# Effekte von C1q/TNFα-related Protein 13 in mikro- und makrovaskulären Endothelzellen

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

des Fachbereichs Medizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Sina Nürnberger, geb. Göttlicher

aus Gießen

Gießen 2019

Aus dem Physiologischen Institut, unter der Leitung von Prof. Dr. Rainer Schulz,

des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Gutachterin: Frau Prof. Dr. Susanne Rohrbach

Gutachterin: Frau Prof. Dr. Veronika Grau

Tag der Disputation: 23.09.2020

Meinen Eltern gewidmet

# Inhaltsverzeichnis

1	Einle	eitung.	itung1						
	1.1	Das F	Das Fettgewebe als wichtiges endokrines Organ des menschlichen Körpers						
	1.2	Das A	Das Adiponektin						
	1.3	Die C	e C1q/TNFα-related Protein-Familie						
	1.4	Das C	C1q/TNFα-related Protein 13 (CTRP 13)	4					
	1.5	Signa	Ikaskaden	7					
		1.5.1	Die AMP-aktivierte Proteinkinase (AMPK)	7					
		1.5.2	Die Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK)	8					
			1.5.2.1 Die p38 Mitogen-aktivierte Proteinkinase (p38 MAPK)	8					
			1.5.2.2 Die p44/42 Mitogen-aktivierte Proteinkinase (p44/42 MAPK	)9					
	1.6	Die Er	ndothelzellen	10					
	1.7	Zellpro	oliferation und Zellmigration – Voraussetzungen für die Angiogenese	11					
	1.8	Der Z	elltod	12					
	1.9	Frage	stellung	14					
2	Mate	erial un	ıd Methoden	15					
	2.1	Mater	ial	15					
		2.1.1	Verwendete Reagenzien	15					
		2.1.2	Primer	18					
		2.1.3	Antikörper	20					
		2.1.4	Escherichia coli-Stämme	22					
		2.1.5	Gewebeproben für die physiologischen Experimente	23					
		2.1.5	Gewebeproben für die physiologischen Experimente	23 23					
		2.1.5	<ul> <li>Gewebeproben für die physiologischen Experimente</li></ul>	23 23 23					
		<ul><li>2.1.5</li><li>2.1.6</li></ul>	Gewebeproben für die physiologischen Experimente         2.1.5.1         Atriales Gewebe des Menschen (Patientenproben)         2.1.5.2         Ventrikuläres Gewebe von Ratten (Murine Proben)         Versuchstiere für die Gewinnung spezifischer kardialer Zellen	23 23 23 24					
		2.1.5 2.1.6	Gewebeproben für die physiologischen Experimente	23 23 23 24 24					
		2.1.5 2.1.6	<ul> <li>Gewebeproben für die physiologischen Experimente</li></ul>	23 23 23 24 24 24					
		<ul><li>2.1.5</li><li>2.1.6</li><li>2.1.7</li></ul>	Gewebeproben für die physiologischen Experimente	23 23 23 24 24 24 25					

2.2	Metho	den27
	2.2.1	RNA-Isolation
	2.2.2	Reverse Transkription
	2.2.3	Polymerase-Kettenreaktion
	2.2.4	Agarosegelelektrophorese
	2.2.5	Realtime-Polymerase-Kettenreaktion31
	2.2.6	Gelextraktion der PCR-Produkte und Klonierungsreaktion
	2.2.7	Plasmidpräparation (Mini-Präparation)
	2.2.8	Restriktionsanalysen isolierter Plasmide
	2.2.9	Sequenzierung
	2.2.10	Plasmidisolierung (Midi-Präparation)
	2.2.11	Proteinexpression in <i>E. coli</i> -Bakterien mit Histidin-Tag und Isolierung des Proteins mit Hilfe der Affinitätschromatographie (Nickelsäule)37
	2.2.12	Zellkultur und Zellstimulation
		2.2.12.1 Isolation, Kultivierung, Passagieren und Stimulation von mikrovaskulären Endothelzellen (MVEC)
		2.2.12.2 Isolation, Kultivierung, Passagieren und Stimulation von humanen Endothelzellen der Nabelschnur (Human Umbilical Vein Endothelial Cells = HUVEC)41
	2.2.13	Gesamtproteinisolation aus Endothelzellen42
	2.2.14	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese42
	2.2.15	Western Blot und Immunfärbung43
	2.2.16	Coomassie-Färbung44
	2.2.17	Zellproliferation45
		2.2.17.1 Proliferation der dispergierten MVEC-Kultur45
		2.2.17.2 Bromdesoxyuridin–Färbung proliferierender MVEC
		2.2.17.3 Proliferation der Monolayer-HUVEC-Kultur
	2.2.18	Apoptose Assay
	2.2.19	Immunzytochemie
	2.2.20	Statistische Verfahren

3	Erge	bnisse51							
	3.1	Gener	Generierung des rekombinanten CTRP 13-Proteins in <i>E. coli</i> -Bakterien51						
	3.2	Vergle Probei	ich der Expression von CTRP 13-mRNA in humanen und murinen n53						
		3.2.1	Expression von CTRP 13-mRNA im rechten Vorhof humaner Individuen						
		3.2.2	Expression von CTRP 13-mRNA im linken Ventrikel von Ratten mit unterschiedlichen Diäten						
	3.3	Das E der Ra	expressionsmuster von CTRP 13 in verschiedenen kardialen Zelltypen atte						
	3.4	Die int	razelluläre Lokalisation von CTRP 13 in Endothelzellen58						
	3.5	Einflus Endoth	ss von CTRP 13 auf die intrazelluläre Signaltransduktion in nelzellen						
		3.5.1	Einfluss von CTRP 13 auf die intrazelluläre Signaltransduktion mikrovaskulärer Endothelzellen						
		3.5.2	Einfluss von CTRP 13 auf die intrazelluläre Signaltransduktion makrovaskulärer Endothelzellen						
	3.6	Einflus	ss von CTRP 13 auf die Proliferation von Endothelzellen70						
		3.6.1	Einfluss auf das Proliferationsverhalten mikrovaskulärer Endothelzellen						
			3.6.1.1 Einfluss von CTRP 13 auf die Zellzahl von MVEC70						
			3.6.1.2 Bromdesoxyuridin–Färbung proliferierender MVEC71						
		3.6.2	Einfluss auf das Proliferationsverhalten makrovaskulärer Endothelzellen						
			3.6.2.1 Proliferation der Monolayer-HUVEC-Kultur73						
	3.7	Einflus	ss von CTRP 13 auf den Zelltod mikrovaskulärer Endothelzellen75						
4	Disk	ussion							
	4.1	Das E	xpressionsmuster von CTRP 1376						
		4.1.1	Kardiale Expression in Abhängigkeit von Alter und Ernährungsstatus 76						
		4.1.2	Differenzielle Expression bei Adipositas						
		4.1.3	Expression in verschiedenen kardialen Zelltypen79						

		4.1.4	Endotheliale Expression und intrazelluläre Lokalisation	80
	4.2 Einfluss von CTRP 13 auf die Phosphorylierung der AMPK, der p44/42 MAP und der p38 MAPK in Endothelzellen		2 MAPK	
	4.3	Einflus	s auf das Proliferations- und Migrationsverhalten von Endothelz	ellen .84
5	Zusa	mmenf	fassung	87
6	Sum	mary		88
7	Abki	irzungs	sverzeichnis	89
8	Abbi	Idungs	verzeichnis	92
9	Tabe	llenver	zeichnis	94
10	Liter	atur		95
11	Anha	ang		103
	11.1	Seque	nzierung	103
	11.2	Vektor	karten	109
		11.2.1	pCRII-TOPO CTRP 13 Maus	109
		11.2.2	pENTR/D-TOPO CTRP 13 mit Stop	109
		11.2.3	pDEST 17 CTRP 13 mit Stop	110
12	Publ	ikation	sverzeichnis	111
	12.1	Kongre	essbeiträge	111
13	Erklä	arung z	ur Dissertation	112
14	Dank	sagun	g	113
15	Tabe	llarisch	her Lebenslauf	114

## 1 Einleitung

In den modernen Industrienationen, aber auch in den sogenannten Schwellenländern steigt die Prävalenz der Adipositas (Body-Mass-Index (BMI)  $\geq$  30 kg/m<sup>2</sup>) kontinuierlich an (Deutsche Adipositas Gesellschaft (DAG), 2015). Insbesondere die damit assoziierten Krankheiten, wie der Diabetes mellitus Typ 2 oder kardiovaskuläre Erkrankungen, einschließlich des Bluthochdrucks, stellen für die Patienten aber auch für die jeweilige Volkswirtschaft eine erhebliche therapeutische Herausforderung dar. Aus diesem Grund sind Studien zu kausalen humoralen Mechanismen und die Analyse der endokrinen Abläufe im Fettgewebe Gegenstand der aktuellen Forschung [37].

# 1.1 Das Fettgewebe als wichtiges endokrines Organ des menschlichen Körpers

Seit der Entdeckung des Leptins als erstes Adipozytenhormon (= Adipokin) im Jahr 1994 rückt das Fettgewebe mit seiner Bedeutung als endokrines Organ zunehmend in den Fokus der Forschung [81]. Seine Funktion als zentrales Speicherorgan im Lipidmetabolismus und in der Thermogenese stellen offenbar nur einen Bruchteil seiner Bedeutung für den Organismus dar - gerade durch die Sezernierung verschiedener Botenstoffe nimmt das Fettgewebe auch entscheidenden Einfluss auf die unterschiedlichsten homöostatischen Funktionen des Körpers [52, 53, 64]. Für die Sekretion der Gesamtheit der Botenstoffe sind dabei nicht allein die Adipozyten verantwortlich: Im Fettgewebe finden sich weitere Zelltypen wie Fibroblasten, Endothelzellen oder Immunzellen, die ebenfalls humorale Stoffe sezernieren [18]. Die Fettgewebshormone Leptin und Adiponektin kontrollieren über ihre Beeinflussung der Insulinwirkung in erster Linie die Glukosehomöostase des Organismus. Über diesen Mechanismus spielen die Adipokine eine wichtige Rolle in der Pathogenese der peripheren Insulinresistenz, des Diabetes mellitus Typ 2, welcher als Volkskrankheit der Industrienationen in seiner Häufigkeit drastisch zunimmt [15, 81]. Durch die Bildung verschiedener Zytokine, wie Interleukin-6 (IL-6) oder Tumornekrosefaktor-a (TNF-a), spielt das Fettgewebe außerdem eine Rolle bei inflammatorischen Prozessen [53]. Neben diesen Effekten werden auch die Regulation des Blutdrucks und der Blutgerinnung durch vom Fettgewebe sezernierte Botenstoffe beeinflusst: Beispiele dafür sind die Bildung und Freisetzung von Angiotensinogen oder von Plasminogen-Aktivator-Inhibitor 1 (PAI 1) [15].

Wegen seiner vielseitigen metabolischen, sekretorischen und regulatorischen Funktionen muss das Fettgewebe als das volumenmäßig größte endokrine Organ des

menschlichen Körpers betrachtet werden. Im Folgenden liegt der Fokus auf dem Fettgewebshormon Adiponektin und dessen Strukturhomologen, den C1q/TNFαrelated Proteinen (CTRPs). Diese Proteine werden innerhalb verschiedener Spezies von diversen Organen sezerniert und besitzen unterschiedlichste Funktionen im Organismus [73]. Sie nehmen unter anderem Einfluss auf die metabolische Homöostase und stellen somit ein potenzielles Bindeglied zwischen der Adipositas und den damit assoziierten Krankheiten dar. Die CTRP-Familie umfasst 15 derzeit bekannte Mitglieder [51]. CTRP 13 wurde 2011 erstmals beschrieben und gehört somit zu den neueren Mitgliedern der Proteinfamilie [71]. CTRP 13 ist eines von mehreren Synonymen für ein Protein, das von einem Gen mit dem offiziellen Gennamen C1QL3 codiert wird. In der vorliegenden Arbeit wird ebenso wie in der gängigen Literatur der Name CTRP 13 verwendet [7, 71, 72].

#### 1.2 Das Adiponektin

Die erste Beschreibung von Adiponektin als Fettgewebshormon erfolgte 1995 durch Scherer et al. [54]. Das Serumprotein weist als Monomer ein Molekulargewicht von 30 Kilodalton (kDa) bei einer Komposition aus 247 Aminosäuren auf und wird fast ausschließlich von Adipozyten gebildet. Es ist aus vier Domänen aufgebaut: Eine Nterminale Signalsequenz mit einer nachfolgenden variablen artspezifischen Domäne, bestehend aus insgesamt 27 Aminosäuren; eine Kollagendomäne, die sich aus 22 repetitiven Gly-X-Y-Sequenzen zusammensetzt und eine aus 137 Aminosäuren bestehende C-terminale globuläre Domäne, die in ihrer Struktur homolog zum Komplementfaktor C1q ist (siehe Abbildung 1) [54]. Im Serum finden sich verschiedene Isoformen von Adiponektin, welche sich in Abhängigkeit von der jeweiligen Stoffwechselsituation ausbilden [54]. Anhand des Molekulargewichts werden drei Formen unterschieden: Das sogenannte LMW-Adiponektin (englisch: Low Molecular Weight) weist ein niedriges Molekulargewicht auf - als Trimer ~70 kDa [70]. Das Zusammenlagern zu höher organisierten Multimeren geschieht über die Ausbildung von Disulfidbrücken [54]. Die nächste Form mit einem mittleren Molekulargewicht wird dementsprechend als MMW-Adiponektin (englisch: Medium Molecular Weight) klassifiziert. Ein Beispiel für diese Unterform ist das Hexamer mit einem Molekulargewicht von ~140 kDa. Multimere (18-mer, 36-mer) mit einem höheren Molekulargewicht (~300 kDa) bezeichnet man als HMW-Adiponektin (englisch: High Molecular Weight) [70, 73, 76].

Die Serumlevel von Adiponektin differieren in Abhängigkeit von der metabolischen Situation des Organismus: Übergewichtige Individuen und Individuen mit Stadien von Insulin-Resistenz (z.B. Diabetes mellitus Typ 2) zeigen ein deutlich reduziertes Niveau an Plasma-Adiponektin; Gewichtsverlust und kalorische Restriktion gehen mit erhöhten Plasmaspiegeln einher [73]. Die Sekretion des Adipokins ist außerdem geschlechtsabhängig, wobei weibliche Individuen höhere Serumlevel aufweisen [73]. Interessanterweise zeigen auch Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen oder einer generellen Entzündungsreaktion im Organismus erniedrigte Level des Proteins im Blut [53]. Obwohl die erniedrigten Level also nicht allein durch einen Diabetes mellitus Typ 2 oder eine kardiovaskuläre Erkrankung bedingt sind, stellen sie dennoch einen aussagekräftigen Prädiktor zur Entwicklung der Krankheiten dar [53]. Adiponektin wirkt weiterhin der Atherosklerose in Gefäßen über eine Steigerung der endothelialen Angiogenese [42] und eine Reduktion des oxidativen Stresses entgegen [74]. Anti-inflammatorische Effekte werden unter anderem im Fettgewebe und in Makrophagen erreicht [40]. In Kardiomyozyten führt Adiponektin zu einer Reduktion der Apoptose, ebenso in Zellen des Immunsystems und in den Podozyten der Niere [78]. Auch in Endothelzellen konnten anti-apoptotische Effekte von Adiponektin über eine Aktivierung der AMP-aktivierte Proteinkinase (AMPK) gezeigt werden [29, 42].

Die metabolischen Effekte von Adiponektin werden maßgeblich über zwei Adiponektin-Rezeptoren vermittelt: Adiponektin-Rezeptor 1 (AdipoR1) und Adiponektin-Rezeptor 2 (AdipoR2) [76]. Diese transmembranären Rezeptoren ähneln in ihrer Struktur den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren und sind in der Lage Homo- und Heteromultimere auszubilden. AdipoR1 wird vornehmlich im Muskel exprimiert, AdipoR2 findet sich vorwiegend in der Leber [76]. Insulinresistenz führt zu einer signifikanten Herunterregulation beider Rezeptoren – eine Hochregulation in der Skelettmuskulatur und in der Leber wird daher als potenzieller therapeutischer Ansatz in der Behandlung der peripheren Insulinresistenz angesehen [48]. Nach der Bindung an Adiponektin-Rezeptoren, ist das wichtigste Enzym in der Vermittlung der metabolischen Effekte von Adiponektin die AMPK [77]. Über deren Phosphorylierung - und dadurch Aktivierung werden die Glukose-Aufnahme und die Fettsäure-Oxidation in Myozyten stimuliert. Auch die verringerte Glukose-Freisetzung aus Hepatozyen wird auf diesem Weg gesteuert [73]. Im Mausmodel impliziert die periphere Injektion von rekombinantem Adiponektin eine Steigerung der muskulären Fettsäureoxidation mit nachfolgender Verbesserung der Insulinwirkung. Die gleichzeitig beobachtete Reduktion des Körpergewichts ist am wahrscheinlichsten auf die Steigerung des Energieumsatzes zurückzuführen, da sich dieser Effekt unabhängig von der Kalorienzufuhr zeigt [45].

3

Das Fettgewebshormon Adiponektin hat einen Einfluss auf den gesamten Metabolismus eines Organismus und rückt vor allem durch seine Fähigkeit, die durch Übergewicht oder Diabetes mellitus verursachte periphere Insulinresistenz zu korrigieren, in den Fokus der aktuellen Forschung [13].

#### 1.3 Die C1q/TNFα-related Protein-Familie

Die Gruppe der CTRPs als hochkonservierte Paraloge des Adiponektins umfasst 15 derzeit bekannte Mitglieder (CTRP 1-15). Der strukturelle Aufbau dieser Peptidhormone mit 4 Domänen (C-terminale globuläre Kopfdomäne, eine variable Sequenz, eine Kollagendomäne und eine N-terminale Signalsequenz) ist bis auf Abweichungen in der jeweiligen Länge der einzelnen Sequenzen mit dem Aufbau von Adiponektin identisch [73]. Über die Ausbildung von Disulfidbrücken formiert sich wie bei Adiponektin die Basisstruktur der CTRPs, das Trimer [51]. Die Proteine werden in verschiedenen Geweben wie dem Fettgewebe oder dem Nierengewebe und in verschiedenen Zelltypen wie Herzmuskelzellen oder Skelettmuskelzellen exprimiert und weisen je nach metabolischer Situation des Organismus individuelle Serumspiegel auf. Auch zeigen sich - bei Mäusen und beim Menschen - Unterschiede in der Expression in Abhängigkeit vom Geschlecht [13].

Die CTRPs und das Adiponektin lassen sich der sognannten C1q/TNF-Superfamilie zuordnen: Sie enthalten eine C-terminale Domäne, welche homolog zum Komplementfaktor C1q ist und ähneln in ihrer dreidimensionalen Struktur dem TNF-α [71].

## 1.4 Das C1q/TNFα-related Protein 13 (CTRP 13)

Die erste Charakterisierung von CTRP 13 als Effektor der metabolischen Regulation erfolgte 2011 durch Wei *et al.* [71]. Sie definierten das Protein als ein weiteres hochkonserviertes Mitglied der CTRP-Familie mit einem Molekulargewicht von circa 36 kDa und einer Proteinstruktur, die in ihrer Organisation dem in Kapitel 1.2 beschriebenem Aufbau von Adiponektin gleicht: Ein N-terminal gelegenes Signalpeptid gefolgt von einer variablen Domäne mit 2 konservierten Cystein-Resten, einem Kollagenanteil mit 17 Wiederholungen der Aminosäuresequenz Gly-X-Y und einer Cterminalen Domäne, welche identisch zu derjenigen des Komplementfaktors C1q ist (Abbildung 1) [71].



Abbildung 1: Darstellung der Struktur von Adiponektin und CTRP 13 (modifiziert nach [54, 71, 73]).

Wie die anderen Mitglieder der CTRP-Familie formt auch CTRP 13 Dimere, Trimere oder höher organisierte Multimere, indem es Disulfidbrücken ausbildet. Im Serum formt es oligomere Komplexe mit einer Größe von > 350 kDa, deren genaue Organisation bisher unklar ist [71]. Es wurden bislang keine Isoformen des Proteins beschrieben [51].

Bei Mäusen liegt das Gen für CTRP 13 auf Chromosom 2A1, es besteht aus 2 Exons und weist eine Größe von 9,6 Kilobasen (kb) auf. Beim Menschen ist das Gen auf Chromosom 10p13 lokalisiert [51]. Innerhalb verschiedener Spezies zeigt sich CTRP 13 als hochkonserviertes Protein: Die Aminosäuresequenz von murinem CTRP 13 stimmt zu 100 % mit derjenigen von Menschen, Hunden, Kühen, Opossums und Pferden überein. Analysiert man die Aminosäuresequenz der C1q-Domäne, ergeben sich weitere Homologien des murinen CTRP 13 von 83-100 %, beispielsweise mit Schweinen oder Fröschen [71]. Die Struktur der C-terminalen globulären Domäne von CTRP 13 ähnelt mit einer Übereinstimmung von 89 % am meisten derjenigen von CTRP 10 [71], mit welchem es in vitro heteromere Komplexe bildet [51]. Adiponektin weist mit CTRP 13 eine Übereinstimmung für die globuläre Domäne von etwa 39 % auf [71].

Es zeigt sich, dass CTRP 13 vornehmlich im Fettgewebe von Mäusen und Menschen detektiert werden kann [71]. Dabei differiert die Höhe der mRNA-Expression deutlich: In den murinen Proben ist die Expression von CTRP 13 im Gehirn und im Fettgewebe vergleichbar, wohingegen die Fettgewebsexpression beim Menschen mehr als das 100-fache im Vergleich zur Gehirnexpression beträgt [71]. Bei Mäusen findet sich außerdem eine CTRP13-Expression in der Niere, dem Hoden, im Auge und in Lymphknoten. Eine schwächer ausgeprägte Expression wird im Herz, in der Milz, in der Leber, im Skelettmuskel, in der Plazenta, in der glatten Muskulatur, in der Prostata, im Thymus und im Uterus detektiert [71]. Im Vergleich dazu findet sich beim Menschen in der Leber und im Pankreas eine deutliche Expression und im Skelettmuskel, im

Herz, in der Milz, in der Prostata und im Kolon eine nachweisbare, wenn auch im Vergleich zum Fettgewebe schwächere, CTRP 13-Expression [71].

Die Fettgewebsexpression von CTRP 13 erfolgt im Gegensatz zu Adiponektin nur zu einem geringen Anteil von den Adipozyten: Die Sekretion geschieht vornehmlich von der sogenannten stromal vascular fraction (SVF; deutsch: Gefäßsystem des bindegewebigen Anteils) des Fettgewebes [71]. Dies konnte auch für andere Mitglieder der CTRP-Familie (CTRP 1, 2, 3, 5, 6, 7, 10) gezeigt werden [13, 73]. Die SVF enthält neben mesenchymalen Stammzellen auch Vorläuferzellen von Endothelzellen, von Zellen des Immunsystems und von Adipozyten [46]. Auffallend ist eine signifikant höhere Exprimierung von CTRP 13 in weiblichen Mäusen - dies ist sowohl in der SVF des Fettgewebes als auch frei zirkulierend im Serum nachweisbar [71]. Auch die Expressionsprofile von Adiponektin, CTRP 3 und CTRP 6 zeigen gleichartige Geschlechtsunterschiede mit deutlich höherer Expression in weiblichen Mäusen [73]. Neben dem Fettgewebe zeigt sich auch im Gehirn von Mäusen eine ausgeprägte Expression von CTRP 13 [71]. Das Protein scheint dabei auf zentraler Ebene einen entscheidenden Einfluss auf das Verhalten zu besitzen, da die zentrale Applikation von CTRP 13 im Mausmodel zu einer relevanten Reduktion der Nahrungsaufnahme und des Körpergewichts führt [7].

Auf eine mögliche Rolle von CTRP 13 für den Energiehaushalt lässt sich aus einem erhöhten mRNA-Level in männlichen Leptin-defizienten *ob/ob* Mäusen schließen [71]. Wei *et al.* demonstrierten weiterhin einen Einfluss auf den Glukosemetabolismus in Adipozyten, Hepatozyten und Skelettmuskelzellen: Die Behandlung der Zellen mit rekombinantem CTRP 13 führte über die Aktivierung der AMPK zu einer gesteigerten Glukoseaufnahme [71]. Wie Adiponektin verringert auch CTRP 13 die hepatische Glukose-Produktion [51] über eine Hemmung der mRNA-Expression wichtiger glukoneogenetischer Enzyme und verbessert damit die Lipid-induzierte Insulinresistenz in Hepatozyten [71].

#### 1.5 Signalkaskaden

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von CTRP 13 auf unterschiedliche Signalkaskaden evaluiert. Diese werden im Folgenden näher betrachtet.

## 1.5.1 Die AMP-aktivierte Proteinkinase (AMPK)

Das wichtigste Enzym in der Signaltransduktionskaskade von Adiponektin für die Vermittlung seiner metabolischen Effekte ist die AMPK [73, 77]. Die AMPK nimmt eine zentrale Rolle im Energiehaushalt eukaryotischer Zellen ein [20]. Als Indikator des Energiezustands dient dabei das Verhältnis von Adenosinmono- (AMP) bzw. Adenosindiphosphat (ADP) zu Adenosintriphosphat (ATP) [35]: Das Molekül ATP stellt den wichtigsten Energielieferanten der Zelle dar. Als Abbauprodukte beim Verbrauch von ATP entstehen ADP und AMP [19]. Erhöhte Spiegel dieser Moleküle weisen daher auf ein Energiedefizit der Zelle hin und führen zur Aktivierung der AMPK durch eine Phosphorylierung der Aminosäure Threonin an Position 172 (Thr 172) [21]. Als Ursache eines Energiemangels in der Zelle kommen beispielsweise metabolischer Stress durch Hypoxie oder ein gesteigerter Bedarf an energiereichen Substraten wegen eines erhöhten Verbrauchs (z.B. bei körperlicher Arbeit) in Betracht [19]. Auch verschiedene Hormone (beispielsweise Schilddrüsenhormone) aktivieren die AMPK und nehmen so Einfluss auf den Energiehaushalt der Zellen [32].

Die AMPK besteht aus drei Untereinheiten: Eine katalytische  $\alpha$ -Untereinheit sowie zwei regulatorische Untereinheiten  $\beta$  und  $\gamma$  [19]. Kommt es zu einem erniedrigten ATP-Spiegel bzw. eine Erhöhung von AMP und ADP, führt deren Bindung an die  $\gamma$ -Untereinheit zur Phosphorylierung der AMPK [34]. Über diese Phosphorylierung steigert das Fettgewebshormon Adiponektin die Glukose-Aufnahme und die Fettsäure-Oxidation in Myozyten und verringert die Glukose-Freisetzung aus Hepatozyen [73]. Auch CTRP 13 bewirkt eine Phosphorylierung der AMPK und steigert auf diesem Weg die Glukoseaufnahme in verschiedenen Zelltypen (z.B. Hepatozyten, Skelettmuskelzellen (L6 Myotuben)) [71].

Neben seinen Funktionen auf den Stoffwechsel nimmt die AMPK Einfluss auf Vorgänge wie das Zellwachstum, die Zellproliferation und die Zellpolarität [19]. Auch die bereits erwähnte Induktion der endothelialen Angiogenese durch Adiponektin geschieht über die AMPK-Signalkaskade [42].

#### 1.5.2 Die Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK)

Die Familie der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) spielt eine wichtige Rolle in der Funktion des Zellmetabolismus von Säugetieren und nimmt eine zentrale Stellung in der Signaltransduktion extrazellulärer Stimuli auf Zellproliferation, Zelldifferenzierung, Zellwachstum und Apoptose ein [80]. Die Familie umfasst 14 derzeit bekannte Mitglieder, welche sich verschiedenen Untergruppen zuordnen lassen. Die konventionellen Proteinkinasen werden dabei in 3 Gruppen eingeteilt [9]: Die p38 MAPK, die p44/42 MAPK - welche in der Literatur auch als extrazellulär Signal-regulierten Kinasen 1 und 2 (ERK1/2) bezeichnet wird - und die c-Jun Nterminale Kinasen 1, 2, und 3 (JNK1/2/3). Die Aktivierung dieser Serin/Threonin-Kinasen verläuft kaskadenartig [56]: Ein externer Stimulus führt zur Phosphorylierung einer MAPK-Kinase-Kinase (MAPKKK oder MEK-Kinase), welche anschließend eine MAPK-Kinase (MAPKK oder MEK) aktiviert [43]. Diese bewirkt dann die duale Phosphorylierung von Threonin- und Tyrosin-Resten der MAPK, wodurch die Zellantwort auf den Stimulus eingeleitet wird [9] - meist in Form einer Phosphorylierung regulatorischer Moleküle im Zytosol (enzymatische Prozesse) oder im Nukleus (spezifische Genexpression) der Zelle [49]. Die Inaktivierung der Kinasen geschieht durch Phosphatasen, welche den zuvor angehängten Phosphatrest wieder abspalten [43].

In der vorliegenden Arbeit wurde der Effekt von CTRP 13 auf die Phosphorylierung der p38 MAPK und der p44/42 MAPK in Endothelzellen untersucht. Diese Enzyme und ihre Eigenschaften werden im Folgenden näher erläutert.

#### 1.5.2.1 Die p38 Mitogen-aktivierte Proteinkinase (p38 MAPK)

Die p38 MAPK ist eine Serin/Threonin-Kinase, deren Aktivierung vor allem durch zelluläre Stressfaktoren induziert und über die duale Phosphorylierung der Aminosäuresequenz Thr-Gly-Tyr hervorgerufen wird. Typische Induktoren für die Phosphorylierung des Enzyms sind Wachstumsfaktoren wie z.B. VEGF, UV-Strahlung, Hypoxie, Ischämie, osmotische Veränderungen im Zellmilieu und Zytokine im Rahmen einer Inflammation wie beispielsweise der TNF- $\alpha$  [9, 12]. Die p38 MAPK nimmt eine zentrale Stellung im zellulären Metabolismus ein, da sie unter anderem über eine negative Regulation die Proliferation von Zellen beeinflussen kann. Des Weiteren kann das Enzym über transkriptionelle und posttranskriptionelle Mechanismen den programmierten Zelltod induzieren [9] – als Gegenpol zur Mitose stellt dieser einen für den Organismus essenziellen Vorgang dar, um das Gleichgewicht zwischen Zellteilung

und Zellabbau zu erhalten und so die Zellzahl zu regulieren [28]. Durch die Aktivierung proinflammatorischer Zytokine nimmt die p38 MAPK weiterhin eine zentrale Stellung im immunologischen Geschehen des Organismus ein [9]. Die vier bekannten Isoformen des Enzyms ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  und  $\delta$ ) werden durch unterschiedliche Gene kodiert und in Abhängigkeit vom Gewebetyp in unterschiedlichem Ausmaß exprimiert: Während die kodierenden Sequenzen der p38 $\alpha$ - und p38 $\beta$ -Isoform ubiquitär vorkommen, lässt sich die p38 $\gamma$ -Isoform vor allem im quergestreiften Skelettmuskel nachweisen. In der Lunge, der Niere, den Hoden und im Pankreas dominiert die Isoform p38 $\delta$ . Des Weiteren zeigen sich Unterschiede in Abhängigkeit vom Zelltyp: So wird die p38 $\alpha$ -Isoform vor allem in Makrophagen und die p38 $\beta$ -Isoform vor allem in Endothelzellen detektiert [30]. Die Phosphorylierung der p38 MAPK geschieht im Wesentlichen durch 2 MAPKK: Die MAPKK 3 und 6 [79]. Die Aktivierung der Untereinheiten ist dabei nicht homolog – beispielsweise kann die p38 $\beta$ -Isoform nicht durch die MAPKK 3 phosphorylierung der p38 $\alpha$ -Untereinheit dar [79].

#### 1.5.2.2 Die p44/42 Mitogen-aktivierte Proteinkinase (p44/42 MAPK)

Die extrazellulär Signal-regulierten Kinasen 1/2 (ERK1/2) werden entsprechend ihrer Molekülgröße von 44 bzw. 42 kDa auch als p44/42 MAPK bezeichnet. Da beide Enzyme in Aufbau und Funktion nahezu identisch sind (die Aminosäuresequenzen stimmen zu 84 % überein), werden sie häufig gemeinsam betrachtet [49]. Die p44/42 MAPK wird in nahezu allen Geweben exprimiert - eine hohe Expression zeigt sich in Gehirn, Skelettmuskel, Thymus und Herz [9]. Analog zu den anderen MAPK erfolgt die Aktivierung der Enzyme über eine duale Phosphorylierung an Threonin- und Thyrosin-Resten (Aminosäuresequenz Thr-Glu-Tyr). Typische Induktoren sind dabei unter anderem Wachstumsfaktoren wie PDGF (englisch: platelet-derived growth factor), EGF (englisch: epidermal growth factor) oder NGF (englisch: nerve growth factor), verschiedene Zytokine und eine osmotische Dysregulation der Zelle. Die direkte Aktivierung der Proteinkinasen geschieht dabei in Abhängigkeit vom extrazellulären Stimulus durch die MAPKK 1 oder 2, durch G-Protein-vermittelte Signalkaskaden oder durch die Autophosphorylierung des Tyrosin-Rests [9]. Das aktivierte Enzym gelangt dann in den Zellkern, wo es über die direkte Einflussnahme auf die Transkription die Proliferation, die Differenzierung und die Mitose der jeweiligen Zelle begünstigt [80].

#### 1.6 Die Endothelzellen

Die Endothelzellpopulation kleidet als einschichtiges Plattenepithel die innere Gefäßwand aus und stellt somit eine physikalische Barriere zwischen der Gefäßwand und dem Blutstrom dar [10]. In seiner Funktion als sogenannte "semipermeable Membran" kontrolliert das Endothel den Austausch von Molekülen zwischen dem Blut und dem umgebenden Gewebe [61]. Durch die Sekretion verschiedener Stoffe beeinflussen die Zellen außerdem den Gefäßtonus und die Blutstillung und initiieren Immun- und Entzündungsreaktionen. Dies geschieht über eine Stimulation glatter Muskelzellen oder Zellen des Immunsystems, welche durch die vom Endothel freigesetzten Stoffe aktiviert werden [61]. Die Funktion des Endothels variiert je nach der Lage im Organismus: In großen Gefäßen, wie beispielsweise der Aorta, unterbindet die glatte Oberfläche des auskleidenden Endothels die Anlagerung prokoagulatorischer und proinflammatorischer Moleküle. Außerdem wird die transendotheliale Passage atherogener Lipidpartikel in die Arterienwand inhibiert [14]. Das Endothel der Widerstandsgefäße ist maßgeblich an der Blutdruck-Regulation durch die Freisetzung vasodilatierender bzw. vasokonstringierender Mediatoren beteiligt. Im Bereich der Kapillaren wird vor allem der Austausch von Nährstoffen (z.B. Hormonen (z.B. Insulin) und die Glukose, Fett). Entsorgung von Stoffwechselendprodukten zwischen dem Gewebe und dem fließenden Blut durch das auskleidende Endothel reguliert [11].

Die in dieser Arbeit betrachteten Endothelzellen stammen aus unterschiedlich großen Gefäßen: Die humanen Endothelzellen aus den Gefäßen der Nabelschnur (Human Umbilical Vein Endothelial Cells = HUVEC) werden auch als makrovaskuläre Endothelzellen bezeichnet, da es sich um große Gefäße des Blutkreislaufs handelt. Die kardialen Endothelzellen der Ratte (Endothelzellen der Koronargefäße) werden im Folgenden als mikrovaskuläre Endothelzellen bezeichnet (mikrovaskuläre Endothelzellen der Ratte = MVEC), da sie aus kleinen Gefäßen des Blutkreislaufs stammen.

Die zentrale Bedeutung des Endothels für den Organismus wird vor allem in Hinblick auf Krankheiten wie die Atherosklerose und die daraus resultierende arteriellen Hypertonie, der Herzinfarkt und die Herzinsuffizienz deutlich, bei deren Genese die Dysfunktion der Endothelzellen eine entscheidende Rolle einnimmt [14]. Sie ist eine der frühesten Anomalien in der Entwicklung der Atherosklerose und spielt auch für die Progression der Krankheit eine maßgebliche Rolle [11]. Als Ursache wird dabei ein Missverhältnis von Vasokonstriktion und Vasodilatation - zugunsten der Vasokonstriktion – angenommen [69]. Diese Diskrepanz kommt wahrscheinlich durch eine verminderte Freisetzung von vasodilatierendem Stickstoffmonoxid (NO) durch die Endothelzellen zustande [1]. NO vermittelt außer dieser Vasodilatation noch eine Vielzahl weiterer Effekte, so dass der NO-Mangel auch die Koagulation, die Zelladhäsion und inflammatorische Prozesse begünstigt [68]. Der transendotheliale Transport atherogener Lipoproteine wird gefördert, was in der Summe die Entstehung und Progression der Atherosklerose weiter unterstützt. Auch die transkapillare Passage von Insulin wird beeinträchtigt, was die Insulinwirkung im Zielgewebe negativ beeinflusst [14]. Deshalb spielt die Dysfunktion des Endothels auch eine wichtige Rolle bei der Entwicklung der peripheren Insulinresistenz und damit für die Genese des metabolischen Syndroms. Gefäßschäden, die durch oxidativen Stress oder die Ablagerung von Lipiden getriggert werden, führen zu einer Entzündungsreaktion und zur Freisetzung von Zytokinen, welche die Insulinresistenz fördern und die endotheliale Dysfunktion weiter verschlechtern [11].

Interessanterweise scheint das Adipozytokin Adiponektin eine entscheidende Rolle in Bezug auf die endotheliale Dysfunktion einzunehmen: Niedrige Serumlevel des Fettgewebshormons korrelieren mit dem vermehrten Auftreten kardiovaskulärer Erkrankungen als Folge einer Dysfunktion des Endothels [4]. Adiponektin fungiert dabei als endogener Regulator der Endothelzellen, wenn diese beispielsweise proinflammatorischen Molekülen ausgesetzt sind [41].

# 1.7 Zellproliferation und Zellmigration – Voraussetzungen für die Angiogenese

Die Bildung neuer Blutgefäße durch Sprossung aus bereits bestehenden Gefäßen bezeichnet man mit dem Fachterminus "Angiogenese" [31]. Davon abzugrenzen ist die Vaskulogenese: Die dabei entstehenden Blutgefäße werden durch die primitiven Vorläuferzellen der Endothelzellen – die sogenannten Angioblasten – gebildet [47]. Aus der Literatur sind Effekte von Adiponektin auf die Neubildung von Gefäßen bekannt: Das Adipozytokin hemmt die endotheliale Angiogenese, indem es die Migration und Proliferation der Zellen beeinträchtigt [5] - die Signaltransduktion wird dabei in erster Linie über MAPK vermittelt [1]. Über die Signalkaskade der AMPK vermittelt es hingegen eine Induktion der Angiogenese [42].

Die Angiogenese ist ein für den Organismus essenzieller Mechanismus: Vorgänge wie die Wundheilung, die Regeneration von Geweben, die embryonale Entwicklung aber auch das Tumorwachstum wären ohne die Neubildung von Gefäßen nicht möglich [31]. Im Zentrum der Gefäßneubildung stehen die Endothelzellen, welche die Gefäßwand auskleiden, und die Perizyten, welche als Bindegewebszellen die Endothelzellen umgeben [16]. Um die Neubildung durch Sprossung aus bereits bestehenden Gefäßen zu ermöglichen, müssen die Endothelzellen wandern und sich vermehren – die Zellmigration und Zellproliferation sind daher essenzielle Bestandteile der Angiogenese [31, 50]. Als wichtiges Signalmolekül der Angiogenese wurde unter anderen der VEGF (englisch: vascular endothelial growth factor) identifiziert – ein Wachstumsfaktor, der die Proliferation und Migration der Endothelzellen stimuliert [63]. An der Signaltransduktion von VEGF sind im Wesentlichen MAPK beteiligt: Die p38 MAPK wird durch den Wachstumsfaktor aktiviert und moduliert daraufhin die Zellmigration. Die p44/42 MAPK greift in die Angiogenese ein, indem sie die Zellproliferation stimuliert [50].

#### 1.8 Der Zelltod

Wie bereits in Kapitel 1.2 beschrieben, führt Adiponektin in verschiedenen Zellarten zu einer Reduktion der Apoptose [78]. Sowohl für Kardiomyozyten als auch für Endothelzellen konnte in verschiedenen Studien die AMPK als zentrales Enzym der Signalkaskade identifiziert werden [29, 57]. In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von CTRP 13 auf den Zelltod von Endothelzellen untersucht. Aus diesem Grund werden im Folgenden allgemeine Aspekte des programmierten Zelltods (die sogenannte Apoptose) und der Nekrose erläutert. Am Ende steht dabei letztendlich das Absterben einer Zelle - die Abläufe und Reaktionen unterschieden sich allerdings grundlegend.

Die Apoptose als physiologisches endogenes Selbstzerstörungsprogramm der Zelle spielt ebenso wie die Zellproliferation eine wichtige Rolle für die Organisation und die korrekt verlaufenden physiologischen Prozesse eines Organismus [28]. Sie dient der Elimination überflüssiger, mutierter oder infizierter Zellen [22]. Folgen eines fehlerhaften Ablaufs der Apoptose können beispielsweise Autoimmunerkrankungen oder die Entartung von Zellen sein. Typische Auslöser des programmierten Zelltods sind Stoffwechselmetabolite und Chemikalien (z.B. Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), Zytostatika), physikalische Schädigung durch UV- oder Röntgenstrahlung, das Fehlen von Wachstumsfaktoren, Mutationen in der DNA der Zelle oder Effekte des Immunsystem (im Wesentlichen zytotoxische T-Lymphozyten) [26]. Es zeigt sich, dass die Apoptose ein in der Evolution hoch konservierter Mechanismus der Zell-Elimination ist, an dem im Wesentlichen drei Komponenten beteiligt sind: Die Mitochondrien, die Caspasen als zentrale Enzyme und die Familie der Bcl-2-Proteine [6]. Caspasen sind

Proteasen mit einem Cysteinrest im aktiven Zentrum, welche eine Spaltung ihrer Substrate hinter Aspartatresten bewirken. Sie liegen als inaktive Procaspasen im Zytoplasma vor und werden durch Proteolyse kaskadenartig aktiviert [6]. Die Bcl2-Familie lässt sich in anti-apoptotische und pro-apoptotische Proteine unterteilen. Sie induzieren eine Verringerung bzw. Erhöhung der Permeabilität der Mitochondrienmembran und nehmen so Einfluss auf den programmierten Zelltod. Zu den pro-apoptotischen Proteinen zählen Bid, Bax und Bad; zu den anti-apoptotischen Bcl-2 und Bcl-xL [23].

Man unterscheidet einen extrinsischen von einem intrinsischen Aktivierungsweg der Apoptose: Der extrinsische Weg wird dabei durch die Bindung von Liganden an Rezeptoren in der Zellmembran eingeleitet - Beispiele für diese sogenannten Todesrezeptoren und ihre Liganden sind TNFR1 oder Fas [6]. Nach der Ligandeninduzierten Trimerisierung des Rezeptors werden intrazelluläre Proteine aktiv und lösen schließlich die Aktivierung der Procaspase 8 aus, welche auch als Initiator-Caspase bezeichnet wird. Über die nun aktive Caspase 8 werden die Effektor-Caspasen 3 und 7 aktiviert, welche zur Fragmentierung der Zellbestandteile führen [23]. Außerdem kommt es zu einer Aktivierung pro-apoptotischer Mitglieder der Bcl-2-Proteinfamilie [6]. Der intrinsische Weg des programmierten Zelltods wird durch Schäden innerhalb der Mitochondrien ausgelöst, was zum Zusammenbruch ihres Membranpotenzials führt. Die Freisetzung pro-apoptotischer Faktoren induziert die Bildung des sogenannten "Apoptosoms" – ein Komplex bestehend aus Cytochrom c, Procaspase 9 und dem Protein Apaf-1. Daraufhin werden über die Caspase 9 wiederum die Effektor-Caspasen 3 und 7 aktiviert [23].

Charakteristisch für den programmierten Zelltod ist dabei - neben dem Ablauf eines genetisch festgelegten Programms - der Erhalt der äußeren Zellmembran. Diese wird bei der Nekrose als pathophysiologische Form des Zelltods zerstört [26]. Zeichen der Apoptose sind die Chromatin-Kondensation, die Fragmentierung der DNA und das Schrumpfen der gesamten Zelle, bedingt durch eine Kontraktion des Zytoskeletts und das Ausschleusen von Elektrolyten über Ionenpumpen [23, 28]. Die sogenannten "apoptotic bodies" stellen Abschnürungen der Zellmembran mit darin enthaltenen Zellfragmenten dar, welche von Makrophagen abgebaut werden, ohne dass eine Inflammation im umliegenden Gewebe der apoptotischen Zelle induziert wird [26]. Im Gegensatz dazu schwellen die Zellen bei der Nekrose wegen der erhöhten Permeabilität der Zellmembran an und platzen. Dieser unkontrollierte passiv ablaufende Vorgang löst eine Entzündungsreaktion durch das Freiwerden von

Zellbestandteilen (denaturierte Zelltrümmer) und die damit verbundene Aktivierung einer Immunreaktion aus [17].

## 1.9 Fragestellung

Das in dieser Arbeit fokussierte CTRP 13 weist eine dem Adiponektin sehr ähnliche Molekülstruktur auf. Die strukturellen Parallelen führen zu der Frage, ob auch Ähnlichkeiten in Hinblick auf Funktionen im Organismus bestehen. In der Literatur finden sich Hinweise auf eine Expression von CTRP 13 im Herzen von Menschen und Mäusen. Allerdings gibt es aktuell keine Daten zu potenziellen zellulären Effekten von CTRP 13 in diesem Organ, welches sich wiederum aus unterschiedlichen Zelltypen zusammensetzt. Daher wurden unter Einbeziehung der Funktionen von Adiponektin und CTRP 13 in anderen Gewebe- und Zelltypen folgende Fragestellungen entwickelt:

- (1) Welchen Einfluss nehmen Lebensalter und Body-Mass-Index (BMI) auf die rechtsatriale Expression von CTRP 13 beim Menschen?
- (2) Welchen Einfluss nimmt hochkalorische Diät auf die linksventrikuläre Expression von CTRP 13 im Tiermodel?
- (3) In welchen Zelltypen des Herzens wird CTRP 13 exprimiert?
- (4) Welche Signalkaskaden werden von CTRP 13 in Endothelzellen in vitro aktiviert? Sind diese aktivierten Signalwege mit den von Adiponektin aktivierten vergleichbar?
- (5) Kann CTRP 13 die Proliferation und Migration von Endothelzellen beeinflussen? Welche Signalkaskaden spielen hierbei eine Rolle?
- (6) Schützt CTRP 13 Endothelzellen vor dem programmierten Zelltod? Welche Signalwege spielen hierbei eine Rolle?

# 2 Material und Methoden

## 2.1 Material

## 2.1.1 Verwendete Reagenzien

In der folgenden Tabelle sind alle für die vorliegende Arbeit verwendeten Chemikalien in alphabetischer Reihenfolge mit Angabe des jeweiligen Lieferanten aufgelistet.

## Tabelle 1: Verwendete Chemikalien und deren Bezugsquelle.

Chemikalie	Lieferant
Acrylamid/Bis (Stammlösung: 40 g in 100 ml Wasser)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Adenin-9-β-D-Arabinofuranosid (Ara A)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Agarose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ammoniumperoxodisulfat (APS; Stammlösung: 1 g in 10 ml destilliertem Wasser)	Merck, Darmstadt
Ammoniumacetat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ampicillin (Stammlösung: 100 mg/ml in Wasser)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Borsäure	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Bromdesoxyuridin (BrdU; 1000x)	BioVision Inc., Milpitas (Kalifornien)
5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D- Galactopyranosid (X-Gal)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Chloroform, minimum 99 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Coomassie-Brilliant-Blau R-250	Ferak Berlin GmbH, Berlin
p-Cumarsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Desoxyribonukleosidtriphosphat-(dNTP)-Mix	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
D(+)-Glucose anhydrous	Fluka Chemie AG, Buchs (CH)
Diethylpyrocarbonat-Wasser (DEPC-Wasser)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Dithiothreitol (DTT; Stammlösung: 10 g in 100 ml Wasser)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Endothelial Cell Growth Medium C-22020	PromoCell GmbH, Heidelberg
Endothelial Cell Supplement Mix C-39225	PromoCell GmbH, Heidelberg
Endothelial Cell Supplement Mix C-39215	PromoCell GmbH, Heidelberg
Essigsäure	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ethanol	Honeywell Riedel-de Haën AG, Seelze
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Fetales Kälberserum (Fetal calfserum = FCS)	PAA Laboratories GmbH, Pasching (AU)

Gateway LR Clonase II Enzym-Mix Thermo Fisher Scientific, Langenselbold GelRed<sup>™</sup> Nucleic Acid Gel Stain Biotium, Haywood (USA) Gibco<sup>®</sup> Medium 199 Thermo Fisher Scientific, Langenselbold Gibco® PBS Tabletten (1 g in 100 ml Thermo Fisher Scientific, Langenselbold destilliertem Wasser) Gibco® Opti-MEM Medium Thermo Fisher Scientific, Langenselbold Glyzerin Carl Roth GmbH & Co. KG. Karlsruhe Glycin Carl Roth GmbH & Co. KG. Karlsruhe GoTaq<sup>®</sup> DNA Polymerase Promega GmbH, Mannheim Größenstandard: GeneRuler 1 kb DNA Ladder Thermo Fisher Scientific, Langenselbold Größenstandard: GeneRuler 100 bp DNA Thermo Fisher Scientific, Langenselbold Ladder Plus Größenstandard: MassRuler Low Range DNA Thermo Fisher Scientific, Langenselbold Ladder (Katalognummer: SM0383) Größenstandard: PageRuler Prestained Protein Fermentas GmbH, St. Leon-Rot Ladder Plus (Katalognummer: SM1811) Hefe-Extrakt Hanks' Balanced Salt solution (HBSS) Hoechst 33342 (Stammlösung: 20 mg/ml in Wasser) Imidazol Isoproterenol Isotone Natriumchloridlösung Isopropylthio-β-Galactosid (IPTG) Kaliumacetatlösung Luminol Lysogeny broth (LB) Agar Lysogeny broth (LB) Medium Mastermix Realtime-PCR Methanol Merck, Darmstadt Natriumacetat Natriumazid-Stammlösung (10 mg/ml in destilliertem Wasser) Natriumchlorid (NaCl) Natriumhydroxid (NaOH) Merck, Darmstadt Oxalacetat Biochrom KG, Berlin Penicillin/Streptomycin-Stammlösung (Penicillin: 10.000 Units/ml; Streptomycin: 10.000 µg/ml)

Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe B. Braun Melsungen AG, Melsungen AppliChem GmbH, Darmstadt Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe Thermo Fisher Scientific, Langenselbold Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim 16

PfuUltra HF DNA Polymerase	Stratagene, Heidelberg
Phosphatase Inhibitor Cocktail (Katalognummer P0044; 1 ml Cocktail-Lösung in 100 ml Extraktionspuffer)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ponceau S	Merck, Darmstadt
Primer (diverse)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Propidiumiodid (Stammlösung: 1 mg/ml in	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Wasser) Protease Inhibitor Cocktail (Katalognummer P2714; 1 ml Cocktail-Lösung in 100 ml Extraktionspuffer)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Proteinase K-Lösung (20 mg/ml)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Random Primer	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Restriktionsenzyme (diverse)	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Reverse Transkriptase	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
RNase A	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
RNase Inhibitor	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
RNase Out	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
RT-Puffer	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
ROX reference dye	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Salzsäure	Honeywell Riedel-de Haën AG, Seelze
SB202190	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
SDS Ultrapur	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
SYBRgreen Supermix	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
N, N, N', N'-Tetramethylendiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB)- Substratlösung	BioVision Inc., Milpitas (Kalifornien)
Io-Pro 3 642/661	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
TRIzol-Reagenz	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Trockenmilchpulver	AppliChem GmbH, Darmstadt
0,5 % Trypsin-EDTA (Stammlösung: 1:10 in Wasser)	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold
Trypan-Blau Lösung 0,4 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Tween 20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
U0126	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Wasserstoffperoxid 30 %	AppliChem GmbH, Darmstadt

## 2.1.2 Primer

Die gentechnischen Methoden der Dissertationsarbeit wurden mit Hilfe der nachfolgend aufgelisteten Primer durchgeführt.

Tabelle 2: Eigenschaften des zur Klonierung	g eingesetzten	Primers (Lieferant:	Invitrogen
GmbH, Karlsruhe).			

CTRP 13 (Maus)					
Sequenz (5' $\rightarrow$ 3')	sense: ATGGTGCTTCTGCTGGTC				
	antisense: ATCAGTCAGCATAAATAATAAATCCA				
Position	sense: 18-35				
	antisense: 786-761				
Kodierende Sequenz	18-785				
Fragmentlänge (bp)	768				
Genbanknummer	NM_153155.2				

Tabelle	93:E	igenschaften	der für	die	Realtime-PCR	eingesetzten	Primer	(Lieferant	aller
Primer:	: Invit	rogen GmbH,	Karlsru	he).					

CTRP 13 (Human)					
Sequenz (5' $\rightarrow$ 3')	sense: GGAAACCACTACGACCCCAC				
	antisense: CACTAGCACGCACCTGGTT				
Position	sense: 1397-1416				
	antisense: 1541-1523				
Kodierende Sequenz	941-1708				
Fragmentlänge (bp)	144				
Genbanknummer	NM_001010908.1				
	CTRP 13 (Ratte)				
Sequenz (5' → 3')	CTRP 13 (Ratte) sense: CATCCTCATCCCGGTGCT				
Sequenz (5' → 3')	CTRP 13 (Ratte) sense: CATCCTCATCCCGGTGCT antisense: TTTGGGACCCTGGATGAAAG				
Sequenz (5' → 3') Position	CTRP 13 (Ratte) sense: CATCCTCATCCCGGTGCT antisense: TTTGGGACCCTGGATGAAAG sense: 18-35				
Sequenz (5' → 3') Position	CTRP 13 (Ratte) sense: CATCCTCATCCCGGTGCT antisense: TTTGGGACCCTGGATGAAAG sense: 18-35 antisense: 189-170				
Sequenz (5' → 3') Position Kodierende Sequenz	CTRP 13 (Ratte) sense: CATCCTCATCCCGGTGCT antisense: TTTGGGACCCTGGATGAAAG sense: 18-35 antisense: 189-170 1-768				
Sequenz (5' → 3') Position Kodierende Sequenz Fragmentlänge (bp)	CTRP 13 (Ratte) sense: CATCCTCATCCCGGTGCT antisense: TTTGGGACCCTGGATGAAAG sense: 18-35 antisense: 189-170 1-768 171				

GAPDH (Human)					
Sequenz (5' $\rightarrow$ 3')	sense: CATCACCATCTTCCAGGAGGG				
	antisense: GGTTCACACCCATGACGAACA				
Position	sense: 295-313				
	antisense: 485-465				
Kodierende Sequenz	175-1182				
Fragmentlänge (bp)	290				
Genbanknummer	NM_002046.4				
	GAPDH (Ratte)				
Sequenz (5' → 3')	GAPDH (Ratte) sense: AGTGCCAGCCTCGTCTCATA				
Sequenz (5' → 3')	GAPDH (Ratte) sense: AGTGCCAGCCTCGTCTCATA antisense: GATGGTGATGGGTTTCCCGT				
Sequenz (5' $\rightarrow$ 3') Position	GAPDH (Ratte) sense: AGTGCCAGCCTCGTCTCATA antisense: GATGGTGATGGGTTTCCCGT sense: 50-69				
Sequenz (5' $\rightarrow$ 3') Position	GAPDH (Ratte) sense: AGTGCCAGCCTCGTCTCATA antisense: GATGGTGATGGGTTTCCCGT sense: 50-69 antisense: 297-278				
Sequenz (5' → 3') Position Kodierende Sequenz	GAPDH (Ratte) sense: AGTGCCAGCCTCGTCTCATA antisense: GATGGTGATGGGTTTCCCGT sense: 50-69 antisense: 297-278 76-1077				
Sequenz (5' → 3') Position Kodierende Sequenz Fragmentlänge (bp)	GAPDH (Ratte) sense: AGTGCCAGCCTCGTCTCATA antisense: GATGGTGATGGGTTTCCCGT sense: 50-69 antisense: 297-278 76-1077 247				

Tabelle 4: Eigenschaften der für die Sequenzierung der Plasmide eingesetzten Primer(Lieferant: Thermo Fisher Scientific, Langenselbold).

M13 forward					
Sequenz (5' $\rightarrow$ 3')	sense: GTAAAACGACGGCCAG				
	SDC				
	56				
Sequenz (5' $\rightarrow$ 3')	sense: ATTTAGGTGACACTATAG				

# 2.1.3 Antikörper

Für die immunologischen Nachweisverfahren wurden Antiseren verwendet, die in den nachfolgenden Tabellen nach Lieferant, Ursprungstierart und Arbeitsverdünnung aufgelistet sind.

Taballa 5. Auflictum	a dar für Wastarn	RIAT Analysan	vorwondoton	nrimäron Anti	körnar
Tabelle J. Aumstung	y uci iui westeili	Diol Analysen	verwendeten	ριππαι επ Απα	κυι μει .

Antikörper	Firma	Spezies	eingesetzte
, unincorpor		0002100	Verdünnung
Anti-phospho AMPKα	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers (USA)	Kaninchen	1:500
Anti-AMPKa	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers (USA)	Kaninchen	1:1000
Anti-GAPDH	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers (USA)	Kaninchen	1:5000
Anti-phospho Akt (Serin 473)	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers (USA)	Kaninchen	1:500
Anti-phospho Akt (Threonin 308)	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers (USA)	Kaninchen	1:1000
Anti-Akt	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers (USA)	Kaninchen	1:1000
Anti-phospho p38 MAPK	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers (USA)	Kaninchen	1:1000
Anti-p38 MAPK	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers (USA)	Kaninchen	1:1000
Anti-phospho p44/42 MAPK	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers (USA)	Kaninchen	1:1000
Anti-p44/42 MAPK	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers (USA)	Kaninchen	1:1000
Anti-Polyhistidin-Tag (Anti-His-Tag)	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers (USA)	Maus	1:1500

Antikörper	Firma	Spezies	eingesetzte Verdünnung
Anti-Kaninchen-IgG- HRP-gekoppelt	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg	Ziege	1:10.000
Anti-Maus-IgG-HRP- gekoppelt	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg	Ziege	1:10.000

Tabelle 6: Auflistung der für Western Blot Analysen verwendeten sekundären Antikörper.

# Tabelle 7: Auflistung der verwendeten primären Antikörper für die konfokale Mikroskopie.

Antikörper	Firma	Spezies	eingesetzte Verdünnung
Anti-CD31	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold	Maus	1:50
Anti-CTRP 13	BIOZOL Diagnostica Vertrieb GmbH, Eching	Kaninchen	1:50

Tabelle	8:	Auflistung	der	verwendeten	sekundären	Antikörper	für	die	konfokale
Mikrosk	opie	9.							

Antikörper	Firma	Spezies	eingesetzte Verdünnung
Anti-Maus-IgG-FITC- gekoppelt	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim	Schaf	1:100
Anti-Kaninchen-IgG-Cy3- gekoppelt	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim	Schaf	1:100

# 2.1.4 Escherichia coli-Stämme

Sowohl für die Vermehrung von Plasmiden mit dem CTRP 13-Gen als auch für die Expression des CTRP 13-Proteins wurden die Methoden der Mikrobiologie in *Escherichia coli* (*E. coli*) Kulturen genutzt. Die dafür verwendeten *E. coli*-Stämme und ihre Bezugsquelle sind in der nachfolgenden Tabelle aufgelistet:

Tabelle 9: Verwendete E.	coli-Stämme mit	Genotyp und	d Bezugsquelle.

Stamm	Genotyp	Bezugsquelle
BL21 Rosetta	$F^{-}$ ompThsdS <sub>B</sub> (R <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) galdcm $\lambda$ (DE3 [lacl lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5]) pLysSRARE (Cam <sup>R</sup> )	Stratagene, Heidelberg
	F'[laclq Tn10(tetR)] mcrA Δ(mrr-hsdRMS-	
Тор 10	mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 deoRnupG	Thermo Fisher Scientific,
	recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697	Langenselbold
	galUgalKrpsL(StrR) endA1 λ-	

## 2.1.5 Gewebeproben für die physiologischen Experimente

Um die physiologischen Effekte von CTRP 13 zu analysieren, wurde die mRNA aus Gewebeproben von Menschen und Ratten verwendet.

## 2.1.5.1 Atriales Gewebe des Menschen (Patientenproben)

Die verwendete RNA stammte aus Proben des rechten Herzohres von männlichen Patienten, welche sich einer herzchirurgischen Bypass-Operation unterziehen mussten. Die Proben wurden von der Klinik für Herz- und Thoraxchirurgie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg bereitgestellt (Ethikvotum: Aktenzeichen 65/10) Es wurden 4 Gruppen mit jeweils 15 Patienten in Abhängigkeit von Alter und BMI generiert: Ein BMI zwischen 18,5 und 25 kg/m<sup>2</sup> führte zum Einschluss in die Gruppe "normosom", ein BMI > 30 kg/m<sup>2</sup> in die Gruppe "adipös". Als "jung" wurden Patienten mit einem Lebensalter unter 55 Jahren gewertet, als "alt" mit einem Lebensalter von mehr als 70 Jahren. Als Ausschlusskriterien galten das Vorliegen eines Diabetes mellitus, eine reduzierte linksventrikuläre Pumpfunktion (Ejektionsfraktion < 55 %), vergrößerte Vorhöfe und das Vorhandensein von Arrhythmien [38].

## 2.1.5.2 Ventrikuläres Gewebe von Ratten (Murine Proben)

Die für den späteren Einsatz in der Realtime-PCR verwendete RNA stammte aus Proben des linken Ventrikels männlicher Ratten des Wistar-Auszuchtstammes der Firma Charles River Laboratories (Deutschland). Die Tiere hatten freien Zugang zu Wasser und wurden einem hell/dunkel Rhythmus von 12/12 h ausgesetzt. Es wurden 6 Gruppen mit jeweils 14 Tieren in Abhängigkeit von Alter und Nahrung generiert: Tiere mit einem Lebensalter von 3 Monaten wurden als "jung" gewertet, Ratten mit einem Lebensalter von 18 Monaten als "alt". Die Tiere erhielten über 16 Wochen entweder eine Kontrolldiät (Haltungsdiät, HD; 2,400 cal/g; Altromin), eine fettarme Diät (Low Fat Diet, LFD; 3,850 cal/g, Research Diets) oder hochkalorische Nahrung (High Fat Diet, HFD; 4,730 cal/g, Research Diets) [3]. Die Tiere wurden konventionell gehalten mit Zugangsbeschränkung und Barriere. Es erfolgten regelmäßige Gesundheitskontrollen und Hygienemonitoring gemäß FELASA-Empfehlungen. Die RNA wurde für die cDNA-Synthese und die daran anschließende Realtime-PCR verwendet.

## 2.1.6 Versuchstiere für die Gewinnung spezifischer kardialer Zellen

## 2.1.6.1 Kardiale Zellen der Ratte

Für die Gewinnung kardialer Endothelzellen wurden Rattenherzen von männlichen Wistar-Hannover-Ratten (Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle, Frankreich) mit einem Gewicht von ca. 300 Gramm und einem Alter zwischen 3-4 Monaten verwendet. Sie hatten freien Zugang zu Wasser und Standardfutter (Altromin). Spezielle Hygieneanforderungen für die Haltung wurden nicht gestellt. Die Sektion der Tiere, die Präparation der Herzen und die Isolation der verschiedenen Zellarten wurden nach dem Protokoll von Schlüter *et al.* von Mitarbeitern des Physiologischen Instituts der Justus-Liebig-Universität Gießen durchgeführt [55]. Auch die im Kapitel 3.3 verwendeten Zellen (adulte Kardiomyozyten, kardiale Fibroblasten, linker Ventrikel) stammten von diesen Tieren.

## 2.1.6.2 Neonatale Ratten-Kardiomyozyten

Die in Kapitel 3.3 verwendeten Proben der neonatalen Kardiomyozyten stammten von männlichen Ratten des Wistar-Auszuchtstammes der Firma Charles River Laboratories (Deutschland). Die Proben wurden von der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg bereitgestellt und waren eine Schenkung an Frau Prof. Dr. Müller-Werdan.

# 2.1.7 Verwendete Kit-Systeme

## Tabelle 10: Verwendete Kit-Systeme und deren Bezugsquelle.

BrdU Cell Proliferation Assay Kit	BioVision Inc., Milpitas (Kalifornien)
CELLecion™ Pan Mouse IgG Kit	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
EndoTrap <sup>®</sup> red Kit	Hyglos GmbH, Bernried
E.Z.N.A.® Plasmid Miniprep Kit II	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
pENTR™/D-TOPO™ Cloning Kit	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold
peqGOLD Gel Extraction Kit	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Pierce <sup>®</sup> BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold
Pierce® LAL Chromogenic Endotoxin Quantitation	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold
Kit	
Platinum <sup>®</sup> SYBR <sup>®</sup> Green qPCR SuperMix-UDG	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Pure Link TM Hi Pure Plasmid Midiprep Kit	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
TOPO TA Cloning <sup>®</sup> Kit for Sequencing	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

## 2.1.8 Geräte

Tabelle 11: Verwendete Geräte und deren Bezugsquelle.

Brutschrank BBD 6220 Heraeus Fusion Fx7 Detektionssystem Feinwaage ALJ 160-4NM Infusionsspritzenpumpe Perfusor<sup>®</sup> JuLI<sup>™</sup> Br Live Cell Analyzer Mikroplatten-Lesegerät Infinite TM Mikroskop Olympus IX70

Mikroskop TMS-F Typ 102 Monitor Typ Observation Monitor Nano Drop® ND-1000 Schüttler KS 250 basic Schwenkschüttler Unitwist R7 Thermocycler Mx3000P Thermocycler T3 Ultraschallstoßgerät Labsonic U UV-Tisch Vortexmischer Top-Mix 11118 Zentrifuge Heraeus Fresco 17 Zentrifuge Heraeus Labofuge 400 Thermo Fisher Scientific, Langenselbold Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen Kern GmbH, Balingen B. Braun AG, Melsungen Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen M200 Tecan Group Ltd., Männedorf Olympus Europa SE & Co. KG, Hamburg Nikon GmbH, Düsseldorf Philips Deutschland GmbH, Hamburg Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen Schütt Labortechnik, Göttingen Kisker-Biotech, Steinfurt Stratagene Co., La Jolla (USA) Biometra GmbH, Göttingen B. Braun AG, Melsungen Schütt Labortechnik GmbH, Göttingen Fisher Scientific GmbH, Schwerte Thermo Fisher Scientific, Langenselbold Thermo Fisher Scientific, Langenselbold

## 2.2 Methoden

## 2.2.1 RNA-Isolation

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden physiologische Effekte von CTRP 13 in humanen und murinen Gewebeproben analysiert. Die benötigte RNA musste dazu aus den Proben isoliert werden.

Zunächst wurde das Zellmedium entfernt und TRIzol-Reagenz hinzugefügt (1 ml pro 50-100 mg Gewebe). Mit Hilfe des Zellschabers wurden die Zellen gelöst und in ein 1,5 ml Probenröhrchen überführt. Durch mehrmaliges vorsichtiges Durchmischen mit einer Pipette wurde die Lösung homogenisiert. Die Proben konnten dann direkt weiterverarbeitet oder zunächst bei -80° C eingefroren werden. Zur weiteren Verarbeitung wurden die Proben dann gegebenfalls für 10 min bei Raumtemperatur aufgetaut und sodann mit Chloroform im Verhältnis 1:5 mit der verwendeten Menge an TRIzol-Reagenz versetzt. Die Homogenisierung erfolgte durch Schütteln auf dem Vortexmischer. Die Proben wurden danach für ca. 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend bei 17000 x g für 15 min bei 4°C zentrifugiert. Bei der Zentrifugation bildeten sich insgesamt drei Phasen – zur Isolation der RNA benötigte man die wässrige Oberphase, welche mit Hilfe einer Pipette in ein neues Probenröhrchen transferiert wurde. Zu der abgezogenen Lösung wurde dann Isopropanol im Verhältnis 1:2 an eingesetztem TRIzol gegeben. Nach einer kurzen Durchmischung erfolgte die 10-minütige Inkubation auf Eis. Die Präzipitation der RNA gelang durch eine 30-minütige Zentrifugation bei 17000 x g und 4°C. Nach Entfernen des Überstands erfolgte das Waschen des RNA-Pellets mit 75 %igem Ethanol und anschließend die erneute Zentrifugation für 5 min bei 4°C mit 17000 x g. Der Wasch-Schritt wurde wiederholt und es folgte eine dritte Zentrifugation unter den oben genannten Bedingungen. Der Überstand wurde mit einer Pipette vorsichtig entfernt und das entstandene Pellet kurz bei Raumtemperatur getrocknet. Anschließend wurde die isolierte RNA in DEPC-Wasser gelöst und auf Eis gelagert beziehungsweise bei -80°C bis zur weiteren Verwendung eingefroren. Die Konzentration der gewonnen RNA wurde am Photometer bestimmt und gegebenfalls verdünnt. Anschließend wurden die Proben bei -80°C gelagert oder direkt für die reverse Transkription weiterverwendet. Da es sich bei RNA um ein instabiles Molekül handelt, sind Qualitätskontrollen erforderlich. Zum einen gelingt dies mit dem Auftragen und Analysieren eines RNA-Agarosegels. Bei intakter RNA sind bei der jeweiligen Probe im Gel zwei deutlich getrennte Banden zu erkennen: Die 28s-rRNA- und die 18s-rRNA-Bande. Unterhalb dieser Banden kann die 5s-rRNA-Bande zu sehen sein. Abbildung 2 zeigt exemplarisch ein solches RNA-Gel.



#### Abbildung 2: Exemplarisches RNA-Agarosegel

Dargestellt sind die RNA-Banden nach der Gelelektrophorese. Die obere Bande ist die 28srRNA, die untere Bande die 18s-rRNA. Die 5s-rRNA-Bande und genomische DNA sind nicht zu sehen. Verwendeter Größenstandard: GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific).

Außerdem wurde die Reinheit der RNA-Proben durch Bestimmung des Verhältnisses der UV-Absorption bei 260 nm und 280 nm bestimmt: Ebenso wie Nukleinsäuren absorbieren auch Proteine und andere organische Komponenten bei einer Wellenlänge von 260 nm. Durch die zusätzliche Analyse der Absorption bei 280 nm, welche dann vornehmlich Proteine absorbiert, gelingt eine Aussage zur Reinheit: Ein Verhältnis größer 2,0 zeigt dabei eine reine RNA-Probe ohne Verunreinigungen an. Eine Aussage über die RNA-Qualität gelingt weiterhin mit der sogenannten *RNA integrity number* (RIN): Ein Wert von 10 repräsentiert eine intakte, nicht degradierte RNA, ein Wert von 1 steht für degradierte RNA von geringer Qualität. Die eingesetzte RNA hatte stets einen RIN-Wert zwischen 9 und 10.

# 2.2.2 Reverse Transkription

Mit Hilfe der reversen Transkription (RT) konnte aus der vorliegenden mRNA eine dazu komplementäre DNA (cDNA) synthetisiert werden. Dazu wurden 10 µl einer Lösung aus RNA (Konzentration 500 ng) und DEPC-Wasser verwendet. Im Thermocycler (Biometra GmbH, Göttingen) erfolgte zunächst die Denaturierung bei 72°C für 3 min. Danach wurde der RT-Mastermix (Tabelle 12) hinzugefügt und der Ansatz für 1 h bei 42°C inkubiert. Die abschließende Inaktivierung der reversen Transkriptase erfolgte durch eine Temperaturerhöhung auf 95°C für 1 min. Anschließend wurden die Proben mit dem äquivalenten Volumen an sterilem Wasser verdünnt und bei -20°C bis zu ihrer Verwendung bei der Polymerase-Kettenreaktion eingefroren.

RT-Mastermix	Volumen
RT-Puffer	5 µl
12,5 mM dNTP Mix	1 µl
Random Primer (3 µg/µl)	3 µl
RNase Inhibitor (40 U/µI)	0,25 µl
Reverse Transkriptase (200 U/µl)	0,25 µl
DEPC-Wasser	5,5 µl

Tabelle 12:	Zusammensetzung	des	RT-Mastermix.
-------------	-----------------	-----	---------------

# 2.2.3 Polymerase-Kettenreaktion

Die Amplifikation der nach 2.2.2 gewonnenen cDNA erfolgte mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (englisch: polymerase chain reaction, PCR) unter Verwendung von Tag-Polymerasen verschiedener Hersteller. Zwei Ansätze wurden verwendet: Der erste Ansatz nutzte die Mango-Taq-Polymerase, der zweite die Go-Taq-Polymerase. Für beide Ansätze wurden 2 µl der cDNA mit 23 µl des jeweiligen Mastermix (Tabellen 13 und 14) versetzt und im Thermocycler (Biometra GmbH, Göttingen) denaturiert (zunächst 2 min bei 95°C, dann 30 s bei 95°C). Anschließend wurde der Ansatz für 30 s auf 60°C abgekühlt, um die Anlagerung der Primer zu ermöglichen. Die Synthese der DNA-Stränge erfolgte in zwei Schritten: zunächst 30 s bei 72°C, dann 2 min bei 72°C. Zykluswiederholungen wurde Die Anzahl der in Abhängigkeit von der Expressionsstärke der zu synthetisierenden DNA gewählt. Neben den zu untersuchenden Proben wurde stets eine Wasserkontrolle durchgeführt: Anstelle einer
Probe wurde steriles Wasser pipettiert, um die Sensitivität der PCR zu sichern und eine Kontamination auszuschließen. Außerdem wurde jeweils eine Reaktion durchgeführt, in welcher statt cDNA RNA pipettiert wurde.

Tabelle	13: Zusammensetzung	des	Mastermix	für	die	Mango-Taq-Polymerase	(Bioline
GmbH,	Luckenwalde).						

Mastermix Mango-Taq-Polymerase	Volumen
5x Mango-Taq-Puffer	5 µl
100 μM dNTP Mix	3 µl
50 mM MgCl <sub>2</sub>	2 µl
Sense-Primer (10 pmol)	0,5 µl
Antisense-Primer (10 pmol)	0,5 µl
H <sub>2</sub> O	11,75 µl
<i>Mango-Taq</i> DNA-Polymerase (5 U/μl)	0,25 µl

Tabelle 14: Zusammensetzung des Mastermix für die Go-Taq-Polymerase (Promega GmbH, Mannheim).

Mastermix Go-Taq-Polymerase	Volumen
5x Go-Taq-Puffer	5 µl
100 μM dNTP Mix	3 µl
25 mM MgCl <sub>2</sub>	1,5 µl
Sense-Primer (10 pmol)	0,5 µl
Antisense-Primer (10 pmol)	0,5 µl
H <sub>2</sub> O	12,375 µl
Go-Taq DNA-Polymerase (5 U/µl)	0,125 µl

#### 2.2.4 Agarosegelelektrophorese

Zur elektrophoretischen Auftrennung wurden die nach 2.2.3 gewonnen PCR-Proben sowie ein Größenstandard (1 kb DNA-Ladder; Fermentas GmbH) auf ein Agarosegel (1 % Agarose in 1x TBE-Puffer) aufgetragen und die angelegte Spannung in Abhängigkeit von der Gelgröße zwischen 80-140 V gewählt. Zur Herstellung des Gels wurde die Agarose in TBE-Puffer aufgekocht, mit GelRed<sup>™</sup> (1:50.000) versetzt und in eine mit Kämmen bestückte Gelkammer gegossen. Nach der Polymerisation des Gels wurden die Kämme entfernt und die Proben sowie der Größenstandard aufgetragen. Die Elektrophorese-Kammer wurde mit TBE-Puffer befüllt. Zur optischen Darstellung wurde das Gel im UV-Transluminator (Fusion Fx7 Detektionssystem, Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen) fotografiert und die entstandenen Banden mit Hilfe des Computerprogramms QuantityOne (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) analysiert.

#### 2.2.5 Realtime-Polymerase-Kettenreaktion

Das Prinzip der Realtime-Polymerase-Kettenreaktion (Realtime-PCR) beruht auf Fluoreszenz-Messungen der DNA-Amplifikation einer Probe in Echtzeit. Das Fluoreszieren wird durch Farbstoffe hervorgerufen, welche sich an die DNA anlagern. Im Gegensatz zur Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR, Kapitel 2.2.2 und 2.2.3) kann hier zusätzlich eine Quantifizierung der enthaltenen DNA-Menge erfolgen, da die Fluoreszenz in Abhängigkeit von der sich bildenden Menge an Nukleinsäuren zunimmt [24]. Für die Durchführung wurde der Thermocycler Mx3000P Realtime-PCR System Firma Stratagene eingesetzt. Als Standardreihe dienten Plasmide in der unterschiedlichen Verdünnungen (Kopien von 1:10 bis 1:10<sup>9</sup> in sterilem Wasser). Zur Herstellung der Plasmide siehe Kapitel 2.2.6 bis 2.2.10. Als Referenzgen für die anschließende Auswertung fungierte die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), da deren Expression auch während einer Stimulation konstant bleibt. Die Proben durchliefen 40 Zyklen. Neben den zu untersuchenden Proben wurde stets eine Wasserkontrolle durchgeführt: Anstelle einer Probe wurde steriles Wasser pipettiert, um die Sensitivität der PCR zu sichern und eine Kontamination auszuschließen. Weiterhin konnte ohne den Zusatz von reverser Transkriptase keine Amplifikation beobachtet werden. Die verwendeten Primer finden sich in Tabelle 3. Die Zusammensetzung des verwendeten Mastermix findet sich in Tabelle 15. Das verwendete PCR-Programm findet sich in Tabelle 16.

Reagenz	Volumen
SYBRgreen Supermix	12,5 µl
ROX reference dye	0,5 µl
Sense-Primer (10 pmol)	1 µl
Antisense-Primer (10 pmol)	1μ
Dest. H <sub>2</sub> O	9 µl
cDNA	1 µl

#### Tabelle 16: SYBRgreen-PCR-Programm.

	Denaturierung	95°C	5 min
Γ	Denaturierung	95°C	30 s
40 Zyklen –	Primerhybridisierung	60°C	30 s
	Elongation	72°C	30 s
	Schmelzkurve	60-95°C	0,5°C pro 30 s

Um die Spezifität der Reaktion sicherzustellen, wurden die Schmelzkurven analysiert (Abbildung 3).



Abbildung 3: Repräsentative Schmelzkurve nach durchgeführter Realtime-PCR. Dargestellt ist eine repräsentative Schmelzkurve mit einem deutlichen Anstieg der Fluoreszenz aller Proben bei ca. 80°C. Bei niedrigeren Temperaturen ist kein Anstieg der Fluoreszenz nachzuweisen. Ebenso zeigt sich kein Anstieg der Fluoreszenz in der Negativkontrolle (steriles Wasser).

Die Realtime-PCR wurde mit Hilfe der Standardkurve ausgewertet: Die Analyse der Plasmidstandards mit bekannter Molekülzahl ermöglichte dem Programm eine exakte Berechnung der Anzahl an DNA-Kopien in jeder Probe. Anschließend wurde der Quotient des zu analysierenden Gens und GAPDH ermittelt und diese Werte dann verwendet.

#### 2.2.6 Gelextraktion der PCR-Produkte und Klonierungsreaktion

Für die Extraktion der DNA wurde das peqGOLD Gel Extraction Kit der Firma Peqlab verwendet: Zunächst wurde das PCR-Produkt (hier: CTRP 13 Maus) mit Hilfe des UV-Tischs aus dem Agarosegel ausgeschnitten, in einem äquivalenten Volumen Binde-Puffer gelöst und im Heizblock ( $60^{\circ}$ C) bis zum Auflösen des Gels inkubiert. Bei Bedarf erfolgte das Titrieren mit Natriumacetat bis zum korrekten pH-Wert, welcher sich durch einen Farbumschlag der Lösung in hellgelb anzeigte. Unter Nutzung der Perfect Bind-DNA-Säule erfolgte das Waschen mit 600 µl Wasch-Puffer und das anschließende Trocknen der Säule durch Zentrifugation für 1 min bei 9600 x g. Zum Herauslösen der DNA aus der Säule wurden 40 µl Elutions-Puffer hinzugefügt und der Ansatz anschließend 1 min bei 2400 x g zentrifugiert. Zur Kontrolle des Elutionsprodukts wurde eine PCR durchgeführt (Abbildung 4).



Abbildung 4: Kontrolle des Elutionsprodukts (CTRP 13 Maus).

Dargestellt ist das Ergebnis der RT-PCR nach erfolgter Eluation des PCR-Produkts (CTRP 13 Maus, 197 bp). Größenstandard: MassRuler Low Range DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific).

Zur späteren Verwendung bei der Realtime-PCR wurde die darauffolgende Klonierungsreaktion mit Hilfe des TOPO TA Cloning® Kits (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) durchgeführt: Für die Ligation wurden 2 µl des Eluats mit 0,5 µl einer

verdünnten Salzlösung (1:4 in Wasser) und 0,5 μl des Vektors (pCRII-TOPO Vektor, Vektorkarte: Abbildung 23) versetzt und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgte die Transformation des entstandenen Plasmids in elektrokompetente *E. coli*-Top 10 Bakterien (Tabelle 9). 20 μl Bakterien wurden mit 1 μl Ligationsansatz gemischt und 1 min auf Eis inkubiert. Es folgte die Überführung in eine eisgekühlte Küvette und die Transformation durch Auslösen eines elektrischen Impulses (1,85 kV bei 200  $\Omega$  und 25 μF). Anschließend wurden 250 μl LB-Medium hinzugefügt und der Ansatz für 1 h bei 37°C im Schüttler (Thermoshake; C. Gerhardt GmbH & Co. KG, Königswinter) inkubiert. Es folgten das Ausstreichen auf selektiven Ampicillin-Agarplatten und die Kultivierung bei 37°C über Nacht. Vor dem Aufbringen der Bakterien wurden die Agarplatten mit X-Gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galactopyranoside, AppliChem) bestrichen, was durch eine Blau-Weiß-Selektion die Identifizierung der Plasmid-tragenden Bakterienkolonien ermöglichte.

Die Klonierungsreaktion für die Herstellung des rekombinanten CTRP 13 erfolgte analog zum oben beschriebenen Prozedere mit Hilfe des pENTR™/D-TOPO™ Cloning Kits der Firma Thermo Fisher Scientific. Der dabei eingesetzte Vektor pENTR/D-TOPO (Vektorkarte: Abbildung 24) fungierte bei der späteren LR-Rekombinationsreaktion als Eingangsvektor. Das Ziel der Rekombinationsreaktion ist das Erzeugen eines Expressionsvektors, welcher das gewünschte Gen (hier: CTRP 13) enthält und bei der späteren Transformation in kompetente E. coli-Bakterien eingesetzt werden kann. Dazu wurde die LR-Rekombinationsreaktion zwischen dem Eingangsvektor (pENTR/D-TOPO) mit dem enthaltenen Gen (CTRP 13) und dem Zielvektor (pDEST17, Vektorkarte: Abbildung 25) durchgeführt, sodass der Expressionsvektor pDEST17 CTRP 13 entstand. Dazu wurden 50 ng Eingangsvektor mit 75 ng Zielvektor und 1 µl Gateway LR Clonase II Enzym-Mix angesetzt und mit 4 µI TE-Puffer (pH 8,0) aufgefüllt. Der Ansatz wurde für 4 h bei einer Temperatur von 25°C inkubiert. Im Anschluss daran wurde 1 µl Proteinase K-Lösung hinzugeben und der Ansatz für 30 min bei 37°C inkubiert. Danach erfolgte die Transformation in kompetente E. coli-Top 10 Bakterien (Tabelle 9) und das Ausplattieren auf Agarplatten nach Auswahl der entsprechenden Antibiotikaresistenz des Expressionsvektors. Nach der Vermehrung der Bakterien und deren Picken erfolgten die Plasmidpräparation (Mini-Präparation, Kapitel 2.2.7), die Restriktionsanalyse (Kapitel 2.2.8) und die Seguenzierung des Plasmids (Kapitel 2.2.9). Zeigte sich diese erfolgreich hinsichtlich des Vorkommens des CTRP 13-Plasmids, erfolgte dessen Transformation in kompetente E. coli-Bakterien des Stamms BL21 Rosetta (Tabelle 9) und das Ausplattieren auf Agarplatten.

### 2.2.7 Plasmidpräparation (Mini-Präparation)

Nach Vermehrung der Bakterien, welche das CTRP 13-Plasmid enthielten, musste das amplifizierte Plasmid gewonnen werden. Dazu erfolgten zunächst das Picken einer Bakterienkolonie der Agarplatte und die Kultivierung in 4 ml LB-Medium mit Ampicillin (1:1000; Stammlösung: 100 mg/ml in Wasser) für 12-14 h bei 37°C im Laborschüttler (Thermoshake; C. Gerhardt GmbH & Co. KG, Königswinter). Danach wurden 2 ml des Ansatzes für 10 min bei 2400 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das entstandene Pellet in 200 µl Lösung A (Tabelle 17) mittels Schütteln auf dem Vortexmischer gelöst. Anschließend wurden 200 µl Lösung B (Tabelle 17) hinzugefügt und der Ansatz bei Raumtemperatur inkubiert, bis die Lösung eine klare Farbe annahm. Zur Proteinausfällung erfolgte die Zugabe von 200 µl Lösung C (Tabelle 17) und die Zentrifugation für 10 min bei 9600 x g. Nach dem Überführen des Überstands in ein frisches Gefäß, erfolgte die Zugabe einer äguivalenten Menge Isopropanol und die anschließende Zentrifugation für 30 min bei 17000 x g. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 500 µl Ethanol gewaschen und die Lösung erneut zentrifugiert (1 min, 9600 x g). Schließlich wurde das entstandene Pellet in 50 µl erwärmten Wasser gelöst.

	10 mM EDTA
Lösung A	50 mM Tris (pH 8)
	100 μg/ml RNase A
	0,2 M NaOH
Lösung B	1 % SDS
	gelöst in Wasser
Lösung C	3 M Kaliumacetatlösung (pH 5,5)

Tabelle 17: Zusammensetzung der verwendeten Lösungen (Plasmidpräparation).

#### 2.2.8 Restriktionsanalysen isolierter Plasmide

Um den Erfolg der Transformation hinsichtlich des Vorkommens entsprechender Basensequenzen zu überprüfen, wurde eine Restriktionsanalyse mit anschließender Erstellung einer Vektorkarte durchgeführt. Dazu wurden 5 µl Plasmid mit 15 µl Enzymansatz (0,1 µl Enzym, 2 µl Enzym-Puffer, 12,9 µl Wasser) vermischt und 1 h bei 37°C inkubiert. Das Auftragen der Proben und des Größenstandards auf ein Agarosegel, sowie die anschließende Analyse erfolgten analog zu den Beschreibungen in Kapitel 2.2.4. Als Negativkontrolle kamen 10 µl Plasmid-DNA ohne entsprechenden Zusatz des Enzyms zum Einsatz.

#### 2.2.9 Sequenzierung

Die Sequenzierung der Plasmid-DNA im Anschluss an die Restriktionsanalyse erfolgte als Auftragsarbeit. Dazu wurden die Plasmidproben bestehend aus 15 µl Plasmid-DNA (mit einer Konzentration zwischen 80-100 ng/µl) und 5 pmol/µl Sequenzier-Primer an die Firma GATC Biotech AG (Konstanz) geschickt. Anschließend erfolgte der Abgleich der ermittelten Sequenzen mit der Zielsequenz über eine DNA-Datenbank (NCBI). Als Sequenzier-Primer kamen SP6 (Vektor: pCRIITOPO) und M13 forward (Vektor: pENTR/D-TOPO) (Tabelle 4) für die Sequenzierung der Plasmide sowie die jeweiligen genspezifischen Sense-Primer für die direkte Sequenzierung der PCR-Produkte zum Einsatz. Das exemplarische Ergebnis einer solchen Sequenzierung findet sich im Kapitel 11.1 im Anhang (Abbildung 22).

#### 2.2.10 Plasmidisolierung (Midi-Präparation)

Die Präparation größerer Plasmidmengen erfolgte unter Verwendung des Plasmid Midi Kit der Firma Qiagen. Dazu wurde ein Klon der Ampicillin-Agarplatte gepickt und in 150 ml LB-Medium mit selektivem Antibiotikum (Ampicillin (1:1000; Stammlösung: 100 mg/ml in Wasser)) 12 bis 14 h bei 37°C im Schüttler (Thermoshake, Gerhardt) inkubiert. Anschließend erfolgte die Plasmidpräparation nach den Angaben im Protokoll des Herstellers. Am Ende der Isolation wurde das Pellet in 500 µl Wasser gelöst und die DNA-Konzentration mittels Photometer (Nano Drop ND-1000, Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen) bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt.

### 2.2.11 Proteinexpression in *E. coli*-Bakterien mit Histidin-Tag und Isolierung des Proteins mit Hilfe der Affinitätschromatographie (Nickelsäule)

Zunächst wurde eine Übernachtkultur aus Bakterien des *E. coli*-Stamms *Rosetta*, welche das Plasmid pDEST17 CTRP 13 Maus enthielten, angefertigt. Dazu wurden 10 ml LB-Medium mit dem Antibiotikum Ampicillin (Stammlösung: 100 mg/ml in Wasser) in einer Konzentration von 1:1000 versetzt. Als Kontrollpeptid fungierte His-markiertes grün fluoreszierendes Protein (GFP), welches zur Kontrolle der Expression mit Hilfe des Plasmids pDEST17 GFP eingesetzt wurde. Die Übernachtkultur wurde am darauffolgenden Tag 1:20 in 500 ml LB-Medium mit 0,5 % Hefe-Extrakt und 0,1 % der

Ampicillin-Stammlösung verdünnt und bei 37°C im Schüttler bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5-0,8 inkubiert. Es folgte die Proteininduktion mit 0,3 mM IPTG bei idealer Temperatur und die Zentrifugation für 10 min bei 2400 x g nach Ablauf der Induktionszeit. Die Idealtemperatur wurde durch Vorversuche mit 17°C ermittelt (Kapitel 3.1). Das entstandene Pellet wurde in 10 ml PBS resuspendiert und bei -20°C für 24 h eingefroren. Nach dem Auftauen des Pellets am nächsten Tag wurde die Probe mittels Ultraschall (Ultraschallstoßgerät Labsonic U; B. Braun Melsungen AG, Melsungen) aufgebrochen (2x1 min) und anschließend 10 min bei 4°C und 17000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Röhrchen überführt.

Die anschließend verwendete Nickelsäule bestand aus 1 ml His-Buster-Nickel-Affinitygel und einer dünnen Schicht Glaswolle – aufgebaut in einem kleinen Zentrifugenröhrchen. Die darauffolgenden Schritte fanden bei einer Umgebungstemperatur von 4°C statt: Die Säule wurde zunächst mit 8 ml 1x PN-Puffer (20 mM Phosphat, 0,5 M NaCl, pH 7,4) gewaschen und anschließend mit dem Überstand beladen (Geschwindigkeit von 7 ml/h). Vor dem Auswaschen des Proteins mit Elutionspuffer (PN-Puffer + 500 mM Imidazole) wurde die Säule mit 12 ml 1x PN-Puffer mit einer Geschwindigkeit von 10 ml/h gewaschen. Es folgte die Dialyse des Eluats gegen PBS bei 4°C über Nacht. Das Entfernen eventueller Endotoxine wurde das EndoTrap® red Kit der Firma Hyglos (Hyglos GmbH, Bernried) durchgeführt.

Für den Einsatz des rekombinanten Proteins in der Zellkultur musste der Endotoxingehalt des hergestellten CTRP 13 analysiert werden, um potenzielle Effekte von Endotoxinen auszuschließen. Dazu kam das Pierce® LAL Chromogenic Endotoxin Quantitation Kit der Firma Thermo Fisher Scientific nach den Angaben des Herstellers zum Einsatz. Als Positivkontrolle, um das Funktionieren des Kits zu überprüfen, diente Lipopolysaccharid (LPS). Der Endotoxingehalt des rekombinanten CTRP 13 lag unterhalb der Nachweisgrenze, sodass das Protein in der Zellkultur eingesetzt werden konnte.

#### 2.2.12 Zellkultur und Zellstimulation

Die Experimente zur Analyse der biologischen Wirkung von CTRP 13 wurden an Endothelzellkulturen durchgeführt. Sämtliche Arbeiten mit Endothelzellen erfolgten dabei an der Sterilwerkbank (Hera Safe KS; Thermo Fisher Scientific, Langenselbold), um eine möglichst keimfreie Umgebung zu gewährleisten.

## 2.2.12.1 Isolation, Kultivierung, Passagieren und Stimulation von mikrovaskulären Endothelzellen (MVEC)

Für die Gewinnung mikrovaskulärer Endothelzellen wurden Rattenherzen von männlichen Hannover-Ratten des Wistar-Aufzuchtstammes (Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle, Frankreich) mit einem Gewicht von ca. 300 Gramm verwendet. Die Sektion der Tiere, die Präparation der Herzen und die Isolation der verschiedenen Zellarten wurden nach dem Protokoll von Schlüter et al. von Mitarbeitern des Physiologischen Instituts der Justus-Liebig-Universität Gießen durchgeführt [55]. Von Bedeutung für die vorliegende Arbeit war dabei die Isolation der Endothelzellen aus dem Überstand des Zentrifugats, welches nach der Präparation bei der Zentrifugation der Zellsuspension entstand. Da im verwendeten Überstand neben Endothelzellen auch andere Zellarten vorkommen, wurde das Gemisch mit Hilfe des CELLection™ Pan Mouse IgG Kit (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) aufgereinigt. Dabei macht man sich die Expression des Oberflächenantigens CD31 (Cluster of differentiation 31) auf den Endothelzellen zunutze [67], die sich für die Auftrennung mit Hilfe von magnetischen Beads eignet. 5 µl der magnetischen Beads (DynaMag-2 Cat. No. 123.21D; Invitrogen GmbH, Karlsruhe) wurden dreimal in Folge mit 500 µl PBS gewaschen. Das dafür verwendete Probenröhrchen befand sich dabei im Magnetständer (Magnetic Particle Concentrator, Invitrogen GmbH, Karlsruhe), wodurch ein Absaugen der Beads verhindert werden konnte. Es folgte das Hinzufügen des Antikörpers Anti-CD31 (Thermo Fisher Scientific, Langenselbold) in einer Konzentration von 1:20 in PBS und die Inkubation für 1 h bei Raumtemperatur unter langsamer kontinuierlicher Bewegung im Rotator. Im Magnetständer erfolgte dann das dreimalige Waschen der Beads mit Gibco® Medium 199. Zur Entfernung vorhandener Zelltrümmer wurde die Suspension mit den darin enthaltenen Endothelzellen 5 min bei 100 x g zentrifugiert, der Überstand verworfen das Zellpellet in 1 ml Medium (Gibco<sup>®</sup> Medium 199 plus 1 % und Penicillin/Streptomycin-Stammlösung) resuspendiert. Die Suspension wurde dann in das Gefäß mit den gewaschenen Beads überführt und vorsichtig mit diesen vermischt. Die Inkubation dauerte bei 4°C und schonender Rotation 1 h. Anschließend wurde der Komplex aus Beads, Antikörper und Zellen mit Hilfe des Magnetständers mit Gibco<sup>®</sup> Medium 199 gewaschen. Die Endothelzellen hafteten dabei über den Antikörper an den magnetischen Beads und wurden daher nicht mit dem Überstand verworfen. Zur anschließenden Kultivierung der Endothelzellen wurde das EC Growth Medium nach den Angaben des Herstellers mit Supplement Mix (C-39225; PromoCell GmbH, Heidelberg) und 2 % Penicillin/Streptomycin-Stammlösung versetzt. Die Zellen wurden ausplattiert und unter dem Lichtmikroskop betrachtet (Abbildung 5). Die Inkubation der Zellen erfolgte bei 37°C im Brutschrank. Ein Auffrischen des Mediums erfolgte alle 48 h.



Abbildung 5: Mikrovaskuläre Endothelzellen unter dem Mikroskop nach erfolgter Isolation und Aufreinigung.

Zum Passagieren der Endothelzellen erfolgte zunächst ein Waschschritt mit erwärmtem PBS. Nach der anschließenden Inkubation mit einem erwärmten Trypsin/PBS-Gemisch (im Verhältnis 1:1; für Stammlösungen siehe Tabelle 1) für 5 min im Brutschrank wurde das Ablösen der Zellen vom Boden der Schale unter dem Lichtmikroskop beurteilt. Nach dem vollständigen Ablösen des Zellrasens wurde die Lösung vorsichtig mit einer Pipette aufgenommen und in ein sauberes Zentrifugenröhrchen überführt. Das Hinzufügen von einigen Millilitern Kulturmedium führte zum Abbruch der Trypsin-Reaktion. Es folgte die Zentrifugation für 8 min bei 100 x g bei Raumtemperatur mit anschließendem Verwerfen des Überstandes. Das Zellpellet wurde in 1 ml Kulturmedium resuspensdiert. Je nach Versuchsansatz wurden verschiedene Mengen an Endothelzellen benötigt. Mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer (Fein-Optik, Bad Blankenburg) konnten die Zellen gezählt und die benötigte Menge an Medium zum Erreichen der gewünschten Endothelzelldichte errechnet werden. Diese Suspension wurde in Kulturschalen überführt, wobei sich die Anzahl der Schalen an den Anforderungen der Einzelversuche orientierte. Eine ausreichende Menge an Kulturschalen für die Kontrollen wurde ebenfalls für jeden Versuchsansatz vorbereitet: Zellen wurden dazu in Medium ohne die Zugabe von CTRP 13 kultiviert. Die Stimulation der Endothelzellen erfolgte stets mit CTRP 13 in einer Konzentration von 4 µg/ml. Diese entspricht einem Kompromiss aus Vorversuchen der Arbeitsgruppe [58] und den Angaben in der gängigen Literatur zum Thema: Wei *et al.* verwendeten CTRP 13 beispielsweise in einer Konzentrationen von 5 µg/ml [71].

## 2.2.12.2 Isolation, Kultivierung, Passagieren und Stimulation von humanen Endothelzellen der Nabelschnur (Human Umbilical Vein Endothelial Cells = HUVEC)

Für die Gewinnung von humanen venösen Endothelzellen kamen Nabelschnüre aus dem Universitätsklinikum Gießen zum Einsatz, welche unmittelbar nach der Geburt bei 4°C gelagert wurden (Ethikvotum: Aktenzeichen 18/13). Die Präparation erfolgte nach dem Protokoll von Jaffe et al. innerhalb von 48 h nach der Abnabelung [27]: Nach einer Reinigung der Nabelschnur und dem mechanischen Fixieren der Nabelvene mit einer Knopfkanüle, welche mit einem Dreiwegehahn verbunden war, erfolgten das Spülen mit HBSS, das Füllen der Vene mit einer Kollagenaselösung (HBSS, 0,025 % Collagenase II 293 Units/mg (wt/vol), 0,5 mM MgCl<sub>2</sub> \* 6 H<sub>2</sub>O, 1,5 mM CaCl<sub>2</sub>) und schließlich die Inkubation über 20 min bei 37°C. Nach dem Massieren der Nabelschnur, um das Ablösen der Endothelzellen zu gewährleisten, wurden die Zellen in 20 ml HBSS in ein 50 ml Röhrchen überführt, welches zum Stoppen der Kollagenase-Reaktion 1 ml fetales Kälberserum (fetal calfserum = FCS) enthielt. Es folgten eine Zentrifugation von 5 min bei 250 x g bei Raumtemperatur, das Verwerfen des Übertandes und die Kultivierung der Zellen in EC Growth Medium. Dieses wurde mit Supplement Mix (C-39215, PromoCell), 2 % FCS und 2 % Penicillin/Streptomycin-Stammlösung versetzt und nach jeweils 48 h aufgefrischt.

Das Passagieren und Stimulieren der HUVEC erfolgten analog zum Vorgehen mit mikrovaskulären Endothelzellen.

#### 2.2.13 Gesamtproteinisolation aus Endothelzellen

Für die spätere Western Blot Analyse der untersuchten Signalkaskaden wurden 3 voneinander unabhängige Versuche mit jeweils 2 Zellkulturschalen pro Gruppe (Kontrolle, 5 min, 10 min, 20 min, 40 min, 80 min, 24 h) durchgeführt. Pro Schale wurden jeweils 20.000 MVEC bzw. 200.000 HUVEC ausgesät. Für die 24 h-Gruppe wurden zusätzliche Kontrollschalen angefertigt.

Nach dem Entfernen des Mediums folgte ein Waschschritt mit 2 ml PBS (4°C) und die Proteinisolation mit 100 µl SDS-Lysepuffer (50 mM Tris-HCI (pH 8,1), 10 mM EDTA, 1 % SDS), welcher mit Phosphatase-Inhibitor (1:200) und Proteinase-Inhibitor (1:500) angereichert wurde. Anschließend wurden die Proben durch Ultraschall-Homogenisation (Ultraschallstoßgerät Labsonic U, B. Braun Melsungen AG, Melsungen) aufgebrochen und 10 min auf Eis inkubiert. Schließlich erfolgte die Zentrifugation für 10 min bei 9600 x g und einer Temperatur von 4°C. Das fertige Proteinlysat wurde in neue Probenröhrchen überführt und die Proteinmenge bestimmt.

#### 2.2.14 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Bestimmung der Gesamtproteinmenge kam das Pierce<sup>™</sup> BCA Protein Assay Kit der Firma Thermo Fisher Scientific nach den Angaben des Herstellers zum Einsatz. Nach der Bestimmung der Proteinkonzentration konnten Proben mit identischem Proteingehalt angefertigt werden, indem eine entsprechende Verdünnung durchgeführt wurde. Es folgten die Zugabe von 6x SDS-Probenpuffer (350 mM Tris (pH 6,8), 30 % Glycerin, 3 mM SDS, 60 mM DTT) und die anschließende Denaturierung bei 95°C für 5 min. Die Proben wurden dann auf die vorbereiteten Gele (Zusammensetzung Tabelle 18) aufgetragen, welche sich in der mit 1x Laufpuffer (10x Laufpuffer: 250 mM Tris (pH 8,3), 2 M Glycin, 35 mM SDS, destilliertes Wasser) befüllten Kammer befanden. Es wurde außerdem ein Größenstandard (PageRuler<sup>™</sup> Prestained Protein Ladder Plus (SM 1811), Fermentas GmbH) aufgetragen, um bei der abschließenden Analyse das Molekulargewicht der erhaltenen Proteinbanden zu bestimmen. Die angelegte Spannung betrug für das Sammelgel 80 V und für das Trenngel 140 V. Mit Hilfe der Blaufärbung durch Farbstoff, konnten die Proteine verfolgt und der Zeitpunkt ermittelt werden, zu dem die ersten Proteine die Unterkante des Trenngels erreichten.

	Trenngel		Sammelgel
Konzentration	5 %	10 %	
steriles Wasser	5,80 ml	4,30 ml	2,95 ml
Acrylamid/Bis-Stammlösung	1,50 ml	3,00 ml	0,50 ml
Puffer (1,5 M Tris, pH 8,8)	4,50 ml	4,50 ml	-
Puffer (1 M Tris, pH 6,8)	-	-	0,50 ml
SDS 10 % (w/v)	120 µl	120 µl	40 µl
APS 10 % (w/v)	100 µl	100 µl	25 µl
TEMED	10 µl	10 µl	5 µl

Tabelle 18: Zusammensetzung der verwendeten Western Blot Gele.

#### 2.2.15 Western Blot und Immunfärbung

Mit Hilfe des Western Blots können Proteine vom Polyacrylamid-Gel auf eine Nitrocellulosemembran übertragen werden, ohne die Ordnung der elektrophoretischen Auftrennung zu beeinflussen. Zunächst wurde das Sammelgel vom Trenngel abgetrennt. Die für den Western Blot nötigen Utensilien (Netzschwämme, Whatman-Filterpapiere, Nitrocellulosemembranen) wurden für einige Minuten in Blotpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20 % Methanol, destilliertes Wasser) befeuchtet. Schließlich wurden diese in der folgenden Reihenfolge in der Blot-Halterung zusammengesetzt: 1.) Netzschwamm, 2.) zwei Whatman-Filterpapiere, 3.) Nitrocellulosemembran, 4.) Trenngel, 5.) zwei Whatman-Filterpapiere, 6.) Netzschwamm. Die verschlossene Halterung kam anschließend mit zwei Kühlakkus in die Blotapparatur, welche dann mit Blotpuffer aufgefüllt wurde. Durch das Blotten für 1,5 h bei 4°C und einer angelegten Spannung von 120 V gelang der Proteintransfer vom Polyacrylamid-Gel auf die Nitrocellulosemembran. Die Banden auf der Nitrocellulosemembran konnten anschließend durch eine kurze Inkubation in Ponceau-Lösung (0,5 g Ponceau S, 1 % Essigsäure, destilliertes Wasser) sichtbar gemacht werden. Nach dem Abspülen der Ponceau-Färbung mit Wasser erfolgte die Blockierung für 1 h bei Raumtemperatur. Die verwendete Blockierlösung bestand aus 5 % Trockenmilchpulver, welches in TBS-T-Puffer (8 g NaCl, 12,1 g Tris, 2 ml Tween 20, 1000 ml destilliertes Wasser) gelöst wurde.

Die anschließende Inkubation der Membranen mit den entsprechenden primären Antikörpern (Tabelle 5), gelöst in 2,5 % Trockenmilchpulver in TBS-T und Natriumazid-Stammlösung (1:500), erfolgte bei 4°C über Nacht unter leichtem Schütteln. Nach dem dreimaligen Waschen der Membranen mit TBS-T für jeweils 5 min erfolgte die Inkubation mit dem entsprechenden sekundären Antikörper (Tabelle 6) – gelöst in 2,5 % Trockenmilchpulver in TBS-T – für 1 h bei Raumtemperatur. Danach wurden die Membranen erneut dreimal mit TBS-T für jeweils 5 min gewaschen. Um die entstandenen Banden auf der Membran sichtbar zu machen, erfolgte eine Inkubation für 1 min in ECL-Lösung (10 ml 100 mM Tris-HCI (pH 8,5), 90 mM Cumarsäure, 250 mM Luminol, Wasserstoffperoxid 1:2000) und die anschließende Dokumentation mit dem Detektionssystem Fusion FX7 (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen). Die Analyse wurde mit der Computersoftware Quantity One (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) durchgeführt.

#### 2.2.16 Coomassie-Färbung

Bei der Herstellung des rekombinanten CTRP 13 erfolgte im Anschluss an die Gelektrophorese eine Coomassie-Färbung, um die im Anschluss an die Proteinexpression in E. coli-Bakterien vorhandenen Proteine sichtbar zu machen. Der "Coomassie-Färbung" ist eine gebräuchliche Begriff Abkürzung für ein coomassiegefärbtes Polyacrylamid-Gel. Der Farbstoff Coomassie-Brillant-Blau R-250, lagert sich an basische und aromatische Seitenketten von Aminosäuren an und führt so zu einem unspezifischen Anfärben aller größeren Proteine auf dem Polyacrylamid-Gel. Für die Färbung wird das gesamte Gel nach dem Ablauf der Gelelektrophorese für ca. 1 h bei leichtem Schütteln in die Coomassie-Färbelösung (Zusammensetzung: 2 g Coomassie-Brilliant-Blau R-250, 4,25 ml Ethanol 96 %, 50 ml Methanol 20 %, 100 ml Essigsäure 10 %, 425 ml destilliertes Wasser) gelegt. Es folgt die Differenzierung der Färbung in Entfärbelösung (Zusammensetzung: 200 ml Methanol 20 %, 100 ml Essigsäure 10 %, 1000 ml destilliertes Wasser) für 20 min unter leichtem Schütteln. Dieser Schritt wurde mehrmals wiederholt, um ein adäguates Entfärben zu erreichen. Anschließend wurde das Gel vorsichtig mit Wasser abgewaschen und in Geltrocknungspuffer (Zusammensetzung: 225 ml Methanol 20 %, 15 ml Glycerol, 500 ml destilliertes Wasser) gegeben. Die anschließende Dokumentation erfolgte mit Hilfe einer Konverterplatte und dem Detektionssystem Fusion FX7 (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen).

#### 2.2.17 Zellproliferation

#### 2.2.17.1 Proliferation der dispergierten MVEC-Kultur

Der Effekt von CTRP 13 auf die Proliferation mikrovaskulärer Endothelzellen wurde durch die Bestimmung der Zellzahl nach einem Inkubationsintervall analysiert. Dazu wurden 15.000 MVEC in 12-Loch-Platten ausgesät und über Nacht inkubiert. Ein Teil der Zellen diente als Kontrolle in Endothelial Cell Growth Medium mit 2 % FBS und 2 % Penicillin/Streptomycin-Stammlösung, ohne Zugabe der Wachstumsfaktoren. Eine weitere Gruppe erhielt das identische Medium mit 4 µg/ml CTRP 13. Nach einer Inkubation von 24 h bei 37°C erfolgte das Zählen der Zellen mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer. Des Weiteren wurde der Einfluss des AMPK-Inhibitors Adenine-9-β-D-Arabinofuranosid (AraA) untersucht, indem eine Präinkubation mit 500 µM AraA für 30 min bei 37°C stattfand – jeweils ohne bzw. mit anschließender Zugabe von CTRP 13. Es wurden 3 voneinander unabhängige Experimente durchgeführt. Die Versuche wurden verblindet durchgeführt.

#### 2.2.17.2 Bromdesoxyuridin–Färbung proliferierender MVEC

Eine gängige Methode zur Quantifizierung eines pro-proliferativen Effekts einer Substanz ist der Einsatz von Bromdesoxyuridin (BrdU). Als sogenanntes Pyrimidinanalogon wird es an Stelle der Nukleinbase Thymin in die DNA proliferierender Zellen eingebaut und kann somit zur immunhistochemischen Markierung proliferierender Zellen genutzt werden (PubChem 2016). Gegen BrdU gerichtete Antikörper ermöglichen dann eine Aussage über den Einbau von BrdU in die DNA der proliferierenden Zellen. Der Einbau von BrdU ist damit direkt proportional zur Proliferationsrate der Zellen. In der vorliegenden Arbeit kam das BrdU Cell Proliferation Assay Kit der Firma Biovision zur Anwendung und wurde nach den Angaben des Herstellers eingesetzt. Zusätzlich wurden Enzyminhibitoren verwendet, um Rückschlüsse auf kausale Zusammenhänge zu ziehen: Als selektiver Inhibitor der p38 MAPK kam SB202190 zum Einsatz. Die p44/42 MAPK wurde durch U0126 selektiv gehemmt und die AMPK durch AraA.

Zunächst wurden die MVEC in Kulturmedium mit einer Dichte von 5.000 Zellen pro Well in einer 96-Well-Mikroplatte ausgesät. Es wurden 8 Gruppen generiert: Als Kontrollgruppe dienten Zellen ohne die Zugabe von CTRP 13 und Inhibitoren. Eine weitere Gruppe wurde mit 4  $\mu$ g/ml CTRP 13 über 24 h stimuliert. Der Einfluss der Enzyminhibitoren wurde untersucht, indem eine Präinkubation mit 500  $\mu$ M AraA beziehungsweise jeweils 10 µM SB202190 und U0126 für 30 min bei 37°C stattfand jeweils ohne bzw. mit anschließender Zugabe von 4 µg/ml CTRP 13. Es folgte die Inkubation für 24h bei 37°C, um das Absetzen und Anhaften der Zellen auf dem Boden der Kulturschale zu gewährleisten. Zunächst wurde die BrdU-Stammlösung vorbereitet: Dazu wurde BrdU (1000x) 1:100 in Zellkulturmedium gelöst und anschließend wiederum mit einer Konzentration von 1:10 eingesetzt (Endkonzentration 1:1000). Pro Well wurden 50 µl der Lösung hinzugefügt und für 6 h bei einer Temperatur von 37°C inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit folgten ein Waschschritt mit erwärmtem PBS und das anschließende Fixieren der Zellen mit Formaldehyd 3,7 % für 15 min im Inkubator (37°C). Nach dem erneuten Waschen der Zellen mit erwärmtem PBS folgte die 20-minütige Permeabilisierung der Zellmembran mit 0,2 % Triton-X100. Anschließend wurde Salzsäure eingesetzt: 1 N HCl über 10 min, danach 2 N HCl ebenfalls für 10 min. Schließlich wurde ein Phosphat-Citrat-Puffer hinzugefügt und für 10 min inkubiert. Nach einem Waschschritt mit PBS wurde der gegen BrdU gerichtete Antikörper (Anti-BrdU) mit einer Konzentration von 1:300 in Antikörperlösung hinzugefügt und für 1,5 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Lösung entfernt und der sekundäre Antikörper (Anti-Maus-IgG-HRP-gekoppelter Antikörper, 1:2.000 in Antikörperlösung) hinzugegeben. Die Inkubation betrug 1 h bei Raumtemperatur. Nach dreimaligem Waschen für je 15 min mit Waschlösung folgte die Zugabe von 50 µl der im Kit mitgelieferten TMB-Substratlösung pro Well, um einen Farbumschlag zu hellgelb zu erreichen, was die Detektion bei einer Wellenlänge von 450 nm ermöglichte. Vor dem Auslesen am Mikroplatten-Lesegerät (Infinite TM) musste die TMB-Reaktion mit einer Blockierlösung (100 µl pro Well) gestoppt werden.

#### 2.2.17.3 Proliferation der Monolayer-HUVEC-Kultur

Um den Effekt von CTRP 13 auf die Migration und Proliferation von Endothelzellen zu untersuchen, wurde der JuLI™ Br Live Cell Analyzer (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen) verwendet. Die Zellkulturschalen wurden mit Hilfe zweier Mikroskopier-Einheiten gefilmt und Standbilder in unterschiedlichen Zeitintervallen angefertigt. Vor der Zellaussaat erfolgte das Bestücken der Kulturschalen mit den Einsätzen der Firma Ibidi GmbH nach den Angaben des Herstellers (Abbildung 6). Die Silikoneinsätze bewirkten einen definierten zellfreien Spalt mit einer Breite von 500 µm. Pro Well eines Culture-Inserts wurden 20.000 HUVEC in Opti-MEM Medium mit 2 % FBS und 2 % Penicillin/Streptomycin-Stammlösung, ohne Zugabe der Wachstumsfaktoren ausgesät. Eine weitere Gruppe erhielt das identische Medium mit 4 µg/ml CTRP 13. Die

Inkubation erfolgte im Brutschrank bis zum Entstehen eines konfluenten Zellrasens. Anschließend folgten das vorsichtige Entfernen des Silikoneinsatzes mit Hilfe einer sterilen Pinzette und die Kontrolle des entstandenen Spalts unter dem Lichtmikroskop. Die Behandlung der Zellen erfolgte nach dem jeweiligen Versuchsprotokoll.



#### Abbildung 6: Schematische Darstellung der Anwendung der Culture-Inserts.

1) zeigt den ursprünglichen Zustand der Kulturschale mit dem darin platzierten Culture-Insert. In 2) wurde das zellhaltige Medium hinzugefügt (ca. 20.000 Zellen in 70 μl Medium pro Well). 3) zeigt das Entfernen des Silikoneinsatzes mit einer sterilen Pinzette und 4) gibt die Ausgangsituation für den jeweiligen Versuch wieder (modifiziert nach [83]).

Um eine quantifizierte Aussage zum Einfluss von CTRP 13 auf das Proliferationsverhalten der HUVEC zu erhalten, kam das Computerprogramm Gwyddion (Version 4.28) zum Einsatz. Ausgehend von der Bildmitte wurden fünf Pixelkoordinaten mit identischem Abstand zueinander festgelegt, die jeweilige Spaltbreite gemessen und der Mittelwert mit Standardabweichung ermittelt.

#### 2.2.18 Apoptose Assay

Um den Effekt von CTRP 13 auf die Zelltod von Endothelzellen zu untersuchen, wurden die basale Apoptose- und Nekroserate nach einer 24-stündigen Stimulation mit 4 µg/ml CTRP 13 bestimmt. Um den programmierten Zelltod (Apoptose) von einer Nekrose der Zellen zu unterscheiden, kamen die DNA-Farbstoffe Hoechst-33342 und Propidiumiodid (PI) im Rahmen des Assays zum Einsatz. Im Gegensatz zu PI kann Hoechst-33342 die intakte Zellmembran passieren und an die DNA binden. Der Erhalt der Zellmembran ist neben der Kondensation und Fragmentierung des Chromatins im Zellkern ein wichtiges Charakteristikum des programmierten Zelltods [26]. Es kommt zur charakteristischen hellblauen Färbung der apoptotischen Zellen mit dem Hoechst-Farbstoff. Wichtiges Zeichen der Nekrose ist hingegen die Zerstörung der äußeren Zellmembran [26]. Da ein Anfärben der Zellen mit PI nur bei geschädigter Zellmembran möglich ist, wurden die PI-positiven Zellen als nekrotisch gewertet.

Für die Untersuchungen wurden 4 voneinander unabhängige Experimente mit jeweils 2 Zellkulturschalen pro Gruppe (Kontrolle, CTRP 13, Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), CTRP 13 + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) durchgeführt. Pro Schale wurden jeweils 30.000 MVEC ausgesät. Ein Teil der Zellen diente als Kontrolle in Endothelial Cell Growth Medium mit 2 % FBS und 2 % Penicillin/Streptomycin-Stammlösung, ohne Zugabe der Wachstumsfaktoren. Die anderen Gruppen erhielten das identische Medium mit 4 µg/ml CTRP 13 bzw. 100 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.10 min vor dem Mikroskopieren erfolgte die Zugabe der Farbstoffe (pro Schale Hoechst-33342 in einer Konzentration von 8 µg/ml und PI in einer Konzentration von 2,5 µg/ml) und die kurze Inkubation bei Raumtemperatur. Zur gleichmäßigen Verteilung der Farbstoffe wurden die Schalen vorsichtig geschwenkt. In jeder Schale wurden dann 5 zufällig ausgewählte Gesichtsfelder analysiert. Der Mikroskopierende wusste nicht, welcher Gruppe die mikroskopierte Schale angehörte. Die Analyse erfolgte bei entsprechender Wellenlänge (350 nm für Hoechst-33342, 530 nm für PI) und Vergrößerung mit Hilfe des inversen Fluoreszenzmikroskops Olympus IX70 (Olympus Deutschland GmbH, Hamburg), wobei die prozentualen Anteile der Hoechst-33342- bzw. PI-positiven Zellen ermittelt wurden.

#### 2.2.19 Immunzytochemie

Die HUVEC wurden auf Deckgläsern ausgesät, welche sich in Zellkulturschalen befanden. Pro Deckglas wurden ca. 300.000 Zellen über Nacht kultiviert. Nach einem Waschschritt mit erwärmtem PBS wurden die Zellen mittels Formaldehyd 3,7 % (20 min, 37°C) fixiert. Es folgte die 20-minütige Permeabilisierung der Zellmembran mit 0,2 % Triton-X100 und die anschließende Blockierung der Reaktion mit 5 % bovinem Serumalbumin (englisch: bovine serum albumine = BSA) und 5 % FCS für 1 h bei Raumtemperatur. Die Blockierungslösung wurde ebenfalls für die Einstellung der Konzentration der primären Antikörper (Tabelle 7) verwendet. Die Inkubation der Zellen in der Antikörperlösung erfolgte bei 4°C über Nacht. Nach dreimaligem Waschen für je 15 min mit PBS folgte die Inkubation mit den entsprechenden sekundären Antikörpern (Tabelle 8) für 1 h bei Raumtemperatur, gelöst in PBS. Die Immunreaktion mit dem Antikörper gegen CTRP 13 wurde mit einem an den Fluoreszenzfarbstoff Cy3 gekoppelten Sekundärantikörper visualisiert. Der an FITC gekoppelte Sekundärantikörper wurde für die Deckgläser verwendet, welche zuvor mit dem CD31-Primärantikörper behandelt wurden. Als Übersichtsfärbung kam To-Pro 3 642/661 (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) 1:200 in PBS zum Markieren der Zellkerne zum Einsatz. Als Kontrollen dienten Zellen, welche direkt mit der Sekundärantikörper-Lösung behandelt wurden ohne die vorherige Inkubation in Primärantikörper-Lösung. Nach erneutem dreimaligem Waschen der Deckgläser mit PBS für je 15 min, wurden diese gewebeseitig mit AF3 (Citifluor) auf Objektträgern fixiert und bei 4°C dunkel gelagert. Zur mikroskopischen Analyse kam das konfokale Laser-Scanning-Mikroskop (Carl Zeiss AG, Oberkochen Deutschland) zur Anwendung. Die Anregung von Cy3 erfolgte bei einer Wellenlänge von 543 nm und die Detektion unter Verwendung eines 560-615 nm Bandpassfilters. Die FITC-Fluoreszenz wurde mit 488 nm angeregt und dessen Emission bei 505-550 nm detektiert. Die Anregung von To-Pro 3 erfolgte mit einer Wellenlänge 633 nm und die Detektion mit Hilfe des 650 nm Bandpassfilters.

#### 2.2.20 Statistische Verfahren

Die deskriptive Statistik der Versuche erfolgte anhand der Computersoftware Sigma Stat Version 3.5 (Sigma Stat Software Inc., USA). Da in den Versuchen der vorliegenden Arbeit stets mehr als zwei Versuchsgruppen miteinander verglichen wurden, wurde zur Signifikanzanalyse die Einweg-Varianzanalyse (englisch: one-way analysis of variance = one-way ANOVA) angewendet. Die Computersoftware testet anhand des Kolmogorow-Smirnow-Tests, ob die eingegeben Daten normalverteilt sind, um anschließend die Varianzanalyse (hier die one-way ANOVA) durchzuführen. Der paarweise Mittelwertvergleich (post-hoc-Test) erfolgte anschließend mit dem Student-Newman-Keuls-Test. Berechnet wurden die Mittelwerte ± Standardabweichungen. Unterschiede mit einem p-Wert < 0,05 wurden als statistisch signifikant angenommen.

### 3 Ergebnisse

### 3.1 Generierung des rekombinanten CTRP 13-Proteins in *E. coli*-Bakterien

Für die Herstellung des rekombinanten CTRP 13-Proteins wurde das Plasmid pDEST17 CTRP 13 verwendet und in *E. coli*-Bakterien des *Rosetta*-Stamms transformiert. Um die optimalen Bedingungen für die Proteinexpression zu generieren, erfolgte die Zugabe von 0,3 mM IPTG bei verschiedenen Induktionstemperaturen (17°C, 37°C) und für unterschiedliche Zeitintervalle (2 h, 4 h und 6 h). Als Kontrolle diente für jede Temperatur eine Plasmid-Kultur ohne Zugabe von IPTG.

Abbildung 7 zeigt die Coomassie-Färbung des Polyacrylamid-Gels, um die darin enthaltenen Proteine sichtbar zu machen.





Die Coomassie-Färbung macht im Polyacrylamid-Gel vorhandene Proteine im Anschluss an die Proteinexpression in E. coli-Bakterien (Stamm: BL 21 Rosetta) sichtbar. Verwendeter Größenstandard: PageRuler Prestained Protein Ladder Plus (Fermentas GmbH). Da das verwendete Plasmid auch das Anhängen eines Polyhistidin-Tags (His-Tag) an das Protein kodiert, konnte die erfolgreiche Proteinsynthese durch Western Blot Analyse unter Verwendung eines spezifischen Anti-Polyhistidin-Tag-Antikörpers nachgewiesen werden. Die stärkste Proteinexpression von CTRP 13 zeigte sich bei einer Kultivierungstemperatur von 17°C und einer Induktionszeit von 4 h (Abbildung 8), so dass diese als optimale Induktionsbedingungen für die Generierung des rekombinanten CTRP 13 festgesetzt wurden.





Dargestellt ist der Nachweis des Polyhistidin-Tags mittels Anti-Polyhistidin-Tag-Primärantikörper und HRP-gekoppeltem sekundärem Antikörper im Western Blot im Anschluss an die Proteinexpression in E. coli-Bakterien (Stamm: BL 21 Rosetta). Verwendeter Größenstandard: PageRuler Prestained Protein Ladder Plus (Fermentas GmbH).

## 3.2 Vergleich der Expression von CTRP 13-mRNA in humanen und murinen Proben

Für die vorliegende Arbeit kamen sowohl humane als auch murine Proben zum Einsatz. Bei beiden Spezies wurde mRNA aus kardialen Zellen verwendet: Die humanen Proben stammten aus dem rechten Vorhof, die murinen Proben aus dem linken Ventrikel. Der Grund für diesen Unterschied in der Probenherkunft ist technisch bedingt: Bei herzchirurgischen Operationen geschieht der Anschluss der Herz-Lungen-Maschine über den rechten Vorhof des Patienten, sodass hierbei eine Probenentnahme leicht gelingt und kein zusätzliches Risiko für den Patienten birgt. Bei der Präparation von Rattenherzen hingegen, sind die Vorhöfe zu klein, um ausreichendes Probenmaterial zu erhalten und damit die umfangreichen Untersuchungen durchzuführen.

#### 3.2.1 Expression von CTRP 13-mRNA im rechten Vorhof humaner Individuen

In früheren Untersuchungen der Arbeitsgruppe konnte die Expression verschiedener CTRPs im rechten Vorhof humaner Individuen gezeigt werden. Die Expression variierte dabei in Abhängigkeit von Alter und körperlicher Konstitution [58]. Wei *et al.* beschrieben außerdem signifikant höhere mRNA-Level von CTRP 13 in männlichen Leptin-defizienten *ob/ob* Mäusen, was eine konstitutionsabhängige Expression des Proteins vermuten lässt [71]. Für die vorliegende Arbeit wurde daher die mRNA-Expression von CTRP 13 in humanen Proben des rechten Vorhofs in Abhängigkeit von Alter und Ernährungsstatus (normosom: BMI 18-25 kg/m<sup>2</sup>; adipös: BMI > 30 kg/m<sup>2</sup>) untersucht.

Zum Einsatz kam die mRNA von Gewebeproben aus dem rechten Vorhof humaner Individuen, welche von der Klinik für Herz- und Thoraxchirurgie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg bereitgestellt wurde. Mit Hilfe der reversen Transkription wurde aus der mRNA die dazu komplementäre DNA (englisch: complementary DNA = cDNA) hergestellt, welche im Anschluss bei der Realtime-PCR zum Einsatz kam. Für die Auswertung wurde die Expression der CTRP 13-mRNA mit der Expression der GAPDH abgeglichen.



Abbildung 9: Realtime-PCR-Analyse von CTRP 13 in ausgewählten Proben des rechten Herzohres herzchirurgischer Patienten.

Dargestellt ist die Auswertung der Realtime-PCR zum Nachweis der mRNA-Expression von CTRP 13 in humanen Individuen unter Berücksichtigung von Lebensalter und Stoffwechselsituation. Jung: Lebensalter < 55 Jahre. Alt: Lebensalter > 70 Jahre. Normosom: BMI 18,5 – 25 kg/m<sup>2</sup>: Adipös: BMI > 30 kg/m<sup>2</sup>. n=15 pro Gruppe. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD.

Die Expressionsanalyse ergab eine deutlich höhere CTRP 13-Expression im rechten Vorhof junger, adipöser Patienten. Die Proben der Patienten mit einem BMI zwischen 18,5 – 25 kg/m<sup>2</sup> zeichneten sich durch eine annähernd analoge Expressionsstärke von CTRP 13–mRNA ohne Bezug zum Lebensalter aus. Bei Patienten mit einem BMI > 30 kg/m<sup>2</sup> schien das Alter hingegen einen stärkeren Einfluss auf das Expressionsmuster zu nehmen, da in der Gruppe der unter 55-Jährigen eine annähernd 2-fach höhere mRNA-Expression im Vergleich zu den älteren Probanden beobachtet wurde (Abbildung 9).

## 3.2.2 Expression von CTRP 13-mRNA im linken Ventrikel von Ratten mit unterschiedlichen Diäten

Verwendet wurde die RNA aus Gewebeproben des linken Ventrikels von Ratten, welche über einen Zeitraum von 16 Wochen unterschiedlichen Nahrungszusammenstellungen ausgesetzt waren: Ein Teil der Tiere erhielt eine Kontrollnahrung (Haltungsdiät, HD), eine zweite Gruppe eine fettarme Diät (Low Fat Diet, LFD) und eine dritte Gruppe hochkalorisches Futter (High Fat Diet, HFD). Die Tiere wurden außerdem in Abhängigkeit ihres Lebensalters in zwei Gruppen unterteilt (junge Tiere mit einem Lebensalter von 3 Monaten, ältere Tiere mit einem Lebensalter von 18 Monaten). Die mRNA wurde mit Hilfe der reversen Transkription in cDNA umgeschrieben und diese im Anschluss für die Realtime-PCR verwendet. Für die Auswertung wurde die Expression der CTRP 13-mRNA mit der Expression der GAPDH abgeglichen.



Abbildung 10: Realtime-PCR-Analyse von CTRP 13 in ausgewählten Proben des linken Ventrikels von Ratten mit unterschiedlichen Diäten.

Dargestellt ist die Auswertung der Realtime-PCR zum Nachweis der mRNA-Expression von CTRP 13 im linken Ventrikel von Ratten mit unterschiedlichen Diäten. Jung: Lebensalter zu Beginn der Diät 3 Monate. Alt: Lebensalter zu Beginn der Diät 18 Monate. HD: Haltungsdiät (2,400 cal/g). LFD: Fettarme Diät (3,850 cal/g). HFD: Hochkalorische Nahrung (4,730 cal/g). n=14 pro Gruppe. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD. Signifikante Unterschiede sind mit \* gekennzeichnet, \*= p < 0,05, \*\* = p < 0,01.

In beiden Altersgruppen ergab die Expressionsanalyse der mRNA signifikant höhere CTRP 13-Level in den kardialen Proben der Tiere mit fettreicher Nahrung. Interessanterweise zeigte sich dabei eine signifikant höhere mRNA-Expression in jungen gegenüber älteren Tieren. Die Haltungsdiät wie auch die fettarme Diät führten zu keinen signifikanten Unterschieden im kardialen Expressionsmuster von CTRP 13 (Abbildung 10).

## 3.3 Das Expressionsmuster von CTRP 13 in verschiedenen kardialen Zelltypen der Ratte

Mit Hilfe der RT-PCR wurde das Expressionsmuster von CTRP 13-mRNA in verschiedenen kardialen Zelltypen der Ratte untersucht: Der stärkste Nachweis zeigte sich dabei in adulten Kardiomyozyten, kardialen Endothelzellen und im linken Ventrikel adulter Ratten. Eine schwächere Expression von CTRP 13 fand sich in neonatalen Kardiomyozyten und kardialen Fibroblasten (Abbildung 11). Zur Probenherkunft siehe Kapitel 2.1.6.1 für adulte Kardiomyozyten, den linken Ventrikel, die kardialen Endothelzellen und Fibroblasten. Für die Herkunft der neonatalen Kardiomyozyten siehe Kapitel 2.1.6.2.







Abbildung 11: Expressionsmuster von CTRP 13 in unterschiedlichen kardialen Zelltypen der Ratte.

Dargestellt ist das Ergebnis der RT-PCR. 1) zeigt die Expression von CTRP 13 (171 bp), 2) zeigt die Expression des Housekeeping-Gens GAPDH (247 bp). Negativkontrolle: steriles Wasser.

#### 3.4 Die intrazelluläre Lokalisation von CTRP 13 in Endothelzellen

Die Lokalisation von CTRP 13 in HUVEC wurde immunzytochemisch unter Verwendung verschiedener Antikörper untersucht (Kapitel 2.2.19). Eine Markierung der Zellmembran durch CD31 charakterisierte die gefärbten Zellen zunächst als Endothelzellen. Durch den Einsatz des im Western Blot verwendeten und somit spezifisch gegen CTRP 13 gerichteten Antikörpers konnte die intrazelluläre Lokalisation des Proteins detektiert werden: Es ließ sich ubiquitär im Zytosol der HUVEC nachweisen (Abbildung 12). Als Kontrolle diente die Inkubation in Sekundärantikörper-Lösung ohne die vorherige Verwendung von Primärantikörper, bei der keine Markierung beobachtet werden konnte (Bilder nicht gezeigt).



Zellkernfärbung

CTRP 13

CD 31 und CTRP 13

### Abbildung 12: Immunfluoreszenz für die Darstellung der intrazellulären Lokalisation von **CTRP 13.**

Die HUVEC wurden zunächst mit den Primärantikörpern (Anti-CD31 bzw. Anti-CTRP 13) inkubiert. Die Detektion der FITC- bzw. Cy3-Markierung, welche an den Sekundärantikörper gekoppelt waren, erfolgte mit dem konfokalen Laser-Scanning Mikroskop (Cy3: Anregungsstrahlung 543 nm, Emissionsstrahlung 560-615 nm; FITC: Anregungsstrahlung 488 nm, Emissionsstrahlung 505-550 nm). Die Zellkerne wurden mit To-Pro 3 642/661 1:200 in PBS angefärbt (Anregungsstrahlung 633 nm, Emissionsstrahlung 650 nm). Als Kontrolle diente die Sekundärantikörper-Lösung ohne Inkubation in die vorherige Verwendung von Primärantikörper.

### 3.5 Einfluss von CTRP 13 auf die intrazelluläre Signaltransduktion in Endothelzellen

Da eine ausgeprägte Expression von CTRP 13 in kardialen Endothelzellen nachgewiesen werden konnte (Kapitel 3.3), wurde der Einfluss des Proteins auf intrazelluläre Signalwege, von welchen in der Literatur eine Aktivierung durch andere CTRPs beschrieben ist, in diesen Zellen betrachtet. Dazu erfolgte die Stimulation von Endothelzellen aus unterschiedlich großen Gefäßen des Blutkreislaufs (mikrovaskulär = die kleinen Gefäße des Blutkreislaufs betreffend, hier die MVEC; makrovaskulär = die großen Gefäße des Blutkreislaufs betreffend, hier die HUVEC) über unterschiedliche Zeitintervalle (5 min, 10 min, 20 min, 40 min, 80 min und 24 h) mit 4 µg/ml CTRP 13. Im Anschluss wurde die Phosphorylierung verschiedener Enzyme durch Western Blot analysiert. Die Auswahl der Enzyme erfolgte entsprechend den Angaben in der Literatur. Analysiert wurden die Effekte einer Behandlung mit CTRP 13 auf die AMPK, die Proteinkinase B (Akt, Serin 473 und Threonin 308), die p38 MAPK und die p44/42 MAPK. Die Phosphorylierung zeigte dabei die Aktivierung der jeweiligen Signalkaskade an. Für die densitometrische Auswertung wurde zunächst ein Quotient gebildet, der das phosphorylierte Enzym in Beziehung zum Gesamtgehalt des Enzyms setzte.

# 3.5.1 Einfluss von CTRP 13 auf die intrazelluläre Signaltransduktion mikrovaskulärer Endothelzellen

Eine Phosphorylierung der AMPK an der Aminosäure Threonin 172 durch CTRP 13 zeigte sich nach einer Inkubationszeit von 5 min und 20 min auf das 1,5-fache der Kontrolle. Eine Stimulation nach 10 min, 40 min und 80 min konnte nicht detektiert werden. Nach 24 h wurde eine erneute Phosphorylierung des Enzyms auf das 1,6-fache beobachtet. Der Gehalt an gesamt AMPK zeigte über 24 h einen leichten Rückgang (Abbildung 13).

1) Phospho AMPK



2) Gesamt AMPK



#### 3) Graphische Darstellung



## Abbildung 13: Western Blot Nachweis der AMPK-Phosphorylierung durch CTRP 13 in MVEC.

Dargestellt ist die zeitabhängige Aktivierung der AMPK in MVEC nach der Behandlung mit CTRP 13. Als Kontrolle diente EC Growth Medium ohne Zusatz von Wachstumsfaktoren und CTRP 13. 1) Phosphorylierung der AMPK: Verwendeter Größenstandard: PageRuler Prestained Protein Ladder Plus (Fermentas GmbH). 2) Gesamt AMPK: Verwendeter Größenstandard: PageRuler Prestained Protein Ladder Plus (Fermentas GmbH). 3) Graphische Darstellung der Aktivierung nach Bildung des Quotienten aus phospho AMPK und gesamt AMPK. Angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  SD, n=6 pro Gruppe. Signifikante Unterschiede sind mit \* gekennzeichnet, \* = p < 0,05.

Eine Behandlung mit CTRP 13 führte weiterhin zur signifikanten Phosphorylierung der p38 MAPK nach einer Inkubationszeit von 5 min: Die Phosphorylierung erreichte nahezu das Doppelte im Vergleich zum Kontrollniveau. Nach einer Inkubationszeit von 10 min war der Effekt bereits aufgehoben und konnte erst nach einer Stimulationszeit von 80 min mit einem erneuten Anstieg der Phosphorylierung auf das 2-fache der Kontrolle beobachtet werden. Der Gehalt an gesamt p38 MAPK war über den Zeitraum von 24 h weitestgehend konstant (Abbildung 14).



1) Phospho p38 MAPK

2) Gesamt p38 MAPK



#### 3) Graphische Darstellung



## Abbildung 14: Western Blot Nachweis der p38 MAPK-Phosphorylierung durch CTRP 13 in MVEC.

Dargestellt ist die zeitabhängige Aktivierung der p38 MAPK in MVEC nach der Behandlung mit CTRP 13. Als Kontrolle diente EC Growth Medium ohne Zusatz von Wachstumsfaktoren und CTRP 13. 1) Phosphorylierung der p38 MAPK: Verwendeter Größenstandard: PageRuler<sup>TM</sup> Prestained Protein Ladder Plus (Fermentas GmbH). 2) Gesamt p38 MAPK: Verwendeter Größenstandard: PageRuler<sup>TM</sup> Prestained Protein Ladder Plus (Fermentas GmbH). 3) Graphische Darstellung der Aktivierung nach Bildung des Quotienten aus phospho p38 MAPK und gesamt p38 MAPK. Angegeben sind die Mittelwerte ± SD, n=6 pro Gruppe. Signifikante Unterschiede sind mit \* gekennzeichnet, \* = p < 0,05.

Eine Behandlung mit CTRP 13 führte in mikrovaskulären Endothelzellen zu einer signifikanten Phosphorylierung der p44/42 MAPK auf annähernd das 4-fache der Kontrolle nach einem Zeitintervall von 5 min. Auch nach 10-minütiger Behandlung zeigte sich eine Enzymaktivierung auf fast das Doppelte im Vergleich zum Kontrollniveau. Nach längerer Inkubation mit CTRP 13 (20 min, 40 min, 80 min, 24 h) konnte keine erhöhte Phosphorylierung detektiert werden. Für den Gesamtgehalt an p44/42 MAPK wurde weitestgehend Konstanz über 24 h festgestellt (Abbildung 15).



1) Phospho p44/42 MAPK

2) Gesamt p44/42 MAPK



#### 3) Graphische Darstellung



## Abbildung 15: Western Blot Nachweis der p44/42 MAPK-Phosphorylierung durch CTRP 13 in MVEC.

Dargestellt ist die zeitabhängige Aktivierung der p44/42 MAPK in MVEC nach der Behandlung mit CTRP 13. Als Kontrolle diente EC Growth Medium ohne Zusatz von Wachstumsfaktoren und CTRP 13. 1) Phosphorylierung der p44/42 MAPK: Verwendeter Größenstandard: PageRuler<sup>TM</sup> Prestained Protein Ladder Plus (Fermentas GmbH). 2) Gesamt p44/42 MAPK: Größenstandard: PageRuler<sup>TM</sup> Prestained Protein Ladder Plus (Fermentas GmbH). 3) Graphische Darstellung der Aktivierung nach Bildung des Quotienten aus phospho p44/42 MAPK und gesamt p44/42 MAPK. Angegeben sind die Mittelwerte ± SD, n=6 pro Gruppe. Signifikante Unterschiede sind mit \* gekennzeichnet, \* = p < 0,05, \*\* = p < 0,01.

Eine Änderung der Phosphorylierung der Proteinkinase B im Vergleich zur Kontrollgruppe konnte nach keinem Stimulationszeitraum mit CTRP 13 in mikrovaskulären Endothelzellen beobachtet werden.
# 3.5.2 Einfluss von CTRP 13 auf die intrazelluläre Signaltransduktion makrovaskulärer Endothelzellen

Eine Behandlung mit CTRP 13 führte in makrovaskulären Endothelzellen nach 5minütiger Inkubation zu einer deutlichen Phosphorylierung der AMPK. Zu späteren Zeitpunkten zeigte sich zunächst ein Abfall der Aktivierung über 10, 20 und 40 min gefolgt von einer erneuten Phosphorylierung auf mehr als das 1,5-fache der Kontrolle nach einer Inkubation über 80 min und 24 h. Der Gehalt an gesamt AMPK war über den betrachteten Zeitraum von 24 h weitestgehend konstant (Abbildung 16).



1) Phospho AMPK

2) Gesamt AMPK



#### 3) Graphische Darstellung



## Abbildung 16: Western Blot Nachweis der AMPK-Phosphorylierung durch CTRP 13 in HUVEC.

Dargestellt ist die zeitabhängige Aktivierung der AMPK in HUVEC nach der Behandlung mit CTRP 13. Als Kontrolle diente EC Growth Medium ohne Zusatz von Wachstumsfaktoren und CTRP 13. 1) Phosphorylierung der AMPK: Verwendeter Größenstandard: PageRuler Prestained Protein Ladder Plus (Fermentas GmbH). 2) Gesamt AMPK: Verwendeter Größenstandard: PageRuler Prestained Protein Ladder Plus (Fermentas GmbH). 3) Graphische Darstellung der Aktivierung nach Bildung des Quotienten aus phospho AMPK und gesamt AMPK. Angegeben sind die Mittelwerte ± SD, n=6 pro Gruppe. Signifikante Unterschiede sind mit \* gekennzeichnet, \* = p < 0,05. CTRP 13 führte in humanen Endothelzellen zu einer annähernd 3-fach stärkeren Phosphorylierung der p44/42 MAPK nach 5-minütiger Stimulation im Vergleich zur Kontrolle. Eine Enzymaktivierung auf mehr als Doppelte im Vergleich zum Kontrollniveau konnte nach 10 min, 20 min und 40 min Inkubationszeit beobachtet werden. Nach längerer Behandlung mit CTRP 13 konnte keine gesteigerte Phosphorylierung nachgewiesen werden. Unterschiede im Gesamtgehalt der p44/42 konnten während der 24 h nicht detektiert werden (Abbildung 17).



1) Phospho p44/42 MAPK

2) Gesamt p44/42 MAPK



#### 3) Graphische Darstellung



# Abbildung 17: Western Blot Nachweis der p44/42 MAPK-Phosphorylierung durch CTRP 13 in HUVEC.

Dargestellt ist die zeitabhängige Aktivierung der p44/42 MAPK in HUVEC nach der Behandlung mit CTRP 13. Als Kontrolle diente EC Growth Medium ohne Zusatz von Wachstumsfaktoren und CTRP 13. 1) Phosphorylierung der p44/42 MAPK: Verwendeter Größenstandard: PageRuler<sup>TM</sup> Prestained Protein Ladder Plus (Fermentas GmbH). 2) Gesamt p44/42 MAPK: Verwendeter Größenstandard: PageRuler<sup>TM</sup> Prestained Protein Ladder Plus (Fermentas GmbH). 3) Graphische Darstellung der Aktivierung nach Bildung des Quotienten aus phospho p44/42 MAPK und gesamt p44/42 MAPK. Angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  SD, n=6 pro Gruppe. Signifikante Unterschiede sind mit \* gekennzeichnet, \* = p < 0,05, \*\* = p < 0,01.

Eine Änderung der Phosphorylierung der p38 MAPK sowie der Proteinkinase B im Vergleich zur Kontrollgruppe konnte nach keinem Stimulationsintervall mit CTRP 13 in HUVEC beobachtet werden.

#### 3.6 Einfluss von CTRP 13 auf die Proliferation von Endothelzellen

Sowohl in MVEC als auch in HUVEC zeigte sich die Aktivierung verschiedener Signalwege nach der Stimulation mit CTRP 13. Die untersuchten Enzyme haben unterschiedlichste Einflüsse auf den Metabolismus von Zellen. Um mögliche Effekte des CTRP-Proteins über eine Aktivierung der zuvor untersuchten Enzyme auf die Proliferation von Endothelzellen zu ermitteln, wurden verschiedene Versuchsansätze gewählt: Der Einfluss auf das Proliferationsverhalten mikrovaskulärer Endothelzellen wurde in Zählversuchen analysiert. Außerdem kam der BrdU-Assay zum Einsatz, welcher eine Standardmethode beim Nachweis proliferierender Zellen darstellt. Um Rückschlüsse auf Kausalzusammenhänge zu ziehen, wurden Enzyminhibitoren verwendet: Als selektiver Inhibitor der AMPK kam AraA zum Einsatz. Die p44/42 MAPK wurde durch U0126 selektiv gehemmt und die p38 MAPK durch SB909120. Ein möglicher Einfluss von CTRP 13 auf die Migration und Proliferation makrovaskulärer Zellen wurde mittels Wound healing Assay untersucht.

# 3.6.1 Einfluss auf das Proliferationsverhalten mikrovaskulärer Endothelzellen3.6.1.1 Einfluss von CTRP 13 auf die Zellzahl von MVEC

Um den Effekt von CTRP 13 auf das Proliferationsverhalten von mikrovaskulären Endothelzellen zu analysieren, wurden 4 Gruppen generiert. Eine Gruppe wurde mit 4  $\mu$ g/ml CTRP 13 über 24 h stimuliert und mit einer Kontrollgruppe ohne Zugabe von CTRP 13 verglichen. Ein Teil der Zellen wurde außerdem mit dem selektiven Inhibitor der AMPK AraA behandelt, um Rückschlüsse auf die intrazellulären Mechanismen zu ziehen. Dies erfolgte durch eine 30-minütige Präinkubation mit 500  $\mu$ M AraA und die anschließende Zugabe von 4  $\mu$ g/ml CTRP 13. Als interne Kontrolle diente die Zugabe des Enzyminhibitors ohne Zusatz von CTRP 13.

Es zeigte sich eine deutlich niedrigere Zellzahl nach der Behandlung mit CTRP 13: Die Zellzahl erreichte nur knapp 60 % im Vergleich zum Kontrollniveau. Die Zellen, welche mit dem Inhibitor der AMPK AraA behandelt wurden, zeigten keine Unterschiede in der Zellzahl im Vergleich zur Kontrollgruppe. Somit konnte ein Eigeneffekt des Inhibitors ausgeschlossen werden. Der abschwächende Effekt von CTRP 13 auf die Zellzahl ließ sich nach der 30-minütigen Präinkubation mit AraA als Zeichen der Bedeutung der AMPK nicht mehr nachweisen – es zeigte sich kein signifikanter Unterschied verglichen mit der Kontrolle (Abbildung 18).



#### Abbildung 18: Einfluss von CTRP 13 auf die Zellzahl von MVEC.

Dargestellt ist der Einfluss von CTRP 13 auf die Zellzahl von MVEC, welche über 24 h mit 4  $\mu$ g/ml CTRP 13 behandelt wurden. Als Kontrolle diente die Kultivierung der Zellen in Medium ohne Zugabe von Wachstumsfaktoren und CTRP 13. Der AMPK-Inhibitor AraA wurde in einer Konzentration von 500  $\mu$ M verwendet. Die Präinkubationszeit betrug 30 min. Angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  SD, n=9 pro Gruppe. Signifikante Unterschiede sind mit \* gekennzeichnet, \*\* = p < 0,01.

#### 3.6.1.2 Bromdesoxyuridin–Färbung proliferierender MVEC

Eine Quantifizierung des anti-proliferativen Effekts von CTRP 13 in mikrovaskulären Endothelzellen und die mögliche Beteiligung bestimmter Signalkaskaden erfolgte auch mit Hilfe des BrdU Cell Proliferation Assay Kits der Firma Biovision (Kapitel 2.2.17.2). Abbildung 19 zeigt die Ergebnisse des Versuchs: Die Stimulation mit CTRP 13 führte zu einer verminderten Proliferationsrate der MVEC auf knapp 60 % im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Präinkubation der Zellen mit dem Enzyminhibitor AraA und die anschließende Zugabe von CTRP 13 führten zu einer Proliferationsrate, welche das Kontrollniveau überstieg. Die Enzyminhibitoren SB202190 und U0126, welche die Signalkaskaden der p38 MAPK beziehungsweise der p44/42 MAPK negativ beeinflussen, führten im Experiment trotz der Zugabe von CTRP 13 zu niedrigeren Proliferationsraten verglichen mit der Kontrollgruppe. Die MVEC, welche mit CTRP 13 und dem selektiven Inhibitor der p44/42 MAPK behandelt wurden, erreichten eine Proliferationsrate von unter 50 % verglichen mit der Kontrollgruppe. Die Proliferationsrate zeigte sich hier am niedrigsten. Die Zellen, welche nur mit einem der jeweiligen Inhibitoren behandelt wurden, zeigten keine Unterschiede der Proliferation im Vergleich zur Kontrollgruppe. Somit konnte ein selektiver Effekt der Inhibitoren auf das Proliferationsverhalten ausgeschlossen werden.



Abbildung 19: Einfluss von CTRP 13 auf die Proliferation von MVEC.

Dargestellt ist der Einfluss von CTRP 13 auf das Proliferationsverhalten von MVEC, welche über 24 h mit 4 µg/ml CTRP 13 behandelt wurden. Als Kontrolle diente die Kultivierung der Zellen in Medium ohne Zugabe von Wachstumsfaktoren und CTRP 13. Der AMPK-Inhibitor AraA wurde in einer Konzentration von 500 µM verwendet. Der Inhibitor der p38 MAPK-SB202190 und der p44/42 MAPK-Inhibitor U0126 wurden jeweils in einer Konzentration von 10 µM eingesetzt. Die Präinkubationszeit betrug 30 min. Angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  SD, n=48 pro Gruppe. Signifikante Unterschiede sind mit \* gekennzeichnet, \* = p < 0,05.

# 3.6.2 Einfluss auf das Proliferationsverhalten makrovaskulärer Endothelzellen3.6.2.1 Proliferation der Monolayer-HUVEC-Kultur

Um den Effekt von CTRP 13 auf das Proliferations- und Migrationsverhalten von makrovaskulären Endothelzellen zu analysieren, wurden humane Endothelzellen aus der Nabelschnur in Schalen mit Silikoneinsätzen ausgesät und kultiviert (Kapitel 2.2.17.3). Durch die Einsätze konnte ein zellfreier Spalt mit einer exakten Breite von 500 µm generiert werden. Nach dem Entfernen des Einsatzes wurden mit Hilfe der Mikroskopiereinheit des JuLI™ Br Live Cell Analyzer (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen) über insgesamt 72 h Standbildserien mit 5-minütigen Zeitintervallen angefertigt. Als Kontrolle dienten Zellen in Zellmedium ohne Zusatz von Wachstumsfaktoren oder CTRP 13. Die Zellen der zweiten Schale wurden mit 4 µg/ml CTRP 13 stimuliert.

1) Originalbilder



#### 2) Graphische Darstellung



#### Abbildung 20: Einfluss von CTRP 13 auf die Migration und Proliferation von HUVEC.

Dargestellt ist der Einfluss von 4 µg/ml CTRP 13 auf das Migrations- und Proliferationsverhalten von HUVEC. Als Kontrolle diente die Kultivierung der Zellen in Medium ohne Zugabe von Wachstumsfaktoren und CTRP 13. Mit Hilfe von Silikoneinsätzen (Culture inserts, Ibidi) wurde ein zellfreier Spalt mit einer definierten Breite von 500 µm generiert. 1) zeigt die Originalbilder der Kameraeinheit. 2) zeigt die relative Spaltbreite in Prozent: Ausgehend von der Bildmitte wurden fünf Pixelkoordinaten mit identischem Abstand zueinander festgelegt, die jeweilige Spaltbreite gemessen und der Mittelwert berechnet.

Abbildung 20 veranschaulicht unter 1) an einigen ausgewählten Bildern beispielhaft den Einfluss von CTRP 13 auf das Proliferations- und Migrationsverhalten der HUVEC: Zu Beginn des Versuchs zeigte sich in beiden Schalen ein konfluenter Zellrasen mit einem exakt definierten zellfreien Spalt mit einer Breite von 500 µm. Nach einer Inkubationszeit von 24 h bedeckten die Endothelzellen der Kontrollgruppe gleichmäßig den zuvor zellfreien Spalt und generierten nach ca. 30 h einen homogenen konfluenten Zellrasen. Die mit CTRP 13 behandelten Zellen proliferierten und migrierten deutlich langsamer und erreichten zu keinem Zeitpunkt des gesamten Beobachtungszeitraums von 72 h eine komplette Konfluenz. Der zweite Teil der Abbildung quantifiziert die relative Spaltbreite in Bezug zur Zeit: Mit steigendem Beobachtungszeitraum wird der negative Effekt von CTRP 13 auf Proliferation und Migration der Zellen zunehmend deutlicher. Zu beachten ist, dass die dargestellte Abbildung rein deskriptiv ist: Ausgehend von der Bildmitte wurden fünf Pixelkoordinaten mit identischem Abstand zueinander festgelegt, die jeweilige Spaltbreite gemessen und der Mittelwert

berechnet. Für eine aussagekräftige statistische Auswertung ist die Stichprobengröße zu klein. Die Abbildung dient der visuellen Veranschaulichung des CTRP 13-Effekts.

#### 3.7 Einfluss von CTRP 13 auf den Zelltod mikrovaskulärer Endothelzellen

In der vorliegenden Arbeit konnte ein antiproliferativer Effekt von CTRP 13 auf mikround makrovaskuläre Endothelzellen dokumentiert werden. Die Zählversuche an MVEC zeigten einen negativen Einfluss von CTRP 13 auf die Zellzahl. Die deutliche Verringerung der Zellzahl in der CTRP 13-Gruppe könnte auch durch eine Zunahme des Zelltods hervorgerufen werden. Um einen möglichen Effekt von CTRP 13 auf den Zelltod von Endothelzellen zu evaluieren, wurden die basale Apoptose- und Nekroserate mit Hilfe des Apoptose Assays bestimmt (Kapitel 2.2.18). Als Kontrolle diente die Kultivierung der Zellen in Medium ohne Zugabe von Wachstumsfaktoren oder CTRP 13. Eine zweite Gruppe wurde über 24 h mit 4 µg/ml CTRP 13 stimuliert.

Es konnte keine Induktion des Zelltods nach einer Behandlung der Endothelzellen mit CTRP 13 detektiert werden (Abbildung 21). Sowohl die basale Apoptose-, als auch die basale Nekroserate erreichten annähernd das Kontrollniveau.



#### Abbildung 21: Einfluss von CTRP 13 auf den Zelltod von MVEC.

Dargestellt ist der Einfluss von 4 µg/ml CTRP 13 auf den Zelltod von MVEC. Hoechst-positive Zellen wurden als apoptotisch, PI-positive als nekrotisch gewertet. Als Kontrolle diente die Kultivierung der Zellen in Medium ohne Zugabe von Wachstumsfaktoren und CTRP 13. Pro Schale wurden 5 zufällig ausgewählte Gesichtsfelder analysiert. Angegeben sind die Mittelwerte ± SD, n=40 pro Gruppe.

#### 4 Diskussion

#### 4.1 Das Expressionsmuster von CTRP 13

Sowohl Adiponektin als auch seine Strukturhomologe, die CTRPs, werden in verschiedenen Gewebearten und dabei zu einem hohen Anteil im Fettgewebe verschiedener Spezies gebildet [51]. Im Gegensatz zu Adiponektin werden die CTRPs nicht nur von den Adipozyten sondern vor allem von der stromavaskulären Fraktion sezerniert [51, 71–73] – ein Teil des Fettgewebes, der neben Fibroblasten, Endothelzellen und glatten Muskelzellen auch Vorstufen der Adipozyten enthält [46]. Eine umfangreiche Untersuchung der Gewebeexpression von CTRP 13 wurde 2011 durch Wei *et al.* durchgeführt: Sowohl in murinen als auch in humanen Proben finden sich die höchsten mRNA-Level im Fettgewebe und im Gehirn [71]. Wong *et al.* demonstrierten weiterhin die kardiale Expression der CTRPs 1, 2, 6 und 7 in adulten Mäusen [73]. Ergänzend dazu konnte in vorangegangenen Arbeiten der Gruppe erstmals die humane kardiale Expression der CTRPs 1, 2, 7 und 9 gezeigt werden [58].

Die Datenlage wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit mit dem Nachweis der CTRP 13-Expression im linken Ventrikel von Ratten und im rechten Vorhof humaner Individuen erweitert. Außerdem wurden erstmals die unterschiedlichen Zelltypen des Herzens hinsichtlich einer CTRP 13-Expression analysiert.

#### 4.1.1 Kardiale Expression in Abhängigkeit von Alter und Ernährungsstatus

Wong *et al.* untersuchten die altersabhängige Expression von Adiponektin und verschiedener CTRPs in murinem epididymalem Fettgewebe in Abhängigkeit vom Phänotyp: Adipöse Leptin-defiziente Mäuse zeigten dabei im Alter von 8 Wochen eine signifikant stärker ausgeprägte Expression von Adiponektin und der CTRPs 1, 2, 6, 7 und 10 im Vergleich zur normosomen Kontrollgruppe. Im Gegensatz dazu zeigten Tiere im Alter von 12 Wochen keinen Unterschied im Expressionsmuster dieser CTRPs, wohingegen eine deutlich niedrigere Adiponektin-Expression in den Leptin-defizienten Tieren verglichen mit den normosomen Tieren detektiert werden konnte [72]. Auch für CTRP 13 wurden deutlich höhere mRNA-Level in 8 Wochen alten Leptin-defizienten Mäusen verglichen mit der normosomen Kontrollgruppe demonstriert, weshalb die Autoren eine potenzielle Rolle von CTRP 13 im Metabolismus postulierten [71]. Ihre Hypothese untermauerten Wei *et al.* mit einer gesteigerten CTRP 13-Expression nach einer Behandlung von Hepatozyten mit Rosiglitazon, welches als sogenannter Insulin-Sensitizer die Gewebeempfindlichkeit für Insulin steigert und somit antidiabetisch wirkt. Die beobachtete erhöhte CTRP 13-Expression in Leptin-

defizienten Tieren könnte laut Wei *et al.* einer kompensatorischen Reaktion auf eine Adipositas-bedingte periphere Insulinresistenz entsprechen [71].

In vorangegangenen Studien unserer Arbeitsgruppe wurde die alters- und gewichtsabhängige Expression von Adiponektin und verschiedener CTRPs (1, 2, 7 und 9) am Menschen untersucht: Hierbei zeigte sich einerseits, dass die Adiponektin-Expression im epikardialen Fettgewebe normosomer und adipöser Individuen mit zunehmendem Lebensalter signifikant erniedrigt ist. Außerdem zeigte sich in beiden Altersgruppen eine niedrigere Adiponektin-Expression bei Adipösen im Vergleich zu Normosomen [39]. Dies entspricht dem von Wong *et al.* beobachteten Adiponektin-Defizit bei adipösen älteren Mäusen [72]. Das kardiale Expressionsmuster der CTRPs 7 und 9 differiert hingegen mit einer signifikant höheren RNA-Expression bei adipösen älteren Probanden [58]. Somit wurde in Anlehnung an die von Wong *et al.* beschriebenen Beobachtungen die Hypothese aufgestellt, dass es mit zunehmendem Lebensalter zu einer kompensatorischen Heraufregulation der CTRPs kommt, um ein aufgetretenes Adiponektin-Defizit auszugleichen und eventuelle kardioprotektive Effekte zu übernehmen [58].

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit ergänzen die Datenlage mit dem Nachweis der CTRP 13-Expression in humanem kardialem Gewebe mit signifikant höherem RNA-Level im rechten Vorhof adipöser Individuen mit einem Lebensalter unter 55 Jahren. Die Ergebnisse decken sich teilweise mit dem kardialen Expressionsmuster von CTRP 7 und 9, da diese ebenfalls eine höhere RNA-Expression in adipösen Individuen aufweisen [58]. Die Annahme einer kompensatorischen Heraufregulation der CTRPs im Rahmen eines durch Adipositas bedingten Adiponektin-Defizits wird somit weiter untermauert. Erstmals wird aber auch eine altersabhängige Variabilität im kardialen Expressionsmuster unterschiedlicher CTRPs aufgezeigt, dessen Ursache in altersabhängigen Wirkungsweisen der verschiedenen CTRPs begründet sein könnte.

#### 4.1.2 Differenzielle Expression bei Adipositas

Aus der Literatur sind Effekte von CTRP 13 auf das Körpergewicht und die Nahrungsaufnahme von Mäusen bekannt: Fettreiche Nahrung führte zu einer Erhöhung der CTRP 13 mRNA-Expression im Hypothalamus der Tiere. Nahrungsrestriktion resultierte in einer Herunterregulation der Expression. Nach der zentralen Injektion von rekombinantem CTRP 13 in den Seitenventrikel der Tiere konnte eine Verringerung der Nahrungsaufnahme mit signifikanter Reduktion des Körpergewichts beobachtet werden [7]. Auch die zentrale Applikation von Adiponektin bewirkte eine Verringerung des Körpergewichts – der Kausalzusammenhang besteht hierbei im Gegensatz zu CTRP 13 [7] in einer Steigerung des Energieverbrauchs [45]. Für andere CTRPs wurde ebenfalls eine nahrungsabhängige Expression beschrieben: So zeigte sich beispielsweise für CTRP 9 eine signifikant niedrigere kardiale Expression bei Tieren mit fettreicher Nahrung [60]. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten hingegen signifikant höhere CTRP 13-Level in den kardialen Proben der Tiere mit fettreicher Nahrung detektiert werden. Interessanterweise zeigte sich dabei eine deutlich höhere mRNA-Expression in jungen gegenüber älteren Tieren. Dies korreliert mit den von Wong et al. beschriebenen Beobachtungen [73] und deckt sich weiterhin mit den Ergebnissen der humanen Proben der vorliegenden Arbeit. Die Kontrolldiät wie auch die fettarme Diät führten zu keinen signifikanten Unterschieden im kardialen Expressionsmuster von CTRP 13. Die Ergebnisse korrelieren mit der von Byerly et al. beschrieben Expression von CTRP 13 in Abhängigkeit von der verabreichten Nahrung [7]. Zu beachten ist allerdings die Diskrepanz der untersuchten Gewebeproben: Die in dieser Arbeit verwendeten Proben stammen aus dem linken Ventrikel der Tiere; die Untersuchungen aus der Literatur beziehen sich auf das Gewebe des Hypothalamus.

Des Weiteren wurde die mRNA-Expression von CTRP 13 in humanen kardialen Gewebeproben untersucht und mit der Expression in murinen kardialen Proben verglichen. Interessanterweise zeigte die mRNA-Expression von CTRP 13 der humanen und murinen Proben deutliche Parallelen: In beiden Spezies ließ sich die höchste RNA-Expression in adipösen Individuen beziehungsweise in Tieren mit fettreicher Nahrung beobachten. Auch die höhere Expression in jungen Probanden bzw. Tieren im Vergleich zur älteren Gruppe korreliert in beiden Spezies. Obwohl die Ergebnisse in humanen und murinen Proben deutliche Parallelen aufweisen, soll an dieser Stelle kurz auf die Limitation hinsichtlich der Interpretation und Vergleichbarkeit der Ergebnisse eingegangen werden. Zum einen differiert die Generierung der betrachteten Gruppen: Während die humanen Proben hinsichtlich Lebensalter und Körpergewicht klassifiziert wurden, richtete sich die Einteilung der murinen Proben

Diskussion

nach Lebensalter und verabreichter Nahrung über einen Zeitraum von 16 Wochen. Obwohl eine hochkalorische Nahrung in einer Zunahme des Körpergewichts resultiert, sind die Voraussetzungen nicht mit denen der humanen Proben identisch, da die eingeschlossenen Patienten schon zu Beginn der Studie adipös waren. Weiterhin unterscheidet sich auch das verwendete Gewebe hinsichtlich seiner Herkunft: Die humanen Proben stammten aus dem rechten Herzohr; die murinen Proben wurden aus dem linken Ventrikel gewonnen. In beiden Fällen handelt es sich um kardiales Gewebe, allerdings unterliegen die verschiedenen Abschnitte des Herzen unterschiedlichen Anforderungen.

Der Nachweis einer erhöhten kardialen CTRP 13-Expression in adipösen jungen Tieren bzw. Probanden untermauert nicht nur die Hypothese einer kompensatorischen Heraufregulation zum Ausgleich eines Adiponektin-Defizits bei Adipositas. Vielmehr stellt sich die Frage, ob eine frühzeitige – das heißt in jungen Lebensjahren – gesteigerte CTRP 13-Expression bereits protektive Effekte im adipösen Organismus vermittelt.

#### 4.1.3 Expression in verschiedenen kardialen Zelltypen

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte eine kardiale Expression von CTRP 13 bei Ratten und Menschen gezeigt werden. Zur weiteren Quantifizierung wurden einzelne kardiale Zelltypen der Ratte hinsichtlich ihrer CTRP 13-Expression näher betrachtet, da sich das kardiale Gewebe neben Kardiomyozyten auch aus Fibroblasten und Endothelzellen zusammensetzt. Gemessen an der Zellzahl sind dabei die Fibroblasten der am häufigsten vorkommende kardiale Zelltyp. Gemessen am Volumen ist der Anteil der Kardiomyozyten am größten. Auch die stromavaskuläre Fraktion als Hauptsekretionsort der CTRPs im Fettgewebe setzt sich aus verschiedensten Zelltypen zusammen [46], sodass deren Analyse sowie ihre potenzielle Sekretionsleistung einen interessanten Untersuchungsansatz darstellt. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit legen dabei vor allem eine Beteiligung der Endothelzellen sowie der Kardiomyozyten an der Produktion und Sekretion von CTRP 13 nahe. Wei et al. untersuchten neben verschiedenen Gewebearten auch die CTRP 13-Expression in unterschiedlichen Zelltypen: Hierbei zeigte sich eine mRNA-Expression in verschiedenen humanen Blutzellen (Lymphozyten, Monozyten) [71], sodass diese ebenfalls als potenzielle Sekretionsquelle in Betracht kommen.

#### 4.1.4 Endotheliale Expression und intrazelluläre Lokalisation

CTRP 13 wird nicht nur in verschiedenen Geweben, sondern auch in verschiedenen Zelltypen differenziell exprimiert [71]. In der vorliegenden Arbeit konnte dies für adulte Kardiomyozyten, kardiale murine Endothelzellen und humane Endothelzellen der Nabelschnur gezeigt werden. Zur immunhistochemischen Markierung von Endothelzellen macht man sich die Expression des Oberflächenantigens CD31 zunutze. Dabei ist zu beachten, dass CD31 außerdem auf der Zelloberfläche von Granulozyten, Thrombozyten und Lymphozyten exprimiert wird [59], weshalb nach der Aufreinigung der Zellsuspension im Rahmen der Zellisolation eine Betrachtung der Zellen unter dem Lichtmikroskop erfolgte, um die Endothelzellen auch anhand ihrer typischen Morphologie zu identifizieren (Abbildung 5).

In Adipozyten lässt sich Adiponektin im Zytosol nachweisen – insbesondere im perinukleären Kompartiment zeigt es ein erhöhtes Vorkommen [75]. Im Gegensatz sich das höchste Adiponektin-Vorkommen in murinen aortalen dazu ließ Endothelzellen an der luminalen und basalen Zellmembran nachweisen [36]. Laut Mori et al. kommen hierfür maßgeblich zwei Erklärungsansätze in Betracht: Adiponektin könnte die Zelle durchqueren oder entlang des Interzellulärspalts von der luminalen zur basalen Zellmembran gelangen. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen das ubiquitäre Vorkommen von CTRP 13 im Zytosol humaner Endothelzellen – dies deckt sich einerseits mit den von Xie et al. gemachten Beobachtungen hinsichtlich des Adiponektin-Vorkommens in Adipozyten [75]. Die Hypothese einer Zelldurchwanderung von Adiponektin [36] bzw. seiner Strukturhomologe wird ebenfalls untermauert und könnte Gegenstand weiterführender Untersuchungen sein. Von Bedeutung sind dabei vor allem die Analyse potenzieller Rezeptoren für CTRP 13 auf der Zelloberfläche. Tan et al. konnten 2004 die Expression beider Adiponektinrezeptoren (AdipoR1 und 2) auf der Zelloberfläche humaner aortaler Endothelzellen nachweisen [62]. Basierend auf der ähnlichen Molekülstruktur der Familie der CTRPs mit Adiponektin scheint die Vermutung naheliegend, dass auch die in der vorliegenden Arbeit beobachteten Effekte von CTRP 13 über diese Rezeptoren vermittelt werden. Im Hinblick auf künftige Untersuchungen stellen sich daher die Fragen, ob die Adiponektinrezeptoren auf der Zelloberfläche von HUVEC und MVEC exprimiert werden und ob es zu einer Interaktion von CTRP 13 mit diesen Rezeptoren kommt.

### 4.2 Einfluss von CTRP 13 auf die Phosphorylierung der AMPK, der p44/42 MAPK und der p38 MAPK in Endothelzellen

Adiponektin und einige Mitglieder der CTRP-Familie (CTRP 1, 2, 5, 6, 7 und 9) führen zu einer Aktivierung der AMPK [58, 71]. Die CTRPs 1, 3 und 9 induzieren die Phosphorylierung der p44/42 MAPK, während CTRP 3 zudem die Aktivierung der p38 MAPK bewirkt [51]. In der Literatur wird außerdem die CTRP 13-vermittelte Phosphorylierung der AMPK in Adipozyten, Hepatozyten und Myozyten beschrieben [71]. Für die vorliegende Arbeit stellte sich daher die Frage, ob CTRP 13 in den untersuchten Endothelzellen eine Aktivierung der genannten Signalkaskaden bewirkt. Die Ergebnisse zeigen, dass CTRP 13 eine gesteigerte Phosphorylierung der AMPK, der p44/42 MAPK und der p38 MAPK in Endothelzellen induziert.

Das Phosphorylierungsprofil der AMPK durch CTRP 13 in MVEC und HUVEC entspricht weitestgehend dem von Wei et al. gezeigten Phosphorylierungsprofil in Adipozyten und Hepatozyten [71]. In vorherigen Untersuchungen der Arbeitsgruppe konnte die Phosphorylierung der AMPK in Kardiomyozyten durch Adiponektin und die CTRPs 1, 2, 7 und 9 gezeigt werden. Auch in diesen Zellen fand sich eine signifikante Aktivierung der AMPK nach einer Inkubationszeit von 5 min. Für die CTRPs 1 und 9 konnte außerdem ein ähnliches Aktivierungsmuster mit einer signifikanten Phosphorylierung nach der Langzeitinkubation von 24 h detektiert werden [58]. Die Beobachtungen der vorliegenden Arbeit lassen vermuten, dass die induzierte Phosphorylierung der AMPK durch verschiedene Mitglieder der CTRP-Familie unabhängig vom Zelltyp zu einem vergleichbaren Aktivierungsprofil führt. Dagegen spricht die von Wei et al. demonstrierte AMPK-Aktivierung durch CTRP 13 in Myozyten (L6 Myotuben) mit einer Phosphorylierung zu deutlich späteren Stimulationszeitpunkten [71]. Außerdem wird die AMPK nicht von allen CTRPs aktiviert [51]. Obwohl die Mitglieder der CTRP-Familie deutliche Parallelen in ihrer Molekülstruktur – insbesondere im Aufbau der globulären Domäne – aufweisen [73] und ein vergleichbares Phosphorylierungsprofil hervorrufen, gibt es dennoch signifikante Unterschiede. Diese könnten beispielsweise durch eine Analyse potenzieller CTRP-Rezeptoren auf der Oberfläche der genannten Zelltypen geklärt werden. Es ist bisher nicht hinreichend bekannt, über welche Rezeptoren die CTRPs und im Besonderen CTRP 13 - ihre Effekte vermitteln. Parallelen im Aktivierungsprofil unterschiedlicher Zellen durch CTRP 13 könnten allerdings durch die Bindung identischer Rezeptoren auf der Zelloberfläche erklärt werden. Vermutet wird eine Bindung der CTRPs an Adiponektinrezeptoren - im Speziellen konnte bereits eine Interaktion von AdipoR1 und CTRP 9 gezeigt werden [82].

Die im Rahmen dieser Arbeit gezeigte doppelgipflige Phosphorylierung der AMPK und der p38 MAPK in MVEC lassen unterschiedliche Erklärungsansätze zu: Zum einen könnte es zu späteren Stimulationszeitpunkten zu einer Sättigung der Rezeptoren für CTRP 13 gekommen sein, was eine weitere Aktivierung der Signalkaskaden verhindert. Denkbar wäre außerdem das Überschreiten der Enzymkapazität bei überproportionalem Substratangebot (hier CTRP 13), was eine erneute Phosphorylierung erst wieder zu einem späteren Zeitpunkt ermöglicht. Eine dritte Erklärung für die zweigipflige Phosphorylierung könnte die Aktivierung paralleler Signalwege durch CTRP 13 sein, die ihrerseits ebenfalls in einer Aktivierung der AMPK bzw. p38 MAPK münden. So sind für die Phosphorylierung der p38 MAPK mindestens zwei Kinasen (MAPKK 3 und 6) verantwortlich, die ihrerseits wiederum durch eine Vielzahl von Stimuli aktiviert werden [79]. Auch für die Aktivierung der AMPK sind übergeordnete Kinasen, die sogenannten AMPK-Kinasen, bekannt: Hierzu zählen beispielsweise die LKB1 und die CAMKK, welche eine Phosphorylierung der AMPK induzieren [8]. Auch eine erneute Aktivierung zu einem späteren Zeitpunkt im Sinne einer positiven Rückkopplung stellt einen möglichen Erklärungsansatz dar.

Die Phosphorylierung der p44/42 MAPK zeigte in beiden Endothelzelltypen eine maximale Aktivierung durch CTRP 13 nach einer Stimulationsdauer von 5 min. Das Phosphorylierungsprofil erinnert dabei an eine Sättigungskurve: Mit steigender Stimulationszeit flacht die Phosphorylierung wieder ab. Dabei könnten einerseits die vermittelnden Rezeptoren auf der Zelloberfläche besetzt sein, so dass auch das anhaltende Angebot an CTRP 13 keine weitere Enzymaktivierung bewirken kann. Andererseits könnte die Kapazität der MAPK ihrerseits ausgeschöpft sein, was ebenfalls eine weitere Phosphorylierung verhindert.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse eine Aktivierung identischer Signalkaskaden in mikro- und makrovaskulären Gefäßzellen – die Aktivierung differiert jedoch in Abhängigkeit vom jeweiligen Stimulationsintervall. Hierfür kommen verschiedene Erklärungsansätze in Betracht: Zum einen handelt es sich zwar um den gleichen Zelltyp, allerdings aus unterschiedlich großen Gefäßen. MVEC finden sich im kapillaren Endstromgebiet, wohingegen die HUVEC große Gefäße (in diesem Fall die Nabelschnurvene) auskleiden. Des Weiteren könnten die Unterschiede in der Enzymaktivierung auch in Abhängigkeit von der jeweiligen Spezies variieren – Wei *et al.* demonstrierten allerdings eine Übereinstimmung der murinen und humanen Aminosäuresequenz von CTRP 13 von 100 % [71].

82

Diskussion

Im Hinblick auf das für diese Arbeit bakteriell hergestellte CTRP 13 gilt es zu beachten, dass es im Gegensatz zum *in vivo* vorkommenden Protein nicht über posttranslationale Modifikationen verfügt – diese beeinflussen ebenfalls die Wirkung, beispielsweise an spezifischen Rezeptoren. Wie in Kapitel 1.4 beschrieben, formt CTRP 13 ebenso wie Adiponektin Trimere und höher organisierte Multimere indem es Disulfidbrücken ausbildet [71]. Das in der vorliegenden Arbeit verwendete rekombinante CTRP 13 ist dazu jedoch nicht in der Lage. Für Adiponektin konnte nicht nur die differenzielle Expression der verschiedenen Isoformen in unterschiedlichen Zelltypen gezeigt werden [65] – vielmehr vermitteln die unterschiedlichen Molekülstrukturen auch die Aktivierung unterschiedlicher Signalkaskaden [66].

Zu beachten ist außerdem, dass die verwendete Konzentration von CTRP 13 in Anlehnung an die Literatur gewählt wurde und nicht der physiologischen Konzentration im Serum entspricht – diese liegt im Bereich von ng/ml und ist somit um ein Vielfaches geringer. Allerdings geht man im Allgemeinen davon aus, dass die CTRPs ihre biologischen Funktionen im Organismus vor allem para- beziehungsweise autokrin vermitteln [73], was einerseits die niedrige Serumkonzentration erklärt und andererseits auch lokal deutlich höhere CTRP-Konzentrationen als die im Blut gemessenen möglich erscheinen lässt.

### 4.3 Einfluss auf das Proliferations- und Migrationsverhalten von Endothelzellen

Zellproliferation und Zellmigration von Endothelzellen sind essenzielle Vorgänge für die Neubildung von Gefäßen, die Angiogenese [31]. Aus der Literatur sind verschiedenartige Effekte von Adiponektin auf diese Mechanismen bekannt: Einerseits wird es als potenter Inhibitor des endothelialen Wachstums charakterisiert [5], indem es die VEGF-vermittelte Endothelzellmigration über eine Aktivierung der p44/42 MAPK inhibiert [33]. Ergänzend dazu zeigten Brakenhielm et al., dass die Angiogenesehemmenden Effekte von Adiponektin eine Aktivierung der Caspasen-vermittelter Apoptose von Endothelzellen beinhalten [5]. Ouchi et al. demonstrierten andererseits eine Induktion der Angiogenese durch Adiponektin – katalysiert über die Signalkaskade der AMPK [42]. Auch für Mitglieder der CTRP-Familie wurde eine Beeinflussung von Endothelzellen demonstriert. So beschrieben Akiyama et al. die CTRP 3-vermittelte Induktion der Endothelzellproliferation und -migration und demonstrierten weiterhin die maßgebliche Beteiligung der p44/42 und p38 MAPK an diesen Vorgängen [2]: Eine Unterdrückung der p44/42 MAPK durch den selektiven Inhibitor U0126 resultierte in einer Aufhebung des positiven Effekts von CTRP 3 auf Proliferation und Migration. Ein Ausschalten der p38 MAPK durch den Enzyminhibitor SB203580 bei gleichzeitiger Stimulation der Zellen mit CTRP 3 führte zu einer Hemmung der Proliferation. Die Endothelzellmigration blieb hingegen von einer Inhibition der p38 MAPK unbeeinflusst [2]. In der vorliegenden Arbeit konnte die CTRP 13-vermittelte Aktivierung verschiedener Signalkaskaden (AMPK, p44/42 MAPK, p38 MAPK) gezeigt werden, wobei die untersuchten Enzyme unter anderem eine wichtige Rolle für die Proliferation und Migration von Zellen spielen. Es wurden mehrere Versuchsansätze gewählt, um einen möglichen Effekt von CTRP 13 auf die Endothelzellproliferation und -migration zu evaluieren. Zur Analyse möglicher Signalwege kamen ergänzend verschiedene Enzyminhibitoren zum Einsatz.

Zusammenfassend zeigte sich eine signifikante Reduktion der Endothelzellproliferation und -migration nach einer Stimulation der Zellen mit CTRP 13. Der proliferationshemmende Effekt konnte dabei in den MVEC und ein zusätzlich migrationshemmender Effekt in den HUVEC gezeigt werden. Wurden die MVEC außerdem mit dem selektiven Inhibitor der AMPK AraA behandelt, erholte sich die Zellzahl auf annähernd das Kontrollniveau. Dies lässt einen signifikanten Einfluss der Proteinkinase auf die CTRP 13-vermittelte Reduktion der Endothelzellproliferation vermuten. Die alleinige Behandlung der Zellen mit AraA beeinflusste die Zellzahl hingegen nicht, womit selektive Effekte des Inhibitors auf die Proliferation der Endothelzellen ausgeschlossen werden konnten. Dies zeigte sich auch im sogenannten Bromdesoxyuridin-Assays (BrdU-Assay), wo der antiproliferative Effekt von CTRP 13 weiter quantifiziert werden konnte. Die Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass die AMPK an diesem antiproliferativen Effekt maßgeblich beteiligt ist: Eine Inhibierung des Enzyms resultierte in einer signifikant höheren Proliferationsrate. Auch ein möglicher Effekt der p44/42 MAPK wurde im Rahmen des BrdU-Assays evaluiert: Die Ergebnisse lassen auf einen additiven Effekt von CTRP 13 und Enzyminhibitor schließen. Die p38 MAPK scheint hingegen keine Rolle in der CTRP 13-vermittelten Reduktion der Endothelzellproliferation zu spielen. Die Untersuchungen der HUVEC-Kultur zeigten einen inhibierenden Effekt von CTRP 13 auf das Proliferations- und Migrationsverhalten der Zellen: Bereits nach einer Induktionszeit von 10 h zeigten sich deutliche Unterschiede bei der Überwindung des zellfreien Spaltes. Diese Diskrepanz hielt weiter an, so dass zusätzlich zur reduzierten Proliferation eine Hemmung der Endothelzellmigration in Betracht kommt.

Im Gegensatz zu CTRP 13 ist CTRP 3 ein potenter Induktor von Proliferation und Migration in Endothelzellen. Der Umstand, dass zwei Mitglieder der gleichen Proteinfamilie gegensätzliche Auswirkungen auf die Endothelzellproliferation haben, erscheint zunächst paradox - er könnte allerdings in der deutlichen Inkongruenz hinsichtlich der Aminosäuresequenz der globulären Domäne begründet sein: Die Übereinstimmung der Funktionsdomäne von CTRP 13 und CTRP 3 ist mit 35 % so gering [71], dass gegensätzliche Effekte durchaus vorstellbar sind. Auch in diesem Zusammenhang wird deutlich, welche Relevanz einer zukünftigen Identifikation potenzieller CTRP-spezifischer Rezeptoren zukommt. Ebenso gewinnt die Untersuchung der verschiedenen Isoformen von CTRP 13 mit eventuell vorhandenen differenziellen Effekten weiter an Bedeutung.

Eine direkte Beeinflussung des Zellzyklus der Endothelzellen erscheint als plausibler Kausalzusammenhang hinsichtlich des antiproliferativen Effekts von CTRP 13. So demonstrierten Peyton *et al.* den antiproliferativen Effekt der AMPK in humanen Nabelschnur-Endothelzellen: Über eine gesteigerte Phosphorylierung und Expression regulatorischer Proteine, wie beispielsweise p53, p21 oder p27, konnte ein Arrest des Zellzyklus in der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Phase induziert werden [44]. Als potenter Aktivator der AMPK in Endothelzellen könnte der antiproliferative Effekt von CTRP 13 ebenfalls über diese Signalkaskade vermittelt sein. Auch der direkte Einfluss von CTRP 13 auf den Zellzyklus durch eine Expressionssteigerung der genannten Regulatorproteine stellt einen Erklärungsansatz dar und ist Gegenstand aktueller Untersuchungen der Arbeitsgruppe. Erste Ergebnisse lassen dabei die direkte Induktion des Zellzyklusarrests durch CTRP 13 vermuten, da das Protein die Phosphorylierung und Expression regulatorischer Proteine bewirkt, welche ihrerseits zu einem Zellzyklusarrest führen (Daten nicht gezeigt). In weiterführenden Untersuchungen könnte ein Effekt von CTRP 13 auf die Vasomotorik der Gefäße im Fokus stehen: Als wesentliche Ursache bei der Entstehung der Atherosklerose wird eine Dysfunktion der Endothelzellen angenommen, die vor allem in einer dominierenden Vasokonstriktion mit gleichzeitig verminderter Vasodilatation begründet ist [25].

Die Zählversuche an MVEC zeigten einen negativen Einfluss von CTRP 13 auf die Zellzahl. Die deutliche Verringerung der Zellzahl in der CTRP 13-Gruppe könnte durch eine Zunahme des Zelltods hervorgerufen werden. Dies könnte sowohl durch CTRP 13 als auch durch das natürliche Absterben der Zellen im Laufe der Versuchszeit bedingt sein. Dagegen spricht allerdings, dass die Zellzahlen der anderen 3 Gruppen (Kontrolle, AraA, CTRP 13 + AraA) annähernd konstant blieben. Als Erklärungsansatz für das Absterben der Zellen kommt eine Induktion des Zelltods durch eine Aktivierung pro-apoptotischer Faktoren durch CTRP 13 in Betracht – diesen Zusammenhang demonstrierten Brakenhielm *et al.* bereits für den Angiogenese-hemmenden Effekt von Adiponektin [5]. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit legen allerdings einen anderen kausalen Mechanismus nahe, da CTRP 13 unter basalen Bedingungen keinen Einfluss auf den Zelltod mikrovaskulärer Endothelzellen ausübt. Im Gegensatz dazu scheint CTRP 13 eher protektiv hinsichtlich der Wasserstoffperoxid-induzierten Apoptose zu wirken (Daten nicht gezeigt).

### 5 Zusammenfassung

Das 2011 erstmals beschriebene C1q/TNFα-related Protein 13 (CTRP 13) ist ein weiteres Mitglied einer Proteinfamilie, deren Angehörige eindeutige Parallelen hinsichtlich des strukturellen Aufbaus sowie verschiedenster Funktionen mit dem Fettgewebshormon Adiponektin aufweisen. Die bis dato 15 bekannten CTRPs zeigen signifikante Unterschiede im Hinblick auf ihre Expressionsmuster und Effekte in verschiedenen Spezies, Gewebearten und Zelltypen.

In der vorliegenden Dissertation wurde erstmals die kardiale Expression von CTRP 13 in humanen und murinen Proben in Abhängigkeit von Alter und Ernährungsstatus demonstriert: CTRP 13 lässt sich in beiden Spezies am stärksten in jungen adipösen Individuen detektieren. Die kardiale Expression ist in verschiedenen Zelltypen nachweisbar – primär jedoch in kardialen Endothelzellen und Kardiomyozyten. Die weiterführenden Untersuchungen an kardialen Endothelzellen der Ratte und humanen Endothelzellen der Nabelschnur belegen eine zeitabhängige Phosphorylierung verschiedener Signalkaskaden (AMPK, p44/42 MAPK in MVEC und HUVEC, p38 MAPK in MVEC) durch CTRP 13. Da diese Signalkaskaden wesentlich an zellulären Vorgängen wie Proliferation, Migration und Zelltod mitwirken, ergab sich die Analyse einer CTRP 13-Beteiligung an diesen Vorgängen als weiterer Untersuchungsansatz. Die Ergebnisse verdeutlichen, dass CTRP 13 in Endothelzellen antiproliferative Effekte besitzt, welche über eine maßgebliche Beteiligung der AMPK katalysiert werden. Außerdem konnte gezeigt werden, dass CTRP 13 unter basalen zellulären Bedingungen keinen Einfluss auf die Apoptose und Nekrose der Endothelzellen hat.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit legen eine wesentliche Beteiligung von CTRP 13 an essenziellen zellulären Mechanismen nahe. Adipositas gilt als einer der Hauptrisikofaktoren zur Ausbildung atherosklerotischer Plaques – die Hypothese einer kompensatorischen Heraufregulation der CTRPs zum Ausgleich eines Adiponektin-Defizit in jungen Lebensjahren wird weiter untermauert. Zusätzlich konnte erstmals eine altersabhängige Variabilität im kardialen Expressionsmuster verschiedener CTRPs aufgezeigt werden. Die gesteigerte CTRP 13-Expression in jungen adipösen Organismen in Kombination mit den evaluierten antiproliferativen Effekten lassen protektive Mechanismen vermuten, die bereits in jungen Lebensjahren insbesondere in Hinblick auf die Atherosklerose-Entstehung von Bedeutung sein könnten.

#### 6 Summary

The C1q/TNF $\alpha$ -related protein 13 (CTRP 13) was described for the first time in 2011. It belongs to a protein family which reveals a number of distinct similarities, in particular regarding the constructive structure and various functions with the adipocytokine adiponectin. The 15 CTRPs known to date, show significant differences in terms of expression patterns and effects in various species, tissues and cell types.

In the present dissertation the cardiac expression of CTRP 13 in human and murine samples in dependence on age and nutritional status was observed for the first time: In both species the highest CTRP 13 levels are detected in young obese individuals. CTRP 13 is detectable in various cardiac cell types, but mainly in cardiac endothelial cells and cardiomyocytes. Further investigations with rat cardiac endothelial cells and human umbilical vein endothelial cells verify the time-dependent activation of different signaling cascades: CTRP 13 induces the phosphorylation of the AMPK, the p44/42 MAPK in MVEC and HUVEC and the p38 MAPK in MVEC. Due to their role in cellular processes like proliferation, migration and cell-death, the analysis of a potential participation of CTRP 13 in these processes constitutes a suitable scientific approach. The results indicate anti-proliferative effects of CTRP 13 in endothelial cells – mainly catalyzed by the AMPK. Furthermore, it could be shown that CTRP 13 has no influence on the apoptosis and necrosis of the endothelial cells under the investigated basal cellular conditions.

The results of the present study indicate an important role of CTRP 13 in essential cellular mechanisms. Obesity is one of the major risk factors for developing arteriosclerotic plaques – the hypothesis of an upregulation of the CTRPs to compensate a lack of adiponectin at an early age is underlined. Additionally an age-dependent variability concerning the cardiac expression patterns of various CTRPs was shown for the first time. The increased CTRP 13 expression in young obese organisms in combination with the detected anti-proliferative effects presume protective mechanisms in early years, in particular with regards on the development of arteriosclerosis.

## 7 Abkürzungsverzeichnis

AdipoR1	Adiponektin-Rezeptor 1
AdipoR2	Adiponektin-Rezeptor 2
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
AMPK	AMP-aktivierte Proteinkinase
APS	Ammoniumpersulfat
Ara A	Adenine-9-P-D-Arabinofuranosid
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BMI	Body-Mass-Index
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	Bovines Serumalbumin (englisch: bovine serum
	albumine
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
CD	Differenzierung (englisch: cluster of differentiation)
cDNA	Komplementäre DNA (englisch: complementary DNA)
CTRP	C1q/TNFα-related Protein
DAG	Deutsche Adipositasgesellschaft
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (englisch: deoxyribonucleic acid)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
ECL	Chemolumineszenz (englisch: enhanced
	chemoluminescence)
E. coli	Escherichia coli
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor (englisch: epidermal
	growth factor)
ERK	extrazellulär Signal-regulierte Kinasen
FCS	Fetales Kälberserum (englisch: fetal calf serum)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GFP	Grün fluoreszierendes Protein

$H_2O_2$	Wasserstoffperoxid
HBSS	Hanks' Balanced Salt solution
h	Stunde
HD	Haltungsdiät (Kontrollnahrung)
HFD	Hochkalorische Nahrung (englisch: high fat diet)
His	Polyhistidin (Synonym: Histidin)
HMW	Hohes Molekulargewicht (englisch: high molecular
	weight)
HRP	Meerrettichperoxidase (englisch: horseradish-
	peroxidase)
HUVEC	Humane Endothelzellen aus der Nabelschnurvene
	(englisch: human umbilical vein endothelial cells)
IL-6	Interleukin-6
IPTG	Isopropylthio-β-Galactosid
JNK	c-Jun N-terminale Kinasen
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LB Medium	Lysogeny broth Medium
LFD	Fettarme Nahrung (englisch: low fat diet)
LMW	Leichtes Molekulargewicht (englisch: low molecular
	weight)
LPS	Lipopolysaccharid
LV	Linker Ventrikel
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
МАРКК	MAPK-Kinase
MAPKKK	MAPK-Kinase-Kinase
MEK	= MAPKK
min	Minute
MMW	Mittleres Molekulargewicht (englisch: medium molecular
	weight)
mRNA	Messenger RNA
MVEC	Mikrovaskuläre Endothelzellen der Ratte
NaCl	Natriumchlorid
NGF	Nervaler Wachstumsfaktor (englisch: nerve growth

	factor)
NO	Stickstoffmonoxid (englisch: nitric oxide)
PAI 1	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor 1
pAMPK	phosphorylierte AMPK
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung (englisch:
	phosphate buffered saline)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (englisch: polymerase chain
	reaction)
PDGF	Thrombozytärer Wachstumsfaktor (englisch: platelet-
	derived growth factor)
PI	Propidiumiodid
RIN	RNA Integrität Nummer (englisch: RNA integrity number)
RNA	Ribonukleinsäure (englisch: ribonucleic acid)
RT	Reverse Transkription
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-PCR
S	Sekunde
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SVF	Gefäßsystem des bindegewebigen Anteils (englisch:
	stromal vascular fraction)
TBS-T	TRIS-Buffered Saline mit Tween
TBE-Puffer	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
TE-Puffer	TRIS-EDTA-Puffer
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylendiamin
ТМВ	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TNF-α	Tumornekrosefaktor-α
TRIS	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
UV	Ultraviolett
V	Volt
VEGF	Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (englisch:

## 8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Darstellung der Struktur von Adiponektin und CTRP 13 (modifiziert nach
	[54, 71, 73])
Abbildung 2:	Exemplarisches RNA-Agarosegel
Abbildung 3:	Repräsentative Schmelzkurve nach durchgeführter Realtime-PCR 33
Abbildung 4:	Kontrolle des Elutionsprodukts (CTRP 13 Maus) 34
Abbildung 5:	Mikrovaskuläre Endothelzellen unter dem Mikroskop nach erfolgter
	Isolation und Aufreinigung 40
Abbildung 6:	Schematische Darstellung der Anwendung der Culture-Inserts 47
Abbildung 7:	Coomassiegefärbtes Polyacrylamid-Gel der Proteinexpression von
	rekombinantem CTRP 13 in IPTG-induzierten und nicht induzierten E.
	coli-Bakterien51
Abbildung 8:	Repräsentativer Western Blot der Proteinexpression von rekombinantem
	CTRP 13 in IPTG-induzierten und nicht induzierten E. coli-Bakterien 52
Abbildung 9:	Realtime-PCR-Analyse von CTRP 13 in ausgewählten Proben des
	rechten Herzohres herzchirurgischer Patienten
Abbildung 10:	Realtime-PCR-Analyse von CTRP 13 in ausgewählten Proben des
	linken Ventrikels von Ratten mit unterschiedlichen Diäten 55
Abbildung 11:	Expressionsmuster von CTRP 13 in unterschiedlichen kardialen
	Zelltypen der Ratte 57
Abbildung 12:	Immunfluoreszenz für die Darstellung der intrazellulären Lokalisation
	von CTRP 13 58
Abbildung 13:	Western Blot Nachweis der AMPK-Phosphorylierung durch CTRP 13 in
	MVEC
Abbildung 14:	Western Blot Nachweis der p38 MAPK-Phosphorylierung durch CTRP
	13 in MVEC
Abbildung 15:	Western Blot Nachweis der p44/42 MAPK-Phosphorylierung durch
	CTRP 13 in MVEC
Abbildung 16:	Western Blot Nachweis der AMPK-Phosphorylierung durch CTRP 13 in
	HUVEC
Abbildung 17:	Western Blot Nachweis der p44/42 MAPK-Phosphorylierung durch
	CTRP 13 in HUVEC
Abbildung 18:	Einfluss von CTRP 13 auf die Zellzahl von MVEC71
Abbildung 19:	Einfluss von CTRP 13 auf die Proliferation von MVEC
Abbildung 20:	Einfluss von CTRP 13 auf die Migration und Proliferation von HUVEC.74
Abbildung 21:	Einfluss von CTRP 13 auf den Zelltod von MVEC

Abbildung 22:	Chromatogra	amm nach erfolgter	DNA-Seq	luenziei	rung (CTR	P 13 M	aus).
							. 108
Abbildung 23:	Vektorkarte p	CRII TOPO CTRP	13 Maus	(aus de	em Comput	erprogr	amm
	Vector NTI).						. 109
Abbildung 24:	Vektorkarte	pENTR/D-TOPO	CTRP	13 m	it Stop	(aus	dem
	Computerpro	ogramm Vector NTI)					. 109
Abbildung 25:	Vektorkarte p	DEST 17 CTRP 13	8 mit Stop	(aus de	em Comput	erprogr	amm
	Vector NTI).						. 110

### 9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Verwendete Chemikalien und deren Bezugsquelle 15
Tabelle 2:	Eigenschaften des zur Klonierung eingesetzten Primers (Lieferant:
	Invitrogen GmbH, Karlsruhe) 18
Tabelle 3:	Eigenschaften der für die Realtime-PCR eingesetzten Primer (Lieferant
	aller Primer: Invitrogen GmbH, Karlsruhe) 18
Tabelle 4:	Eigenschaften der für die Sequenzierung der Plasmide eingesetzten Primer
	(Lieferant: Thermo Fisher Scientific, Langenselbold) 19
Tabelle 5:	Auflistung der für Western Blot Analysen verwendeten primären Antikörper.
Tabelle 6:	Auflistung der für Western Blot Analysen verwendeten sekundären
	Antikörper21
Tabelle 7:	Auflistung der verwendeten primären Antikörper für die konfokale
	Mikroskopie
Tabelle 8:	Auflistung der verwendeten sekundären Antikörper für die konfokale
	Mikroskopie
Tabelle 9:	Verwendete E. coli-Stämme mit Genotyp und Bezugsquelle 22
Tabelle 10	: Verwendete Kit-Systeme und deren Bezugsquelle
Tabelle 11	: Verwendete Geräte und deren Bezugsquelle
Tabelle 12	Zusammensetzung des RT-Mastermix
Tabelle 13	Zusammensetzung des Mastermix für die Mango-Taq-Polymerase (Bioline
	GmbH, Luckenwalde)
Tabelle 14	Zusammensetzung des Mastermix für die Go-Taq-Polymerase (Promega
	GmbH, Mannheim)
Tabelle 15	Zusammensetzung des SYBRgreen-PCR-Mastermix
Tabelle 16	: SYBRgreen-PCR-Programm
Tabelle 17	Zusammensetzung der verwendeten Lösungen (Plasmidpräparation) 36
Tabelle 18	Zusammensetzung der verwendeten Western Blot Gele

#### 10 Literatur

- 1. Adya R, Tan B K, Randeva H S (2015) Differential effects of leptin and adiponectin in endothelial angiogenesis. J Diabetes Res 2015: 648239.
- 2. Akiyama H, Furukawa S, Wakisaka S, Maeda T (2007) CTRP3/cartducin promotes proliferation and migration of endothelial cells. Mol Cell Biochem 304: 243–248.
- Aurich A-C, Niemann B, Pan R, Gruenler S, Issa H, Silber R-E, Rohrbach S (2013) Age-dependent effects of high fat-diet on murine left ventricles: role of palmitate. Basic Res Cardiol 108: 369.
- 4. Azuma M, Chihara Y, Yoshimura C, Murase K, Hamada S, Tachikawa R, Matsumoto T, Inouchi M, Tanizawa K, Handa T, Oga T, Mishima M, Chin K (2015) Association between endothelial function (assessed on reactive hyperemia peripheral arterial tonometry) and obstructive sleep apnea, visceral fat accumulation, and serum adiponectin. Circ J 79: 1381–1389.
- Brakenhielm E, Veitonmaki N, Cao R, Kihara S, Matsuzawa Y, Zhivotovsky B, Funahashi T, Cao Y (2004) Adiponectin-induced antiangiogenesis and antitumor activity involve caspase-mediated endothelial cell apoptosis. Proc Natl Acad Sci U S A 101: 2476–2481.
- 6. Budihardjo I, Oliver H, Lutter M, Luo X, Wang X (1999) Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. Annu Rev Cell Dev Biol 15: 269–290.
- Byerly M S, Swanson R, Wei Z, Seldin M M, McCulloh P S, Wong G W (2013) A central role for C1q/TNF-related protein 13 (CTRP13) in modulating food intake and body weight. PLoS One 8: e62862.
- 8. Canto C, Auwerx J (2010) AMP-activated protein kinase and its downstream transcriptional pathways. Cell Mol Life Sci 67: 3407–3423.
- 9. Cargnello M, Roux P P (2011) Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. Microbiol Mol Biol Rev 75: 50–83.
- Celermajer D S (1997) Endothelial Dysfunction. Does It Matter? Is It Reversible? J Am Coll Cardiol 30: 325–333.
- 11. Cersosimo E, DeFronzo R A (2006) Insulin resistance and endothelial dysfunction: the road map to cardiovascular diseases. Diabetes Metab Res Rev 22: 423–436.
- 12. Cuadrado A, Nebreda A R (2010) Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling. Biochem J 429: 403–417.

- 13. Davis K E, Scherer P E (2008) Adiponectin: no longer the lone soul in the fight against insulin resistance? Biochem J 416: e7-9.
- 14. Deanfield J E, Halcox J P, Rabelink T J (2007) Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance. Circulation 115: 1285–1295.
- 15. Diez J, Iglesias P (2003) The role of the novel adipocyte-derived hormone adiponectin in human disease. Eur J Endocrinol 148: 293–300.
- 16. Folkman J, Shing Y (1992) Angiogenesis. J Biol Chem Vol. 2067: 10931–10934.
- 17. Formigli L, Papucci L, Tani A, Schiavone N, Tempestini A, Orlandini G E, Capaccioli S, Orlandini S Z (2000) Aponecrosis: morphological and biochemical exploration of a syncretic process of cell death sharing apoptosis and necrosis. J Cell Physiol 182: 41–49.
- Halberg N, Wernstedt-Asterholm I, Scherer P E (2008) The adipocyte as an endocrine cell. Endocrinol Metab Clin North Am 37: 753-68, x-xi.
- 19. Hardie D G (2011) AMP-activated protein kinase: an energy sensor that regulates all aspects of cell function. Genes Dev 25: 1895–1908.
- 20. Hardie D G, Hawley S A (2001) AMP-activated protein kinase: the energy charge hypothesis revisited. Bioessays 23: 1112–1119.
- 21. Hawley S A, Davison M, Woods A, Davies S P, Beri R K, Carling D, Hardie D G (1996) Characterization of the AMP-activated Protein Kinase Kinase from Rat Liver and Identification of Threonine 172 as the Major Site at Which It Phosphorylates AMP-activated Protein Kinase. J Biol Chem 271: 27879–27887.
- 22. Hengartner M O (2000) The biochemistry of apoptosis. Nature 407: 770–776.
- 23. Höffeler F (2004) Die Maschinerie der Apoptose. Chronik eines angekündigten Todes. Biol. Unserer Zeit 34: 16–23.
- 24. Holzapfel B, Wickert L (2007) Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR). Methoden und Anwendungsgebiete. Biol. Unserer Zeit 37: 120–126.
- 25. Hsueh W A, Lyon C J, Quinones M J (2004) Insulin resistance and the endothelium. Am J Med 117: 109–117.
- 26. Hug H (2000) Apoptose: die Selbstvernichtung der Zelle als Überlebensschutz.Biol. Unserer Zeit 30.: 128–135.

- 27. Jaffe E A, Nachman R L, Becker C G, Minick C R (1973) Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. J Clin Invest 52: 2745–2756.
- 28. Kerr J F R, Wyllie A H, Currie A R (1972) Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. Br J Cancer: 239–257.
- 29. Kobayashi H, Ouchi N, Kihara S, Walsh K, Kumada M, Abe Y, Funahashi T, Matsuzawa Y (2004) Selective suppression of endothelial cell apoptosis by the high molecular weight form of adiponectin. Circ Res 94: e27-31.
- 30. Koistinaho M, Koistinaho J (2002) Role of p38 and p44/42 mitogen-activated protein kinases in microglia. Glia 40: 175–183.
- 31. Lamalice L, Le Boeuf F, Huot J (2007) Endothelial cell migration during angiogenesis. Circ Res 100: 782–794.
- 32. López M, Varela L, Vázquez M J, Rodríguez-Cuenca S, González C R, Velagapudi V R, Morgan D A, Schoenmakers E, Agassandian K, Lage R, Martínez de Morentin P B, Tovar S, Nogueiras R, Carling D, Lelliott C, Gallego R, Oresic M, Chatterjee K, Saha A K, Rahmouni K, Diéguez C, Vidal-Puig A (2010) Hypothalamic AMPK and fatty acid metabolism mediate thyroid regulation of energy balance. Nat Med 16: 1001–1008.
- 33. Mahadev K, Wu X, Donnelly S, Ouedraogo R, Eckhart A D, Goldstein B J (2008) Adiponectin inhibits vascular endothelial growth factor-induced migration of human coronary artery endothelial cells. Cardiovasc Res 78: 376–384.
- 34. Mihaylova M M, Shaw R J (2011) The AMPK signalling pathway coordinates cell growth, autophagy and metabolism. Nat Cell Biol 13: 1016–1023.
- 35. Moore F, Weekes J, Hardie D G (1991) Evidence that AMP triggers phosphorylation as well as direct allosteric activation of rat liver AMP-activated protein kinase. A sensitive mechanism to protect the cell against ATP depletion. Eur J Biochem 199: 691–697.
- 36. Mori T, Koyama Y, Maeda N, Nakamura Y, Fujishima Y, Matsuda K, Funahashi T, Shimada S, Shimomura I (2014) Ultrastructural localization of adiponectin protein in vasculature of normal and atherosclerotic mice. Sci Rep 4: 4895.
- 37. Muoio D M, Newgard C B (2006) Obesity-related derangements in metabolic regulation. Annu Rev Biochem 75: 367–401.

- 38. Niemann B, Chen Y, Teschner M, Li L, Silber R-E, Rohrbach S (2011) Obesity induces signs of premature cardiac aging in younger patients: the role of mitochondria. J Am Coll Cardiol 57: 577–585.
- 39. Niemann B, Pan R, Teschner M, Boening A, Silber R-E, Rohrbach S (2013) Age and obesity-associated changes in the expression and activation of components of the AMPK signaling pathway in human right atrial tissue. Exp Gerontol 48: 55–63.
- 40. Ouchi N (2003) Reciprocal Association of C-Reactive Protein With Adiponectin in Blood Stream and Adipose Tissue. Circulation 107: 671–674.
- 41. Ouchi N, Kihara S, Arita Y, Maeda K, Kuriyama H, Okamoto Y, Hotta K, Nishida M, Takahashi M, Nakamura T, Yamashita S, Funahashi T, Matsuzawa Y (1999) Novel modulator for endothelial adhesion molecules: adipocyte-derived plasma protein adiponectin. Circulation 100: 2473–2476.
- 42. Ouchi N, Kobayashi H, Kihara S, Kumada M, Sato K, Inoue T, Funahashi T, Walsh K (2004) Adiponectin stimulates angiogenesis by promoting cross-talk between AMP-activated protein kinase and Akt signaling in endothelial cells. J Biol Chem 279: 1304–1309.
- 43. Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu B E, Karandikar M, Berman K, Cobb M H (2001) Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. Endocr Rev 22: 153–183.
- 44. Peyton K J, Liu X-m, Yu Y, Yates B, Durante W (2012) Activation of AMP-activated protein kinase inhibits the proliferation of human endothelial cells. J Pharmacol Exp Ther 342: 827–834.
- 45. Qi Y, Takahashi N, Hileman S M, Patel H R, Berg A H, Pajvani U B, Scherer P E, Ahima R S (2004) Adiponectin acts in the brain to decrease body weight. Nat Med 10: 524–529.
- 46. Riordan N H, Ichim T E, Min W-P, Wang H, Solano F, Lara F, Alfaro M, Rodriguez J P, Harman R J, Patel A N, Murphy M P, Lee R R, Minev B (2009) Non-expanded adipose stromal vascular fraction cell therapy for multiple sclerosis. J Transl Med 7: 29.
- 47. Risau W (1997) Mechanisms of angiogenesis. Nat Med: 671–674.
- 48. Rojas E, Rodriguez-Molina D, Bolli P, Israili Z H, Faria J, Fidilio E, Bermudez V, Velasco M (2014) The role of adiponectin in endothelial dysfunction and hypertension. Curr Hypertens Rep 16: 463.

- 49. Roskoski R, JR (2012) ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation. Pharmacol Res 66: 105–143.
- 50. Rousseau S, Houle F, Landry J, Huot J (1997) p38 MAP kinase activation by vascular endothelial growth factor mediates actin reorganization and cell migration in human endothelial cells. Oncogene 15: 2169–2177.
- 51. Schaffler A, Buechler C (2012) CTRP family: linking immunity to metabolism. Trends Endocrinol Metab 23: 194–204.
- 52. Schaffler A, Scholmerich J, Salzberger B (2007) Adipose tissue as an immunological organ: Toll-like receptors, C1q/TNFs and CTRPs. Trends Immunol 28: 393–399.
- 53. Scherer P E (2006) Adipose tissue: from lipid storage compartment to endocrine organ. Diabetes 55: 1537–1545.
- 54. Scherer P E, Williams S, Fogliano M, Baldini G, Lodish H F (1995) A Novel Serum Protein Similar to C1q, Produced Exclusively in Adipocytes. J Biol Chem 270: 26746–26749.
- 55. Schluter K-D, Schreiber D (2005) Adult ventricular cardiomyocytes: isolation and culture. Methods Mol Biol 290: 305–314.
- 56. Seger R, Krebs E G (1995) The MAPK signaling cascade. FASEB J 9: 726–735.
- 57. Shibata R, Sato K, Pimentel D R, Takemura Y, Kihara S, Ohashi K, Funahashi T, Ouchi N, Walsh K (2005) Adiponectin protects against myocardial ischemiareperfusion injury through AMPK- and COX-2-dependent mechanisms. Nat Med 11: 1096–1103.
- 58. Siegler B H (2015) Protektive Effekte des Adiponektins und der Adiponektin-Paraloge C1q/tumor necrosis factor-»-related protein (CTRP) 1-9 im Herz. Justus-Liebig-Universität, Gießen.
- 59. Stockinger H, Gadd S J, Eher R, Majdic O, Schreiber W, Kasinrerk W, Strass B, Schnabl E, Knapp W (1990) Molecular characterization and functional analysis of the leukocyte surface protein CD31. J Immunol 145: 3889–3897.
- 60. Su H, Yuan Y, Wang X-M, Lau W B, Wang Y, Wang X, Gao E, Koch W J, Ma X-L (2013) Inhibition of CTRP9, a novel and cardiac-abundantly expressed cell survival molecule, by TNFalpha-initiated oxidative signaling contributes to exacerbated cardiac injury in diabetic mice. Basic Res Cardiol 108: 315.

- 61. Sumpio B E, Riley J T, Dardik A (2002) Molecules in focus. Cells in focus: endothelial cell. J Biochem Cell B: 1508–1512.
- 62. Tan K C B, Xu A, Chow W S, Lam M C W, Ai V H G, Tam S C F, Lam K S L (2004) Hypoadiponectinemia is associated with impaired endothelium-dependent vasodilation. J Clin Endocrinol Metab 89: 765–769.
- 63. Tanaka K, Abe M, Sato Y (1999) Roles of Extracellular Signal-regulated Kinase 1/2 and p38 Mitogen-activated Protein Kinase in the Signal Transduction of Basic Fibroblast Growth Factor in Endothelial Cells during Angiogenesis. Jpn J Cancer Res 90: 647–654.
- 64. Tilg H, Moschen A R (2006) Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. Nat Rev Immunol 6: 772–783.
- 65. Tsao T-S, Murrey H E, Hug C, Lee D H, Lodish H F (2002) Oligomerization statedependent activation of NF-kappa B signaling pathway by adipocyte complementrelated protein of 30 kDa (Acrp30). J Biol Chem 277: 29359–29362.
- 66. Tsao T-S, Tomas E, Murrey H E, Hug C, Lee D H, Ruderman N B, Heuser J E, Lodish H F (2003) Role of disulfide bonds in Acrp30/adiponectin structure and signaling specificity. Different oligomers activate different signal transduction pathways. J Biol Chem 278: 50810–50817.
- 67. van Mourik J A, Leeksma O C, Reinders J H, Groot P G de, Zandbergen-Spaargaren J (1985) Vascular endothelial cells synthesize a plasma membrane protein indistinguishable from the platelet membrane glycoprotein IIa. J Biol Chem 260: 11300–11306.
- Vanhoutte P M (1997) Endothelial dysfunction and atherosclerosis. Eur Heart J 18 Suppl E: E19-29.
- 69. Vriese A S de, Verbeuren T J, van de Voorde J, Lameire N H, Vanhoutte P M (2000) Endothelial dysfunction in diabetes. Br J Pharmacol 130: 963–974.
- 70. Waki H, Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, Uchida S, Kita S, Hara K, Hada Y, Vasseur F, Froguel P, Kimura S, Nagai R, Kadowaki T (2003) Impaired multimerization of human adiponectin mutants associated with diabetes. Molecular structure and multimer formation of adiponectin. J Biol Chem 278: 40352–40363.
- 71. Wei Z, Peterson J M, Wong G W (2011) Metabolic regulation by C1q/TNF-related protein-13 (CTRP13): activation OF AMP-activated protein kinase and suppression of fatty acid-induced JNK signaling. J Biol Chem 286: 15652–15665.

- 72. Wong G W, Krawczyk S A, Kitidis-Mitrokostas C, Revett T, Gimeno R, Lodish H F (2008) Molecular, biochemical and functional characterizations of C1q/TNF family members: adipose-tissue-selective expression patterns, regulation by PPAR-gamma agonist, cysteine-mediated oligomerizations, combinatorial associations and metabolic functions. Biochem J 416: 161–177.
- 73. Wong G W, Wang J, Hug C, Tsao T-S, Lodish H F (2004) A family of Acrp30/adiponectin structural and functional paralogs. Proc Natl Acad Sci U S A 101: 10302–10307.
- 74. Wong W T, Tian X Y, Xu A, Yu J, Lau C W, Hoo R L C, Wang Y, Lee V W Y, Lam K S L, Vanhoutte P M, Huang Y (2011) Adiponectin is required for PPARγ-mediated improvement of endothelial function in diabetic mice. Cell Metab 14: 104–115.
- 75. Xie L, Boyle D, Sanford D, Scherer P E, Pessin J E, Mora S (2006) Intracellular trafficking and secretion of adiponectin is dependent on GGA-coated vesicles. J Biol Chem 281: 7253–7259.
- 76. Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, Tsuchida A, Yokomizo T, Kita S, Sugiyama T, Miyagishi M, Hara K, Tsunoda M, Murakami K, Ohteki T, Uchida S, Takekawa S, Waki H, Tsuno N H, Shibata Y, Terauchi Y, Froguel P, Tobe K, Koyasu S, Taira K, Kitamura T, Shimizu T, Nagai R, Kadowaki T (2003) Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. Nature 423: 762–769.
- 77. Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, Ito Y, Waki H, Uchida S, Yamashita S, Noda M, Kita S, Ueki K, Eto K, Akanuma Y, Froguel P, Foufelle F, Ferre P, Carling D, Kimura S, Nagai R, Kahn B B, Kadowaki T (2002) Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. Nat Med 8: 1288–1295.
- 78. Ye R, Scherer P E (2013) Adiponectin, driver or passenger on the road to insulin sensitivity? Mol Metab 2: 133–141.
- 79. Zarubin T, Han J (2005) Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. Cell Res 15: 11–18.
- 80. Zhang W, Liu H T (2002) MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. Cell Res 12: 9–18.
- Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman J M (1994) Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. Nature 372: 425–432.
- 82. Zheng Q, Yuan Y, Yi W, Lau W B, Wang Y, Wang X, Sun Y, Lopez B L, Christopher T A, Peterson J M, Wong G W, Yu S, Yi D, Ma X-L (2011) C1q/TNF-related proteins, a family of novel adipokines, induce vascular relaxation through the adiponectin receptor-1/AMPK/eNOS/nitric oxide signaling pathway. Arterioscler Thromb Vasc Biol 31: 2616–2623.
- 83. "Wound Healing Assay with the ibidi Culture Insert in a μ-Dish 35 mm", ibidi GmbH (abgerufen am 03.12.2017, 12:15Uhr), URL: https://ibidi.com/img/cms/support/AN/AN21\_Wound\_Healing\_Assay.pdf.

# 11 Anhang

# 11.1 Sequenzierung













Abbildung 22: Chromatogramm nach erfolgter DNA-Sequenzierung (CTRP 13 Maus). Das Chromatogramm zeigt eindeutige Peaks, welche sich nicht überlagern und der jeweiligen Base zugeordnet werden können. Isolierte Spikes sind nicht zusehen. Das Hintergrundrauschen ist gering ausgeprägt.

### 11.2 Vektorkarten

#### 11.2.1 pCRII-TOPO CTRP 13 Maus



Abbildung 23: Vektorkarte pCRII TOPO CTRP 13 Maus (aus dem Computerprogramm Vector NTI).

### 11.2.2 pENTR/D-TOPO CTRP 13 mit Stop



Abbildung 24: Vektorkarte pENTR/D-TOPO CTRP 13 mit Stop (aus dem Computerprogramm Vector NTI).

11.2.3 pDEST 17 CTRP 13 mit Stop



Abbildung 25: Vektorkarte pDEST 17 CTRP 13 mit Stop (aus dem Computerprogramm Vector NTI).

### 12 Publikationsverzeichnis

### 12.1 Kongressbeiträge

M. Aslam, **S. Nürnberger**, L. Li, B. Niemann, S. Rohrbach. Impact of the adiponectin paralog CTRP13 on endothelial cells. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie – Herz- und Kreislaufforschung, Mannheim, 2016.

M. Aslam, **S. Nürnberger**, L. Li, B. Niemann, S. Rohrbach. Impact of the adiponectin paralog CTRP13 on endothelial cells. European Society of Cardiology Congress, Rom, 2016.

### 13 Erklärung zur Dissertation

"Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der "Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis" niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden."

Ort, Datum

Unterschrift

### 14 Danksagung

Auf dem langen Weg zur Fertigstellung dieser Arbeit haben mich viele Menschen begleitet. Die bedingungslose Unterstützung durch meine Familie macht mich sehr dankbar, glücklich und stolz.

Zunächst möchte ich mich aufrichtig bei Frau Prof. Dr. Susanne Rohrbach für die Bereitstellung des Themas und die gute Betreuung bedanken. Sie haben mir in der Zeit im Labor viel beigebracht und waren immer für Erklärungen und zahlreiche Anregungen bereit.

Ein großes Dankeschön geht an Frau Dr. Ling Li, Frau Birgit Rabenau und Frau Bärbel Reuter für die nette Atmosphäre im Labor, die Einarbeitung in die Laborarbeit und die Unterstützung und Motivation.

Ich danke den Mitarbeitern des Physiologischen Instituts der Justus-Liebig-Universität Gießen und dabei im Besonderen Frau Daniela Schreiber für die Präparation der Rattenherzen und die Bereitstellung der dabei isolierten kardialen Endothelzellen.

Des Weiteren danke ich Herrn Dr. Muhammad Aslam aufrichtig für die Bereitstellung der HUVEC und die ausführliche und gute Einführung in die Isolation und Kultivierung von Endothelzellen – ohne seine geduldige und stetige Hilfe wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Auch den anderen Doktoranden der AG Rohrbach gebührt ein Dankeschön. Vor allem gilt mein Dank dabei Benedikt und Dorothee – euer positiver Zuspruch und die konstruktiven Anregungen haben maßgeblich zur Entstehung und Fertigstellung dieser Arbeit beigetragen.

Bei meinen Eltern und Schwiegereltern möchte ich mich für den unermüdlichen Zuspruch und die zahlreichen Babysitter-Einsätze bedanken. Meinem Mann Philipp danke ich vor allem für die Geduld und das Rücken-frei-halten. Und schließlich danke ich meinen Töchtern Lia und Lotta: Ihr zeigt uns jeden Tag, dass es so viele spannende Dinge in der Welt zu entdecken gibt und ich hoffe, dass ihr die Neugier und den ständigen Tatendrang beibehaltet. Ich habe euch lieb.

## 15 Tabellarischer Lebenslauf

Der Lebenslauf wurde aus dieser Version der Arbeit entfernt.