.: Wildmäuse mit Knochenmarktransplantation von db/db-Mäusen und Behandlung

Jede Hauptgruppe wurde in drei Subgruppen eingeteilt. Eine Untergruppe wurde fünf Tage rekombinantem Mausleptin (0,6 µg Leptin/g Körpergewicht; Firma R&D Systems, Deutschland) intraperitoneal gespritzt. Die Dosis wurde gewichtsadaptiert verabreicht. Dafür wurden die Mäuse täglich gewogen. Als Trägersubstanz für das Leptin diente eine Phosphatpuffersalzlösung ((PBS) pH 7,4; R&D Systems). Um jeder Maus die gleiche Menge Flüssigkeit zu verabreichen, wurde die Leptindosis auf 100 µl Gesamtvolumen mit 0,9% physiologischer NaCl-Lösung aufgefüllt. Eine weitere Subgruppe bekam über den gleichen Zeitraum G-CSF (200 µg/kg Körpergewicht; aMGEn Europe B.V., Niederlande)

intraperitoneal verabreicht, das wie Leptin jeden Tag an das Gewicht angepasst und mit 0,9%iger NaCl-Lösung auf 100 µl aufgefüllt wurde. Die dritte Subgruppe, welche als Kontrolle diente, bekam täglich 100 µl 0,9% NaCl (DeltaSelect GmbH; Pfullingen).

Zum Zweck der *in-vivo*-Versuche wurden Mäuse in der „zentralen tierexperimentellen Einrichtung“ der Universitätsmedizin Göttingen gehalten. In einem 12-stündigen Tag-/Nacht-Rhythmus wurden die drei Monate alten männlichen Mäuse mit freiem Zugang zu Wasser und Nagetierfutter (Ssniff, Soest) in der oben genannten Einrichtung aufbewahrt. Die Mäuse wurden jeden Tag zur gleichen Uhrzeit behandelt. Es wurden Insulinspritzen vom Typ Omnican®40 0,33x12mm (Firma Braun Melsungen AG, Deutschland) verabreicht.

## 2.2 VORBEREITUNG DER DURCHFLUSSZYTOMETRIE

Um die Expression von endothelialen Antigenen und anderen EPC-Oberflächenmarker zu überprüfen, wurde eine Durchflusszytometrie (FACS) angewandt. Dafür wurde der Maus intrakardial Blut abgenommen oder Knochenmark aus dem Femur der Maus gelöst, nachdem die Maus getötet worden war. Das gewonnene Blut wurde im Verhältnis 4:1 mit Citratpuffer versetzt. Zwecks der Durchflußzytometrie Durchflusszytometrie(FACS)-Analyse wurde die Probe in ein spezielles FACS Röhrchen überführt. 100 µl des Blutes wurden jeweils mit 5 µl zweier Antikörper (Ak) versetzt (siehe Antikörperliste). Zur Kontrolle wurde ein Isotyp mit gleicher Konzentration und Fluoreszenzmarkierung (FITC und PE) verwendet. Nach dem Zuführen der Ak wurde das Blut für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 2 ml FACS™ Lysing Solution (BD Bioscience) hinzugefügt und gevortext. Daraufhin wurde das Blut zehn Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit je 3 ml PBS wurden die Zellen bei 1.200 U/min. für fünf Minuten zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen durch ein FACScan™-Cytometer (Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA) gemessen. Zur Analyse wurde die Software Cell Quest (BD Bioscience, Heidelberg) benutzt. Innerhalb jeder Analyse wurden mindestens 10.000 Signale von mononukleären Zellen registriert.

## 2.2.1 LISTE DER ANTIKÖRPER FÜR DURCHFLUSSZYTOMETRIE

Antikörper	Hersteller
c-kit	BD Biosciences, USA
Flk1	eBiosciences, USA
ObR	R&D Systems, USA
Sca-1	BD Biosciences, USA

## 2.3 *IN-VITRO* ZELLKULTUR

### 2.3.1 ISOLIERUNG UND KULTIVIERUNG ENDOTHELIALER PROGENITORZELLEN AUS PERIPHEREM HUMANEM BLUT

Zum Zwecke der Isolation humaner endothelialer Progenitorzellen (EPC) wurden *Buffy Coats* (Schichten von Thrombozyten und Leukozyten, die nach Zentrifugation von antikoaguliertem Vollblut gewonnen werden) verwendet. Sie wurden durch die Abteilung Transfusionsmedizin der Universitätsmedizin Göttingen am selben Tag gewonnen und standen zwei bis vier Stunden später zur Isolation zur Verfügung.

12,5 ml eines *Buffy Coats* wurden zunächst 1:1 mit 12,5 ml vorgewärmtem PBS in einem 50 ml Falconröhrchen (Sarstedt, Nümbrecht) verdünnt. Zur Gewinnung der mononukleären Zellfraktion wurde eine Dichtegradientenzentrifugation mit Ficoll durchgeführt – dazu wurde das verdünnte Blut vorsichtig über 20 ml Ficoll (Histopaque 1077, Sigma; Taufkirchen) geschichtet. Es folgte eine Zentrifugation für 30 Minuten bei 1800 U/min. (Eppendorf, Deutschland), bei der sich ein Dichtegradient zeigte. Während der Zentrifugation wurden 100x20 mm Zellkulturplatten (Sarstedt) oder 6-Well- Platten (Becton Dickinson Labware, Le Pont De Claix, Frankreich) mit 5 oder 2 ml 10 µg/ml Fibronectin (TebuBio) beschichtet, welches zusammen mit PBS auf die Platten gegeben wurde. Die Platten wurden eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die nach der Zentrifugation gewonnene Schicht, die vor allem aus mononukleären Zellen ohne Erythrozyten und Granulozyten bestand, wurde nun sorgsam mit einer sterilen Pasteurpipette in ein Falconröhren mit 10 ml PBS überführt. Anschließend wurden die Zellen durch abermalige Zentrifugation für zehn Minuten bei 1500 U/min. gewaschen. Der nun entstandene Überstand wurde abgesaugt und das verbliebende Zellpellet mit 10 ml Kultivierungsmedium (Zusammensetzung siehe unten) resuspendiert. Durch eine weitere Zentrifugation für zehn Minuten bei 1200 U/min wurden die Zellen erneut

gewaschen. Der Überstand wurde abgesaugt und das verbleibende Zellpellet in einem Kultivierungsmedium – bestehend aus Endothelial Cell Growth Medium (Microvaskular) (PromoCell C-22220; Heidelberg) mit 15% Fetal Bovine Serum (FBS)(Gibco), 5% Fetal Calf Serum (FCS), 0,4% Endothelial Cell Growth supplement/heparin, 10 ng/ml Epidermal Growth Factor (EGF), 1µg/ml Hydrocortison (PromoCellSupplementPack C-39220) und 100 U/ml Penicillin und 100 µl/ml Streptomycin (Gibco-Invitrogen, Paisley, UK) – suspendiert, so dass eine Zellzahl von  $2,5 \times 10^7$  MNC/ml erreicht wurde.

### **2.3.2 ISOLATION UND KULTIVIERUNG ENDOTHELIALER PROGENITORZELLEN**

Da das Gesamtblutvolumen einer Maus mit etwa 6 ml sehr gering ist und endotheliale Progenitorzellen nur selten im peripheren Blut vorkommen, wurden die Mäuse splenektomiert, da die Milz als Speicherorgan von Blut und EPC gilt. Die Zellen wurden gemäß eines etablierten Protokolls (Dimmler et al. 2001; Hesschen et al. 2003; Walter et al. 2005) unter endothelialen Bedingungen kultiviert.

Die Mäuse wurden, wie oben beschrieben, mit Isofluran narkotisiert, und mittels eines Querschnitts unterhalb des Rippenbogens wurde ihnen die Milz entnommen. Um Blutungen zu vermeiden, wurde das Zwerchfell geschont und somit der Brustkorb nicht eröffnet. Danach wurde die Maus mit einem Bruch des Dens axis getötet. Die Milzen wurden auf Eis in 3 ml vorgewärmtem RMPI-Medium (Sigma-Aldrich, Steinheim) mit EDTA gelagert und unmittelbar nach der Entnahme für die Isolation verwendet. Die Milzen wurden in dem bereits vorhandenen RMPI-Medium mit einer sterilen 5 ml-Spritze stumpf zerkleinert, um die Zellen aus dem Milzgewebe zu lösen. Die relativ homogene Zellmasse wurde gefiltert, damit keine größeren bindegewebigen Anteile die weitere Isolation der Zellen beeinflussen. Die Proben wurden in einem 15 ml-Falconröhrchen über Histopaque™ (Sigma-Aldrich, Steinheim) mit einer Dichte von 1,083 g/ml geschichtet und für 30 Minuten bei 1800 U/min zentrifugiert. Die Schicht der mononukleären Zellen, welche die mittlere der drei Schichten darstellte, wurde mit einer sterilen Pasteurpipette abgenommen. Zur weiteren Isolation wurden die Zellen in ein mit 10 ml PBS gefülltes Falconröhrchen überführt. Anschließend erfolgte eine weitere Zentrifugation für zehn Minuten bei 1500 U/min, der Überstand wurde abgenommen und das vorhandene Pellet in 10 ml Kultivierungsmedium (siehe unten) resuspendiert. Als weiterer Waschschrift erfolgte eine Zentrifugation für zehn Minuten bei 1200 U/min. Der Überstand wurde abermals abgesaugt und die Zellzahl in einer Neubauer-



Kammer bestimmt. Jede Probe wurde mit Kultivierungsmedium – bestehend aus Endothelial Cell Growth Medium (Microvaskular) (PromoCell C-22220; Heidelberg) mit 15% Fetal Bovine Serum (FBS) (Gibco), 5% Fetal Calf Serum (FCS), 0,4% Endothelial Cell Growth supplement/Heparin, 10 ng/ml Epidermal Growth Factor (EGF), 1µg/ml Hydrocortison (PromoCellSupplementPack C-39220) und 100 U/ml Penicillin und 100µl/ml Streptomycin (Gibco-Invitrogen, Paisley, UK) – auf eine einheitliche Zellkonzentration verdünnt. Die Zellen wurden auf 24-Well Fibronectin-vorbeschichteten Zellkulturplatten (R&D Systems, Minneapolis, USA) mit einer Zelldichte von  $6 \times 10^8$  Zellen pro Well ausgesät; gelöst in jeweils 500µl Kultivierungsmedium. Nun wurden die Zellkulturplatten in den Zellinkubator (Sanyo-Biomedical) bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> gestellt. Nach vier Tagen im Inkubator wurden nicht-adhärenente Zellen durch zweimaliges Waschen mit 2 ml PBS gelöst, und 500 µl frisches Medium wurde hinzugefügt. Nach sieben Tagen in Kultur wurden die Zellen für die Versuche verwendet.

### **2.3.3 MARKIERUNG VON ENDOTHELIALEN PROGENITORZELLEN UND LÖSEN DER ZELLEN VON DER PLATTE**

Für die Fluoreszenzmarkierung der endothelialen Progenitor-Zellen (EPC) wurden die Zellen mit 2,5 µg/ml Chlormethylbenzamido-Derivaten von DiI (CellTracker™ CM-DiI) oder DiD (für nahinfrarot *In-vivo*-Bilder; beides Invitrogen; Karlsruhe, Deutschland) in 5 ml serum-freiem Medium für fünf Minuten bei 37 °C und anschließend 15 Minuten bei 4 °C inkubiert. Danach wurde die Zellkulturplatte einmal mit PBS gewaschen, und die EPC wurden losgelöst durch Inkubation mit 3 ml 5 mmol/l EDTA/PBS für fünf Minuten bei 37° C. Nun wurden die EPC geerntet in 6 ml vorgewärmtem Medium zur Neutralisation des EDTA. Zur Bestimmung der Anzahl und der Vitalität der Zellen wurden separat 70 µl der Zellsuspension nach einer Färbung mit Trypan-Blau (Biochrom AG, Berlin, Deutschland) herangezogen. Durch eine Zentrifugation bei 1300 U/min für zehn Minuten wurden die Zellen anschließend gewaschen, der Überstand wurde verworfen und das endgültige Volumen des Mediums hinzugefügt, um das Zellpellet zu resuspendieren.

### **2.3.4 KULTIVIERUNG VON HUMANEN ENDOTHELZELLEN AUS DER VENA UMBILICALIS**

Die für die Versuche zur Interaktion der Vorläuferzellen mit maturen, ausdifferenzierten Endothelzellen verwendeten humanen Endothelzellen aus der Vena umbilicalis (HUVEC)

wurden käuflich erworben (PromoCell, Heidelberg). Die Zellkulturplatten (100x20 mm, Sarstedt) wurden mit 5 ml Gelatine (Gibco) für eine Stunde vorbehandelt, danach mit 10 ml Endothelial Cell Growth Medium (PromoCell) aufgefüllt und zusätzlich ergänzt durch 0,4 % Endothelial Cell Growth supplement/Heparin, 2 % FCS, 0,1 ng/ml EGF, 1 µg/ml Hydrocortison und 1 ng/ml basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) (PromoCell SupplementPack C-39210). Die in flüssigem Stickstoff gelagerten HUVEC wurden vorsichtig aufgetaut und sofort in die Zellkulturplatten mit 10 ml vorgewärmtem Medium überführt. Zellen, die im Rahmen der Zellproliferation Konfluenz auf den Zellkulturplatten erreicht hatten, wurden umgehend gesplittet und passagiert. Dazu wurden sie mit 2 ml Trypsin für zwei Minuten von den Zellkulturplatten gelöst, durch Zugabe von 10 ml Medium resuspendiert und für weitere Kultivierung in geringerer Zelldichte wieder ausgesät. Die so kultivierten HUVEC wurden für die in Kapitel 2.6 beschriebenen Versuche verwendet.

## 2.4 ***IN-VITRO*-ANGIOGENESE-VERSUCHE**

### 2.4.1 **MATRIGEL-ANGIOGENESE-ASSAY**

Der *in-vitro*-Matrigel-Angiogenese-Versuch wurde wie bereits von der Arbeitsgruppe um Tepper (Tepper et al. 2002) durchgeführt und zur Charakterisierung der angiogenetischen Eigenschaften von EPC (Heida et al. 2010) modifiziert.

Zur Vorbereitung für die Matrigel<sup>TM</sup> Matrix wurde ECMatrix<sup>TM</sup> vorsichtig im Verhältnis von 1:9 mit 10x ECMatrix<sup>TM</sup> Diluent (beide Komponenten des ECMatrix<sup>TM</sup>-Kit: Chemicon, Temecula, CA, USA) in ein vorgekühltes Eppendorfcup mit vorgekühlten Pipettenspitzen gegeben, um eine Verfestigung der Substanzen zu vermeiden. 50 µl der ECMatrix<sup>TM</sup> wurden in je ein Well einer 96-Wellplatte mit flachem Boden (Nunclon<sup>TM</sup> Surface, NUNC A/S, Roskilde, Dänemark) verteilt. Es wurden je zwei Well pro Probe vorbereitet. Das so präparierte Well wurde nun für eine Stunde bei 37 °C zur Festigung inkubiert. Die EPC wurden markiert, von Zellkulturschalen gelöst und auf eine Konzentration von 3 x 10<sup>4</sup> Zellen/ml verdünnt. HUVEC wurden mittels Trypsin von den Zellkulturschalen gelöst und auf 1,2 x 10<sup>5</sup> Zellen/ml verdünnt. 100 µl dieser EPC- und HUVEC-Suspensionen wurden anschließend auf das mittlerweile fest gewordene EC-Matrix<sup>TM</sup> pipettiert, für eine gleichmäßige Verteilung der Zellen vorsichtig geschwenkt und dann bei 37 °C für acht Stunden inkubiert. Nach den acht Stunden wurden die in das HUVEC-Netzwerk integrierten EPC gezählt, indem man zehn randomisierte Aufnahmen (fünf pro Well) mit dem Fluoreszenzmikroskop

(Zeiss Axiovert 200 und Axio Vision 3.1) fotografierte. Die Netzwerklänge der HUVEC wurde mit dem Programm GraphPad Prism 4.01 (GraphPad Software; La Jolla, CA, USA) gemessen, welches entsprechend dem Objektiv des Mikroskops programmiert wurde. Für jedes Gesichtsfeld wurde ein Quotient aus der Zahl der EPC und der Länge des HUVEC-Netzwerks in mm errechnet. Der Quotient von zehn randomisierten Feldern pro Gruppe wurde gemittelt und, ausgedrückt als Mittelwert  $\pm$  der Standardabweichung aller Versuche, aufgeführt.

#### **2.4.2 SPHÄROID-ANGIOGENESE- ASSAY**

Der *in-vitro*-Sphäroid-Angiogenese-Versuch wurde nach etablierten Protokollen der Arbeitsgruppe Korff (Korff et al. 1998) und Schäfer (Heida et al. 2010) durchgeführt und für die Studien der EPC-Interaktion mit vollentwickelten Endothelzellen in einer 3D-Kollagen-Matrix modifiziert. Hierfür wurden  $8 \times 10^3$  markierte EPC und  $3,2 \times 10^4$  HUVEC in 10 ml Kulturmedium suspendiert und durch eine Zentrifugation für zehn Minuten bei 1300 U/min gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 10 ml vorgewärmtem EPC-Medium mit einer 20%-igen Methylcellulose-Lösung (bestehend aus 6 g Methylcellulose [Sigma], aufgelöst in 500 ml M199 Medium [Gibco]) für 24 Stunden bei 37 °C in einer 96-Wellplatte mit rundem Boden (NUNC) inkubiert, nachdem 100 µl der Lösung zu jedem Well hinzugefügt wurden. Danach wurde 1 ml steriles PBS in die randständigen Wells einer 24-Wellplatte (Becton Dickinson Labware) eingefüllt, wodurch eine „feuchte Kammer“ entstand. Rattenschwanz-Kollagen-Typ I (BD Biosciences, USA) wurde mit 0,1% Essigsäure 1:1 verdünnt und mit 10 x M199 Medium (Sigma) zu 10% des endgültigen Volumens vermischt. Die Methylcellulose Standardlösung wurde mit 5% FCS versetzt, vorsichtig gemischt und dann für drei Minuten bei 1400 U/min zentrifugiert. Vorsichtig wurden nun die Sphäroide aus dem 96-Well mit rundem Boden geerntet, dafür wurden die Pipettenspitzen mit sterilen Rasierklingen um 2 mm gekürzt. Die Sphäroide wurden in einem 15 ml Röhrchen gesammelt und die Suspension für drei Minuten bei 1400 U/min zentrifugiert. Nach der Entfernung des Überstandes wurde das Röhrchen über eine unebene Oberfläche gestrichen, um vorsichtig das Pellet zu lösen. Die Sphäroide wurden mit 1 ml 5%-iger FCS/Methylcellulose-Standardlösung bedeckt. Als Nächstes wurde die vorbereitete Kollagenlösung mit 0.2 N NaOH vermischt, bis die Lösung neutralisiert war, was man an einem Farbumschlag von gelb (sauer) zu pink (neutral) erkennen konnte. Dann wurde 1 ml der gerade neutralisierten Kollagenlösung in jedes Röhrchen pipettiert und vorsichtig gemischt. Die Lösung mit den Sphäroiden wurde in die vorgewärmte,

mit feuchter Kammer ausgestattete 24-Wellplatte gegeben und für 30 Minuten bei 37 °C zum Verfestigen inkubiert.

500 µl serum-freies Medium wurden zu jedem Well hinzugefügt und die Platten bei 37 °C für 24 Stunden weiter inkubiert. Die Aussprossung der HUVEC und die Wanderung der EPC entlang der HUVEC-Sprossen wurden mittels Fluoreszenzmikroskopie dokumentiert, mit Hilfe der Software des Programms GraphPad Prism 4.01 quantifiziert und als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung aller Versuche aufgeführt.

## **2.5 MURINES HINTERLAUFISCHÄMIE-MODELL**

In Zusammenarbeit mit der Abteilung Strahlentherapie und Radioonkologie der Universitätsmedizin Göttingen erhielten drei Monate alte männliche Wildtyp-Mäuse (C57B6/J) eine Ganzkörperbestrahlung mit einer letalen Dosis von 10 Gy (6 MV Photonen, Dosisrate von 2.4 Gy/min.). Die experimentellen Bestrahlungen wurden an einem Varian Clinac 600 C Beschleuniger durchgeführt (Varian, Palo Alto, USA). Die Geräteprüfung und die Dosisberechnung wurden von Physikern der Abteilung Strahlentherapie und Radioonkologie durchgeführt.

24 Stunden nach der Bestrahlung erfolgte eine Knochenmarktransplantation. Zu diesem Zweck wurden sowohl GFP-positive Mäuse als auch db/db-Mäuse verwendet, die, wie zuvor bereits beschrieben, auch in der Zentralen Tierexperimentellen Einrichtung gehalten wurden. Die GFP-positiven Mäuse (oder db/db-Mäuse) wurden mit 500 µl Isofluran (Abbott; Wiesbaden) in einem luftdurchlässigen Gefäß narkotisiert und dann mit einer Fraktur des Dens Axis getötet. Nun wurde das Knochenmark aus dem Femur und der Tibia mit Hilfe von RMPI-Medium mit EDTA herausgespült und sofort auf Eis gelagert. Nach einer Zentrifugation für zehn Minuten bei 1700 U/min. wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit 200 µl RMPI-Medium pro bestrahlter Maus gelöst. Für die intracardiale Injektion der Zellen wurde die Lösung in Insulinspritzen vom Typ Omnican®40 0,33 x 12 mm (Firma Braun Melsungen AG, Deutschland) aufgezogen und in die narkotisierte Maus injiziert. Nun wurden die transplantierten Mäuse vier Wochen lang beobachtet und täglich gewogen, um bei einem signifikanten Gewichtsverlust von mehr als 20% des Ausgangsgewichts aus dem Versuch genommen zu werden.

## **2.5.1 INDUKTION DER ISCHÄMIE IM MAUSHINTERLAUF**

Die Mäuse wurden mit einer intraperitonealen Injektion, bestehend aus einem Viertel 2%-igem Xylazin Hydrochlorid (cp-pharma; Burgdorf), einem Viertel 4%-igem Ketamin Hydrochlorid (Pharmanovo; Hannover) und der Hälfte NaCl, betäubt. Sobald die Narkosetiefe ausreichend war und eine Reaktion auf Schmerzreize ausblieb, wurde die Maus auf einem Wärmekissen in Rückenlage gebracht, die Beine wurden in eine leichte abduzierende Stellung verbracht und so fixiert. Nun wurde die Haut der Maus mit einer 70%-igen Ethanollösung entlang der medialen Seite des rechten Oberschenkels desinfiziert. Der Einschnitt erfolgte direkt unterhalb der Region des Ligamentum inguinale und direkt proximal des Kniegelenks in einem Abstand von 3-4 mm. Die einseitige Hinterlaufischämie wurde anschließend durch eine permanente Abbindung der Arteria femoralis sowie ein Abbinden des distalen Teils der Vena saphena magna mit 6-0 Seidenfaden (Ethicon) induziert. Die entstandenen Wunden wurden mit 6-0 Nylon-Faden (Ethicon) genäht. Die Maus wurde auf eine 37 °C warme Heizplatte gelegt, und die Vitalparameter wurden zur Kontrolle des Narkosestadiums engmaschig überprüft, um eventuellen Narkosekomplikationen vorzubeugen.

## **2.6 CHARAKTERISIERUNG VON ENDOTHELIALEN PROGENITOR-ZELLEN**

### **2.6.1 FLUORESZENZFÄRBUNG**

Zur Charakterisierung des endothelialen Phänotyps wurden die noch in der Kulturschale befindlichen adhärennten Zellen mit 2,5 µg/ml *acetylated low density lipoprotein* (acLDL) aus menschlichem Plasma (Invitrogen/ Molecular Probes; Oregon, USA) für eine Stunde bei 37 °C in serum-freiem Medium inkubiert. Anschließend wurde das Medium entfernt und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Nach der Färbung mit acLDL wurden die Zellen mit 2% Paraformaldehyd/PBS (Sigma-Aldrich; Steinheim) für zehn Minuten in Dunkelheit fixiert, damit die Fluoreszenz erhalten blieb. Es folgten drei weitere Waschschrirte mit PBS nach der Fixierung. Die nun fixierten Zellen wurden zur Zellkernfärbung für zehn Minuten mit 4',6'-Diamidino-2-phenylinhydrochlorid (DAPI, Sigma) mit einer Verdünnung von 1:100 im Dunklen inkubiert.

Danach wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Lectin Ulex Europaeus Agglutinin (UEA)-1 ist ein Glykoprotein, das sich spezifisch an Endothelzellen bindet. Zur Darstellung des Endothelzellcharakters wurden die Zellen nun mit 10 µg/ml Ulex Europaeus agglutinin-I (Lectin) (Vector Laboratories; Burlingame, CA, USA) in einer Verdünnung von 1:100 für eine Stunde inkubiert. Nach zwei Waschschritten wurden die Zellen unter einem Fluoreszenzmikroskop (Zeiss Axiovert 200 und Axio Vision 3.1) bei 200-facher Vergrößerung inspiziert. Die dreifach positiven Zellen, gekennzeichnet durch acLDL-Aufnahme, DAPI-Färbung und Lectin-Bindung, wurden als „early outgrowth EPC“ definiert (Hirschi et al., 2008; Schroeter et al. 2008; Vasa et al. 2001)

## 2.7 *IN-VIVO-FIXATION DES MUSCULUS GASTROCNEMIUS*

Zur histologischen Analyse des Muskelgewebes, wurde der Musculus gastrocnemius *in vivo* durch Perfusion fixiert. Dies wurde gemäß dem Protokoll der Arbeitsgruppen Brazelton und Heida durchgeführt (Brazelton et al. 2005 und Heida et al. 2010). Zu diesem Zweck wurden die Mäuse intraperitoneal anästhesiert, und der Thorax wurde eröffnet. Eine schmale Inzision des rechten Atriums des Herzens wurde gesetzt, damit das Blut sowie die angesetzte Perfusionslösung das Gefäßsystem der Maus verlassen konnten. Eine 20-Gauge-Nadel wurde in den linken Ventrikel eingeführt und mit 10-20 ml eiskaltem PBS infundiert, bis klare Flüssigkeit das rechte Atrium verlassen hatte. Anschließend wurde eiskaltes PBS, welches 1,5% PFA und 0,1% Glutaraldehyd (GA) (beides Sigma) enthielt, mit einer Geschwindigkeit von ungefähr 2,5 ml pro Minute infundiert. Nun wurde vorsichtig der Muskel herausgenommen und in ein 15 ml Tube, das mit 3 ml PBS versetzt mit 1,5% PFA, 0,1%GA und 20% Sucrose gefüllt war, überführt. Das Gewebe wurde nun für fünf Stunden bei 4 °C inkubiert, um die Verdrängung des Wassers im Gewebe zu erlauben.

Die Gefrierschnitte des Musculus gastrocnemius wurden durch Eintauchen des ganzen Muskels zuerst in Tissue-Tek (Sakura Finetek; Zoeterwoude, Niederlande) und dann in eisgekühltes Methylbutan vorbereitet. Der gefrorene Muskel wurde in Tissue-Tek eingebettet und bei -20 °C gelagert. Das Gewebe wurde dann mit Hilfe eines Cryostats (Leica, Jung Frigocut 2800 N) auf eine Dicke von 5µm bei -20 °C geschnitten und auf Objektträgern (Thermo Scientific) platziert. Die Schnitte wurden nun 24 Stunden getrocknet, gefolgt von Eintauchen in 4 °C kaltes Aceton für zehn Minuten. Die luftgetrockneten Schnitte wurden zur Beurteilung der Gefäßdichte nun weiter analysiert.

Nach zehn Tagen Induktion der Hinterlaufischämie wurde die Gefäßdichte des Musculus gastrocnemius überprüft mit Antikörpern gegen CD31 (sc-18916; 1:50 verdünnt; Santa Cruz), gefolgt von Cy3-gelabelten sekundären Antikörpern (Molecular Probes; Eugene, OR). Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt.

Die Gefäßdichte wurde manuell ausgezählt durch Bestimmung der CD31-/DAPI doppelt positiven Zellen pro Muskelfaser bei fünf randomisierten Muskelfasern mit einer 200 facher Vergrößerung. Die Daten wurden erfasst als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung.

Die GFP-/CD31-/DAPI dreifach positiven Zellen wurden pro Gesichtsfeld gezählt und auch als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben.

## **2.8 KNOCHENMARKGEWINNUNG**

Zum Zweck der Durchführung einer Polymerasen-Kettenreaktion und der FACS-Analyse wurde den behandelten Mäusen Knochenmark entnommen. Die Maus wurde mit Isofluran narkotisiert und durch Genickbruch getötet. Zur Gewinnung des Knochenmarks wurde das Femur benutzt. Nach Freilegung und Entfernen aller Muskeln wurde der Knochen mit 2 ml RMPI-Medium mit EDTA durchgespült und so das Knochenmark gewonnen. Das Knochenmark wurde in ein Eppendorfcup gefüllt und sofort auf Eis gelagert.

### **2.8.1 RNA-ISOLATION**

Das frisch entnommene Knochenmark wurde nun mit 1 ml TRI-Reagent (Ambion, Deutschland) versetzt und durch mehrfaches Pipettieren mit einer 1000  $\mu$ l-Pipettenspitze zu einer homogenen Masse verarbeitet. Nach fünf Minuten Inkubation bei Raumtemperatur folgte eine Zentrifugation für zehn Minuten bei 12.000 U/min bei 4 °C. Der Überstand wurde entnommen und in ein neues Eppendorfcup überführt. Nun wurden 100  $\mu$ l Chloroform hinzugefügt, gut gemischt und bei Raumtemperatur 15 Minuten inkubiert. Nach einer Zentrifugation für zehn Minuten bei 12.000 U/min bei 4 °C wurde die flüssige Oberste der drei Schichten in ein neues Eppendorfcup überführt. Daraufhin wurden 500  $\mu$ l Isopropanol hinzugefügt und gut vermischt. Nach einer Zentrifugation für acht Minuten bei 12.000 U/min bei 4 °C wurde der Überstand abgenommen und verworfen. Zu dem Pellet wurde 1 ml 75%-iges Ethanol hinzugegeben. Nun wurde eine Zentrifugation bei 7.500 U/min bei Raumtemperatur für fünf Minuten durchgeführt. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet kurz an der Luft getrocknet. Anschließend wurde das Pellet in 10  $\mu$ l DEPC-Wasser

gelöst. An einem Photometer wurde nun die Extinktion bei 260 nm sowie 280 nm und Ratio 260/280 mit einer Verdünnung 1:50 gemessen. Zur Berechnung der RNA-Konzentration wurde nun die Extinktion mit der Verdünnung und dem Faktor 40 multipliziert.

## 2.8.2 REVERSE TRANSKRIPTION

Zur reversen Transkriptase wurde 1 µg RNA benötigt. Die RNA-Menge, die 1 µg RNA entspricht, wurde mit Hilfe der oben genannten Formel berechnet. Um immer die gleiche Menge von 20 µl an Probe zu haben, wurde das DEPC-Wasser angepasst. Die RNA und das DEPC-Wasser wurden in ein auf Eis stehendes Eppendorfcup gegeben. In einem separaten Eppendorfcup wurde – auch auf Eis – ein Master-Mix erstellt. Dieser Master-Mix bestand bei zwei Proben aus:

Master-Mix	Volumen
Magnesiumchlorid (Promega,USA)	4 µl
5-fach PCR buffer (Promega,USA)	4 µl
dNTP (Promega,USA)	2 µl
Random hexamers (Promega, USA)	0,2 µl
RNase Inhibitor (Promega, USA)	0,625 µl
Reverse Transkriptase (Promega,USA)	0,25 µl
Gesamtvolumen	11,075 µl

Dieser Master-Mix wurde nun gemischt und den Proben zugefügt, so dass die Proben auf ein Gesamtvolumen von 20 µl kamen. Anschließend wurden diese Proben in den Cyclor (Eppendorf, Deutschland) gestellt. Das Programm „RT“: 42 °C für 20 Minuten, 99 °C für fünf Minuten, 5 °C wurde für fünf Minuten gestartet. Die so entstandene cDNA konnte man nun zur Polymerase-Kettenreaktion einsetzen.

## 2.8.3 POLYMERASE-KETTENREAKTION

Für die Polymerase-Kettenreaktion wurden 2,5 µl der zuvor hergestellten cDNA verwendet. Die cDNA wurde auf Eis in ein Eppendorfcup gegeben. In einem separaten Eppendorfcup



wurde auf Eis analog zur RT ein Master-Mix erstellt. Dieser Master-Mix bestand bei einer Probe aus:

Master-Mix	Volumen
Magnesiumchlorid (Promega,USA)	2 $\mu$ l
5-fach PCR buffer (Promega,USA)	10 $\mu$ l
DEPC-Wasser (Promega,USA)	25,25 $\mu$ l
Taq Polymerase (Promega,USA)	0,25 $\mu$ l
Primer je	5 $\mu$ l
Gesamtvolumen	42,5 $\mu$ l

Die Primer wurden je nach Untersuchung gewählt und bestanden aus einem Vorwärts- sowie einem Rückwärtsprimer. Das Gesamtvolumen eines Eppendorfcups mit dem beigefüllten Master-Mix betrug 50  $\mu$ l.

Zur Semiquantifizierung der RT-PCR wurde  $\beta$ -Actin als sogenanntes housekeeping Gen gewählt.

Um zu überprüfen, ob die Schritte der RNA-Isolation bis zur PCR funktioniert haben, wurde zuerst als Primer beta-Actin gewählt. Die PCR-Konditionen waren 95 °C für zwei Minuten, gefolgt von 30–35 Zyklen bei 95 °C, einer Annealing-Temperatur von 60–65 °C (außer für die Leptin-Primer, dort betrug die Annealing-Temperatur 65 °C) und 72 °C für 30 Sekunden. Der Vorgang endete mit fünf Minuten bei 72 °C. Das Produkt wurde auf ein 1,5 %-iges Agarosegel aufgetragen und durch einen Stromgradienten elektrophoretisch gespalten. Zur Quantifizierung unter UV-Licht wurde der ChemiImager 4400, Version 5.1 (Alpha Innotech Corporation) benutzt.

## 2.8.4 LISTE DER PRIMER

Gene	Sequenzen (5'-3')	Größe(Basenpaare)
β-Actin	Sense (5'->3') TGGAAATCCTGTGGCATCCATGAAC Antisense (5'->3') TAAAACGCTCATAACAGTCCG	340
SDF	Sense (5'->3') ATGCCCATGCCATTCTTCG Antisense (5'->3') TGTCTGT*GT*GT*TCAGCC	170
SCF	Sense (5'->3') TCATGGTGCACCGTATCCTA Antisense (5'->3') CCTTGGCATGTTCTTCCACT	200
eNOS	Sense (5'->3') CCT*CCGCTACCAGCCAGA Antisense (5'->3') CAGAGACCTTCACTGCATTGG	105
Alpha 4	Sense (5'->3') GT*GGGAGATTAGACAGAGGA Antisense (5'->3') CAAAGCCAGTAGCAACAA	203
MMP9	Sense (5'->3') AGTTTGGTGTTCGGAGGAC Antisense (5'->3') TACATGAGCGCT*CCGGCAC	753
ObR kurz	Sense (5'->3') ACACTGTTAAT*TCACACACCAGAG Antisense (5'->3') AGTCATTCAAACCAT*TAGTT*TAGG	237
ObR Lang	Sense (5'->3') ACACTGTTAAT*TCACACACCAGAG Antisense (5'->3') TGGATAAACCC*TGCTCTTCA	533
NOX 2	Sense (5'->3') ACTTCT*GGGTCAGCACTGG Antisense (5'->3') ATTCC*GTCCAGTTGTCT*TCG	159

## 2.9 STATISTIK

Die statistischen Unterschiede, die sich in den einzelnen Versuchen ergaben, wurden mit dem unverbundenen Student-t-Test getestet. Wurden mehr als zwei Gruppen miteinander verglichen, folgte auf den ANOVA-Test der Bonferroni's Multiple Comparison Test. Als statistisch signifikant wurden Ergebnisse angesehen, die einen p-Wert kleiner als 0,05 hatten. Bei den Zahlenwerten ist jeweils der Standardfehler angegeben. Die statistische Analyse wurde unter Verwendung des Programms GraphPad Prism 4.01 (GraphPad Software Inc, USA) durchgeführt.

### 3 ERGEBNISSE

#### 3.1 LEPTIN VERBESSERT DIE MOBILISATION DER FLK 1<sup>+</sup> PROGENITORZELLEN AUS DEM KNOCHENMARK

Um die Reaktion des Körpers auf die regelmäßige Gabe der drei verschiedenen Substanzen (0,9 %-ige Natriumchlorid- Lösung, Leptin und Granz) zu untersuchen, wurden die zirkulierenden Endothelzellen bestimmt. Nachdem eine Behandlung der Versuchsmäuse fünf Tage lang systemisch entweder mit Leptin oder 0,9 %-iger NaCl-Lösung erfolgte, wurden zur weiteren Untersuchung das Blut und das Knochenmark gewonnen. Als positive Kontrolle dienten dabei Mäuse, die mit G-CSF behandelt worden waren. In den Blutuntersuchungen konnte bestätigt werden, dass der Serum-Leptinspiegel bei den Mäusen, die mit Leptin behandelt wurden, deutlich erhöht war (im Mittel lag er bei 67 ng/ml) im Vergleich zu den Mäusen, denen Kochsalzlösung (1,3 ng/ml ;  $p < 0,001$ ) oder die G-CSF (1,5 ng/ml ;  $p < 0,001$ ) verabreicht worden war.

Zur weiteren Analyse wurde nun eine Durchflusszytometrie durchgeführt. Bei dieser zeigte sich, dass G-CSF die Zahl der sca1<sup>+</sup>/c-kit<sup>+</sup>-Vorläuferzellen sowohl im Blut ( $p < 0,05$  im Vergleich zur Kontrolle; **Abbildung 1 A**) als auch im Knochenmark ( $p < 0,05$ ; **Abbildung 1 B**) signifikant erhöht. Es zeigte sich eine mäßige, jedoch keine signifikante Veränderung nach einer systemischen Gabe von Leptin.

Abbildung A - Blut:

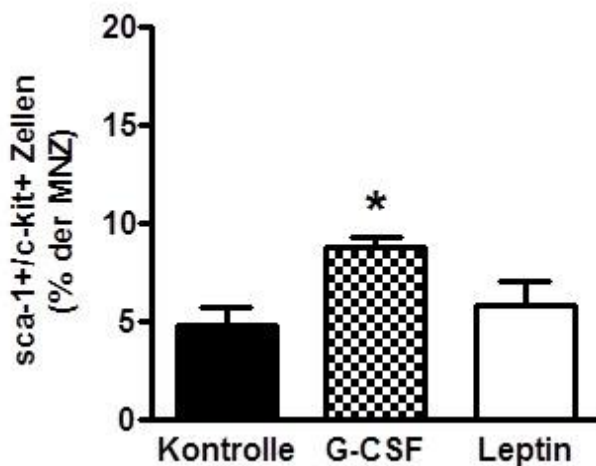
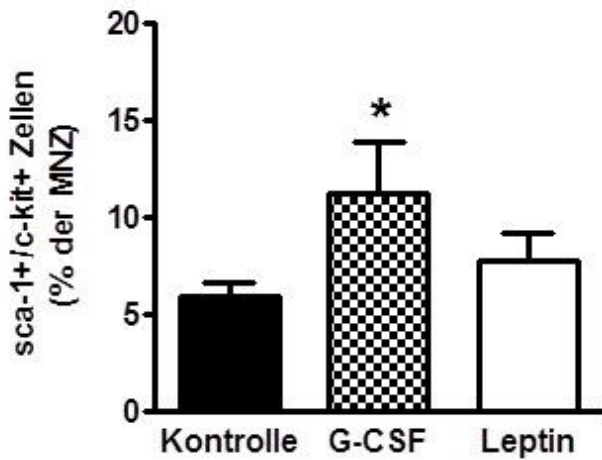


Abbildung B - Knochenmark:



**Abbildung 1.** Der Effekt von Leptin oder G-CSF auf die Anzahl der Vorläuferzellen im peripheren Blut (A) oder im Knochenmark (B) wurde untersucht.

**Abbildung 1 (A).** Quantitative Bestimmung der sca1+/c-kit+-Zellen nach FACS-Analyse im Blut. Es konnte ein signifikanter Anstieg der Zellen nur bei G-CSF (grau), nicht aber bei Leptin (weiß) oder der Kontrolle (schwarz) ( $p < 0,05$ ) festgestellt werden.

**Abbildung 1 (B).** Quantitative Bestimmung der sca1+/c-kit+ Zellen im Knochenmark. Auch hier zeigt sich eine signifikante Erhöhung nur nach systemischer Injektion von G-CSF (grau), nicht aber bei Leptin (weiß) oder der Kontrolle (schwarz) ( $p < 0,005$ ).

Messbar war dabei eine Zunahme der zirkulierenden sca1<sup>+</sup>/flk1<sup>+</sup>-vaskulären Vorläuferzellen in der Durchflusszytometrie nach systemischer Leptin-Gabe für fünf Tage im Vergleich zum Isotyp und der Kontrolle ( $p < 0,005$  **Abbildung 2 A und B**).

Abbildung A:

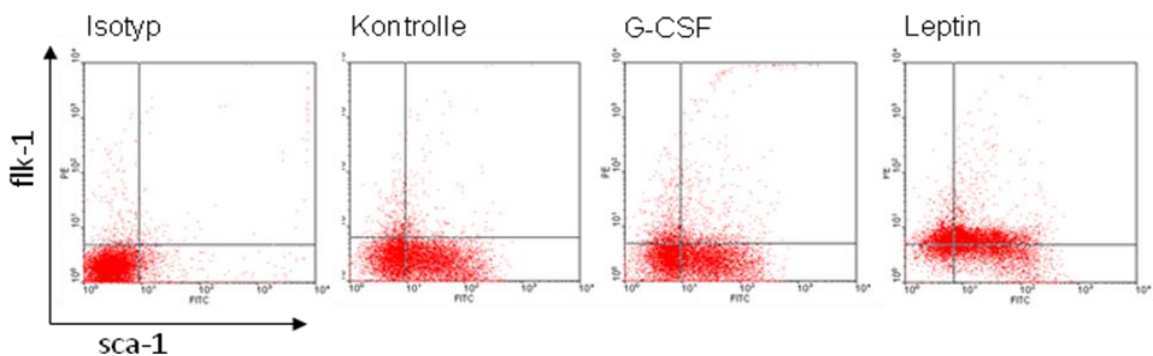
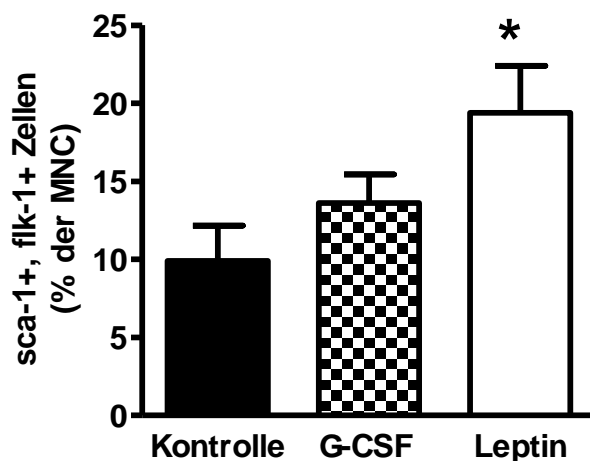


Abbildung B:



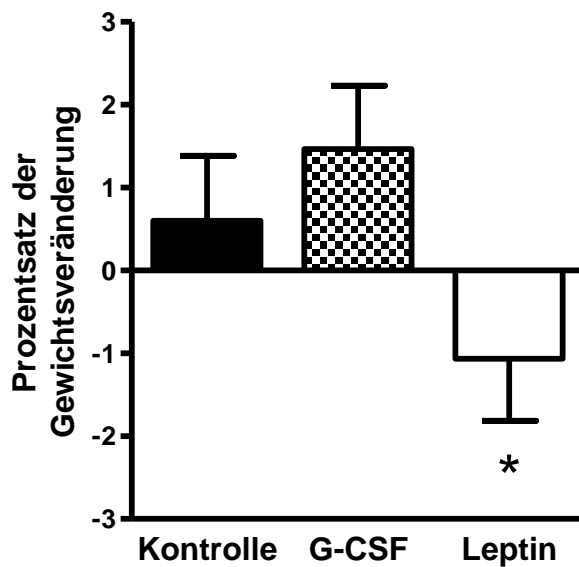
**Abbildung 2 (A).** Ereignisse in der Durchflusszytometrie von peripherem Blut nach systemischer Gabe der Substanzen. Es ist ein signifikanter Anstieg der Ereignisse (rot) nach Leptin-Injektion sichtbar.

**Abbildung 2 (B).** Quantitative Bestimmung der sca1<sup>+</sup>/flk1<sup>+</sup>-Zellen in der Durchflußzytometrie Durchflusszytometrie nach systemischer Gabe von Leptin (weiß), G-CSF (grau) oder Kontrollösung (schwarz) in Prozent pro mononukleären Zellen. Es zeigt sich ein signifikanter Anstieg nach Leptin-Gabe im Vergleich zur Kontrolle und G-CSF ( $p < 0,005$ ).  $n = 14-17$ .

## 3.2 AUSWIRKUNG NACH SYSTEMISCHER INJEKTION

### 3.2.1 GEWICHTSABNAHME

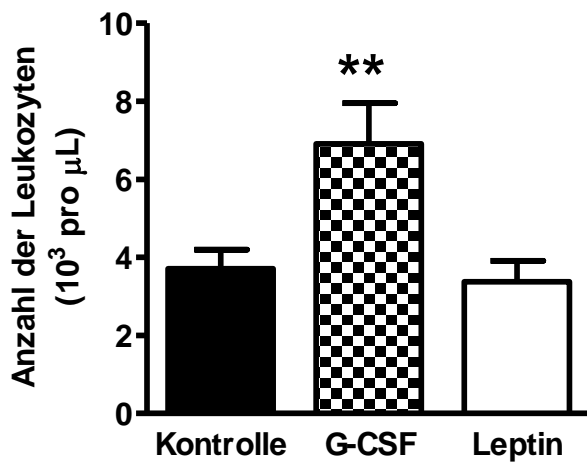
Um zu überprüfen, ob eine Gewichtsabnahme stattfindet, und zur optimalen, gewichtsadaptierten Einstellung von Leptin und G-CSF, wurden die Mäuse über einen Zeitraum von fünf Tagen vor der intraperitonealen Injektion gewogen. Mit dem genauen Gewicht wurde die zu verabreichende Menge an Leptin und G-CSF bestimmt. Die Kontrollgruppe erhielt 0,9-%ige NaCl-Lösung. Nach der Behandlungsdauer von fünf Tagen wurde das Gewicht bestimmt und die Gewichtsveränderung gemessen. Wie die Quantifizierung des Gewichtsverlusts in **Abbildung 3** deutlich macht, konnte kein signifikanter Gewichtsverlust zur Kontrollgruppe bei der Behandlung mit Leptin nachgewiesen werden (Gewichtsverlust: Leptin  $1,068 \pm 0,7473\%$ ,  $n = 30$ ; NaCl:  $0,5995 \pm 0,7843$ ,  $n = 31$ ). Vergleicht man jedoch die Gewichtsveränderung der G-CSF-Gruppe mit der Leptin-Gruppe, ist ein signifikanter Unterschied festzustellen (G-CSF:  $1,466 \pm 0,7649$ ,  $n = 18$ ;  $p = 0,1295$ ).



**Abbildung 3.** Quantifizierung der Gewichtsveränderung nach systemischer Injektion von Leptin (weiß), G-CSF (gepunktet) und 0,9%-iger NaCl-Lösung (Kontrolle; schwarz). Eine Tendenz zum Gewichtsverlust ist sichtbar bei der Gruppe der Mäuse, die mit Leptin behandelt wurden. Ein signifikanter Gewichtsverlust zeigt sich beim Vergleich der mit Leptin beziehungsweise mit G-CSF behandelten Mäusen ( $p=0,01295$ ).

### 3.2.2 LEUKOZYTENANZAHL IM BLUT

Zur Kontrolle, ob eine unspezifische Entwicklung des Körpers durch die injizierten Substanzen entsteht, wurde die Anzahl der Leukozyten im Mausblut im Labor der klinischen Chemie der Universitätsmedizin Göttingen nach fünf Tagen Behandlung bestimmt. Es zeigt sich im Vergleich zur Kontrollgruppe keine signifikante Erhöhung der Leukozyten durch die Injektion von Leptin (Zahl der Leukozyten bei den mit Leptin behandelten Mäusen  $3,4 \pm 0,5$  im Vergleich zu  $3,7 \pm 0,5 \times 10^3$  Zellen/ $\mu\text{l}$  in der Kontrollgruppe). Es ist jedoch zu erkennen, dass G-CSF die Anzahl der Leukozyten deutlich erhöht ( $6,9 \pm 1,0 \times 10^3$  Zellen/ $\mu\text{l}$ ;  $p < 0,01$  im Vergleich zur Kontrolle und  $p < 0,05$  im Vergleich zu Leptin). Die Quantifizierung der Daten zeigt **Abbildung 4**.

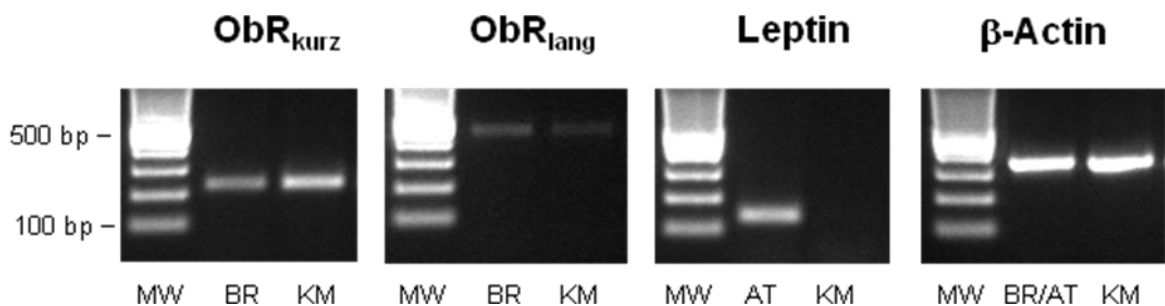


**Abbildung 4.** Quantifizierung der Leukozytenzahl  $10^3$ /Mikroliter. Ein signifikanter Anstieg der Leukozytenzahl nach systemischer Gabe von G-CSF (gepunktet) im Vergleich zur Kontrolle (schwarz) und Leptin (weiß) wird sichtbar (G-CSF:  $p < 0,01$  im Vergleich zur Kontrolle und  $p < 0,05$  im Vergleich zu Leptin).

### 3.3 DER EFFEKT VON LEPTIN AUF DIE MOBILISATION VON ENDOTHELIALEN VORLÄUFERZELLEN

#### 3.3.1 DIE AUSWIRKUNG VON LEPTIN AUF DAS KNOCHENMARK

Um die Expression des Leptinrezeptors im Knochenmark nachzuweisen, wurde eine PCR aus einem Homogenat des Knochenmarks durchgeführt. Dort ließ sich die kurze Form des Leptin-Rezeptors sowie – weniger ausgeprägt – die lange Isoform nachweisen. Leptin selbst konnte nicht detektiert werden (**Abbildung 5**).



**Abbildung 5.** Die mRNA-Expression der kurzen (ObR<sub>kurz</sub>), der langen (ObR<sub>lang</sub>) ObR-Isoform oder Leptin in Knochenmarkszellen. Totale RNA aus dem Gehirn (*brain* = BR) oder Fettgewebe (*adipose tissue* = AT) wurde

parallel als positive Kontrolle für die ObR- oder Leptin-Expression analysiert. Als interner Standard wurde  $\beta$ -Actin-PCR durchgeführt.

Zur Quantifizierung der ObR-positiven Zellen im Knochenmark wurde eine Durchflusszytometrie durchgeführt. Diese Analyse zeigte, dass  $20 \pm 2,5\%$  der Zellen des Knochenmarks ObR-positiv sind. Bei diesen Zellen konnte durch spezifische Antikörper nachgewiesen werden, dass sie zu  $80 \pm 7,8\%$  c-kit, zu  $67 \pm 2,7\%$  flk und zu  $43 \pm 3,7\%$  sca1 exprimieren (**Abbildung 6**).

Abbildung A:

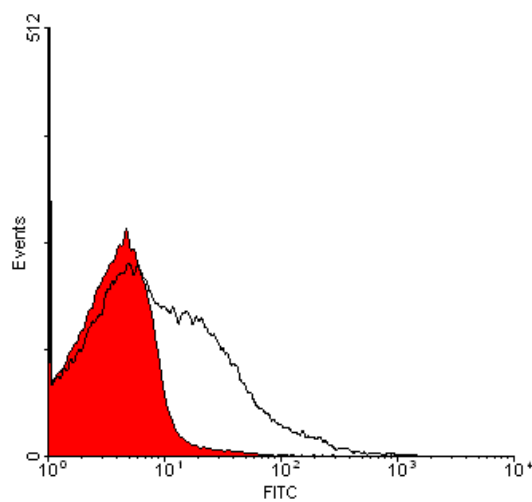
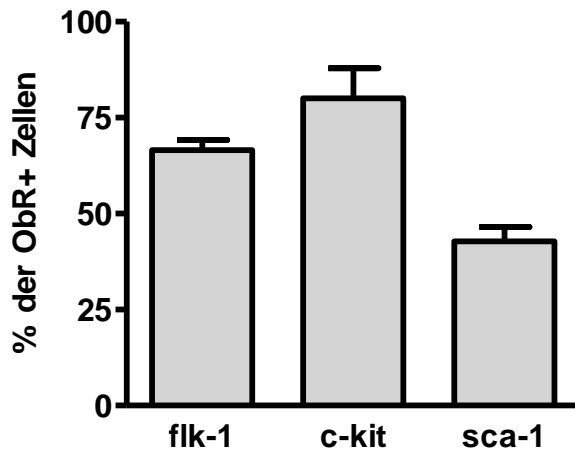




Abbildung B:



**Abbildung 6 (A).** Ereignisse der Durchflusszytometrie mit dem Nachweis der Expression von ObR-positiven Zellen aus dem Knochenmark ( $20 \pm 2,5\%$ ).

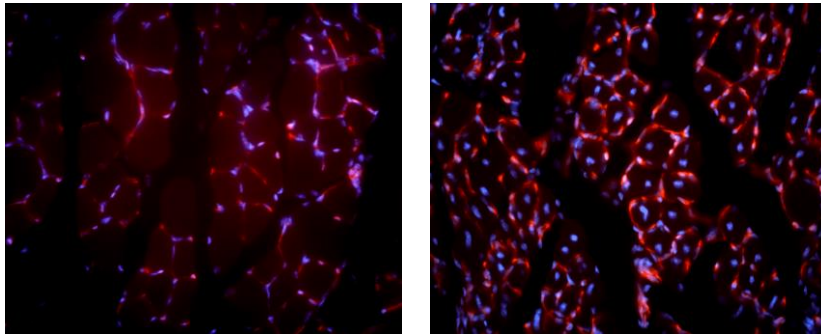
**Abbildung 6 (B).** Quantitative Bestimmung der ObR-positiven Zellen aus dem Knochenmark nach Zugabe von spezifischen Antikörpern ( $67 \pm 2,7\%$  flk-1,  $80 \pm 7,8\%$  c-kit und  $43 \pm 3,7\%$  sca-1)

### 3.4 DIE KAPAZITÄT VON ENDOTHELIALEN PROGENITORZELLEN IM *IN-VIVO*-MAUSMODELL DER HINTERLAUFISCHÄMIE

#### 3.4.1 KAPILLARDICHTE IM MUSCULUS GASTROCNEMIUS NACH INJEKTION VON LEPTIN

Zur Überprüfung der Kapillardichte im Musculus gastrocnemius wurden der Muskel entnommen und das Gewebe nach fünf Tagen systemischer Gabe von Leptin oder 0,9%-iger NaCl-Lösung auf die Kapillardichte untersucht. Es wurde die Kapillardichte im ischämischen Muskelgewebe von Mäusen, welchen zur Kontrolle 0,9%iges NaCl injiziert worden war, und Mäusen, die Leptin erhalten hatten, bestimmt. Die quantitative Bewertung erfolgte über CD31/DAPI-doppelt-immunpositive, kapilläre Endothelzellen pro Muskelfaser (CD31/DAPI-doppelt-positive Zellen pro Muskelfaser:  $2,32 \pm 0,47$  vs.  $5,35 \pm 0,536$ ;  $p < 0,01$ ;  $n = 10$ ). Somit zeigt sich eine signifikante Erhöhung der Kapillardichte in mit Leptin behandelten Mäusen. Repräsentative histologische Bilder zeigt **Abbildung 7 A**; die quantitative Zusammenfassung der Daten ist in **Abbildung 7 B** zu sehen.

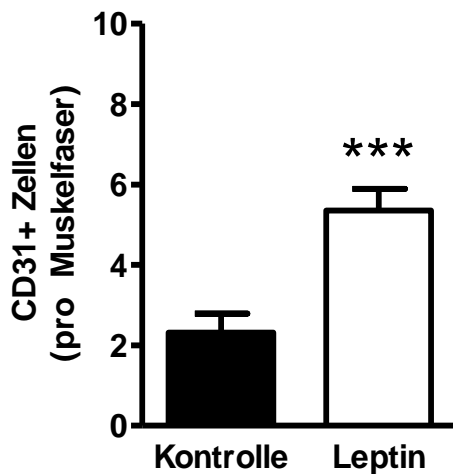
Abbildung A:



Kontrolle

Leptin

Abbildung B:



**Abbildung 7 (A).** Das Muskelgewebe des Musculus gastrocnemius zeigt eine höhere Dichte an CD31 (rot)/DAPI (blau) doppelt-immunpositiven Kapillaren in Mäusen, die fünf Tage lang systemisch mit Leptin behandelt worden sind, im Vergleich zu Mäusen, die fünf Tage lang mit 0,9%-iger NaCl-Lösung behandelt worden sind ( $p < 0,001$ ). Die CD31+ Zellen pro Muskelfaser wurden in 9-10 Mäusen pro Gruppe manuell gezählt. Repräsentative Fotos sind abgebildet.

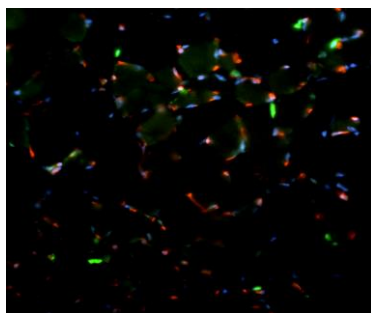
**Abbildung 7 (B).** Die Quantifizierung der CD31-positiven Zellen pro Muskelfaser wird dargestellt. Die Zahl der Zellen hat sich signifikant erhöht ( $p < 0,001$  im Vergleich zur Kontrolle).

### 3.4.2 NACHWEIS VON GFP-POSITIVEN ZELLEN NACH KNOCHENMARKSTRANSPLANTATION IM MUSCULUS GASTROCNEMIUS

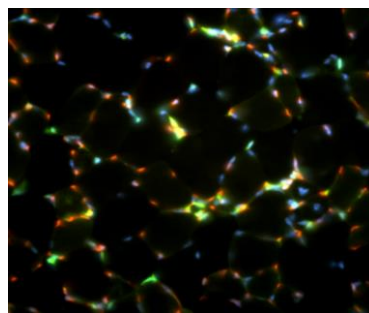
Nach einer letalen Bestrahlung wurde GFP-positives Knochenmark in Wildtypmäuse transplantiert. Nach vier Wochen wurde den Mäusen eine Hinterlaufischämie provoziert. In der Woche der Hinterlaufischämie wurden sie gewichtsadaptiert mit 0,6  $\mu\text{g}$  Leptin oder 0,9%-iger NaCl-Lösung behandelt. Das nach zehn Tagen entnommene Gewebe des Musculus

gastrocnemius wurde auf GFP/CD31/DAPI dreifach immunpositive Zellen pro Muskelfaser analysiert. Im Vergleich der Zellen pro Muskelfaser nach Hinterlaufischämie zwischen Kontrolle und Leptin zeigt sich ein signifikanter Unterschied zu Gunsten des Leptins (GFP/CD31/DAPI dreifach positive Zellen pro Muskelfaser:  $2,83 \pm 0,435$  vs.  $4,98 \pm 0,62$   $p = 0,0084$ ;  $n = 32$ ). Repräsentative histologische Bilder zeigt **Abbildung 8 A**; die quantitative Zusammenfassung der Daten findet sich in **Abbildung 8 B**.

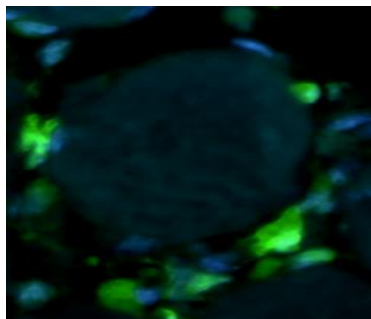
Abbildung A:



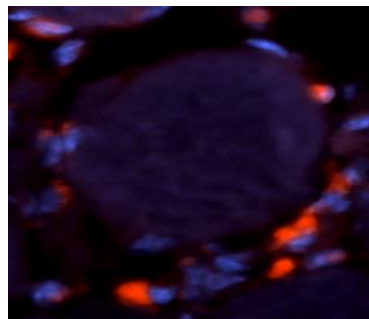
Kontrolle



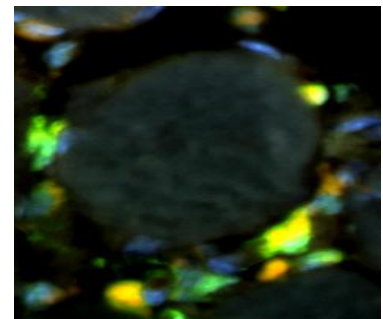
Leptin



GFP

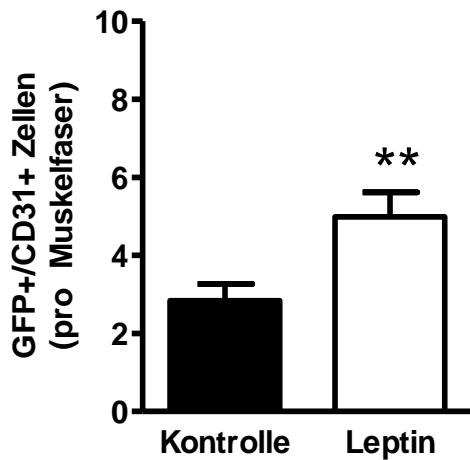


CD31



GFP+ CD31

Abbildung B:

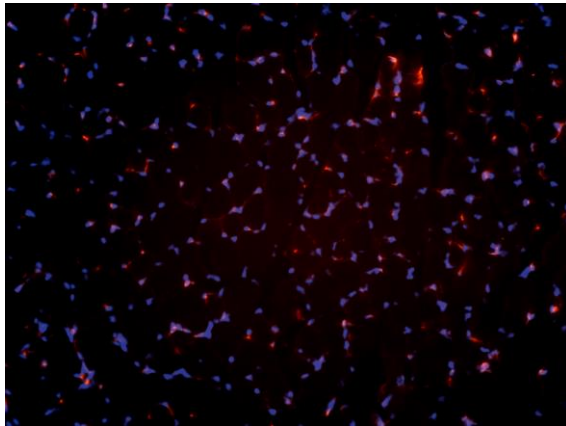


**Abbildung 8 (A).** Repräsentative Bilder des Gewebes des Musculus gastrocnemius nach GFP-positiver Knochenmarktransplantation und Hinterlaufischämie. Deutliche erkennbare Steigerung der GFP/CD31/DAPI-positiven Zellen nach der systemischen Gabe von Leptin.

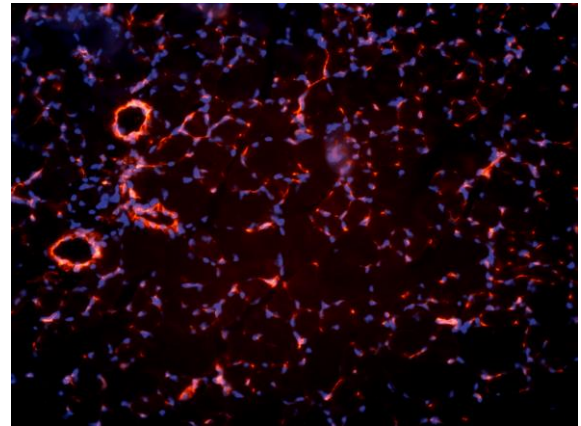
**Abbildung 8 (B).** Quantitative Darstellung der GFP+/CD31+ Zellen nach Knochenmarktransplantation. Es ist ein signifikanter Anstieg der doppelt positiven Zellen unter der Gabe von Leptin (weiß) im Vergleich zur Kontrolle (schwarz) nachweisbar. Es wurden pro Gruppe 6 Mäuse analysiert ( $p < 0,001$ ).

Im Modell der Hinterlaufischämie bei der Maus zeigten sich nach Knochenmarktransplantation folgende Befunde: Ein signifikanter Anstieg der CD31-positiven Zellen pro Muskelfaser sowie der Gefäßneubildung nach systemischer Gabe von Leptin über einen Zeitraum von fünf Tagen und einer Ischämie-Induktion nach drei Tagen. Im Vergleich dazu konnte bei einer Transplantation von db/db-Knochenmark weder eine Zunahme der CD31-positiven Zellen noch eine vermehrte Neovaskularisierung nachgewiesen werden. Es wurde sogar eine Verminderung der CD31-positiven Zellen festgestellt (**Abbildung 9**).

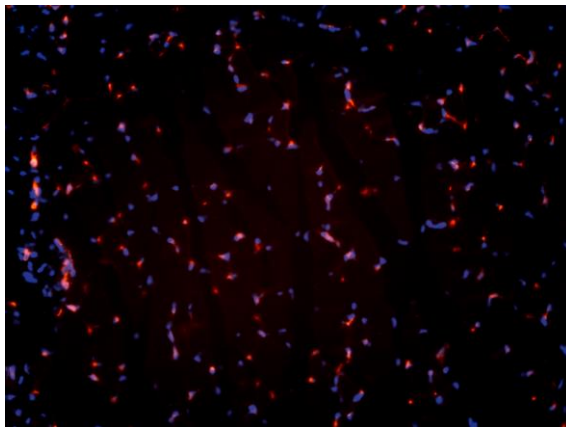
Abbildung A:



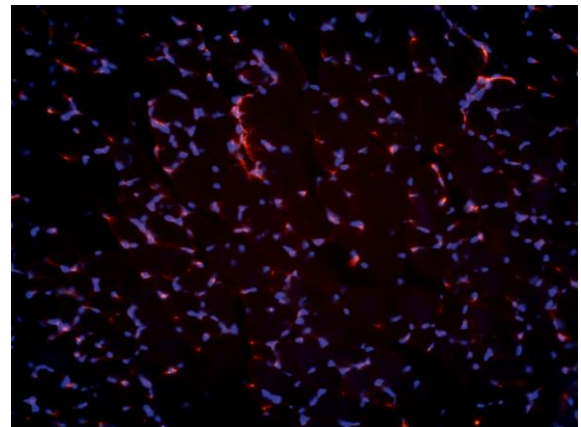
WT<sub>KM</sub> → WT | Kontrolle



WT<sub>KM</sub> → WT | Leptin

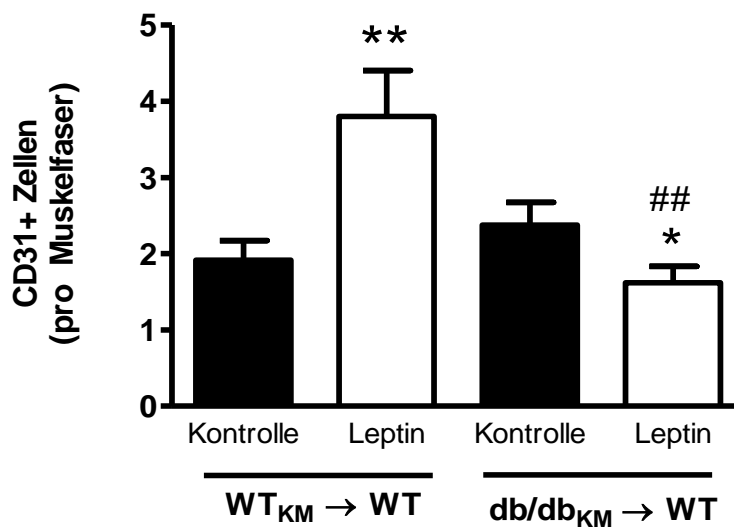


db/db<sub>KM</sub> → WT | Kontrolle



db/db<sub>KM</sub> → WT | Leptin

Abbildung B:



**Abbildung 9 (A).** Im Modell der Hinterlaufischämie im Mausbein zeigt sich nach Knochenmarktransplantation mit Wildtypknochenmark und systemischer Leptingabe eine Leptin-geförderte Angiogenese (Vermehrung der CD31-positiven Zellen (rote Fluoreszenz) im Vergleich zur Kontrollgruppe. Hingegen ist bei einer Hinterlaufischämie und Transplantation von db/db-Knochenmark im Vergleich zur Kontrolle kein Effekt von Leptin zu erkennen.

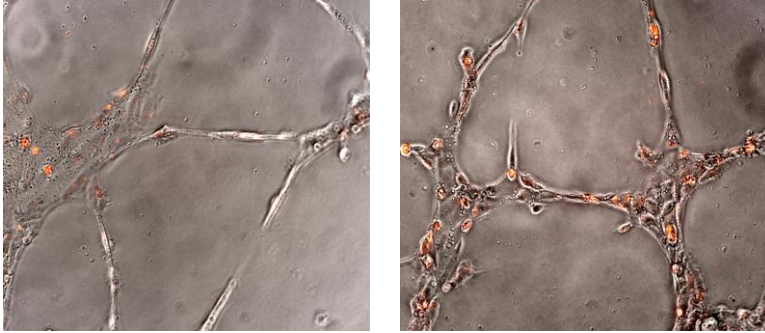
**Abbildung 9 (B).** Quantifizierung der CD31-positiven Zellen pro Muskelfaser. Bei einer systemischen Injektion von Leptin (weiß) und Transplantation von Wildtypknochenmark ist eine signifikante Erhöhung im Vergleich zur Kontrolle (schwarz) erkennbar. Im Gegensatz dazu zeigt sich nach Knochenmarktransplantation von db/db-Knochenmark und systemischer Leptingabe sogar eine Verminderung der CD31-positiven Zellen im Vergleich zur Kontrolle (\*  $p < 0,05$  und \*\*  $p < 0,01$  im Vergleich zur Kontrolle; ##  $p < 0,01$  im Vergleich zur Leptin-Behandlung)  $n = 8-12$ .

## 3.5 LEPTIN FÖRDERT DAS ANGIOGENETISCHE VERHALTEN VON ENDOTHELIALEN PROGENITORZELLEN *IN-VITRO*

### 3.5.1 ERGEBNISSE DES MATRIGEL-ANGIOGENESE-ASSAY

Die Interaktion von zirkulierenden EPC mit ausgereiften Endothelzellen ist Voraussetzung für vaskuloregenerative und angiogenetische Prozesse. Aus diesem Grund wurde die Fähigkeit von EPC getestet, sich in ein endotheliales Netzwerk – bestehend aus HUVEC – zu integrieren. Die EPC stammten aus Mausmilzen, nachdem die Mäuse fünf Tage lang entweder mit Leptin oder 0,9%-iger NaCl-Lösung behandelt worden waren. Zur Kennzeichnung der EPC wurden diese mit DiI, einer roten Fluoreszenz, markiert. Die EPC wurden mit HUVEC im Verhältnis 1:4 resuspendiert und auf einer dünnen Schicht aus Matrigel inkubiert. Nach acht Stunden konnte man erkennen, dass die HUVEC ein Netzwerk geformt hatten, in dem die EPC adhären und integriert waren. **Abbildung 10 A** zeigt die Kontrolle im Vergleich zu den mit Leptin behandelten EPC. Es ist erkennbar, dass mehr EPC im Netzwerk adhären und integriert sind. Die Zusammenfassung der quantitativen Ergebnisse wird in **Abbildung 10 B** dargestellt. Es lässt sich eine signifikante Zunahme der integrierten Zellen nachweisen ( $P < 0,001$ ).

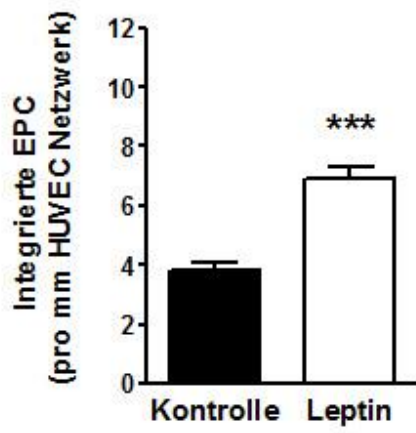
Abbildung A:

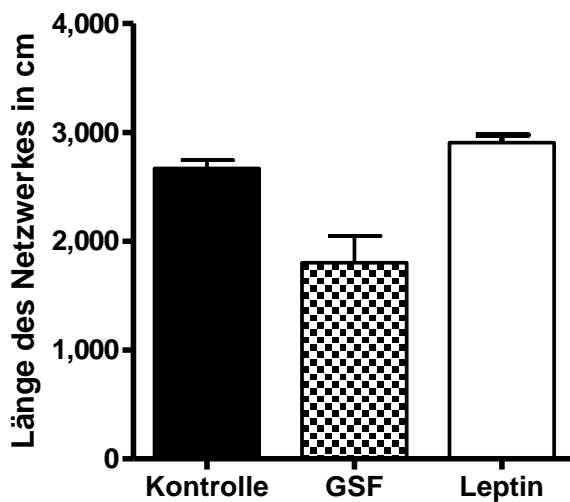


Kontrolle

Leptin

Abbildung B:





**Abbildung 10 (A).** Nach *In-vitro*-Kultivierung und vorheriger systemischer Injektion von Leptin zeigt sich eine vermehrte Adhärenz der EPC (rotes Signal) zum endothelialen Netzwerk, gebildet durch HUVEC (durchsichtig), im Vergleich zur Kontrolle (200x Vergrößerung).

**Abbildung 10 (B).** Quantifizierung der im HUVEC-Netzwerk integrierten EPC ( $p < 0,001$ ). Die Kontrolle (schwarz), Leptin (weiß) und G-CSF (grau) sind abgebildet.  $n = 9$  Mäuse pro Gruppe aus drei verschiedenen Experimenten.

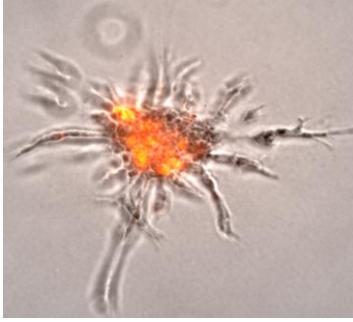
**Abbildung 10 (C).** Die Untersuchung der Netzwerklänge in Zentimeter zeigt keine signifikante Zunahme unter dem Einfluss von Leptin (weiß) im Vergleich zur Kontrolle (schwarz). Ein signifikanter Anstieg der Netzwerklänge konnte nach der Gabe von Leptin (weiß) im Vergleich zu G-CSF (gepunktet) nachgewiesen werden.

### 3.5.2 ERGEBNISSE DES SPHÄROID-ANGIOGENESE-ASSAY

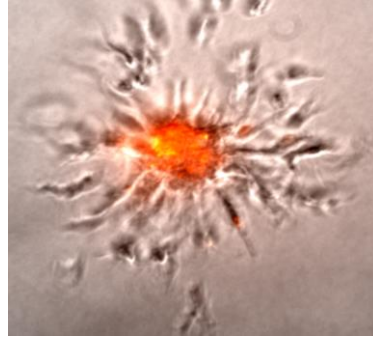
Zur weiteren Untersuchung des Effektes von Leptin auf das angiogenetische Verhalten von EPC und das Potenzial der EPC zur Interaktion mit reifen Endothelzellen, wurde ein dreidimensionaler Sphäroid-Angiogenese-Assay verwendet. Die Sphäroide, bestehend aus EPC und HUVEC im Verhältnis 1:4, wurden in eine kollagene Matrix integriert. Ausgewertet wurden nach 24 Stunden Inkubation: a) Aussprossungsaktivität der Endothelzellen und b) Migration der EPC an der neu geformten HUVEC-Aussprossung. Die EPC, bei denen die Maus systemisch mit Leptin behandelt worden war, zeigen eine signifikant vermehrte Aussprossung ( $p < 0,001$ ) ebenso wie die Auswanderung der EPC entlang der neu geformten HUVEC-Sprosse, wie in **Abbildung 11 A** sichtbar. Die Quantifizierung der Daten findet sich in **Abbildung 11 B**.



Abbildung A:



Kontrolle



Leptin

Abbildung B:

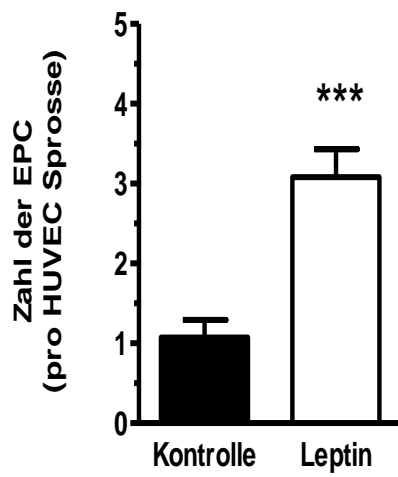
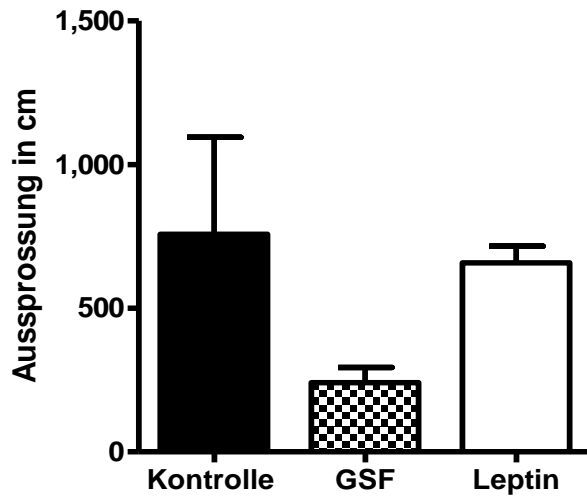


Abbildung C:



**Abbildung 11 (A).** Nach Kultivierung und systemischer Injektion von Leptin zeigt sich ein vermehrtes Aussprossen der aus HUVEC bestehenden Sphäroide (durchsichtig) sowie eine vermehrte EPC-Wanderung (rotes Signal) im Vergleich zur Kontrolle (200x Vergrößerung).

**Abbildung 11 (B).** Die Quantifizierung der EPC, die sich im HUVEC-Netzwerk bewegt haben, zeigt eine signifikante Erhöhung der Leptin-stimulierten Zellen (weiß) im Vergleich zur Kontrolle (schwarz) ( $p < 0,001$ );  $n = 6$  Mäuse pro Gruppe aus zwei verschiedenen Experimenten.

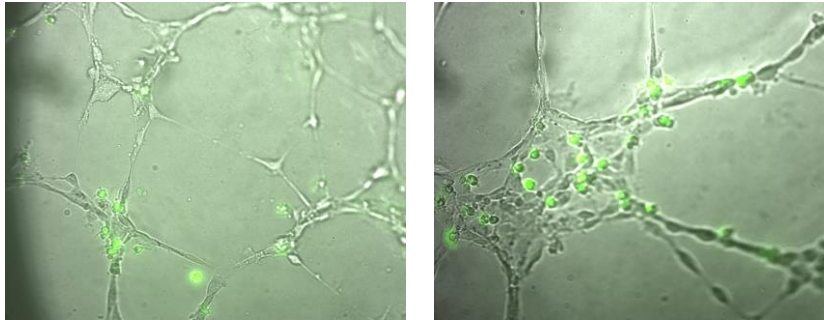
**Abbildung 11 (C).** Bei der Aussprossung des HUVEC-Netzwerks konnte kein signifikanter Unterschied, abhängig von den injizierten Substanzen, nachgewiesen werden. Es ist zu erkennen, dass die Aussprossung bei GSF-behandelten Zellen vermindert ist im Vergleich zur Kontrolle und zu Leptin. Die Aussprossung von Leptin-behandelten Zellen und den Kontrollzellen ist fast identisch.

### 3.5.3 DER EFFEKT VON LEPTIN AUF ENDOTHELIALE PROGENITORZELLEN NACH KNOCHENMARKTRANSPLANTATION IM MATRIGEL-ANGIOGENESE-ASSAY

Um herauszufinden, ob der Effekt von Leptin auf die EPC im Matrigel-Assay nur durch zirkulierende EPC oder auch durch EPC aus dem Knochenmark hervorgerufen wird, wurden Wildtypmäuse bestrahlt und mit GFP-positivem Knochenmark transplantiert. Vier Wochen nach der Transplantation wurden die Mäuse fünf Tage lang mit Leptin oder der Kontrolllösung behandelt. Anschließend wurde mit den gewonnenen Milzzellen ein Matrigel-Assay durchgeführt. Wie in **Abbildung 12 A** zu sehen, zeigt die systemische Injektion von Leptin einen deutlichen Effekt auf die Integration der EPC im Vergleich zur Kontrolle. Es

sind vermehrt GFP-positive EPC im HUVEC-Netzwerk erkennbar. Die Quantifizierung der Daten ist in **Abbildung 12 B** zusammengefasst ( $p < 0,001$ ).

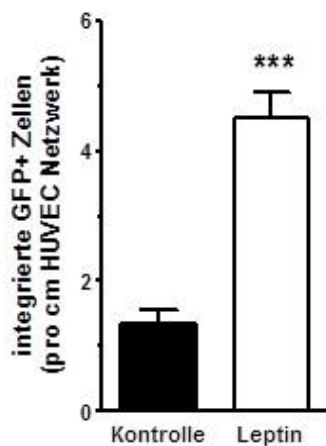
Abbildung A:



Kontrolle

Leptin

Abbildung B:



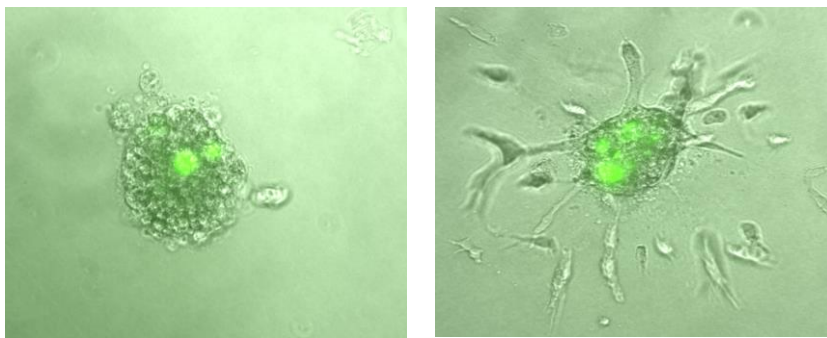
**Abbildung 12 (A).** Nach Kultivierung und vorheriger systemischer Injektion von Leptin zeigt sich eine vermehrte Integration GFP-positiver Zellen (grünes Signal) in das aus HUVEC bestehende Netzwerk (weiß). Die Vergrößerung wurde mit 200x gewählt. Es werden repräsentative Bilder gezeigt.

**Abbildung 12 (B).** Quantifizierung der ins HUVEC-Netzwerk integrierten Zellen. Sichtbar ist eine deutliche Signifikanz der Zellen, die systemisch mit Leptin (weiß) behandelt worden sind, im Vergleich zur Kontrollgruppe (schwarz) ( $p < 0,001$ ).

### 3.5.4 DER EFFEKT VON LEPTIN AUF ENDOTHELIALE PROGENITORZELLEN NACH KNOCHENMARKSTRANSPLANTATION IM SPHÄROID-ANGIOGENESE-ASSAY

Um die Herkunft der zirkulierenden EPC nach systemischer Gabe von Leptin oder 0,9%-iger NaCl-Lösung festzustellen, wurden nun Wildtypmäuse bestrahlt und mit GFP-positivem Knochenmark transplantiert. Nach einer Inkubation von vier Wochen wurden die Mäuse fünf Tage lang mit intraperitonealen Injektionen von Leptin oder 0,9%-iger NaCl-Lösung behandelt. Nun wurde, wie zuvor erwähnt, ein Sphäroid-Angiogenese-Assay durchgeführt. In **Abbildung 13 A** ist eine deutlich vermehrte Aussprossung der Sphäroide sowie eine vermehrte Integration von EPC zu erkennen. Die Quantifizierung verdeutlicht **Abbildung 13 B** ( $p < 0,01$ ).

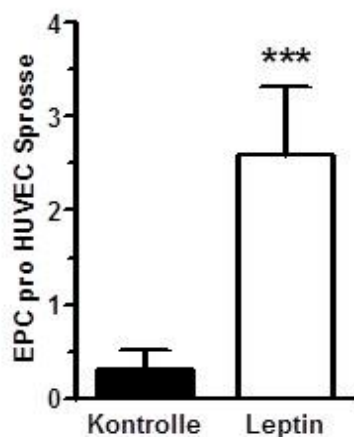
Abbildung A:



Kontrolle

Leptin

Abbildung B:



**Abbildung 13 (A).** Nach Kultivierung und vorheriger systemischer Injektion von Leptin zeigt sich eine vermehrte Aussprossung der HUVEC-Sphäroide (durchsichtig) mit Integration von GFP-positiven EPC (grünes Signal). Die repräsentativen Bilder sind in 200-facher Vergrößerung dargestellt.

**Abbildung 13 (B).** Quantifizierung der in den HUVEC-Sphäroide integrierten GFP-positiven EPC. Es zeigt sich eine signifikante Erhöhung der EPC-Zahl nach systemischer Gabe von Leptin (weiß) im Vergleich zur Kontrollgruppe (schwarz) ( $p < 0,01$ ).

### 3.5.5 DIE WIRKUNG VON LEPTIN NACH KNOCHENMARK-TRANSPLANTATION

Um zu überprüfen, ob die vermehrte Zellzahl aus dem Knochenmark stammt, wurden Wildtypmäuse subletal bestrahlt und erhielten Knochenmark von GFP<sup>+</sup>-Mäusen. Nach einer Verweildauer von vier Wochen wurden die Mäuse, je nach Gruppeneinteilung, mit einer intraperitonealen Injektion von Leptin oder 0,9%-iger NaCl-Lösung systemisch behandelt. Für eine Durchflusszytometrie wurde nun das Knochenmark gewonnen. In **Abbildung 14 A** lässt sich erkennen, dass die Zellen aus dem Knochenmark stammen, da sie vermehrt GFP-positiv sind. In **Abbildung 14 B** wurden die Ereignisse der Durchflusszytometrie quantitativ bestimmt. Es zeigt sich ein signifikanter Anstieg nach Leptin-Injektion im Vergleich zur Kontrolle ( $p < 0,01$ ).

Abbildung A:

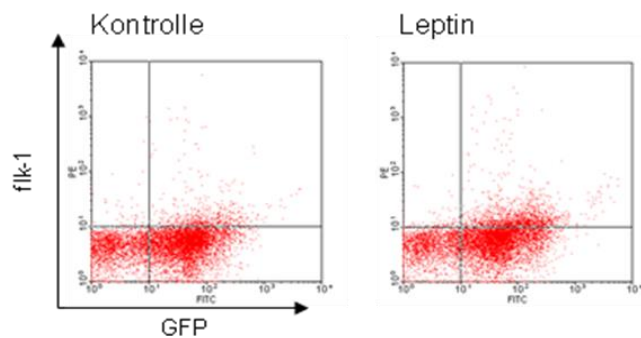
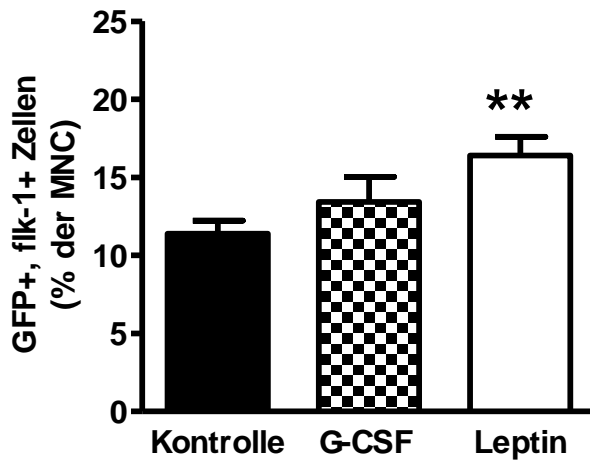


Abbildung B:



**Abbildung 14 (A):** Ereignisse der FACS-Analyse des Knochenmarks nach fünftägiger systemischer Injektion. Es zeigen sich vermehrte GFP<sup>+</sup>/flk1<sup>+</sup>-Zellen im Vergleich zur Kontrolle.

**Abbildung 14 (B):** Quantitative Auswertung der GFP<sup>+</sup> und flk-1<sup>+</sup> Zellen pro mononuklearer Zellen in der Durchflusszytometrie. Es ist ein signifikanter Anstieg nach Leptin-Behandlung (weiß) im Vergleich zur Kontrolle (schwarz) und G-CSF (grau) sichtbar ( $p < 0,01$ ).

### 3.5.6 DER EFFEKT VON LEPTIN NACH KNOCHENMARK-TRANSPLANTATION

Wildtypmäuse wurden einer letalen Bestrahlung unterzogen und am Tag danach entweder mit Wildtypknochenmark oder mit Knochenmark von db/db-Mäusen transplantiert. Nach einer Inkubationszeit von vier Wochen wurden die Mäuse systemisch mit Leptin oder 0,9%-iger NaCl-Lösung behandelt. Um zu überprüfen, ob Leptin die Zirkulation von flk-1-positiven Zellen auch in db/db-Mäusen stimuliert, wurde Blut mit Hilfe der Durchflusszytometrie analysiert. Wie **Abbildung 15** zeigt, ist die Anzahl der zirkulierenden flk-1-positiven Zellen nach Knochenmarktransplantation mit db/db-Knochenmark nicht erhöht ( $p =$  nicht signifikant im Vergleich zur Kontrolle); nach Transplantation mit Wildtypknochenmark hingegen steigt die Anzahl an zirkulierenden Zellen signifikant ( $p < 0,05$  im Vergleich zur Kontrolle).

Abbildung A:

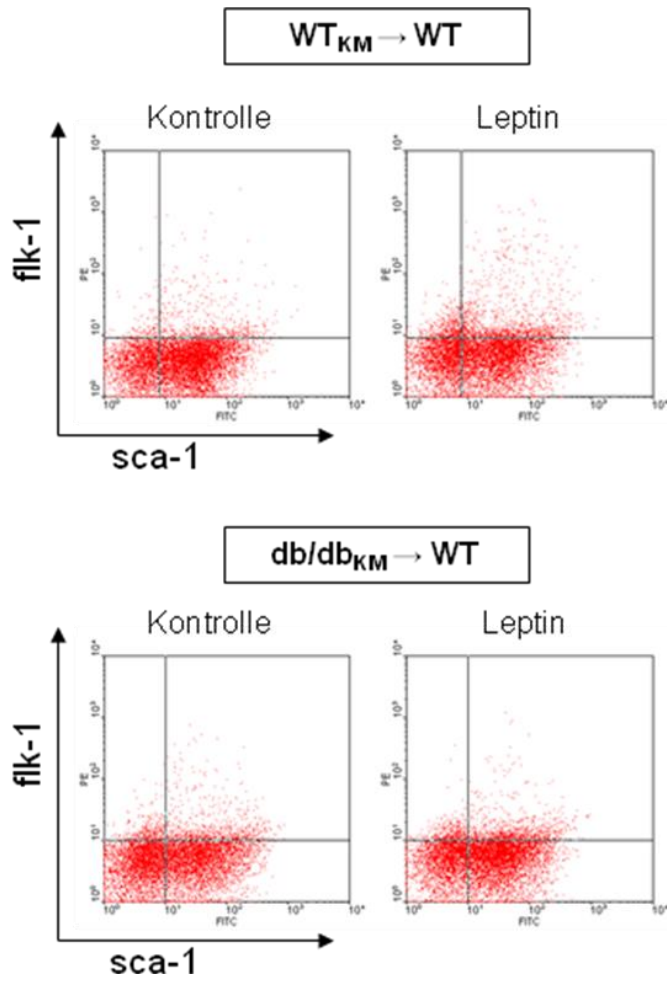
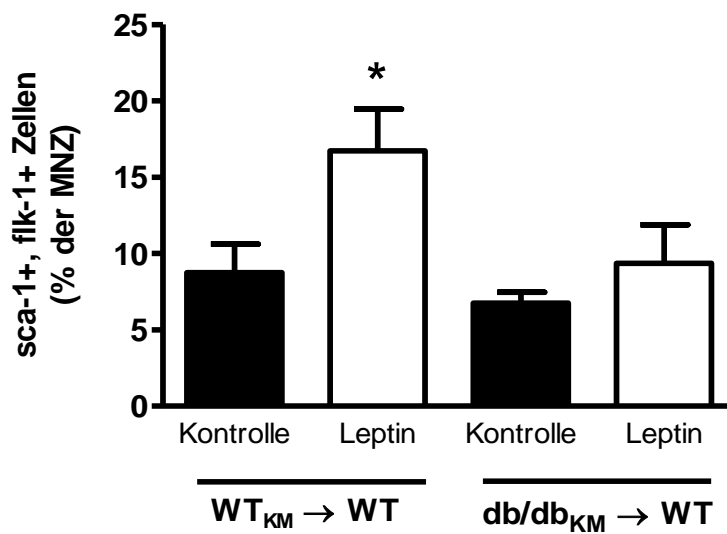


Abbildung B:



**Abbildung 15 (A):** Der Effekt von Leptin auf die Anzahl der sca1+/flk1+ vaskulären Vorläuferzellen wurde in Wildtypmäusen nach Knochenmarktransplantation von entweder db/db- oder Wildtypmäusen untersucht. Dargestellt werden die Ereignisse der Durchflusszytometrie-Analyse nach Untersuchung von je vier Mäusen pro Gruppe.

**Abbildung 15 (B):** Quantitative Bestimmung der Durchflusszytometrie-Ergebnisse. Diese zeigen einen signifikanten Anstieg der sca1+/flk1+ Zellen nach Transplantation mit Wildtypknochenmark und systemischer Leptin-Behandlung ( $p < 0,05$ ). Im Gegensatz dazu zeigt eine Behandlung mit Leptin keinen Effekt bei Mäusen, welchen db/db-Knochenmark transplantiert wurde ( $p =$  nicht signifikant im Vergleich zur Kontrolle);

### 3.5.7 LEPTIN FÖRDERT DIE EXPRESSION VON NOX2 UND MMP9 INNERHALB DES KNOCHENMARKS

Um potenzielle Mechanismen, die die Wirkung von Leptin auf flk1<sup>+</sup>-Zellen vermitteln, zu untersuchen, wurde das Knochenmark bei Mäusen gewonnen, die systemisch entweder mit Leptin, G-CSF oder 0,9%-iger NaCl-Lösung behandelt worden waren. Nun folgte die Analyse von Faktoren, die für die Förderung der Freisetzung von Vorläuferzellen bekannt sind. Die Untersuchung der mRNA zeigte einen durch Leptin geförderten Anstieg der NADPH-Untereinheit NOX2 (**Abbildung 16**). NOX2 wird durch Wachstumsfaktoren oder Zytokine aktiviert und vermittelt die Mobilisation von endothelialen Vorläuferzellen bei Hypoxie (Schroeder et al, 2009; Urao et al, 2008).

Abbildung A:

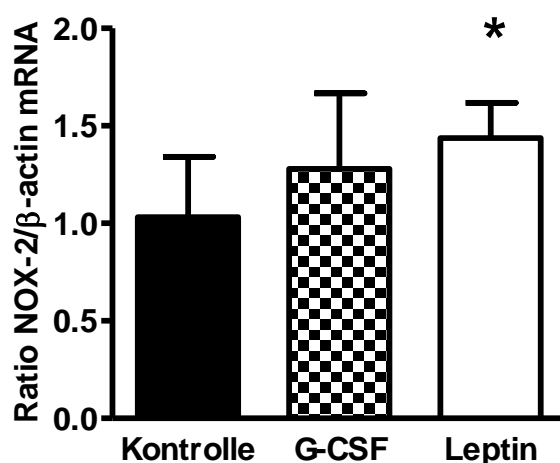




Abbildung B:

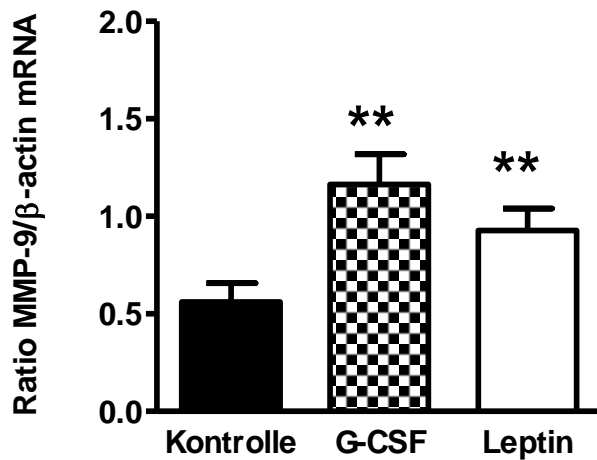
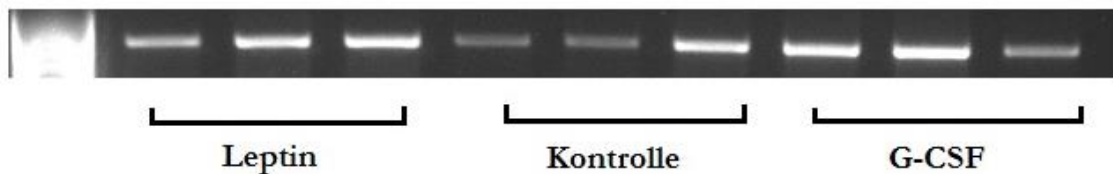


Abbildung C.



**Abbildung 16 (A).** Die Analyse der PCR aus einem Homogenat des Knochenmarks nach systemischer Behandlung mit Leptin (weiß), G-CSF (grau) oder Kontrolle (schwarz). Es ist ein signifikanter Anstieg von NOX2 mRNA nach systemischer Leptin-Behandlung nachweisbar ( $p < 0,05$ ).

**Abbildung 16 (B).** Die Zusammenfassung der quantitativen Auswertung der MMP9 mRNA ist dargestellt. Es ist zu erkennen, dass durch die systemische Gabe von G-CSF die MMP9-Expression im Vergleich zur Kontrolle signifikant steigt ( $p < 0,001$ ). Des Weiteren ist zu erkennen, dass auch die MMP9-Expression nach systemischer Leptin-Gabe signifikant im Vergleich zur Kontrolle ist ( $p < 0,05$ ).

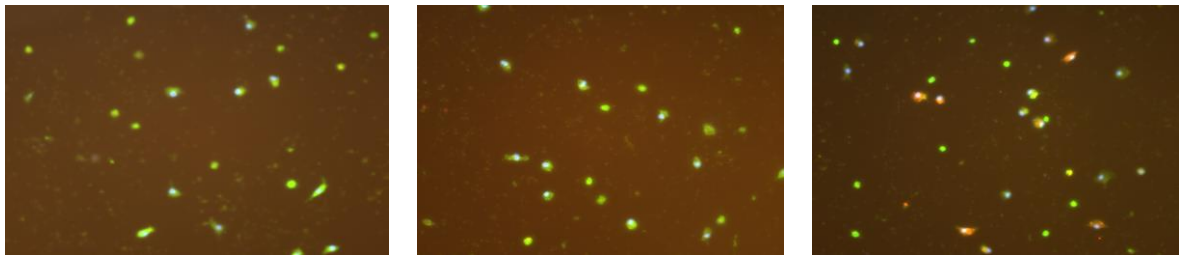
**Abbildung 16 (C).** Bildliche Darstellung der PCR-Banden nach MMP9 PCR. Der optische Eindruck der vermehrten Expression spiegelt sich in der quantitativen Abbildung wider.

### 3.6 BESTIMMUNG VON ENDOTHELIALEN PROGENITOR-ZELLEN

Zur Differenzierung der Zellen wurden murine mononukleäre Zellen aus Mausmilzen gewonnen, nachdem zuvor eine fünf Tage lange systemische Injektion mit NaCl, G-CSF oder Leptin durchgeführt worden war. Sie wurden auf Fibronectin-beschichteten Platten unter endothelialen Wachstumsbedingungen kultiviert. Nach vier Tagen der Kultivierung wurden nicht adhärenente Zellen entfernt und adhärenente Zellen weiter kultiviert.

Am siebten Tag nach der Kultivierung zeigten sich spindelförmige Zellen, die eine typische Morphologie für Endothelzellen aufwiesen. Es wurden Fluoreszenz-Färbungen zur genaueren Charakterisierung der adhärennten Zellen durchgeführt. Zum einen wurden die Zellen mit DiI-markiertem acetyliertem Low Density Lipoprotein (acLDL) inkubiert, welches durch einen spezifischen Endothelzelle-Scavenger-Rezeptor aufgenommen wird (Voyta et al 1984). Zum anderen wurden die Zellen mit Fluoreszeinisothiocyanat-markiertem (FITC) Lectin (lat. *Europaeus agglutinin-I*, Oberflächen-Glykoprotein) inkubiert, das sich auch auf humanen Endothelzellen finden lässt (Hormia et al 1983). **Abbildung 17 A** zeigt die doppelt positiven Zellen abhängig von der *in-vivo* injizierten Substanz. Es ist erkennbar, dass die Zellen der Mäuse, die mit G-CSF behandelt wurden, mehr acLDL aufgenommen haben. **Abbildung 17 B** zeigt die Quantifizierung der Zellen pro Gesichtsfeld – unter der Gabe von Leptin haben sich die doppelt positiven Zellen signifikant vermehrt. Im Vergleich von Kontrolle und G-CSF ist die Zahl der doppelt positiven Zellen nicht signifikant vermindert ( $p < 0,005$ ).

Abbildung 17 A:

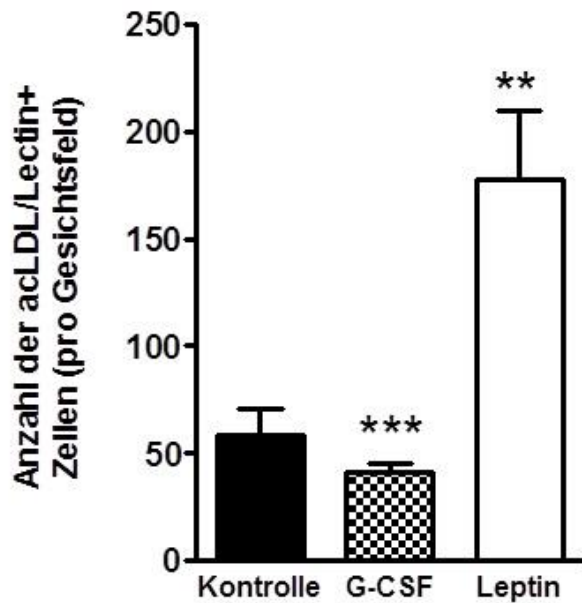


Kontrolle

Leptin

G-CSF

Abbildung 17 B:



**Abbildung 17 (A).** Charakterisierung muriner EPC nach fünftägiger Behandlung der Mäuse mit der jeweiligen Substanz und nach sieben Tagen in Kultur. Die Zellen sind spindelförmig. Die Aufnahme von DiI-markiertem acLDL (rotes Signal) und die Bindung von FITC-markiertem Lectin (grünes Signal) kennzeichnen die Zellen als EPC. Die Zellkerne wurden mit DAPI (blaues Signal) gefärbt (200-fache Vergrößerung).

**Abbildung 17 (B).** Quantifizierung der DiI-markierten acLDL und FITC-markierten Zellen, je nach *in vivo* injizierter Substanz. Es ist ein deutlicher Anstieg der dreifach positiven Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe und der G-CSF Gruppe sichtbar ( $p < 0,005$ ).

## 4 DISKUSSION

Für das Adipozytenhormon Leptin ist berichtet worden, dass es angiogenetische Aktivität durch das Stimulieren von Endothelzellen ausübt (Bouloumie et al. 1998; Sierra- Honigmann et al. 1998, Heida et al. 2010). Neben den reifen Endothelzellen konnte die Beteiligung zirkulierender endothelialer Vorläufer (EPC) in der postnatalen Angiogenese nachgewiesen werden (Asahara et al. 1997; Ashara et al. 1999; Heida et al. 2010). Leptin wirkt sich förderlich auf die Re-Endothelialisierung und die ischämisch induzierte Neovaskularisierung durch die Beeinflussung von humanen EPC (Heida et al. 2010; Schroeter et al. 2008) aus. Ungeachtet der Tatsache, dass die angiogenetischen Effekte des Adipozytenhormons Leptin schon in anderen Studien beschrieben wurden (Sierra- Honigmann et al. 1998; Bouloumie et al. 1999; Park et al. 2001), ist der komplexe molekulare Mechanismus dieser pleiotropen Aktion des Leptins nicht genau verstanden.

Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist die systemische Wirkung von Leptin bei ischämisch induzierter Angiogenese. Ein besonderes Augenmerk lag dabei auf der Fragestellung, ob die EPC vermehrt angelockt werden und woher diese EPC stammen. Die Auswertung der Daten ergibt, dass eine systemische Gabe von Leptin die Neovaskularisierung nach einer Ischämie fördert. Auch lässt sich erkennen, dass endotheliale Vorläuferzellen aus dem Knochenmark an den Abläufen beteiligt sind. Deutlich wurde außerdem, dass die Gabe von Leptin die Mobilisation von  $sca1^+/-/flk1^+$ -EPC fördert. Dises setzt voraus, dass die Zellen des Knochenmarks den Leptin-Rezeptor ObR exprimieren. Zu beobachten war ein ObR-abhängiger Anstieg von NOX2 im Knochenmark.

### 4.1 CHARAKTERISIERUNG VON ENDOTHELIALEN PROGENITORZELLEN

Die Arbeitsgruppe um Ashara beschrieb 1997 erstmals eine Population von zirkulierenden humanen Zellen mit dem Potenzial, sich in Zellen, die dem Endothel ähnlich sind, zu differenzieren. Nach dieser Entdeckung wurden diese Zellen als endotheliale Vorläuferzellen (EPC) benannt (Asahara et al. 1997). In den vergangenen Jahren fand man heraus, dass sie den vaskulären Heilungsprozess fördern und für die Regeneration unerlässlich sind. Dieses Erkenntnis gelangte in den Fokus der Wissenschaft. Nach dem heutigen Verständnis von

Angiogenese und Arteriogenese ist zur Aufrechterhaltung und für Umbauten von Gefäßen im adulten Kreislauf ein Zusammenspiel verschiedener Zellen nötig (Anghelina et al. 2006; Deindl and Schaper 2005; Wassmann et al. 2006; Zengin et al. 2006). Während das Endothel die Innenseite des neuen Gefäßes auskleidet, werden Zellen aus dem zirkulierenden Blut angelockt, um bei der Formation neuer Gefäße durch die Sekretion von Zytokinen und den Umbau des extrazellulären Raums mitzuwirken (Carmeliet 2003; Hiraoka et al. 1998; Zentilin et al. 2006). Obwohl die zirkulierenden Zellen, die für die Angiogenese im erwachsenen Kreislauf angelockt werden, zu einer heterogenen Zellpopulation gehören, wurden sie initial alle der Gruppe endothelialer Vorläuferzellen zugeordnet. Um diese Zellen aus humanem Blut isolieren zu können, wurden verschiedene Protokolle entwickelt (Ashara et al. 1997; Ingram et al. 2004; Vasa et al. 2001). Eine Kontroverse entstand bald aufgrund der phänotypischen und funktionalen Definition verschiedener Subtypen der EPC und des Mechanismus, wie sie vielleicht die Angiogenese fördern. Nach über einer Dekade Forschung an EPC versucht man nun, eine Klassifizierung für die Isolation und die Zellkultur zu erstellen – je nach Beurteilung der Identität, des Phänotyps und des Potenzials der Zellen in der Reparatur von Gefäßen (Hirschi et al. 2008).

Die für die vorliegende Arbeit verwendete Population von EPC wurde durch die Kultivierung mononuklearer Zellen in Anwesenheit von endothelialelem Wachstumsmedium und fetalem Kalbserum gewonnen. Zellen, die nicht auf Fibronektin beschichteten Platten adhärent waren, wurden verworfen. Auf der Basis des Isolationsprotokolls wurde berichtet, dass diese Zellen eine Reihe von endothelialen spezifischen Oberflächenantigenen besitzen, wie zum Beispiel VEGFR-2, CD31.

Des Weiteren exprimieren diese Zellen eine Anzahl von Oberflächenantigenen, wie zum Beispiel CD11b, CD14 oder CD45, die man typischerweise auf Makrophagen oder seinen monozytären Vorläuferzellen findet (Schmeisser et al. 2003). Darüber hinaus zeigen sich auch weitere Oberflächenantigene, die mit denen der Monozyten übereinstimmen. Aus diesen verschiedenen Oberflächenmarkern ergeben sich die phänotypischen Eigenschaften dieser Zellen, wie zum Beispiel die Aufnahme von acetyliertem Low Density Lipoprotein (acLDL) oder die Bindung des pflanzlichen Lectins *Ulex Europaeus agglutinin-1*. Diese Charakteristika der Zellen wurden auch in dieser Arbeit verwendet.

Der Leptin-Rezeptor (ObR) wird auf einer Vielzahl von Zellen exprimiert, unter anderem auf reifen endothelialen Zellen (Bouloumie et al. 1998; Sierra- Honigmann et al. 1998), CD34-

positiven hämatopoetischen Zellen (Cioffi et al. 1996; Gainsford et al. 1996) und an peripheren, aus dem Blut abgeleiteten early outgrowth EPC (Schroeter et al. 2008; Wolk et al. 2005). Die Neuformation von Gefäßen benötigt nicht nur die Proliferation und Migration von ortständigen endothelialen Zellen, sondern auch aus dem Knochenmark stammende zirkulierende Vorläuferzellen (Ashara et al. 1999; Takahashi et al. 1999). Unsere Arbeitsgruppe konnte nachweisen, dass Leptin die Re-Endothelialisierung und Ischämie-induzierte Neovaskularisation durch die Regulierung von humanen, zirkulierenden angiogenetischen Zellen fördert, die man auch als early outgrowth endotheliale Vorläuferzellen oder EPC bezeichnet (Heida et al. 2010; Schroeter et al. 2008).

In den vorherigen Studien wurden humane EPC, die zur mononuklearen Zellfraktion zählen, aus peripherem Blut isoliert und sieben Tage kultiviert. Danach wurden sie für 24 Stunden mit humanem Leptin stimuliert. Nach Ablauf der Zeit wurden sie intravenös in immundefiziente Mäuse injiziert und funktionell analysiert.

Für diese Arbeit wurde die systemische Wirkung von Leptin bei der Angiogenese nach Hinterlaufischämie untersucht. Dafür wurde rekombinantes, murines Leptin ein Mal pro Tag intraperitoneal injiziert. Ähnlich wie bei vorangegangenen Studien wurde die Injektion an fünf aufeinander folgenden Tagen durchgeführt und die Ischämie am dritten Tag gesetzt. Die Studie war darauf ausgelegt um den kurzfristigen Effekt eines erhöhten Leptinspiegels zu untersuchen, nicht aber die chronische Erhöhung des Leptinspiegels, wie man ihn etwa bei Adipositas findet (Considine et al. 1997).

## **4.2 WIRKUNG VON LEPTIN AUF DIE ANGIOGENETISCHEN EIGENSCHAFTEN VON ENDOTHELIALEN PROGENITORZELLEN *IN VITRO***

Bereits 1998 wurde gezeigt, dass Leptin die reifen Endothelzellen stimuliert und ihren angiogenetischen Effekt fördert (Bouloumie et al. 1998; Sierra-Honigmann et al. 1998). Zirkulierende EPC nehmen an der postnatalen Angiogenese, durch Homing zur Seite der Neovaskularisation, wie zum Beispiel nach Gewebeischämie, teil (Chavakis et al. 2008). Unsere Arbeitsgruppe stellte fest, dass Leptin die Adhäsion zu extrazellulären Matrixproteinen wie auch zu Endothelzellen fördert und die Kapazität von EPC zum Homing nach vaskulärer Verletzung erweitert (Schroeter et al. 2008). Allerdings blieb unklar, ob Leptin auch die

angiogenetischen Prozesse durch spezifische und direkte Verbesserung der angiogenetischen Eigenschaften der EPC moduliert.

In dieser Studie wurden Mäuse mit physiologischen Konzentrationen von Leptin (0,6 µg/g Körpergewicht) systemisch über fünf Tage behandelt. Nach fünf Tagen Behandlung wurden die Mausmilzen entnommen und die EPC nach dem Protokoll kultiviert. Um den ersten Schritt der angiogenetischen Prozesse wiederzugeben, der aus Homing und Interaktion von EPC mit dem existierenden Gefäßsystem besteht, wurde der Leptin-Effekt auf die Interaktion zwischen EPC und reifen Endothelzellen überprüft. Dafür wurden die sieben Tage kultivierten Zellen in zwei *in-vitro*-Versuchen getestet.

#### **4.2.1 MATRIGEL-ANGIOGENESE-ASSAY**

Im Matrigel-Angiogenese-Assay wurde die Wirkung von Leptin auf die EPC unter Beobachtung der Interaktion mit Humanen Umbilical Venen Endothelzellen (HUVEC) erforscht. Die HUVEC gelten als repräsentativ für reife Endothelzellen. Matrigel ist eine Gerüstmatrix, bestehend aus extrazellulärer Matrix, Basalmembranproteinen und Endothelzellen (diese bilden schnell röhrenförmige Netzwerke durch Verlängerung der Zellen). EPC aus Mausmilzen, die zuvor fünf Tage systemisch mit Leptin behandelt und dann, je nach Zellzahl, mit HUVEC co-inkubiert worden waren, zeigen eine Erhöhung der adhärennten Zellen im HUVEC-Netzwerk. Diese Erhöhung der EPC-Adhäsion in den Endothelzellen-Tubuli nach der systemischen Behandlung mit Leptin war signifikant und spezifisch. Auf der anderen Seite ist zu erwähnen, dass die direkte strukturelle Beteiligung der EPC in den HUVEC-Tubuli nur bis zu einem bestimmten Ausmaß im Matrigel-Assay beobachtet werden kann und die Fluoreszenz-markierten EPC als runde Zellen erscheinen – im Gegensatz zu den länglichen, reifen Endothelzellen. Diese morphologischen Charakteristika und die funktionellen Eigenschaften bestätigen die Unfähigkeit von EPC, selbständig eigene tubuläre Netzwerke zu bilden, wenn man sie auf Matrigel inkubiert. Die fehlende Eigenschaft, eigenständig Netzwerke zu bilden, wurde als ein Charakteristikum von early outgrowth EPC beschrieben (Hirschi et al. 2008). Um herauszufinden, ob diese EPC aus dem Knochenmark angelockt werden, bestrahlten wir Mäuse mit einer letalen Dosis und transplantierten GFP-positives Knochenmark. Nach erfolgreicher Knochenmarktransplantation wurden die Mäuse fünftägig mit Leptin systemisch behandelt. Der durchgeführte Matrigel-Angiogenese-Assay zeigte einen signifikanten Effekt. Es wurden mehr EPC integriert; auch konnte man anhand der GFP-positiven Zellen nachweisen, dass diese

Zellen aus dem Knochenmark stammen. Die Ergebnisse zeigen, dass eine spezifische Wirkung von Leptin, auf die Kapazität von EPC zu adhären, mit reifen Endothelzellen vorhanden ist und somit Leptin einen wichtigen frühen Schritt der Angiogenese, das sog. Homing, fördert.

#### **4.2.2 SPHÄROID-ANGIOGENESE-ASSAY**

Im Gegensatz zum Matrigel-Angiogenese-Assay untersucht der Sphäroid-Angiogenese-Assay eine komplexere Interaktion der EPC mit reifen Endothelzellen. Eingebettet in eine neutrale dreidimensionale Matrix, bestehend aus Kollagen und Methylzellulose, enthalten die Sphäroide HUVEC und EPC; entweder nach systemischer Behandlung mit Leptin oder vorbehandelt mit 0,9%-iger NaCl-Lösung.

Anhand der Sphäroide lassen sich nun zwei deutliche Phänomene untersuchen:

das Auswachsen der HUVEC-Sprossen, wahrscheinlich stimuliert durch die Co-Inkubation der EPC;

die EPC-Migration entlang dieser Aussprossungen.

Einzelne Endothelzellen in Lösung gehen schnell in die Apoptose über. Diesem Prozess kann auch durch die Anwesenheit von Wachstumsfaktoren nicht vorgebeugt werden. Wenn es Zellen möglich ist, einen Zell-Zell-Kontakt herzustellen, wird der Prozess der Apoptose unterbrochen und ihr Ansprechen auf Wachstumsfaktoren steigt (Harrington et al. 2007). Bei Sphäroiden, die nur aus reifen Endothelzellen bestehen, wurde gezeigt, dass sie im Laufe der Zeit eine Oberflächenschicht aus ruhenden Endothelzellen bilden, wenn man sie ohne Wachstumsfaktor inkubiert. Die Endothelzellen in der Mitte des Sphäroids bleiben im Gegensatz zu randständigen Zellen unsortiert und gingen in die Apoptosephase über, wenn sie nicht durch Überlebensfaktoren gerettet würden (Korff und Augustin 1998). In der Absicht, den Versuchsaufbau zu nutzen, um die Interaktion von EPC und HUVEC zu untersuchen, enthalten die Sphäroide nicht nur HUVEC sondern auch EPC im Verhältnis 4:1. Nach einer 24-stündigen Inkubation zeigen die Sphäroide mit den Kontroll-EPC eine mäßige Aussprossung der HUVEC. Hingegen kann man in den Sphäroiden, die EPC enthalten, welche wiederum systemisch mit Leptin behandelt wurden, eine erhöhte Aussprossungsaktivität feststellen und diese quantitativ mit der kumulativen Sprossenlänge messen. Um auch hier zu überprüfen, ob die Zellen aus dem Knochenmark kommen, wurde dieser Versuch mit GFP-positiven, knochenmarktransplantierten Mäusen durchgeführt. Hier zeigte sich eine vermehrte Aussprossung durch die EPC, die mit Leptin behandelt worden waren.



In weiteren Studien bleibt nun zu klären, ob dieser Effekt durch parakrine Mechanismen der EPC oder durch ein komplexes Zusammenspiel aus Rekrutierung, parakrinen Mechanismen und der Wirkung von Leptin entsteht.

### **4.3 FÖRDERUNG DER NEOVASKULARISATION DURCH LEPTIN NACH DEM *IN- VIVO* -MAUSMODELL DER HINTERLAUFISCHÄMIE**

Im Modell der Hinterlaufischämie wird eine Gewebsischämie induziert durch das Abbinden der Arteria femoralis, die die Hauptversorgung des murinen Hinterlaufes darstellt. Nach dem arteriellen Verschluss wird sowohl die Arteriogenese (das Umformen und das Wachstum vorhandener Arteriolen in physiologisch relevante Arterien) als auch die Angiogenese (die Aussprossung neuer Gefäße) aktiviert. Einer der Hauptauslöser für Gefäßneubildung ist die Hypoxie: Um die Sauerstoffversorgung wiederherzustellen, setzt das Gewebe eine Vielzahl von angiogenetischen Zytokinen frei (Alberts et al. 2002).

Im adulten Organismus spielen zirkulierende EPC eine wichtige Rolle in der Angiogenese. Das Rekrutieren von EPC zur Ischämie oder zur Verletzung ist ein erforderlicher Schritt im angiogenetischen Prozess (Chavakis et al. 2008). Dem Adipozytenhormon Leptin wird dabei eine angiogenetische Wirkung zugeschrieben (Bouloumie et al. 1998; Sierra-Honigmann et al. 1998).

Um nun die Wirkung von Leptin auf das EPC-Homing und die Rolle der EPC bei der Neovaskularisierung zu untersuchen, wurde Mäusen fünf Tage lang täglich ein Mal eine gewichtsadaptierte Dosis Leptin intraperitoneal injiziert. Nach drei Tagen dieser Behandlung wurde eine einseitige Hinterlaufischämie gesetzt. Um den Effekt von Leptin zu beurteilen, entnahmen wir den Musculus gastrocnemius und untersuchten ihn immunhistochemisch. Die Bestimmung der Kapillardichte im ischämischen Hinterlauf der Maus erfolgte, um Unterschiede in der Kapillardichte festzustellen. Tatsächlich zeigte sich, dass Leptin das angiogenetische Potenzial von EPC in der Hinterlaufischämie verstärkt und sich so ein signifikanter Anstieg der Gefäßdichte erkennen ließ. Des Weiteren wurde die Zahl der einzelnen Zellen pro Muskelfasern bestimmt. Diese zeigten auch unter Leptin-Injektion einen signifikanten Anstieg. In früheren Studien wurden EPC aus dem peripheren Blut von Menschen isoliert, für sieben Tage kultiviert und dann für 24 Stunden mit Leptin stimuliert.

Nach der Leptin-Stimulation wurden sie intravenös in die Maus injiziert und nach einer Hinterlaufischämie analysiert (Heida et al. 2010). Auch dort zeigten sich die positiven Effekte von Leptin auf die Angiogenese und die Zellzahl.

Um zu analysieren, woher diese erhöhte Zellzahl kommt, führten wir eine letale Bestrahlung von Wildtyp-Mäusen durch. Anschließend transplantierten wir den Mäusen GFP-positives Knochenmark. Nach einer Inkubation von vier Wochen behandelten wir die Mäuse fünf Tage lang mit Leptin oder 0,9%-iger NaCl-Lösung. Auch hier wurden den Mäuse nach drei Tagen eine Hinterlaufischämie zugeführt. Der positive Effekt von Leptin auf die Angiogenese wurde auch hier sichtbar. So erhöhte sich nicht nur die Zellzahl pro Muskelfaser, sondern auch die Gefäßdichte.

#### **4.4 WIRKUNG VON LEPTIN AUF DAS KNOCHENMARK**

Sowohl in *in-vitro* (Matrigel-Angiogenese-Assay und Sphäroid-Angiogenese-Assay) als auch in *in-vivo* (Knochenmarktransplantation) konnte nachgewiesen werden, dass Leptin auf Zellen aus dem Knochenmark wirkt. Bereits in früheren Studien wurde gezeigt, dass zirkulierende Zellen aus dem Knochenmark in der adulten Neovaskularisierung eine Rolle spielen (Ashara et al. 1999; Kocher et al. 2001; O'Neill et al. 2005; Takahashi et al. 1999). Die Mobilisation von vaskulären Vorläuferzellen aus dem Knochenmark als Antwort auf eine Ischämie oder Gewebsverletzung ist ein dynamischer Prozess, der durch hämatopoetische Wachstumsfaktoren und Zytokine kontrolliert wird (Kalka et al. 2000). Es ist bekannt, dass der Leptin-Rezeptor ObR auf hämatopoetischen Zellen exprimiert wird (Gainsford et al. 1996), und in dieser Arbeit wurde bestätigt, dass seine zwei Hauptisoformen auf Zellen innerhalb des Knochenmarks vorzufinden sind. Außerdem wurde nachgewiesen, dass die systemische Injektion von Leptin in Mäusen die Zahl der zirkulierenden sca1<sup>+</sup>/flk1<sup>+</sup> endothelialen Vorläuferzellen erhöht. Die ObR-vermittelte Effekte auf die Adipokine, wie die Mobilisation von vaskulären Vorläufern und die Ischämie-induzierte Neovaskularisierung, blieben aus nach einer Knochenmarktransplantation von ObR-defizitären Mäusen in Wildtypmäusen. Durch diese Abwesenheit konnte bewiesen werden, dass der ObR wichtig ist zum Ausüben des Leptin-Effekts. Dabei sei gesagt, dass die Vorläuferzellen-Mobilisation durch Leptin kein Ergebnis unspezifischer Entzündungsreaktionen ist, wie sie nach der Anwendung von G-CSF beobachtet werden. Von G-CSF ist bekannt, dass es eine Reihe hämatopoetischer und nicht hämatopoetischer Zellen anspricht; des Weiteren erhöht die

Injektion mit G-CSF die Anzahl von  $sca1^+/c-kit^+$ -Zellen, die eine primitive murine hämatopoetische Stammzellreihe darstellen ohne die Zahl an  $flk1^+$ -Zellen wesentlich zu erhöhen. Ähnliche Ergebnisse über spezifische Mobilisation von endothelialen Vorläuferzellen wurden auch von anderen Faktoren mit angiogenetischen Potenzial beschrieben, wie zum Beispiel VEGF (Kalka et al. 2000), Erythropoetin (Heeschen et al. 2003) oder Statine (Schroeter et al. 2009).

#### **4.4.1 PROGENITORZELLMOBILISIERUNG AUS DEM KNOCHENMARK UND REKRUTIERUNG**

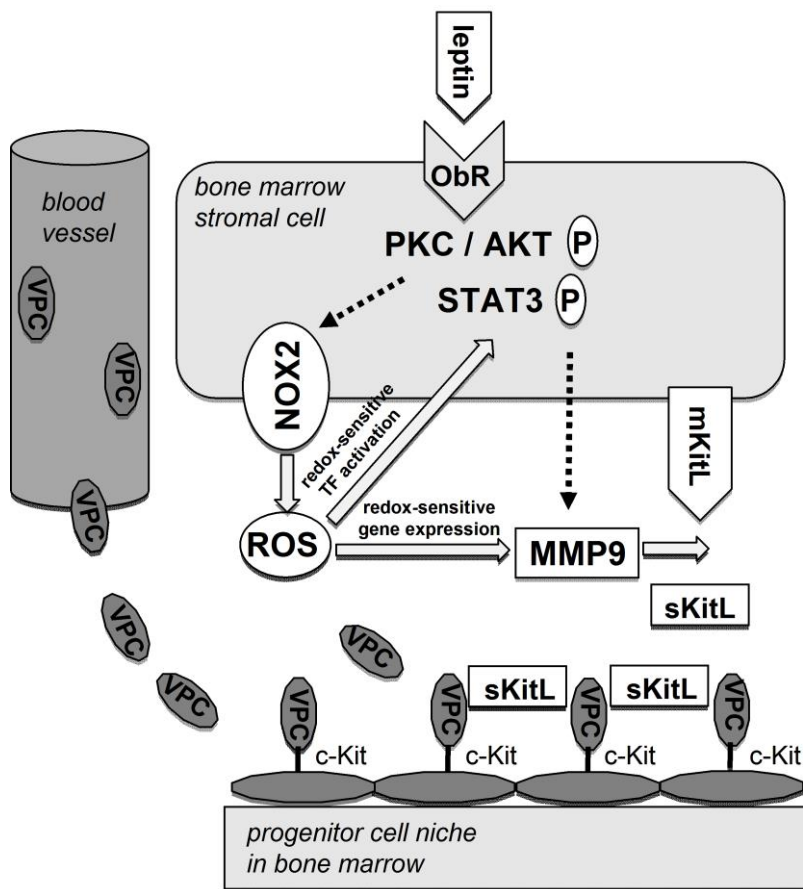
Proinflammatorische Zytokine fördern die Mobilisation von Vorläuferzellen durch Erhöhung der Sekretion von proteolytischen Enzymen aus hämatopoetischen und Stromazellen innerhalb des Knochenmarks. Die tägliche Applikation von G-CSF zeigt eine Mobilisation von SDF-1-positiven hämatopoetischen Vorläuferzellen durch Aktivierung von MMP9-Expression (Jin et al. 2008) In Bezug auf Leptin haben andere Studien für humane Endothelzellen und Zellen der glatten Muskulatur im arteriellen System gezeigt, dass Leptin die MMP2- und MMP9-mRNA Expression hochreguliert (Park et al. 2001). In der vorliegenden Arbeit führte die Applikation von Leptin bei Mäusen wie auch die *ex-vivo*-Stimulation frisch isolierter Knochenmarkzellen zu einer Erhöhung der MMP9-mRNA und der Proteinexpression. Kürzlich wurde beobachtet, dass die MMP9-Expression im Knochenmark essentiell für die ischämie-induzierte Neovaskularisierung ist und eine Steigerung der Mobilisation von  $sca1^+/flk1^+$ -Vorläuferzellen eine Rolle spielt (Huang et al. 2009). Die angiogenetischen Effekte von Leptin konnten weder in db/db-knochenmarktransplantierten Mäusen noch in NOX2-Knockout-Mäusen nachgewiesen werden. Beide wurden auch charakterisiert durch die Abwesenheit einer Leptin-induzierten MMP9-Expression; folglich ergibt sich eine indirekte Unterstützung der Protease beim Vermitteln des Leptin-Effekts. Aktivierung von MMP9 vermittelt proteolytische Spaltung und Freisetzung von sKitL (Heissig et al. 2002). Übereinstimmend mit dem Befund, dass durch die Stimulation von Knochenmarkzellen mit Leptin ein zeitabhängiger Anstieg der MMP9-Expression und -Aktivität zu erwarten ist, konnte man erhöhte Plasmaspiegel für sKitL in Mäusen, die rekombinates Leptin erhalten hatten, messen. sKitL bindet an den Tyrosinkinaserzeptor c-kit, der bei adulten hämatopoetischen Stammzellen sehr stark ausgebildet ist und entscheidenden Einfluss besitzt auf die Mobilisation von Knochenmark-abgeleiteten Vorläuferzellen als Antwort auf verschiedene Agenzien (Beispielsweise Estradiol,

VEGF) (Iwakura et al. 2006). Die Daten der Arbeit deuten eine Leptin-induzierte MMP9-vermittelte Erhöhung von sKitL an, welche dem mobilisierenden Effekt von Leptin *in-vivo* unterliegt. Interessanterweise ergaben Durchflusszytometrie-Analysen bei einer großen Population (>80%) der ObR-positiven Zellen innerhalb des Knochenmarks eine Expression von c-kit.

Vorliegende Befunde weisen darauf hin, dass die MMP9-Expression durch freie Sauerstoffradikale (Reactive Oxygen Species / ROS) reguliert wird (Kim et al. 2010). Die NADPH-Oxidase ist ein Hauptquelle für ROS in vielen Zelltypen, inklusive hämatopoetischer Zellen und Vorläuferzellen (Schröder et al. 2009), und kann durch Wachstumsfaktoren und Zytokine aktiviert werden (Bedard et al. 2007). So fand man nach einer Stimulation von Endothelzellen mit VEGF eine NOX2-abhängige Zunahme von ROS Levels (Colavitti et al. 2002; Ushio et al. 2002). Es zeigte sich, dass eine NOX2-Expression im Knochenmark essentiell für die Mobilisation von EPC und die Neovaskularisierung ist (Schröder et al. 2009; Urao et al. 2008). Leptin stimuliert möglicherweise die ROS-Bildung über NADPH-Oxidase-abhängige Wege (Bouloumie et al. 1999; Li L et al. 2005; Yamagishi et al. 2001). Diese These postuliert eine Rolle von ROS als „second messenger“ bei der Übertragung Leptin-vermittelter Signaltransduktion. Die vorliegende Arbeit zeigt eine Zunahme der Expression von NOX2 in Knochenmarkzellen. Auch die Leptin-geförderte Mobilisation von flk1<sup>+</sup>-Zellen aus dem Knochenmark war in NOX2-defizienten Mäusen aufgehoben und das Auffinden einer Zunahme von MMP9 im Knochenmark nicht nachweisbar (Schroeter et al. 2011). So war bei Wildtypmäusen, denen zuvor ObR-defizientes Knochenmark transplantiert worden war, auch keine NOX2-Expression als Antwort auf Leptin vorhanden. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass sich nach der ObR-Aktivierung eine Signalkaskade anschließt, die eine NOX2-induzierte MMP9-Expression zur Folge hat.

Unsere Arbeitsgruppe konnte zuvor zeigen, dass Leptin die Integrin-vermittelte Adhäsion von EPC in Bezug auf die Reendothelialisierung nach Neointimaverletzung fördert (Schroeter et al. 2008). In dieser Arbeit wurde nicht nur die Wirkung von Leptin auf die Steigerung der zirkulierenden flk1<sup>+</sup>-Vorläuferzellen, sondern auch ihre Rekrutierung zur verletzten Seite und ihre funktionelle Kapazität *in-vitro* untersucht. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass eine systemische Injektion von Leptin die Angiogenese auch durch andere Mechanismen als die Förderung von vaskulären Vorläuferzellen beeinflusst. Gegen diese These sprechen wiederum die Ergebnisse nach Knochenmarktransplantation von ObR-defizienten Mäusen. Die

Darstellung in **Schema 4** zeigt den möglichen Mechanismus der Mobilisation von flk-1+, sca-1+ vasculären Progenitorzellen durch Leptin.



**Schema 4:** Schematische Darstellung des möglichen Mechanismus der Wirkung von Leptin auf die Mobilisation von flk-1+, sca-1+ vasculären Progenitorzellen. Es gibt Hinweise darauf, dass Leptin auf Knochenmarksebene mit dem Leptin-Rezeptor interagiert und eine NOX2-basierte NADPH-Oxidase aktiviert durch die Phosphorylierung von PKC/AKT und STAT3 (P= Phosphorylierung). Dieses führt zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS). Daraufhin kommt es zur Bildung von Transkriptionsfaktoren (TF) und zur MMP9-Expression. Es folgt eine proteolytische Freisetzung von membrangebundenem Kit Ligand (mKitL). Löslicher KitL kann die Mobilisation von vasculären Progenitorzellen in den Blutkreislauf vermitteln. Im Blut werden die Progenitorzellen zum Ischämiebereich rekrutiert und nehmen dort an der Bildung von neuen Gefäßen teilnehmend (aus Schroeter et al. 2011, Figur IV der ergänzenden Figuren)

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Diese Arbeit untersuchte den Einfluss des Adipozytenhormons Leptin auf die Angiogenese, sowohl *in-vitro* also auch *in-vivo* im Mausmodell, sowie die Mobilisation von EPC aus dem Knochenmark.

In der Durchflusszytometrie bestätigte sich, daß durch Leptingabe, die Zahl der *sca1+/flk1+*-Zellen, zunimmt bei denen es sich um vaskuläre Vorläuferzellen handelt. Auch wurde gezeigt, dass diese Zellen funktionstüchtig entlang eines Netzwerks wandern und sich dort integrieren. Diese Zellen sind keine unspezifische Reaktion auf Leptin.

Im *in-vivo*-Hinterlaufischämie-Modell bei der Maus konnte gezeigt werden, dass eine systemische Gabe von Leptin mit einer vermehrten Rekrutierung von Zellen in das ischämische Gewebe und einer vermehrten Kapillardichte im Vergleich zur Kontrollgruppe einhergeht. Durch eine Transplantation von GFP-positivem Knochenmark in Wildtypmäuse konnte eine Herkunft der vermehrten Zellen aus dem Knochenmark gesichert werden. Nach einer Transplantation von *db/db*-Knochenmark in Wildtypmäuse blieb dieser Effekt aus. Das zeigt, dass diese Funktion nur bei funktionierendem Leptin- Rezeptor möglich ist.

In zwei verschiedenen *in-vitro*-Angiogenese-Untersuchungen (Matrigel-Angiogenese-Assay und den Sphäroid-Angiogenese-Assay) der EPC zeigten sich nach systemischer Gabe von Leptin eine Verbesserung der Interaktion mit reifen Endothelzellen im Vergleich zur Kontrollgruppe sowie eine erhöhte Zellzahl. Dieses Phänomen war auch zu beobachten nach Transplantation von GFP-positivem Knochenmark in Wildtypmäuse und systemischer Behandlung.

Auf Knochenmarkebene konnte durch eine systemische Behandlung von Leptin eine Erhöhung von NOX2 nachgewiesen werden, die für eine vermehrte Freisetzung von endothelialen Vorläuferzellen aus dem Knochenmarkt sorgt. Auch konnte eine Erhöhung der MMP9-Expression sowie eine erhöhte Expression des Leptinrezeptors festgestellt werden. Ein Zusammenhang zwischen diesen erhöhten Expressionen, vor allem von NOX2, und der erhöhten Zahl von EPC konnte hergestellt werden.

Der deutliche Einfluss von Leptin auf funktionelle Eigenschaften, wie zum Beispiel Angiogenese und die Neubildung von Gefäßen, konnte in dieser Arbeit eindeutig bestätigt werden. Auch der Mechanismus, über den diese Aufgabe möglicherweise erfüllt wird, konnte weiter identifiziert werden.

In weiteren Untersuchungen bleibt zu klären, ob das Mausmodell der Hinterlaufischämie auf Patienten mit Myokardinfarkt übertragen werden kann. So könnte zum therapeutischem Nutzen nach Ischämie eine systemische oder lokale Gabe von Leptin die Neovaskularisierung fördert und somit das Ischämiegebiet sowie die Schäden am Myokard verkleinert beziehungsweise heilen.

## 6 LITERATUR

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2002): Histology: the lives and deaths of cells in tissues. *Molecular biology of the cell*, 4, 1259-1312

Anghelina M, Krishnan P, Moldovan L, Moldovan NI (2006): Monocytes/macrophages cooperate with progenitor cells during neovascularization and tissue repair: conversion of cell columns into fibrovascular bundles. *AM J Pathol* 168, 529-541

Antic V, Dulloo A, Montani JP (2003): Multiple mechanisms involved in obesity-induced hypertension. *Heart Lung Circ* 12, 84-93

Ashara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzgenbichler B, Schattman G, Isner JM (1997): Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 275, 964-967

Asahara T, Masuda H, Takahashi T, Kalka C, Pastore C, Silver M, Kearne M, Magner M, Isner JM.(1999) Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res* 6; 85(3): 221-228

Bahlmann FH, De Groot K, Spandau JM, Landry AL, Hertel B, Duckert T, Boehm SM, Menne J, Haller H, Fliser D (2004): Erythropoietin regulates endothelial progenitor cells. *Blood* 103, 921-926

Bayrhuber H., Knull U.(1998): Gewebe- und Organbildung. In: Linder Biologie, Auflage 21, S. 37 und S. 368

Bedard K, Krause KH (2007). The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev* 87, 245-313



Bodary PF, Westrick RJ, Wickenheiser KJ, Shen YC, Eitzman DT (2002): Effect of leptin on arterial thrombosis following vascular injury in mice. *J Am Med Assoc* 287, 1706-1709

Bodary PF, Gu S, Shen Y, Hasty AH, Buckler JM, Eitzman DT (2005): Recombinant leptin promotes atherosclerosis and thrombosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vs Biol* 25, e119-e122

Bouloumie A, Drexler HC, Lafontan M, Busse R (1998): Leptin, the product of Ob gene, promotes angiogenesis. *Circ Res* 83 , 1059-1066

Bouloumie A, Marumo T, Lafontan M, Busse R (1999). Leptin induces oxidative stress in human endothelial cells. *FASEB J* 10 , 1231-1238

Brazelton TR, Blau HM (2005): Optimizing techniques for tracking transplanted stem cells in vivo. *Stem Cells* 23, 1251-1265

Burks DJ, Font de MJ, Scubert M, Withers DJ, Myers MG, Towery HH, Altamuro SL, Flint CL, White MF (2000): IRS-2 pathways integrate female reproduction and energy homeostasis. *Nature* 407, 377-382

Byrne JA, Grieve DJ, Bendall JK, Li JM, Gove C, Lambeth JD, Cave AC, Shah AM. (2003): Contrasting roles of NADPH oxidase isoforms in pressure-overload versus angiotensin II-induced cardiac hypertrophy. *Circ Res* 93 , 802-805

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, Sinha MK, Kolaczynski JW, Zhang PL, Considine RV (1996): Leptin: the tale of an obesity gene. *Diabetes* 45, 1455-1462

Carmeliet P (2003): Angiogenesis in health and disease. *Nat Med* 9, 653-660

Chavakis E, Urbich C, Dimmeler S (2008): Homing and engraftment of progenitor cells: A prerequisite for cell therapy. *J Mol Cell Cardiol* 45, 514-522

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

Chua SC Jr, White DW, Wu-Peng XS, Liu SM, Okada N, Kershaw EE, Chung WK, Power-Kehoe L, Chua M, Tartaglia LA, Leibel RL (1996): Phenotype of fatty due to Gln269Pro mutation in the leptin receptor (Lepr). *Diabetes* 45, 1141-1143

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

Colavitti R, Pani G, Bedogni B, Anzevino R, Borrello S, Waltenberger J, Galeotti T. (2002) Reactive oxygen species as downstream mediators of angiogenic signaling by vascular endothelial growth factor receptor-2/KDR. *J Biol Chem* 277, 3101-3108.

Coleman DL (1978): Obese and diabetes: two mutant genes causing diabetes-obesity syndromes in mice. *Diabetologia* 14, 141-148

Considine RV und Caro JF (1997): Leptin and the regulation of body weight *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 29, 1255-1272

Cowley MA, Smart JL, Rubinstein M, Cerdan MG, Diano S, Horvath TL, Cone RD, Low MJ (2001): Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature* 411, 480-484

Dellas C, Schäfer K, Rohm IK, Lankheit M, Leifheit M., Loskutoff DJ, Hasenfuss G, Konstantinides SV (2007): Leptin signaling and leptin-mediated activation of human platelets:

importance of JAK2 and the phospholipase Cgamma and A2. *Thromb Haemost* 98, 1063-1071

Deindl E, Schaper W (2005): The art of arteriogenesis. *Cell Biochem Biophys* 43, 1-15

Dimmeler S, Aicher A, Vasa M, Mildner-Rihm C, Adler K, Tiemann M, Rutten H, Fichtlscherer S, Martin H, Zeiher AM (2001): HMG-CoA reductase inhibitors (statins) increase endothelial progenitor cells via PI 3-kinase/Akt pathway. *J Clin Invest* 108, 391-397

Enriori PJ, Evans AE, Sinnayah P, Cowley MA (2006): Leptin resistance and obesity. *Obesity* 14 Suppl 5, S 254- 258

Evans EA, Calderwood DA (2007): Forces and bond dynamics in cell adhesion. *Science* 316, 1148-1153

Frederich RC, Lollmann B, Hamann A, Napolitano-Rosen A, Kahn BB, Lowell BB, Flier JS (1995): Expression of ob mRNA and its encoded protein in rodents. Impact of nutrition and obesity. *J Clin Invest* 96, 1658-1663

Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN (1976): Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol* 4, 267-274

Friedman JM (2002): The function of leptin in nutrition, weight and physiology. *Nutr Rev* 60 S1-14; discussion S68-84, 85-87

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

Gainsford T, Willson TA, Metcalf D, Handman E, McFarlane C, Ng A, Nicola NA, Alexander WS, Hilton DJ (1996) Leptin can induce proliferation, differentiation, and functional activation of hemopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 14564-8

Giandomenico G, Dellas C, Czekay RP, Koschnick S, Loskutoff DJ (2005): The leptin receptor system of human platelets. *J Thromb Haemost* 3, 1042-9

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

Harrington EO, Lu Q, Rounds S: *Endothelial Cell Apoptosis* (2007): *Endothelial Biomedicine*, Airid WC, Cambridge University Press, 1081-1097

Heeschen C, Aicher A, Lehmann R, Fichtlscherer S, Vasa M, Urbich C, Mildner-Rihm C, Martin H, Zeiher AM, Dimmeler S (2003): Erythropoietin is a potent physiologic stimulus for endothelial progenitor cell mobilization. *Blood* 102, 1340-6

Heida NM, Leifheit-Nestler M, Schroeter MR, Müller JP, Cheng IF, Henkel S, Limbourg A, Limbourg FP, Alves F, Quigley JP, Ruggeri ZM, Hasenfuss G, Konstantinides S, Schäfer K (2010): Leptin enhances the potency of circulating angiogenic cells via src kinase and integrin alphaVbeta5: implications for angiogenesis in human obesity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 30, 200-6

Heissig B, Hattori K, Dias S, Friedrich M, Ferris B, Hackett NR, Crystal RG, Besmer P, Lyden D, Moore MA, Werb Z, Rafi S (2002): Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP 9 mediated to release of kit- ligand. *Cell* 109, 625-637

Hiraoka N, Allen E, Apel IJ, Gyetko MR, Weiss SJ (1998): Matrix metalloproteinases regulate neovascularization by acting as pericellular fibrinolysins. *Cell* 95, 365-377

Hirschi KK, Ingram DA, Yoder MC (2008): Assessing identity, phenotype, and fate of endothelial progenitor cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28 , 1584-95

Huang PH, Chen YH, Wang CH, Chen JS, Tsai HY, Lin FY, Lo WY, Wu TC, Sata M, Chen JW, Lin SJ (2009): Matrix metalloproteinase-9 is essential for ischemia-induced

neovascularization by modulating bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29, 1179-84.

Ingram DA, Mead LE, Tanaka H, Meade V, Fenoglio A, Mortell K, Pollok K, Ferkowicz MJ, Gilley D, Yoder MC (2004): Identification of a novel hierarchy of endothelial progenitor cells using human peripheral and umbilical cord blood. *Blood* 104, 2752-2760

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

Iwakura A, Shastry S, Luedemann C, Hamada H, Kawamoto A, Kishore R, Zhu Y, Qin G, Silver M, Thorne T, Eaton L, Masuda H, Asahara T, Losordo DW (2006): Estradiol enhances recovery after myocardial infarction by augmenting incorporation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells into sites of ischemia-induced neovascularization via endothelial nitric oxide synthase-mediated activation of matrix metalloproteinase-9. *Circulation* 113, 1605-14

Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz- Gonzalez XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M et al (2002): Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 418, 41-49

Jin F, Zhai Q, Qiu L, Meng H, Zou D, Wang Y, Li Q, Yu Z, Han J, Li Q, Zhou B (2008): Degradation of BM SDF-1 by MMP-9: the role in G-CSF-induced hematopoietic stem/progenitor cell mobilization. *Bone Marrow Transplant* 42, 581-8

Joussen A.M., B. Kirchhof und C. Gottstein: Molekulare Mechanismen der Vaskulogenese und Angiogenese. In: *Der Ophthalmologe*. Band 100, Nr. 4, 284–291, 2003

Kalka C, Masuda H, Takahashi T, Gordon R, Tepper O, Gravelleaux E, Pieczek A, Iwaguro H, Hayashi SI, Isner JM, Asahara T (2000): Vascular endothelial growth factor (165) gene transfer augments circulating endothelial progenitor cells in human subjects. *Circ Res* 86, 1198-202

Kalka C, Masuda H, Takahashi T, Kalka-Moll WM, Silver M, Kearney M, Li T, Isner JM, Asahara T (2000): Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *Proc Natl Acad Sci* 97, 3422-7

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

Kocher AA, Schuster MD, Szabolcs MJ, Takuma S, Burkhoff D, Wang J, Homma S, Edwards NM, Itescu S (2001): Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nat Med* 7, 430-6

Konstantinides S, Schäfer 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, 1533-40

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

Korff T, Augustin HG (1998): Integration of endothelial cells in multicellular spheroids prevents apoptosis and induces differentiation. *J Cell Biol* 143, 1341-1352

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

Li L, Mamputu JC, Wiernsperger N, Renier G (2005): Signaling pathways involved in human vascular smooth muscle cell proliferation and matrix metalloproteinase-2 expression induced by leptin: inhibitory effect of metformin. *Diabetes* 54, 2227-34

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

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

Morton GJ, Schwartz MW (2011): Leptin and the CNS control of glucose metabolism. *Physiol Rev* 91, 389-411

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

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

Oda A, Taniguchi T, Yokoyama M (2001): Leptin stimulates rat aortic smooth muscle cell proliferation and migration. *Kobe J Med Sci* 47, 141-150

O'Neill TJ, Wamhoff BR, Owens GK, Skalak TC (2005): Mobilization of bone marrow-derived cells enhances the angiogenic response to hypoxia without transdifferentiation into endothelial cells. *Circ Res* 97, 1027-35

Park HY, Kwon HM, Lim HJ, Hong BK, Lee JY, Park BE, Jang Y, Cho SY, Kim HS (2001): Potential role of leptin in angiogenesis: leptin induces endothelial cell proliferation and expression of matrix metalloproteinases *in vivo* and *in vitro*. *Exp Mol Med* 33, 95-102

Prasher DC, Eckenrode VK, Ward WW, Prendergast FG, Cormier MJ (1992): Primary structure of the *Aequorea Victoria* green-fluorescent protein. *Gene* 111, 229-233

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

Schatteman GC, Dunnwald M, Jiao C (2007): Biology of Bone Marrow-Derived Endothelial Cell Precursors. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292, H1-H18

Schmeisser A, Graffy C, Daniel WG, Strasser RH (2003): Phenotypic overlap between monocytes and vascular endothelial cells. *Adv Exp Med Biol* 522, 59-74

Schneiderman J, Simon AJ, Schroeter MR, Flugelman MY, Konstantinides S, Schäfer K (2008): Leptin receptor is elevated in carotid plaques from neurologically symptomatic patients and positively correlated with augmented macrophage density. *J Vas Surg* 48, 1146-1155

Schröder K, Kohnen A, Aicher A, Liehn EA, Buchse T, Stein S, Weber C, Dimmeler S, Brandes RP (2009): NADPH oxidase Nox2 is required for hypoxia-induced mobilization of endothelial progenitor cells. *Circ Res* 105, 537-44

Schroeter MR, Stein S, Heida NM, Leifheite-Nestler M, Cheng IF, Gogiraju R, Christiansen H, Maier LS, Shah AM, Hasenfuss G, Konstantinides S, Schäfer K (2011): Leptin promotes the mobilization of vascular progenitor cells and neovascularization by NOX2-mediated activation of MMP9. *Circ Res* 93, 170-180

Schroeter MR, Humboldt T, Schäfer K, Konstantinides S (2009): Rosuvastatin reduces atherosclerotic lesions and promotes progenitor cell mobilisation and recruitment in apolipoprotein E knockout mice. *Atherosclerosis* 205, 63-73

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, 536-44

Schroeter MR, Schneiderman J, Schumann B, Gluckermann R, Grimmas P, Buchwald AB, Tirilomis T, Schondube FA, Konstantinides SV, Schäfer K (2007): Expression of the leptin receptor in different types of vascular lesions. *Histochem Cell Bio* 128, 323-333



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

Sierra-Honigsmann MR, Nath AK, Murakami C, Garcia-Cardena G, Papapetropoulos A, Sessa WC, Madge LA, Schechner JS, Schwabb MB, Poverini PJ, Flores-Riveros JR (1998): Biological action of leptin as an angiogenic factor. *Science* 281, 1683-6

Stephenson K, Tunstead J, Tsai A, Gordon R, Henderson S, Dansky HM (2003): Neointimal formation after endovascular arterial injury is markedly attenuated in db/db mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23, 2027-2033

Subramaniam K, Geraerts M, Pauwelyn KA, Park Y, Owens DJ, Muijtjens M, Ulloa-Montoya F, Jiang Y, Verfaillie CM, Hu WS (2010): Isolation procedure and characterization of multipotent adult progenitor cells from rat bone marrow. *Methods Mol Biol* 636, 55-78

Swearingen KE, Loomis WP, Kehimkar B, Cookson BT, Dovichi NJ (2010): Quantification of green fluorescent protein in cellular supernatant by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection for measurement of cell death. *Talanta* 81, 948-953

Takahashi T, Kalka C, Masuda H, Chen D, Silver M, Kearney M, Magner M, Isner JM, Asahara T (1999): Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat Med* 5, 434-8

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

Tepper OM, Galiano RD, Capla JM, Kalka C, Gagne PJ, Jacobowitz GR, Levine JP, Gurtner GC (2002): Human endothelial progenitor cells from type II diabetics exhibit impaired proliferation, adhesion and incorporation into vascular structures. *Circulation* 106, 2781-2786

Urao N, Inomata H, Razvi M, Kim HW, Wary K, McKinney R, Fukai T, Ushio-Fukai M (2008): Role of NOX2-based NADPH oxidase in bone marrow and progenitor cell function involved in neovascularization induced by hindlimb ischemia. *Circ Res* 103, 212-20

Ushio-Fukai M, Tang Y, Fukai T, Dikalov SI, Ma Y, Fujimoto M, Quinn MT, Pagano PJ, Johnson C, Alexander RW (2002): Novel role of gp91(phox)-containing NAD(P)H oxidase in vascular endothelial growth factor-induced signaling and angiogenesis. *Circ Res* 91, 1160-7

Urbich C, Dimmeler S (2004): Endothelial Progenitor Cells: Characterization and Role in Vascular Biology. *Circ Res* 95, 343-353

Vasa M, Fichtschere S, Aicher A, Adler K, Urbich C, Martin H, Zeiher AM, Dimmeler S (2001): Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. *Circ Res* 89, E1-7

Walter DH, Haendeler J, Reinhold J, Rochwalsky U, Seeger F, Honold J, Hoffmann J, Urbich C, Lehmann R, Arenzana-Seisdedos F et al (2005): Impaired CXCR4-signaling contributes to the reduced neovascularization capacity of endothelial progenitor cells from patients with coronary artery disease. *Circ Res* 97, 1142-1151

Wang MY, Zhou YT, Mewgard CB, Unger RH (1996): A novel leptin receptor isoform in rat. *FEBS Lett* 392, 87-90

Wassmann S, Werner N, Czech T, Nickenig G (2006): Improvement of endothelial function by systemic transfusion of vascular progenitor cells. *Circ Res* 99, e74-e83

White CL, Purpera MN, Ballard K, Morrison CD (2010): Decreased food intake following overfeeding involves leptin-dependent and leptin-independent mechanisms. *Physiol Behav* 100, 408-416

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. *JBiol Chem* 272, 4065-4071

Wohlrab F, Henoch U (1988): The life and work of Carl Weigert (1845-1904) in Leipzig 1878-1885. *Zentralbl allg Patho patho Anat* 134, 743-751

Wolk R, Deb A, Caplice NM, Somers VK (2005): Leptin receptor and functional effects of leptin in human endothelial progenitor cells. *Artherosclerosis* 183, 131-139

Yamagishi SI, Edelstein D, Du XL, Kaneda Y, Guzman M, Brownlee M (2001): Leptin induces mitochondrial superoxide production and monocyte chemoattractant protein-1 expression in aortic endothelial cells by increasing fatty acid oxidation via protein kinase A. *J Biol Chem* 276, 25096-100

Yang R, Barouch LA (2007): Leptin signaling and obesity: cardiovascular consequences. *Circ Res* 101, 545-559

Zarkesh-Esfahani H, Pockley G, Metcalfe RA, Bidlingmaier M, Wu Z, Ajami A, Weetman AP, Strasburger CJ, Roos RJ (2001): High-dose leptin activates human leukocytes via receptor expression on monocytes. *J Immunol* 167, 4593-4599

Zengin E, Chalajour F, Gehling UM, Ito WD, Treede H, Lauke H, Weil J, Reichenspurner H, Kilic N, Ergun S (2006): Vascular wall resident progenitor cells: a source for postnatal vasculogenesis. *Development* 133, 1543-1551

Zentilin L, Tafuro S, Zacchigna S, Arsic N, Pattarina L, Sinigaglia M, Giacca M (2006): Bone marrow mononuclear cells are recruited to the sites of VEGF-induced neovascularization but are not incorporated into newly formed vessels. *Blood* 107, 3546-3554

Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM (1994): Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue [published erratum appears in *Nature* 1995 Mar 30;374(6521):479]. *Nature* 372, 425-32

## DANKSAGUNG

Ich danke Frau **Prof. Dr. med. Katrin Schäfer** und Herrn **Dr. med. Marco R. Schroeter** dafür, dass sie mich zu diesem Thema ermutigt und dabei in das wissenschaftlich-experimentelle Arbeiten eingeführt haben. Besonders möchte ich mich bei Herrn Dr. Schroeter für die intensive Betreuung sowie ein immer offenes Ohr bei aufkommenden Fragen und Problemen bedanken. Für die Bereitstellung der Methoden und die Einführung in ebendiese möchte ich ihnen beiden von Herzen danken.

Für ihre engagierte, intensive technische Assistenz und Unterstützung darf ich mich des Weiteren bei **Frau Sarah Barke** und Frau **Dr. rer. nat. Maren Leifheit-Nestler** bedanken.

Der Abteilung Strahlentherapie der Universitätsmedizin Göttingen und vor allem **Herrn Prof. Dr. med. Hans Christiansen** bin ich für den unproblematischen und reibungslosen Ablauf sowie wie für die Überlassung von wissenschaftlichen Geräten und Ressourcen zu Dank verpflichtet.

## LEBENS LAUF

Am 18. Juli 1984 wurde ich, Susanne Stein, als zweites Kind der Hausfrau Susanna Elisabeth Stein geb. Martini und des Diplom-Ingenieurs Karl-Heinz Stein in Worms geboren.

Dort besuchte ich von 1990 bis 1994 die Ernst-Ludwig-Grundschule und ab 1994 das altsprachliche Rudi-Stephan-Gymnasium. Während meiner Schulzeit verbrachte ich drei Monate an der deutschen Schule in Quito, Ecuador (2000) und besuchte für ein Jahr die Libby Highschool in Libby, Montana, USA (2000-2001). 2003 erlangte ich mit dem Abitur die Allgemeine Hochschulreife.

Im Mai 2003 machte ich eine Ausbildung zur Rettungssanitäterin, an die ich 2004 direkt die Ausbildung zur Rettungsassistentin anschloss.

Im April 2005 nahm ich das Studium der Humanmedizin an der Georg-August-Universität in Göttingen auf. Den ersten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung absolvierte ich im April 2007.

Im Dezember 2007 nahm ich meine Forschungstätigkeit im Rahmen der Dissertation auf, und zwar bei Prof. Dr. med. Katrin Schäfer in der Arbeitsgruppe „Vaskuläre Biologie und Atheroskleroseforschung“ der Abteilung Kardiologie und Pneumologie an der Medizinischen Fakultät der Georg-August-Universität Göttingen.

Im Februar 2010 begann ich mein Praktisches Jahr im Rahmen meines Studiums der Humanmedizin in der Helios-Albert-Schweizer-Klinik Northeim. Während dieses Jahres verbrachte ich zwei Monate am Westmead Hospital, Sydney, Australien.

Im April 2011 legte ich den zweiten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung ab.

Seit Oktober 2011 bin ich als Assistenzärztin in Weiterbildung in der Klinik für Anästhesiologie der Universitätsmedizin Mainz (Direktor: Univ.-Prof. Dr. C. Werner) beschäftigt.