

Academiejahr 2011-2012

Faculteit Farmaceutische, Biomedische en Diergeneeskundige wetenschappen

Onderwijscommissie Biomedische Wetenschappen

Circulerende angiogene cellen en obese adolescenten: focus op de leptine-pathway

Door:

Diana Dos Santos Fidalgo Pimentel

Masterproef voorgelegd tot het behalen van de graad van

Master in de Biomedische wetenschappen

Promotor(en): prof. dr. Viviane Conraads

Copromotor: prof. dr. Vicky Hoymans

Begeleider: dr. Luc Bruyndonckx

Laboratorium voor Cellulaire en Moleculaire Cardiologie
Universiteit Antwerpen
Universitair Ziekenhuis Antwerpen
Wilrijkstraat 10
2650 Edegem

Inhoudstabel

Abstract	4
Afkortingen.....	5
Inleiding.....	7
Obesitas.....	7
Obesitas en het cardiovasculair risico.....	8
Endotheeldisfunctie en atherosclerose.....	9
Vasculaire homeostase.....	10
Endotheel progenitorcellen: endothelial outgrowth cells en circulerende angiogene cellen.....	10
Leptine als link tussen obesitas en gerelateerde cardiovasculaire ziekten.....	13
De leptinereceptor	15
De leptine-pathway	15
Regulerende factoren van de leptine-pathway mogelijk verantwoordelijk voor leptineresistentie	16
Fysiologische vormen van leptineresistentie	17
Doelstelling.....	18
Materiaal en methoden	19
Studiepopulaties.....	19
Pilotstudie.....	19
Studie: vergelijking tussen obese en gezonde niet obese kinderen	19
Ethische goedkeuring	19
Bloedname	19
Celcultuur: circulerende angiogene cellen.....	19
Celcultuur: human umbilical vein endothelial cells	20
RNA-stabilisatie en RNA-extractie.....	20
cDNA-synthese	21
Real-time Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction.....	21
Real-time Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction-array	21
Dataverwerking	21
Enzyme-linked immunosorbent assay.....	22
Statistische analyses	22
Resultaten	23
Deel 1: Technische studie.....	23
Bloedstalen van gezonde volwassenen.....	23
Bloedstalen van gezonde kinderen	24

Deel 2: Obese versus gezonde, niet obese kinderen	25
Discussie	28
Hyperleptinemie en de JAK/STAT-pathway	28
Inhibitie van de JAK/STAT-pathway	28
SH2B2	28
PTP-1B	28
SOCS-3	28
SOCS-4	29
Proliferatie, differentiatie en migratie van circulerende angiogene cellen	29
NOS2	29
CCND1	29
F2	30
Factoren met ongekende functie in circulerende angiogene cellen	30
GHR	30
MMP3	30
FCεR1α	31
PDGFRα	31
IL-20	31
Conclusie	31
Samenvatting	32
Referenties	33
Bijlage	38

Abstract

Introduction: The prevalence of obesity is increasing rapidly throughout the world. Obesity has been established as a risk factor for a number of cardiovascular diseases (CVD). Leptin is an adipose-derived hormone and could be an interesting link between obesity and the elevated risk for CVD. Apart from its anorexigenic effects, leptin also exhibits angiogenic and pro-atherogenic features. A possible explanation for hyperleptinemia found in obese patients is leptin resistance, which is not solely found in cells of the hypothalamus but also in circulating angiogenic cells (CAC). The purpose of this thesis is to further explore the JAK/STAT-pathway, which is considered the downstream mediator of leptin in CAC of obese children.

Methods: 20 healthy and 16 obese children were included. CAC were cultured during 7 days, lysed and RNA was extracted. The expression of the leptin receptor in CAC was confirmed with Real-time RT-PCR. Serum leptin concentrations were determined using ELISA. mRNA expression of multiple key players of the JAK/STAT-pathway was analyzed using Real-time RT-PCR-array.

Results: The results confirm hyperleptinemia in obese children ($61,27 \pm 8,91$; $p=0,0001$). Expression of nitric oxide synthase (NOS)2 had the highest upregulation in comparison to healthy children which is associated with an increased oxidative stress. Some factors, such as protein tyrosine phosphatase (PTP)-1B and suppressor of cytokine signaling (SOCS)3, which are known to have adverse effects on CAC through the inhibition of the JAK/STAT-pathway downstream of leptin, didn't exhibit a higher expression, whereas SH2B adaptor protein 2 (SH2B2) did show an upregulation in CAC of obese children. A remarkable finding was the inhibitory quality of cyclin D1. This protein was upregulated in CAC of obese children. Cyclin D1 actually inhibits signal transducers and activators of transcription (STAT)3, which implies that this factor also contributes to leptin resistance found in obese children. Moreover, this is emphasized by the overexpression of thrombin, which had a positive influence on the expression of cyclin D1.

Conclusion: Taken together, these results suggest some differences between obese children and obese adults concerning the mechanisms which contribute to leptin resistance found in CAC.

Afkortingen

acLDL = acetylated Low-density lipoprotein

ARH = Nucleus arcuatus hypothalamus

BMI = Body mass index

CAC = Circulating angiogenic cell

Ct = Threshold cycle

EDTA = Ethyleendiaminetetra-azijnzuur

EGM-2 = Endothelial growth medium-2

eNOS = endothelial Nitric oxide synthase

EOC = Endothelial outgrowth cell

FCS = Fetal calf serum

ELISA = Enzyme-linked immunosorbent assay

EPC = Endothelial progenitor cell

EPO = Erythropoëetine

ER = Endoplasmatisch reticulum

GAPDH = Glyceraldehyde 3-fosfaat dehydrogenase

G-CSF = Granulocyte-colony stimulating factor

GH = Groeihormoon

GHR = Groeihormoonreceptor

gp = glycoproteïne

HRP = Horseradish peroxidase

HUVEC = Human umbilical vein endothelial cell

IGF = Insulin-like growth factor

IL = Interleukine

IRS = Insulin receptor substrate

JAK = Janus kinase

LSM = Lymphocyte separation medium

MMP = Matrix metalloproteïnase

NO = Nitric oxide

Ob-R = leptinereceptor

oxLDL = oxidized Low-density lipoprotein

PAR = Protease activated receptor

PBMC = Perifere bloed mononucleaire cellen

PBS = Phosphored buffered saline

PECAM = Platelet endothelial cell adhesion molecule

PI = Phosphoinositide

PLC = Fosfolipase C

POMC = Pro-opiomelanocortine

PPAR = Peroxisome proliferator-activated receptor

PRMT = Protein N-arginine methyltransferase

PTP = Protein tyrosin phosphatase

ROS = Reactieve zuurstofradicalen

RT-PCR = Reverse transcriptase-polymerase chain reaction

SEM = Standard error of mean

SH2B = SH2B adaptor protein

SOCS = Suppressor of cytokine signaling

STAT = Signal transducers and activators of transcription

T2DM = Type 2 diabetes mellitus

Tyr = Tyrosine

ulex-lectin = Ulex europaeus agglutinin I

VEGF = Vascular endothelial growth factor

Inleiding

Obesitas

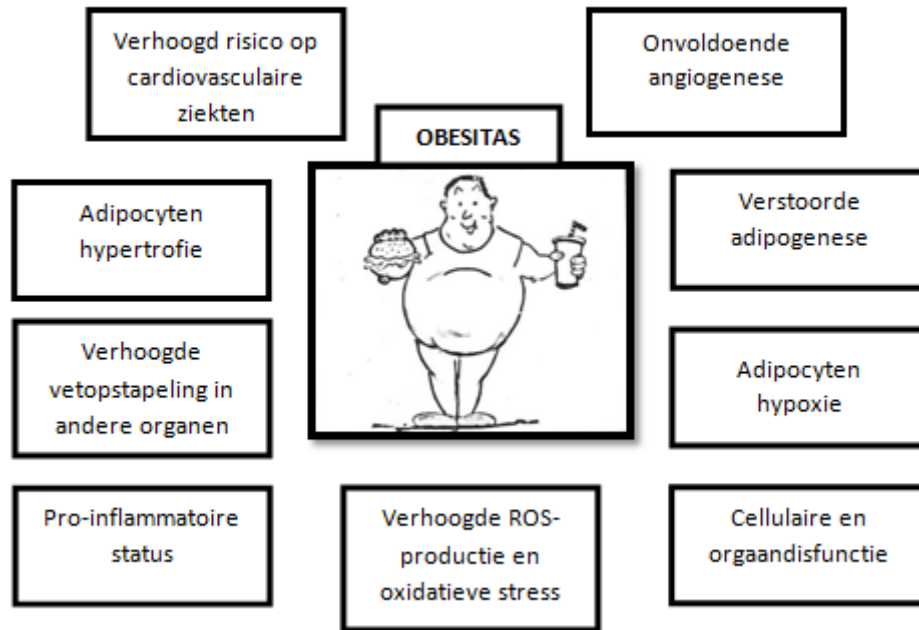
Het aantal obese patiënten is wereldwijd zeer snel aan het stijgen, waarbij morbide obesitas de leiding neemt (Lavie et al., 2011). Wat bovendien zeer verontrustend is, is dat de prevalentie (2-3%) (Lobstein et al., 2004) van obesitas bij kinderen eveneens hoog is (Buxton et al., 2011; Brug et al., 2012), waardoor men zelfs spreekt van een obesitasepidemie (Biro et al., 2010).

Obesitas wordt gekarakteriseerd door een chronisch onevenwicht tussen voedingsinname en energieverbruik, wat resulteert in een teveel aan vetweefsel (Aoki et al., 2010). In het op peil houden van de energiebalans heeft het neuro-endocrien systeem een belangrijke functie; hierbij staan de hersenen en het vetweefsel centraal. De hypothalamus regelt de energiebalans en het lichaamsgewicht door alle metabole signalen vanuit de periferie te registreren en vervolgens in te werken op zowel gedrag als metabole reacties (Morris en Rui, 2009).

Bij volwassenen spreekt men van obesitas bij een body mass index (BMI) $>30 \text{ kg/m}^2$ en van overgewicht bij een BMI $>25 \text{ kg/m}^2$. Bij kinderen moet men echter de aangepaste grenswaarden hanteren. Deze grenswaarden zijn gebaseerd op de BMI-waarde voor iemand van 18 jaar; deze waarden worden dan geëxtrapoleerd naar leeftijden onder de 18 jaar (bijlage, figuur 6 en 7). Tijdens de groeifase vertonen kinderen namelijk veranderingen in de hoeveelheid vetweefsel en spiermassa, waardoor de BMI stijgt. Ook moet men rekening houden met het geslacht, aangezien de BMI lichtjes hoger is bij meisjes dan bij jongens. Bovendien treedt de puberteit bij meisjes gemiddeld vroeger op dan bij jongens.

Obesitas is een aandoening waarbij meerdere oorzaken aan de basis kunnen liggen; hierbij spelen biologische, genetische, sociale en gedragsfactoren een rol. Het risico om ook op volwassen leeftijd obese te zijn is drie keer groter bij kinderen (< 12 jaar) met overgewicht/obesitas en vier keer groter bij adolescenten (12-18 jaar) met overgewicht/obesitas. Een aantal elementen zoals een verhoogde BMI en te weinig fysieke inspanning tijdens de kinderjaren dragen bij tot dit risico. Ook obese ouders, een vervroegde aanvang van de puberteit, een hoog geboortegewicht en een lage socio-economische status spelen hierbij een belangrijke rol (Juonala et al., 2011). Obesitas tijdens de kinderjaren is eveneens gelinkt aan een vroegere aanvang van de puberteit bij meisjes (Biro et al., 2010).

Een aantal cellulaire processen (figuur 1) zijn geassocieerd met de ontwikkeling van obesitas zoals hypertrofie en hyperplasie van adipocyten, die gepaard gaan met angiogenese wat essentieel is voor de adipogenese (Aoki et al., 2010). Doordat adipocyten zich gaan uitzetten, zal de angiogenese nog sterker op gang moeten komen zodat deze hypertrofiërende vetcellen al de nodige nutriënten en zuurstof kunnen opnemen. Door dit ontoereikend zuurstoftransport treedt er een inefficiënte zuurstofopname door deze adipocyten op, waardoor er intracellulaire hypoxie ontstaat (Bays et al., 2011). Deze angiogenese is bovendien van uiterst belang voor de productie en circulatie van adipocytokines die gesecreteerd worden door vetcellen. Groeiende adipocyten produceren bovendien een waaier aan angiogene factoren, zoals vascular endothelial growth factor (VEGF) (Aoki et al., 2010). Uiteindelijk leidt deze hypoxie tot cellulaire disfunctie met als eindresultaat orgaan disfunctie wat bijdraagt tot inflammatoire reacties (Bays et al., 2011). Tijdens dergelijke ontstekingsreacties stijgt het C-reactive protein (CRP)-gehalte, een acute-fase eiwit, in de bloedbaan. Het CRP-gehalte vertoont een zeer sterke correlatie met een stijgende BMI. Obesitas wordt naast het verhoogd cardiovasculair risicoprofiel met andere woorden ook gekenmerkt door een pro-inflammatoire status, die zowel een gevolg is van obesitas als een risicofactor voor de ontwikkeling ervan. (Juonala et al., 2011).



Figuur 1. De karakteristieken van obesitas.

Obesitas en het cardiovasculair risico

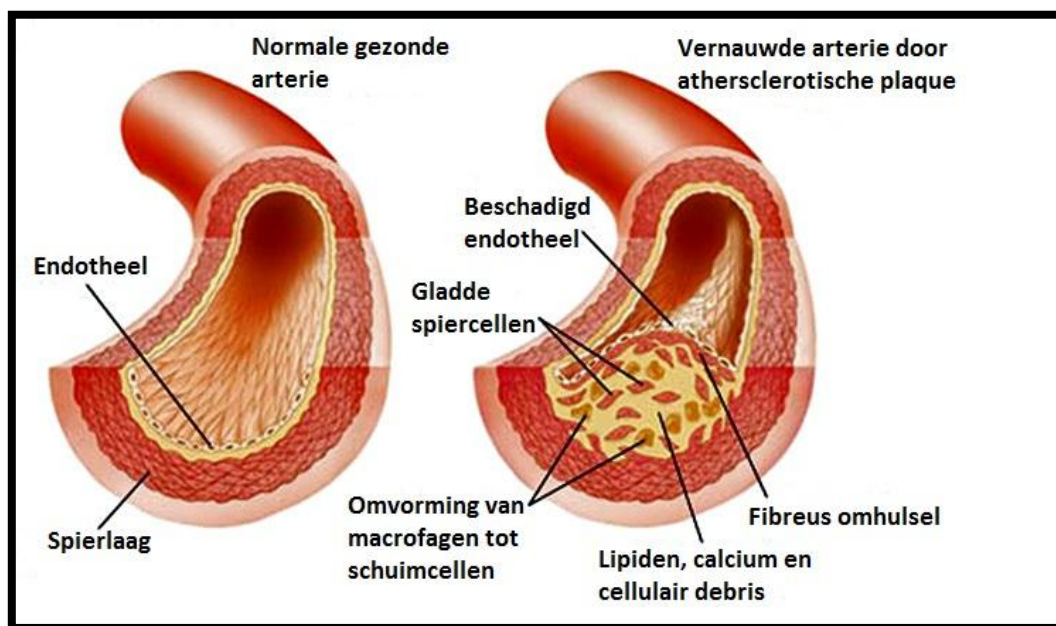
Klinische studies (Cassidy et al., 2005; Yusuf et al., 2005; Wolk et al., 2003) hebben uitgewezen dat er een link bestaat tussen een hoog lichaamsgewicht en het risico op cardiovasculaire aandoeningen, waaronder atherosclerose. Door de stijgende prevalentie van obesitas bij kinderen, wordt er geschat dat tegen het jaar 2035 de prevalentie van vasculaire aandoeningen gestegen zal zijn tot 5-16% (Cassidy et al., 2005). Must et al. hebben aangetoond dat obesitas tijdens de adolescentie jaren geassocieerd is met een verhoogd risico op allerlei comorbiditeiten op latere leeftijd, ook al is men dan niet meer obees (Biro et al., 2010). Een aantal van deze veel voorkomende comorbiditeiten zijn een verhoogde bloeddruk, dyslipidemie en insulineresistentie. Bovendien zijn systemische inflammatie en verhoogde oxidatieve stress ook geassocieerd met een te hoog lichaamsgewicht. Deze factoren kunnen een rechtstreekse bijdrage leveren tot endotheelschade en uiteindelijk endotheeldisfunctie (zie verder) (Berg et al., 2005; Heida et al., 2010). Oxidatieve stress heeft behalve nadelige effecten op het endotheel, ook een versnellend effect op de telomeerverkorting, die nog meer in de hand wordt gewerkt door de inflammatoire status vastgesteld bij obesitas. Telomeren zijn stukjes DNA die zich bevinden aan het uiteinde van chromosomen. Bij iedere celdeling rafelt dit stukje DNA verder uit totdat de cel niet meer kan delen en uiteindelijk sterft. Obese kinderen hebben effectief kortere telomeren dan gezonde, niet obese kinderen. Dergelijke korte telomeren worden geassocieerd met cardiovasculaire aandoeningen, hypertensie en type 2 diabetes mellitus (T2DM) (Buxton et al., 2011). Verkorte telomeren in endotheelcellen leidt tot senescentie van deze cellen, waardoor ze sneller afsterven, wat bijdraagt tot endotheeldisfunctie.

Obesitas hebben met andere woorden een verhoogd risico om atherosclerose eerder te ontwikkelen. Thomas Sydenham, een Engelse arts uit de 17de eeuw heeft toen gezegd: "A man is as old as his arteries" (Raghuvier et al., 2010). Hoewel de klinische effecten van dergelijke cardiovasculaire risicofactoren bij kinderen niet meteen zichtbaar zijn, zijn ze op latere leeftijd wel degelijk persistent aanwezig (Bays et al., 2011). Endotheelschade treedt namelijk al op jonge leeftijd op. Volgens de Bogalusa Heart Study (2005) is het daarom van uiterst belang om in te grijpen op jonge leeftijd, wil men het risico op cardiovasculaire ziekten reduceren. Endotheeldisfunctie (zie hieronder) is namelijk

een eerste stap in de ontwikkeling van dergelijke cardiovasculaire aandoeningen, zoals atherosclerose (Celermajer et al., 2006).

Endotheeldisfunctie en atherosclerose

Endotheeldisfunctie wordt gekenmerkt door een verhoogde schade en een verminderd herstel van het endotheel (Deanfield et al., 2007). Hierbij zorgen cardiovasculaire risicofactoren onrechtstreeks voor de verhoogde expressie van cytokines en adhesiemoleculen die bestemd zijn om te interageren met leukocyten en bloedplaatjes (Deanfield et al., 2007). Uiteindelijk zal dit resulteren in het op gang brengen van inflammatoire processen. Endotheliale stikstofoxide synthase (eNOS) staat in voor het normaal functioneren van het endotheel; dit enzyme vormt stikstofoxide (NO) dat als vasodilatator optreedt. Tijdens inflammatoire reacties kan de functie van eNOS zo negatief beïnvloed worden dat het reactieve zuurstofradicalen (ROS) produceert (Landmesser et al., 2003). Bij een chronische productie van ROS is de productie van antioxidanten niet meer voldoende om deze oxidatieve stress tegen te werken. Het grootste deel van ROS-productie vindt plaats in de mitochondria. Een dergelijke verhoogde productie kan zich voordoen tijdens metabole veranderingen gerelateerd aan obesitas. Zoals eerder aangehaald is endotheeldisfunctie een voorbode op cardiovasculaire aandoeningen waaronder atherosclerose (Deanfield et al., 2007). Bij endotheeldisfunctie worden circulerende monoccyten aangetrokken en wordt hun migratie en aanhechting aan de subendotheliale matrix bevorderd. De monoccyten differentiëren tot macrofagen die geoxideerde low-density lipoproteïnes (oxLDL) fagocyteren, waardoor ze getransformeerd worden tot schuimcellen (figuur 2) (Sarigianni et al., 2010).



Figuur 2. De spelende factoren in de ontwikkeling van atherosclerose. (vertaald naar: <http://www.robertsfox.com/EndoPAT.htm>)

Vasculaire homeostase

Een langdurige blootstelling aan cardiovasculaire risicofactoren (roken, verminderde fysieke activiteit, alcoholinname, verhoogde bloeddruk en hyperlipidemie) leidt niet alleen tot endotheeldisfunctie, maar ook tot senescentie van endotheelcellen die effectief loskomen van de endotheellaag. De vasculaire homeostase hangt niet enkel af van de grootte van de schade, maar ook van de capaciteit tot herstel. Vroeger werd gedacht dat alleen mature endotheelcellen lokaal konden prolifereren om zo de endotheelcellen die ten gronde zijn gegaan te vervangen. Recent is het duidelijk geworden dat stamcellen die vrijgesteld worden uit het beenmerg en in de bloedbaan circuleren, belangrijke cellen zijn die aan de basis liggen van het endotheelherstel. Deze cellen kunnen namelijk een stimulerende werking hebben op endotheelcellen of zelf differentiëren tot endotheelcellen om zo te integreren in het beschadigd endotheel (Deanfield et al., 2007).

Endotheel progenitorcellen: endothelial outgrowth cells en circulerende angiogene cellen

Het onderzoek naar endotheel progenitor cellen (EPC) is al een zekere tijd lopend (Asahara et al., 1997) en men is ervan bewust geworden van de rol die deze progenitorcellen spelen in de cardiovasculaire homeostase. EPC's worden vanuit het beenmerg in de bloedbaan vrijgesteld. Deze mobilisatie wordt op gang gebracht door cytokines en andere stimuli die vrijkomen door weefselschade (Takahashi et al., 1999; Heida et al., 2010). De vrijstelling van EPC's in de circulatie wordt onder meer gemedieerd door erythropoëetine (EPO), granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) en NO. Belangrijk hierbij is dat de NO-beschikbaarheid schaars is bij patiënten met cardiovasculaire risicofactoren. Een gereduceerde NO-productie heeft ook tot gevolg dat het herstelvermogen van EPC's verstoord wordt (Giannotti et al., 2010). Anderzijds is het geweten dat fysieke inspanning de endotheelfunctie en de biologische beschikbaarheid van NO bevordert. Fysieke inspanning heeft namelijk ook een sterk positief effect heeft op de mobilisatie van EPC's uit het beenmerg (Asahara et al., 1999; Laufs et al., 2004; Van Craenenbroeck et al., 2010).

Initieel werd de term EPC voor een aantal celtypen gebruikt. Dit zorgde voor enige verwarring toen men erachter kwam dat deze celtypen niet allemaal dezelfde kenmerken vertoonden. Deze groep cellen bestond namelijk uit stamcellen en witte bloedcellen. De stamcellen vertoonden naast hun typische merkers zoals CD34, ook merkers zoals KDR die ook terug te vinden zijn op endotheelcellen. Hiertegenover werden er voor de witte bloedcellen merkers gevonden die vooral aanwezig zijn op monocyt en lymfocyt, respectievelijk CD14 en CD45.

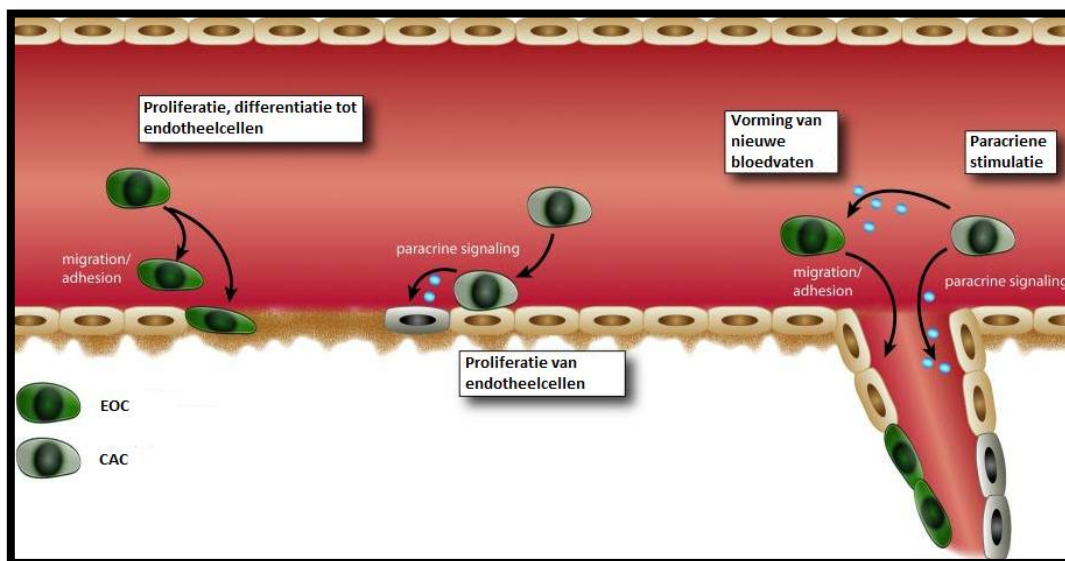
Endothelial outgrowth cells (EOC), ook wel de "echte" EPC's genoemd zijn niet van hematopoëtische oorsprong en hebben de capaciteit om zich te differentiëren tot endotheelcellen (endothelium-like cells) om zo de endotheelcellen die ten gronde zijn gegaan te vervangen (Heida et al., 2010). Deze EOC's hebben een fenotype (tabel 1) gelijkaardig aan mature endotheelcellen, maar ze vertonen een grotere proliferatieve, migrerende en pro-angiogene capaciteit. Bovendien brengen dergelijke EOC's vergeleken met mature endotheelcellen, andere integrines tot expressie zoals $\alpha_v\beta_5$. Ook zijn EOC's resistenter tegen oxidatieve stress dan CAC's; dit is te wijten aan een hoge expressie van manganese superoxide dismutase (Yoon et al., 2005). EOC-culturen (Hirschi et al., 2008) worden bekomen door mononucleaire cellen in cultuur te brengen en de non-adherente cellen te verwijderen. De adherente cellen vertonen een endotheliaal fenotype; deze cellen nemen geacetyleerd (ac)LDL op en binden ulex europaeus agglutinin I (ulex-lectine) (Rehman et al., 2003). EOC's worden 14-21 dagen nadat ze in cultuur werden gebracht, geoogst (Giannotti et al., 2010).

Early EPC's of CAC zijn wel van hematopoëtische oorsprong; ze stammen af van de myeloïde progenitorcel. CAC's werden vroeger beschouwd als een subpopulatie van EPC's, maar worden de dag van vandaag als een volledig aparte groep cellen beschouwd (Heida et al., 2010). CAC's vertonen

geen markers die typisch zijn voor progenitorcellen. Hoewel ze bepaalde karakteristieken gemeenschappelijk hebben met endotheelcellen, zoals de opname van acLDL, de binding van ulexlectine en de expressie van platelet endothelial cell adhesion molecule (PECAM), vertoont slechts een kleine fractie van deze cellen endotheelspecifieke markers zoals VE-cadherine. Rehman et al. hebben vastgesteld dat CAC's vooral markers tot expressie brengen die kenmerkend zijn voor monocyt/en/macrofagen (Rehman et al., 2003). CAC's hebben vergeleken met EOC's een verminderde proliferatieve capaciteit en secreteren een waaier aan pro-angiogene groeifactoren (tabel 1).

De hypothese dat CAC's verwant zijn met monocyt/en/macrofagen heeft een aantal zaken opgehelderd wat betreft de pro-angiogene effecten van CAC's. Ten eerste secreteren CAC's potente pro-angiogene groeifactoren en zijn op deze manier, net zoals monocyt/en, betrokken in de angiogenese (Rehman et al., 2003). Ten tweede is het geweten dat een verminderde functie van monocyt/en leidt tot een afzwakking van neovascularisatie bij diabetische patiënten (Rehman et al., 2003). Dit zou een mogelijke verklaring kunnen zijn waarom er bij deze patiënten ook een gereduceerde pro-angiogene capaciteit van CAC's wordt vastgesteld (Rehman et al., 2003). Ten derde wordt voor de cultuur van CAC's fibronectine gebruikt als coating, waarvan geweten is dat deze een belangrijke rol speelt in de activatie en differentiatie van monocyt/en naar macrofagen. Ten slotte vertonen in cultuur gebrachte CAC's een hogere expressie van CD163 (merker voor monocyt/en/macrofag differentiatie) en CD11c (merker voor monocyt/enactivatie) vergeleken met circulerende monocyt/en. Hieruit kan afgeleid worden dat CAC's hun pro-angiogene capaciteit in cultuur verhogen en dat ze potenter zijn dan dergelijke monocyt/en (Rehman et al., 2003).

Zoals reeds kon afgeleid worden uit voorgaande tekst dragen CAC's ook bij tot het endotheelherstel (figuur 3) door te ageren als potente autocriene en paracriene stimulators van de angiogenese (Heida et al., 2010). De secretie van pro-angiogene cytokines bevordert de overleving, proliferatie en functie van EOC's en mature endotheelcellen. Deze cytokines zijn onder andere VEGF en interleukine (IL)-8. CAC's bevorderen met andere woorden neovascularisatie na ischemie en stimuleren endotheelherstel na vasculaire schade (Heida et al., 2010). Ook CAC's kunnen geïsoleerd worden uit het bloed en kunnen in cultuur gebracht worden. CAC's verkrijgt men 4-7 dagen nadat men PBMC's in cultuur heeft gebracht; vandaar de naam early EPC's (Giannotti et al., 2010).



Figuur 3. De rol van EOC's en CAC's in het endotheelherstel en in de angiogenese. (vertaald naar: Fleissner et al., 2011)

De vasculoprotectieve eigenschappen van EOC's en CAC's zijn toe te schrijven aan hun vermogen om te binden aan moleculen die vrijgesteld worden uit beschadigde weefsels, waardoor deze cellen naar dergelijke aangetaste weefsels kunnen migreren. EOC's en CAC's vertonen een synergistisch effect op de angiogenese (figuur 3) (Yoon et al., 2005).

Tabel 1. Vergelijking tussen EOC's en CAC's. (vertaald naar: Yoon et al., 2005)

	CAC's	EOC's
Oorsprong	Hematopoëtische oorsprong	Niet-hematopoëtische oorsprong
Morfologie	Rond-spoelvormig ('spindle')	Kassesteen-achtig ('Cobblestone')
Monolayer	Geen	Confluent
Cultuur periode	4-7 dagen	2-4 dagen
	Sterven na 4 weken	Sterven na 12 weken
Mogelijkheid tot seriële passages	Niet mogelijk	# seriële passages
Proliferatief vermogen	Klein	Groot
In vitro vorming van bloedvaten	Neen	Ja
In vivo neovascularisatie	Groot	Groot
Cytokine productie	VEGF, HGF, IL-8, G-CSF, GM-CSF	Neen
NO-vrijstelling	Laag	Hoog
Opname van acLDL	Ja	Ja
Binding van UEA-I	Ja	Ja
Expressie van Ag	Klein aantal endotheel specifieke Ag	Vooral endotheel specifieke Ag
Fenotype	CD34 ⁻	CD34 ⁺
	KDR ⁻ of VEGFR-2 ⁻	KDR ⁺ of VEGFR-2 ⁺
	CD45 ⁺	CD45 ⁻
	CD14 ⁺	CD14 ⁻
	CD115 ⁺	CD115 ⁻
	CD133 ⁺	CD133 ⁻
	CD31 ⁺	CD31 ⁺
	vWF ⁺	vWF ⁺
	eNOS ⁺	eNOS ⁺
		CD105 ⁺
		CD146 ⁺

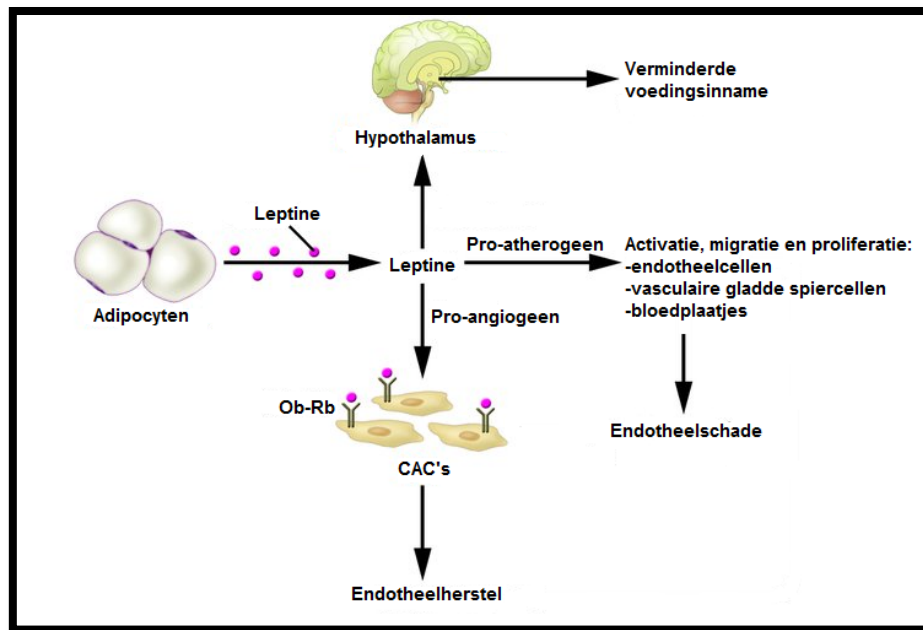
Er bestaat een correlatie tussen het aantal circulerende EPC's en de endotheelfunctie bij patiënten met verscheidene cardiovasculaire risicofactoren. Belangrijk hierbij is dat deze factoren een invloed hebben op de functionele capaciteit van EPC's. De hypothese van Heida et al. is dat obesitas de werking van EPC's negatief zou kunnen beïnvloeden. Meer concreet stellen ze dat het aantal EPC's en hun functie met betrekking tot het endotheelherstel verminderd worden. Deze verstoorde functie van EPC's zou omkeerbaar kunnen zijn door gewichtsverlies (Heida et al., 2010). Bovendien stelden Giannotti et al. vast dat senescentie van CAC's, onder meer gekenmerkt door een overexpressie van telomerase reverse transcriptase, leidt tot een verstoorde capaciteit van deze cellen om te migreren en angiogenese te stimuleren. Daarom zijn deze twee factoren ook belangrijk wat betreft de regulatie van de functie van deze cellen (Giannotti et al., 2010). Deze bevindingen suggereren dat een verminderde functie van EOC's en CAC's in het endotheelherstel, betrokken is in de pathogenese van obesitas gerelateerde cardiovasculaire aandoeningen (Heida et al., 2010).

Nieuwe interventies kunnen ontwikkeld worden om het herstelvermogen van deze cellen te vrijwaren door senescentie en NO-tekort tegen te gaan. Interessant zou zijn om de link te vinden tussen obesitas en cardiovasculaire ziekten en deze zo te gaan moduleren opdat het endotheelherstel gestimuleerd zou worden en de endotheeldisfunctie en uiteindelijk de ontwikkeling van vasculaire aandoeningen voorkomen zou kunnen worden (Giannotti et al., 2010).

Leptine als link tussen obesitas en gerelateerde cardiovasculaire ziekten

Obesitas is een multifactorieel syndroom dat ondermeer beïnvloed wordt door genetische en gedragsfactoren. Obese kinderen kunnen effectief afvallen en later als volwassene niet meer obees zijn, maar het risico op cardiovasculaire aandoeningen blijft echter persistent aanwezig. Daarom is er nood aan preventieve maatregelen die ondernomen kunnen worden. De identificatie van nieuwe vroeg aanwezige biomerkers zou een grote stap vooruit zijn, aangezien deze een idee zouden kunnen geven over de predispositie voor obesitas en de hiermee geassocieerde cardiovasculaire aandoeningen (Sánchez et al., 2012). Voor dergelijke obesitas-gerelateerde cardiovasculaire ziekten zijn er reeds een aantal mechanismen naar voor geschoven, zoals de pro-inflammatoire status en de abnormaliteiten in de adipokine pathways vastgesteld bij obesen. Eén van de belangrijkste adipokines is leptine.

Leptine wordt gecodeerd door het *ob* gen. Dit adipokine wordt gesecreteerd door vetweefsel en circuleert als peptidehormoon in de bloedbaan. Het leptinegehalte in de bloedbaan stijgt met de BMI. De correlatie tussen het leptinegehalte en de hoeveelheid vetweefsel is nog meer uitgesproken dan deze tussen het leptinegehalte en de BMI. Dit adipokine regelt het lichaamsgewicht door in te werken op het hongergevoel en het metabolisme door het hongergevoel te verlagen en het energieverbruik te verhogen; hiervoor heeft leptine de hypothalamus als doelorgaan. Leptine vertoont naast metabole ook vasculaire effecten (figuur 4), die pro-angiogeen of pro-atherogeen kunnen zijn (Wannamethee et al., 2011). Zowel in vitro als in vivo vertoont leptine pro-angiogene effecten, die gedeeltelijk gemedieerd worden via CAC's. Leptine bevordert namelijk de migratie en de adhesie van deze cellen (Heida et al., 2010).



Figuur 4. De effecten van leptine. (vertaald naar: Cao et al., 2007)

Obesen hebben te maken met een hyperleptinemie. Het leptinegehalte in de bloedbaan is bij obesen sterk gestegen vergeleken met niet obesen gecorrigeerd voor geslacht en leeftijd (Sarigianni et al., 2010). Het verhoogde leptinegehalte wordt echter vaak beschouwd als een voorbode op de ontwikkeling van atherosclerose. Bovendien vertonen patiënten met een verhoogd risico voor coronaire aandoeningen ook een verhoogd leptinegehalte. Deze pro-atherogene effecten (tabel 2) van leptine komen tot stand door onder meer in te werken op endotheelcellen (activatie), vasculaire gladde spiercellen (migratie en proliferatie), monocyt en bloedplaatjes (activatie) (Sarigianni et al., 2010).

Tabel 2. Samenvatting: pro-angiogene en pro-atherogene effecten van leptine

	Pro-angiogeen	Pro-atherogeen
EOC's	In vitro bloedvatvorming	Migratie In vitro bloedvatvorming
CAC's	Migratie Adhesie	
Endotheelcellen	Proliferatie	Activatie Migratie
Gladde spiercellen		Proliferatie
Monocyt		
Bloedplaatjes		Activatie
Andere	NO-vorming	Activering van immuuncellen in de vaatwand Bloeddrukverhoging via OS Verhoging van CRP Verhoging van oxidatieve stress

Hoewel leptine ook een potente pro-angiogene factor (tabel 2) is, komen deze pro-angiogene en vasculoprotectieve effecten van leptine bij obese patiënten niet tot uiting (Aoki et al., 2010). Obese hebben te maken met een leptineresistentie ter hoogte van de hypothalamus en ter hoogte van de CAC's (Heida et al., 2010). Dergelijke obese patiënten reageren zelf ook niet op exogene toediening van leptine als mogelijke behandeling van obesitas (Reed et al., 2010). Glavas et al. hebben met hun studie op proefdieren kunnen aantonen dat leptineresistentie mogelijk aanwezig kan blijven gedurende het hele leven, zonder dat er sprake is van een hyperleptinemie; dit is echter nog niet aangetoond geweest bij de mens. Glavas et al. hebben zeer jonge muizen gebruikt die gedurende een lange periode overvoed werden. Dit resulteerde in een leptineresistentie ter hoogte van de nucleus arcuatus in de hypothalamus (ARH), waarbij ook een hyperleptinemie werd waargenomen. Deze muizen vertoonden op oudere leeftijd nog steeds een dergelijke leptineresistentie, maar met een normaal leptinegehalte (Glavas et al., 2010). In de literatuur zijn reeds een aantal mogelijke mechanismen aangehaald geweest die verantwoordelijk zouden kunnen zijn voor een dergelijke leptineresistentie; een verhoogd gehalte aan bindingsproteïnen, circulerende antilichamen, verzadigbare signaal cascades, endoplasmatisch reticulum (ER)-stress en de aanwezigheid van inhibitoren (Moon et al., 2011). Ook mutaties in het gen coderend voor leptine of de leptinereceptor (Ob-R) resulteren in (morbide) obesitas en de daarmee geassocieerde cardiovasculaire en metabole aandoeningen (Morris en Rui, 2009).

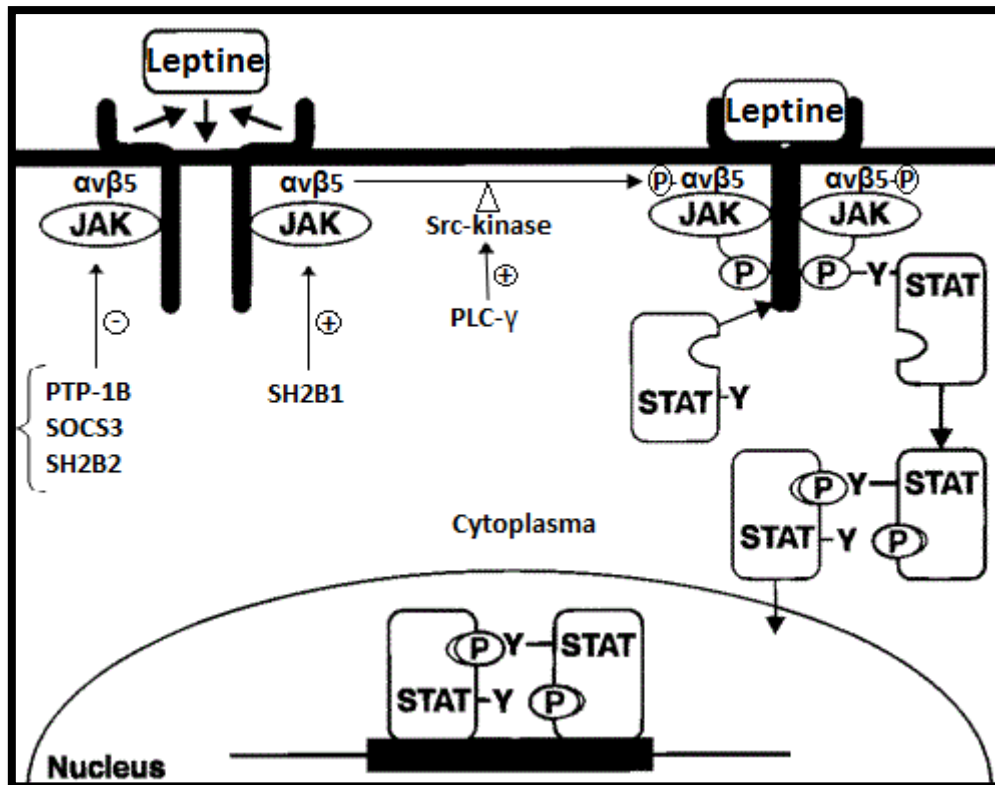
De leptinereceptor

Het mRNA coderend voor de leptinereceptor ondergaat een alternatieve splicing, waardoor er acht isovormen (a, b, c, d, e en f) bestaan voor de Ob-R. De leptinereceptor behoort tot de glycoproteïne (gp) 130 cytokinereceptoren familie. De expressie van de Ob-R is op een aantal cellen aanwezig, waaronder endotheelcellen, CD34⁺-cellen, EOC's en CAC's. Alle isovormen hebben een extracellulair bindingsdomein voor leptine, maar enkel de lange isovorm (Ob-Rb) heeft een volledig intracellulair domein dat nodig is voor de signaal cascade (Morris en Rui, 2009).

De leptine-pathway

Zoals eerder aangehaald, bevordert leptine de pro-angiogene effecten van CAC's. Deze effecten komen tot stand via een specifieke interactie tussen de lange isovorm van de leptinereceptor (Ob-Rb) en $\alpha\beta 5$ -integrines (Heida et al., 2010). De binding van het peptidehormoon op de Ob-Rb induceert conformationele veranderingen in de leptinereceptor zelf (Iwasaki et al., 2010); met andere woorden worden er immuuncomplexen gevormd tussen deze receptor en $\alpha\beta 5$ -integrines. De leptine-geïnduceerde fosforylatie van $\beta 5$ -integrine is essentieel opdat de positieve effecten van leptine op de functies van CAC's en uiteindelijk de angiogenese tot stand kunnen komen. Omdat integrines zelf over geen enkele enzymatische capaciteit beschikken, zijn cytoplasmatische tyrosine kinasen, zoals Src-kinasen, belangrijke regulerende factoren in de signaal cascades ingeleid door integrines. Hierbij blijkt de fosfolipase C (PLC) γ -gemedieerde activatie van Src-kinase ook een vereiste te zijn; PLC γ vergemakkelijkt de lokalisatie van Src-kinase binnenin het integrine-complex. Src-activatie kan met andere woorden gereduceerd worden door PLC γ -inhibitie. Heida et al. hebben aangetoond dat de toediening van leptine resulteert in een verbeterde activatie van Src-kinase, zowel in CAC's als in endotheelcellen. Wat ze ook hebben waargenomen is dat inhibitie van Src-kinase de effecten van leptine op de pro-angiogene eigenschappen van CAC's volledig verhinderen. Eveneens een interessante bevinding was dat in CAC's getransfecteerd met inactieve vormen van Src-kinase, de leptine-geïnduceerde fosforylatie van $\beta 5$ -integrine en angiogenese in deze cellen geblokkeerd was. Bovendien als Janus Kinase (JAK)2 in zijn functie verhinderd zou worden, dan gebeurt er eveneens geen activatie van Src-kinase (Heida et al., 2010). JAK2 bindt aan de Ob-Rb (figuur 5) om zo geactiveerd te worden, doordat tyrosine (Tyr)⁸¹³ op JAK2 gefosforyleerd wordt (Iwasaki et al., 2010).

Vervolgens fosforyleert het geactiveerde JAK2 Tyr⁹⁸⁵, Tyr¹⁰⁷⁷ en Tyr¹¹³⁸ in het cytoplasmatisch domein van de leptinereceptor (Iwasaki et al., 2010). De tyrosine residues (Tyr⁹⁸⁵, Tyr¹⁰⁷⁷ en Tyr¹¹³⁸) dienen na fosforylatie als bindingsplaats voor STAT3-proteïnen. Tyr⁷⁰⁵ op deze proteïnen wordt vervolgens gefosforyleerd. De geactiveerde STAT-proteïnen ondergaan een translocatie naar de kern waar ze als transcriptiefactor binden op specifieke DNA-sequenties om transcriptie van bepaalde genen te induceren (Iwasaki et al., 2010).



Figuur 5. De leptine-pathway. (vertaald naar: <http://www.cs.stedwards.edu>)

Regulerende factoren van de leptine-pathway mogelijk verantwoordelijk voor leptineresistentie

De leptine-pathway is JAK/STAT gemedieerd. Iwasaki et al. toonden aan dat methylering van arginine (Arg)³¹ op STAT3 gekatalyseerd wordt door proteïne N-arginine methyltransferase (PRMT)2. Dit enzym blijkt een belangrijke functie te vervullen in de regulatie van de signaalcascade van leptine. Het is geweten dat PRMT2 en STAT3 samen gelokaliseerd zijn in de hypothalamus. Een afwezigheid van PRMT2 zoals gezien bij PRMT^{-/-} muizen die gebruikt werden in het onderzoek van Iwasaki, resulteert in een verminderde methylering van STAT3. Ook treedt er een verlengde fosforylatie op van Tyr⁷⁰⁵ op STAT3 die geassocieerd is met een verhoogde expressie van pro-opiomelanocortine (POMC). Deze verhoogde expressie gaat gepaard met een gedaald lichaamsgewicht en significante veranderingen in het lipidenmetabolisme, wat Iwasaki et al., associeerde met een verbeterd cardiovasculair risicoprofiel.

Nog een belangrijke regulerende factor van de JAK/STAT pathway is proteïne tyrosine fosfatase (PTP)-1B, die een negatieve invloed heeft op de signaalcascade van leptine. PTP-1B^{-/-} muizen vertonen dezelfde effecten als PRMT2^{-/-} muizen, onder meer een gedaald lichaamsgewicht. PTP-1B bevindt zich in het cytoplasma en heeft JAK2 als substraat, terwijl PRMT2 STAT3 als substraat heeft. PTP-1B defosforyleert JAK2, waardoor de downstream signaalcascade van leptine wordt

geblokkeerd. Enriori et al. hebben bij hun leptineresistente proefdieren een verhoogde PTP-1B-expressie waargenomen; hieruit heeft men afgeleid dat PTP-1B bijdraagt tot een dergelijke leptineresistentie (Iwasaki et al., 2010).

Heida et al., hebben effectief een dergelijke leptineresistentie in CAC's teruggevonden. CAC's van obesen vertonen een overexpressie van PTP-1B; dit heeft als gevolg dat de positieve effecten van leptine op de pro-angiogene kenmerken van deze cellen niet tot hun recht komen. Gewichtsverlies of inhibitie van PTP-1B kan de gevoeligheid van CAC's voor leptine weer herstellen. Omgekeerd leidt gewichtsverlies tot een verminderde expressie van PTP-1B (Heida et al., 2010).

Een derde factor die een negatieve regulerende rol speelt is suppressor of cytokine signaling (SOCS)3. Leptine stimuleert de expressie van SOCS3, met andere woorden fungeert deze factor als een negatief feedback mechanisme om een mogelijke overactivatie van de leptine-pathway te voorkomen. SOCS3 inhibeert JAK2 door met dit enzyme te binden. SOCS3 kan ook een binding aangaan met de gefosforyleerde Tyr⁹⁸⁵ op de Ob-Rb om op deze manier het leptine signaal te blokkeren (Iwasaki et al., 2010). Enriori et al. hebben bij hun leptineresistente proefdieren ook een verhoogde SOCS3-expressie waargenomen, waaruit ze, net zoals voor PTP-1B, konden concluderen dat SOCS3 eveneens bijdraagt tot een dergelijke leptineresistentie.

Anderzijds heeft SH2B adaptor protein (SH2B)1 een positieve invloed op de regulatie van het leptine signaal. Een overexpressie van deze factor zorgt ervoor dat men geen obesitas en geen leptineresistentie ontwikkelt, onder meer door PTP-1B tegen te werken. Dit suggereert dat SH2B1 in de hersenen een belangrijke rol speelt wat betreft de gevoeligheid van weefsels voor leptine, de energiebalans en het lichaamsgewicht. Het bevorderen van het lichaamsgewicht reducerend effect van leptine door SH2B1 kan op twee manieren gebeuren. Deze factor bindt enerzijds via het SH-domein met het gefosforyleerd Tyr⁸¹³ op JAK2, waardoor de activiteit van dit enzyme bevordert wordt. Anderzijds bindt SH2B1 met insulinerceptor substrate (IRS)-1 en -2. De vorming van dit JAK2/SH2B1/IRS-complex bevordert de JAK-gemedieerde fosforylatie van IRS-proteïnen wat resulteert in de activatie van de fosfatidylinositol (PI)3-kinase pathway. Activatie van deze pathway is nodig, opdat het lichaamsgewicht reducerend effect van leptine kan verkregen worden. Een chronische activatie van de PI 3-kinase pathway verhoogt de gevoeligheid van weefsels voor leptine en reduceert de hoeveelheid vetweefsel. De interactie tussen SH2B1 en IRS-1/-2 blokkeert de defosforylatie van deze IRS-proteïnen met als gevolg dat de activatie van de PI 3-kinase pathway verlengd wordt (Morris en Rui, 2009).

Als laatste en eerder aangehaalde factor die mee verantwoordelijk kan zijn voor de ontwikkeling van een dergelijke leptineresistentie, is ER-stress. De homeostase in het ER is afhankelijk van het evenwicht gecreëerd door het aantal proteïnen die het ER krijgt en de capaciteit van het ER om deze proteïnen in de correcte conformatie op te vouwen. Een onbalans resulteert in een accumulatie van verkeerd en niet opgevouwen proteïnen in het ER-lumen wat leidt tot ER-stress. Ozcan et al. hebben een verhoogde ER-stress waargenomen in meerdere weefsels van leptineresistente proefdieren, waaronder de lever, vetweefsel en de hersenen. Hieruit hebben ze afgeleid dat een chronische ER-stress mee bijdraagt tot de ontwikkeling van obesitas en de daarmee gepaarde leptineresistentie (Ozcan et al., 2009).

Fysiologische vormen van leptineresistentie

Leptineresistentie wordt voornamelijk beschreven in de literatuur als een pathologische staat. Deze resistentie kan echter ook optreden als een adaptieve fysiologische respons. Bijvoorbeeld, in het geval van een verminderde beschikbaarheid van voeding, kan dit fenomeen van leptineresistentie voorkomen. Hierbij wordt het energieverbruik tot een zekere mate gereduceerd. Ook tijdens een zwangerschap kan deze fysiologische vorm van leptineresistentie optreden. De enorme energetische

last van de groei van de foetus, de bevalling en de lactatie wegen zwaar door, waardoor significante veranderingen in het lichaamsgewicht van de moeder noodzakelijk zijn. Het resultaat hiervan is een verhoogd hongergevoel. In beide gevallen wordt deze verandering in energiehomeostase gemedieerd door het neuro-endocrien systeem. Dergelijke alteraties vinden plaats ter hoogte van de signaalcascade van leptine die geactiveerd wordt door de binding van leptine op de Ob-Rb (Tups, 2009).

Doelstelling

Het is reeds geweten dat obesitas bij volwassenen gepaard gaat met een hyperleptinemie en een leptineresistentie. In de literatuur spreekt men vooral over een selectieve leptineresistentie ter hoogte van de hypothalamus. Wat wij hier willen nagaan is of een dergelijke leptineresistentie in CAC's bij obese adolescenten te bespeuren valt.

Endotheeldisfunctie als eerste stap in de ontwikkeling van atherosclerose begint vaak op jonge leeftijd. Daarom is het interessant om voor dit project kinderen te includeren opdat men zou kunnen ingrijpen in het atherosclerotisch proces en uiteindelijk de prevalentie voor cardiovasculaire aandoeningen bij obese kinderen zou kunnen verlagen.

Ten eerste wordt er gekeken naar het aantal CAC's dat verkregen kan worden van bloedstalen van kinderen (12-18 jaar); hierbij wordt er gebruik gemaakt van een kweekmethode die aanvankelijk enkel uitgevoerd is geweest op bloedstalen van volwassenen. Ten tweede wordt de expressie op mRNA-niveau van de leptinereceptor op deze CAC's nagegaan. Het leptinegehalte in de bloedbaan wordt door middel van een ELISA gemeten, zodat een dergelijke hyperleptinemie bij obese kinderen kan bevestigd worden. Ten slotte worden er aan de hand van een PCR-array twee genexpressieprofielen opgesteld voor de obesen en de gezonde, niet obese kinderen. Er wordt gekeken naar welke mRNA's er zijn up- of downgereguleerd. Beide groepen worden op basis hiervan met elkaar vergeleken.

Materiaal en methoden

Studiepopulaties

Pilootstudie

Om de technieken op punt te stellen werd aan gezonde kinderen (n=5) die ter controle kwamen op de raadpleging Pediatrie (UZA) gevraagd deel te nemen aan deze studie. Deze kinderen moeten tussen de 12 en 18 jaar oud zijn. Ze mogen geen acute infectie of maligniteit hebben.

Studie: vergelijking tussen obese en gezonde niet obese kinderen

In een verdere fase werd zowel aan obese (n=16) en gezonde, niet obese kinderen (n=20) gevraagd deel te nemen aan deze studie. De leeftijd van deze twee groepen varieert ook tussen de 12 en 18 jaar. De obese kinderen jonger dan 16 jaar moeten een BMI-waarde hebben \geq de 97e geslachts- en leeftijdsspecifieke BMI-percentiel. Deze tussen de 16 en 18 jaar moeten een BMI hebben ≥ 35 kg/m². Ze mogen niet lijden aan een acute of chronische inflammatoire aandoening, ook mogen ze geen anti-inflammatoire geneesmiddelen of immunosuppressiva (inclusief inhalatiecorticosteroiden) innemen. Er mag ook geen sprake zijn van structurele hartafwijkingen of andere cardiale aandoeningen. Ze mogen eveneens niet te kampen hebben met actieve maligne hematologische aandoeningen.

Ethische goedkeuring

Het protocol van deze studie werd voorgelegd aan het ethisch comité van het Universitair Ziekenhuis Antwerpen en voldoet aan de criteria van de verklaring van Helsinki. Alle kinderen en hun ouders kregen zowel mondelinge als schriftelijke uitleg over deze studie en ze hebben hun toestemming gegeven.

Bloedname

Na een nacht vasten werden veneuze bloedstalen genomen met behulp van een 21 gauge vleugelnaald (Valu-Set, BD Biosciences). Concreet werden aan de vrijwilligers een aantal richtlijnen gegeven. Ze moesten 12 uur voor het onderzoek nuchter blijven en mochten de dag voor het onderzoek vanaf 22 uur 's avonds enkel water drinken. Dit werd zo besloten omdat een maaltijd een directe invloed kan hebben op het endotheel en het aantal CAC's. 24 uur voor het onderzoek werd ook geen excessieve inspanning toegelaten. Dit zorgt namelijk voor een stijging in het aantal CAC's in de bloedbaan. Hiermee gepaard zou het aantal PBMC's die in cultuur worden gebracht en het aantal CAC's dat geogst wordt beïnvloed worden.

Om contaminatie met mature endotheelcellen te vermijden werd eerst een serumtube (6 ml, Vacutainer SST II Advance, BD Biosciences) gevuld. Nadien werd 3 maal 6 ml bloed in acid citrate dextrose (ACD) tubes (Vacutainer, BD Biosciences) geïncubeerd.

Celcultuur: circulerende angiogene cellen

In een eerste stap werd er phosphored buffered saline/ethyleendiaminetetra-azijnzuur (PBS, Invitrogen /EDTA, VWR International) toegevoegd aan het bloedstaal. EDTA is een Ca²⁺-chelator die Ca²⁺ bindt, waardoor er geen stolling kan plaatsvinden. Na een goede opmenging werd er een celscheiding uitgevoerd. Hiervoor werd er lymphocyte separation medium (LSM, MP Biomedicals, Inc, 1692254) toegevoegd aan het met PBS verdund bloedstaal. Nadat het plasma verwijderd werd, werden de PBMC's geïsoleerd. Voor het verkrijgen van een zo zuiver mogelijke pellet, werden deze

geïsoleerde witte bloedcellen twee maal gespoeld met PBS-EDTA om resterende rode bloedcellen en bloedplaatjes te verwijderen. De uiteindelijk verkregen pellet werd vervolgens geresuspendeerd door toevoeging van een klein volume endothelial growth medium (EGM, Lonza, CC-3202)-2 waaraan 20% foetaal kalf serum (FCS, Sigma Aldrich, F2442-500ml) werd toegevoegd. Het aantal witte bloedcellen werd geteld (Horiba ABX). Er werd geopteerd voor 6-wellplaten om de geïsoleerde witte bloedcellen in cultuur te brengen, volgens het protocol dat reeds op punt gesteld is geweest (Van Craenenbroeck et al., 2010). Opdat de CAC's zouden adhereren aan de bodem van de 6-wellplaten, werden deze eerst gecoat met fibronectine. De gewenste concentratie witte bloedcellen voor een 6-wellplaat is 1×10^6 /ml medium. Aan iedere well werd EGM-2 en de juiste hoeveelheid celsuspensie toegevoegd. De celculturen werden gedurende 3 dagen geïncubeerd bij 37°C, met een CO₂ van 5% en een vochtigheidsgraad boven de 95%.

Na 72 uur werd het medium verwijderd, de cellen werden gespoeld met PBS om de niet-adherente cellen te verwijderen; vers medium werd weer toegevoegd. 48 uur later werd er opnieuw vers EGM-2 toegevoegd. Zeven dagen nadat de witte bloedcellen in cultuur werden gebracht, werden de CAC's geoogst. Na een celtelling werd 1 miljoen cellen gelyseerd in RLT lysisbuffer (QIAGEN, 79216) en bewaard bij -80°C voor RNA-applicatie. De rest van de cellen dienden om gelyseerd te worden in een lysisbuffer die als ladingsbuffer diende voor de Western Blot. Deze lysisbuffer bevat Laemmli sample buffer (BioRad, 161-0737) en 5% β-mercaptoethanol (Sigma Aldrich, M6250). Deze cellen werden bewaard bij -20°C.

Cellcultuur: human umbilical vein endothelial cells

Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) werden gebruikt als positieve controle voor de Western Blot en voor de RT-PCR (zie verder). Deze cellen werden initieel bewaard in vloeibare stikstof (196°C). Na het ontdooien van deze cellen, werden ze in cultuur gebracht in 75 cm² flessen waaraan 15 ml EGM-2 (5% FCS) werd toegevoegd. Hierna werden ze geïncubeerd bij 37°C, met een CO₂ van 5% en een vochtigheidsgraad boven de 95%. 24 uur later en telkens om de twee dagen werd het medium vervangen door vers medium. Bij een confluentie van 70-80%, werden deze cellen geoogst. Op dezelfde dag werd een celtelling gedaan, zodat, zoals voor CAC's, de ene helft cellen verder bewerkt werd voor RNA-extractie en de andere helft voor Western blot. Aangezien de grotere hoeveelheid geoogste HUVECellen vergeleken met de lagere hoeveelheid CAC's, werden de cellen bestemd voor RNA-extractie eerder geresuspendeerd in RNAprotect Cell Reagent (QIAGEN, 76526) dan in RLT lysisbuffer, opdat ze langer bewaard konden worden bij -20°C.

RNA-stabilisatie en RNA-extractie

Afhankelijk van de hoeveelheid geïsoleerde cellen werd RNAprotect Cell Reagent (>2 miljoen cellen) (QIAGEN, 76526) of de RLT lysisbuffer van de RNeasy Mini Kit (<2 miljoen cellen) (QIAGEN, 74624) gebruikt als stabiliserend reagens om RNA-degradatie te verhinderen. Dit is van uiterst belang wanneer men de genexpressie wil onderzoeken. Indien dit niet gedaan zou worden, zouden er door RNA-afbraak veranderingen in de genexpressie optreden wat zou leiden tot onbetrouwbare resultaten. Na behandeling van de cellen met behulp van RNAprotect Cell Reagent/ RNeasy Mini Kit werden de stalen respectievelijk bewaard bij -20°C/-80°C.

Voor RNA-isolatie is het vastleggen van het startmateriaal zeer belangrijk en als de regels hiervoor niet gerespecteerd worden, is de kans groot dat de hoeveelheid geïsoleerd RNA aan de lage kant is en niet zuiver genoeg is. De RNA-extractie gebeurde met behulp van de RNeasy Plus Mini kit (QIAGEN, 74134).

De zuiverheid en integriteit van het geëxtraheerd RNA werden bepaald met behulp van de Agilent 2100 Electrophoresis Bioanalyzer, waarbij gebruik werd gemaakt van de Agilent RNA 6000 Nano kit (Agilent Technologies, 5067-1511). Het bepalen van de zuiverheid en integriteit van het geïsoleerde RNA is een cruciale stap wil men betrouwbare en betekenisvolle resultaten verkrijgen betreffende de expressie van bepaalde mRNA-sequenties. Het is echt van groot belang om zo intact mogelijk RNA te gebruiken voor succesvolle analyses met Real-time RT-PCR en RT-PCR-array.

De 2100 Electrophoresis Bioanalyzer geeft een visueel beeld weer van de RNA-integriteit. Men verkrijgt voor ieder staal een elektroferogram waarop eventuele aanwezigheid van RNA-degradatie vastgesteld kan worden. Aan ieder elektroferogram wordt een RIN (RNA Integrity Number)-waarde toegekend. Aan volledig intact RNA wordt een RIN-waarde van tien toegeschreven. Bij een RIN-waarde van zeven of hoger, kan men spreken van een goede en zuivere RNA-extractie.

De RNA-concentratie werd bepaald met behulp van de UV-spectrofotometer Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific). Voor deze analyse werd 1,5 µl staal gebruikt. De 260/280 ratio ligt bij voorkeur >1,8-2,0 en de 260/230 >1,7.

cDNA-synthese

Het geëxtraheerd RNA werd omgezet tot cDNA door middel van reverse transcriptase (RT² First Strand Kit, QIAGEN, 330401). Dit werd uitgevoerd met behulp van Biorad CFX-96. Er werd verder gewerkt met cDNA omdat het stabiel is dan RNA en het bevat geen introns vergeleken met DNA.

Real-time Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction

Vervolgens werd het gesynthetiseerd cDNA geamplificeerd met behulp van hetzelfde toestel. Er werd gebruik gemaakt van specifieke primers voor de leptinereceptor (RT² qPCR Primer Assay for human LEPR, QIAGEN, PPH00028B), β-actine (RT² qPCR Primer Assay for Human ACTB, QIAGEN, PPH00073E) en glycerinaldehyde 3-fosfaat dehydrogenase (GAPDH) (RT² qPCR Primer Assay for Human GAPDH, QIAGEN, PPH00150E); deze laatste twee dienden als huishoudgenen (Ladhoff et al., 2010; Barber et al., 2005). Detectie en kwantificatie gebeurde door middel van fluorescentie tijdens de Real-time PCR dat opgewekt wordt met SYBR Green I Dye (RT² Real-time SYBR Green PCR Master Mix, QIAGEN, 330500).

Real-time Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction-array

Een Real-time RT-PCR-array werd gebruikt om op grote schaal verschillen in genexpressie tussen de 2 groepen kinderen te bepalen. Hierbij werd de genexpressie en het eventueel verschil tussen obese en gezonde, niet obese kinderen verder bestudeerd, met bijzondere aandacht voor de mogelijke mechanismen van leptineresistentie. De focus ligt hier op de JAK/STAT-pathway, waarvan geweten is dat deze het angiogene effect van leptine in CAC's medieert. Een commercieel verkrijgbare kit met de gekende genen van deze pathway werd hiervoor gebruikt (JAK/STAT Signaling Pathway PCR Array, QIAGEN).

Dataverwerking

Bij de Real-time RT-PCR en RT-PCR-array werden de threshold cycles (Ct) gebruikt voor de verdere data-analyse. De Ct-waarde of drempelwaarde is de cyclus waarbij de amplificatiecurve de threshold lijn kruist. De Ct-waarde is bepaald voor alle stalen. De threshold lijn werd manueel ingesteld en dit

zodanig dat deze zich boven de achtergrondruis en in het midden van de exponentiële fase van de amplificatiecurve bevond. De baseline, een maat om de achtergrondamplificatie te bepalen, werd ingesteld van cyclus 3 tot cyclus 15. De verdere dataverwerking is gebaseerd op de $\Delta\Delta Ct$ data analyse methode. Deze methode steunt op de inverse proportionele relatie tussen de Ct waarden, het genexpressieniveau (L) en de verdubbeling van de hoeveelheid amplificatieproduct bij elke cyclus, waarbij: $L=2^{-Ct}$. Met name om het genexpressie niveau van het gen van interesse (GOI) te normaliseren, wordt het hierbij gedeeld door de genexpressie van een huishoudgen (HKG). Zo bekomt men: $2^{-Ct(GOI)}/2^{-Ct(HKG)} = 2^{-\Delta Ct}$. Om de verhouding van de genexpressie van een bepaald gen tussen 2 populaties te bepalen, wordt de genormaliseerde expressie van het GOI van de ene populatie gedeeld door deze van de andere populatie. Zo bekomt men: $2^{-\Delta Ct(\text{populatie 1})} / 2^{-\Delta Ct(\text{populatie 2})} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$. Dit wordt de "fold change" of het verschil in genexpressie genoemd. In deze thesis; $2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{\Delta\Delta Ct(CAC)} / 2^{-\Delta Ct(HUVEC)}$ voor de PCR; $2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{-\Delta Ct(\text{samples obesen})} / 2^{-\Delta Ct(\text{samples gezonde})}$ voor de PCR-array. Bij een fold change groter dan 1, is er een upregulatie; indien kleiner dan 1, is er een downregulatie.

Elk verschil in genexpressie werd vervolgens omgezet in een waarde die de fold up- of downregulatie weergeeft. Indien de fold change kleiner is dan 1, dient men -1 te delen door de fold change. Een fold change \geq dan 2, daarentegen, blijft ongewijzigd.

Voor de genormaliseerde waarden die tussen -2 en 2 liggen, wordt het verschil in expressie als niet significant beschouwd. Alle waarden boven 2 zijn significante upregulaties, en deze onder -2 zijn significante downregulaties.

Enzyme-linked immunosorbent assay

Aan de hand van een ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) werd het leptinegehalte in de bloedbaan gemeten, opdat een hyperleptinemie bij de obese kinderen kon bevestigd worden. Hiervoor werden serumstalen gebruikt en gekozen voor Human leptin Quantikine ELISA kit 96 test/kit (R&D Systems Europe Ltd, DLPOO). Deze meting is gebaseerd op het kwantitatieve sandwich enzyme immunoassay principe. De 96-wellplaat was voorgecoat met specifieke monoclonale antilichamen die leptine binden. Het aanwezige leptine in de standaardoplossingen en in de serumstalen bindt met deze antilichamen. Al het ongebonden leptine werd vervolgens geweggewassen. Specifieke monoclonale antilichamen werden toegevoegd om te binden met het gebonden leptine. Na een tweede wasstap om alle ongebonden substanties te verwijderen, werd een substraatoplossing toegevoegd, waarbij een bepaalde kleur (blauwgroen) zichtbaar werd. De redoxreactie die optreedt werd stopgezet door het toevoegen van een stopsolutie (zwavelzuur). Hierdoor veranderde de kleur naar geel. De intensiteit van deze kleur correleerde aan de hoeveelheid gebonden leptine. De resultaten werden afgelezen bij een absorbantie van 450 nm.

Statistische analyses

De continue data werden voorgesteld als gemiddelde \pm SEM (standard error of mean). Met behulp van de Kolmogorov-Smirnov test werd er nagegaan of deze continue variabelen normaal verdeeld waren. De ongepaarde T-test/Mann Whitney-U test werd toegepast om significante verschillen van de continue variabelen aan te tonen respectievelijk tussen de 2 groepen (n=36)/2 kleinere groepen (n=17). De verdeling van meisjes en jongens werd in beide groepen beoordeeld op basis van de chi-square test. Bij een p-waarde kleiner dan 0,05 werden deze resultaten als statistisch significant beschouwd. Alle statistische analyses werden uitgevoerd met behulp van IBM SPSS Statistics for Windows (Versie 20.0, SPSS Inc., Chicago, IL, VS).

Resultaten

Deel 1: Technische studie

Bloedstalen van gezonde volwassenen

Real-time RT-PCR: bevestiging van de expressie van de leptinereceptor op circulerende angiogene cellen

Voor het aantonen van de expressie van de leptinereceptor op CAC's werd gebruik gemaakt van Real-time RT-PCR. HUVECellen werden gekozen als positieve controle, omdat hiervan in de literatuur is geweten dat de expressie van de leptinereceptor op deze cellen hoog is.

PBMC's werden van het bloed van gezonde volwassenen (buffy coat) geïsoleerd. Deze cellen samen met de HUVECellen werden op dag 0 in cultuur gebracht. Op dag 7 werden de CAC's en de HUVECellen geoogst. In tabel 3 worden de celconcentraties weergegeven respectievelijk op dag 0 en op dag 7. De HUVECellen werden bewaard in 1 vial en de geoogste CAC's werden in 8 vials bewaard voor RNA-extractie. 2 van de 8 stalen CAC's werden gebruikt om het RNA van deze cellen te isoleren (tabel 4).

Tabel 3. Het aantal cellen op dag 0 en dag 7

	Dag 0 - Celconcentratie (10^6 /ml)	Dag 7 - Celopbrengst (10^6 /ml)
Staal 1	28,8	6,5
Staal 2	28,8	6,5
HUVEC	0,250	2,5

Tabel 4. Het RNA-volume, concentratie, hoeveelheid en RIN-waarde

	RNA-volume (μ l)	RNA-concentratie (ng/ μ l)	RNA-hoeveelheid (ng)	RIN
Staal 1	27	130,30	3518,10	6,2
Staal 2	27	208,20	5621,40	5,9
HUVEC	27	1208,3	32624,10	N/A

Tabel 5. Resultaten Real-time RT-PCR: $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ en de fold change per staal en huishoudgen

Huishoudgen	β -actine		GAPDH	
	$2^{(-\Delta\Delta Ct)}$	Fold change	$2^{(-\Delta\Delta Ct)}$	Fold change
CAC 1	0,16	-6,23	0,28	-3,56
CAC 2	0,19	-5,28	0,47	-2,11
HUVEC	1,00		1,00	

$$\text{Fold change: } 2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{-\Delta Ct_{(CAC)}} / 2^{-\Delta Ct_{(HUVEC)}}$$

Het geëxtraheerd RNA werd vervolgens omgezet tot cDNA. Real-time RT-PCR werd uitgevoerd met β -actine en GAPDH als huishoudgenen. De $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ -waarden liggen lager dan 1 (tabel 5). Als gevolg hiervan wordt de fold change negatief. Bijvoorbeeld voor staal 1 zien we dat deze verhouding 0,16 is en dat de fold change -6,23. Er wordt aangenomen dat een fold change relevant is wanneer deze groter is dan 2. De berekeningen werden uitgevoerd volgens de $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ (Livak et al., 2001).

Bloedstalen van gezonde kinderen

Oppuntenstelling van kweekmethode

Tabel 6. Vijf controle kinderen: gemiddelde leeftijd, geslacht, bloedvolume, geïsoleerde en geogste cellen

	Gemiddelde ± SEM
<i>Leeftijd (jaar)</i>	14,20 ± 1,07
<i>Geslacht (M/V)</i>	1/4
<i>Bloedvolume (ml)</i>	11,80 ± 0,37
<i>Isolatie PBMC's (10⁶)</i>	16,59 ± 3,07
<i># CAC's na cultuur (10⁶)</i>	0,46 ± 0,14

Bij de 5 kinderen die ter controle kwamen op de raadpleging Pediatrie werd er gemiddeld 11,80 ml bloed (2 x kleine ACD-tubes) genomen. Na het isoleren van PBMC's werd er vastgesteld dat er gemiddeld geen volledige 6-wellplaat gevuld kon worden. Als gevolg hiervan lag het aantal geogste CAC's (tabel 6) aan de lage kant. Er dienden genoeg CAC's geogst te worden zodat nadien zowel RNA-extractie als Western blot konden uitgevoerd worden.

Oppuntenstelling RNA-extractie

Tabel 7. Vijf controle kinderen: gemiddelde RNA-volume, concentratie, opbrengst en RIN-waarde

	Gemiddelde ± SEM
<i>RNA-volume (µl)</i>	27 ± 0,002
<i>RNA-concentratie (ng/µl)</i>	86,94 ± 18,93
<i>RNA-opbrengst (ng)</i>	2347,38 ± 511,00
<i>RIN</i>	8,58 ± 0,37

Het RNA van de 5 controle kinderen werd geïsoleerd. Om de zuiverheid en de integriteit van het geëxtraheerd RNA na te gaan met behulp van de Agilent 2100 Bioanalyzer, wordt er aangeraden hiervoor RNA-stalen van minimaal 50 ng/µl te gebruiken; zoniet kan het voorkomen dat er geen RIN-waarde wordt geregistreerd.

De RNA-opbrengst ligt ook gunstig hoog, wat noodzakelijk is omdat er gewerkt wordt met 500 ng RNA om een Real-time RT-PCR en PCR-array uit te voeren. Zoals eerder aangehaald geeft een RIN-waarde meer informatie over de graad van degradatie van het RNA. In tabel 7 wordt een gemiddelde RIN-waarde van 8,58 weergegeven wat groter is dan 7 en geassocieerd mag worden met kwalitatief goed RNA.

Deel 2: Obese versus gezonde, niet obese kinderen

Tabel 8. Antropometrische gegevens van de 2 groepen

	Obesen (n=16)	Gezonde, niet obese (n=20)	P-waarde
<i>Leeftijd (jaar)</i>	15,08 ± 0,31	15,51 ± 0,33	0,372
<i>Geslacht (M/V)</i>	3/13	7/13	0,456
<i>Leptine (ng/ml)</i>	61,27 ± 8,91	11,12 ± 2,45	0,0001
<i>Gewicht (kg)</i>	102,53 ± 5,47	52,73 ± 2,03	0,0001
<i>BMI (kg/m²)</i>	35,86 ± 1,68	18,98 ± 0,50	0,0001
<i>BMI Z-score</i>	2,66 ± 0,16	-0,64 ± 0,20	0,0001
<i>Vetpercentage (%)</i>	47,95 ± 3,05	17,49 ± 1,60	0,0001
<i>Bloedvolume (ml)</i>	21,19 ± 0,40	21,95 ± 0,81	0,406
<i>Isolatie PBMC's (10⁶)</i>	34,04 ± 2,55	26,32 ± 2,43	0,036
<i># CAC's na cultuur (10⁶)</i>	1,20 ± 0,09	0,95 ± 0,01	0,023
<i>Verhouding CAC's/PBMC's (%)</i>	3,53	3,61	0,752

De p-waarden werden berekend met behulp van de ongepaarde t-test voor de continue variabelen en met behulp van de chi-square voor de verdeling van het geslacht in beide groepen; significantie bij <0,05

Beide studiepopulaties (tabel 8) hebben een gemiddelde leeftijd van ongeveer 15 jaar, waarbij het aantal meisjes duidelijk hoger ligt dan het aantal jongens. De verdeling van meisjes en jongens bij beide groepen is echter vergelijkbaar. Voor de technische studie werden er slechts 2 kleine ACD-tubes bloed afgenomen, waardoor de celopbrengst niet gunstig hoog lag. Zowel voor de obese als voor de gezonde, niet obese werden er daarom 3 kleine ACD-tubes bloed afgenomen. Tabel 8 toont een gemiddelde bloedvolume rond de 21-22 ml voor beide groepen. Eveneens is er een duidelijke stijging te zien in het aantal geïsoleerde en geogste cellen. Dit was te verwachten aangezien er gemiddeld meer bloed werd afgenomen.

Wat er ook duidelijk opvalt is het statistisch significant verschil in het leptinegehalte tussen de obese en de gezonde, niet obese. Ook het gewicht, BMI en het vetpercentage zijn statistisch significant verschillend tussen deze 2 groepen.

Tabel 9. De 2 volledige groepen: gemiddeld RNA-volume, concentratie, opbrengst en RIN-waarde

	Obesen (n=16)	Gezonde, niet obese (n=20)	P-waarde
<i>RNA-volume (μl)</i>	27 ± 0,002	27 ± 0,002	N/A
<i>RNA-concentratie (ng/μl)</i>	103,35 ± 13,55	103,51 ± 12,04	0,993
<i>RNA-opbrengst (ng)</i>	2790,43 ± 365,69	2794,77 ± 325,11	0,993
<i>RIN</i>	6,81 ± 0,25	6,94 ± 0,19	0,700

De p-waarden werden berekend met behulp van de ongepaarde t-test; significantie bij <0,05

Bij het vergelijken van de 2 groepen (tabel 9) wordt er een gemiddelde RIN-waarde berekend juist onder de 7. Zoals eerder reeds werd aangehaald is er een voorkeur voor een RIN-waarde van 7 of hoger, wil men betrouwbare resultaten verkrijgen na het uitvoeren van een Real-time RT-PCR-array. De RNA-opbrengst van sommige stalen waren te laag om de cDNA-synthese uit te voeren met 500 ng

RNA. Omwille van deze 2 redenen, werden de stalen (tabel 10) met een RIN-waarde van 7 of hoger en een gunstige hoeveelheid RNA gekozen om hiermee verder te werken.

Tabel 10. Antropometrische gegevens van de 2 kleine groepen

	Obesen (n=7)	Gezonde, niet obesen (n=10)	P-waarde
<i>Leeftijd (jaar)</i>	14,79 ± 0,98	14,66 ± 1,51	0,740
<i>Geslacht (M/V)</i>	2/5	2/8	1,000
<i>Leptine (ng/ml)</i>	62,32 ± 19,59	15,67 ± 4,12	0,025
<i>Gewicht (kg)</i>	103,58 ± 18,70	50,20 ± 10,90	0,0001
<i>BMI (kg/m²)</i>	36,27 ± 7,12	19,05 ± 2,66	0,0001
<i>BMI Z-score</i>	2,70 ± 0,66	-0,43 ± 0,95	0,0001
<i>Vetpercentage (%)</i>	45,66 ± 12,86	20,30 ± 6,65	0,0001
<i>Bloedvolume (ml)</i>	21,86 ± 2,04	22,20 ± 4,05	0,813
<i>Isolatie PBMC's (10⁶)</i>	33,48 ± 9,44	27,50 ± 8,06	0,161
<i># CAC's na cultuur (10⁶)</i>	1,33 ± 0,53	0,95 ± 0,25	0,133
<i>Verhouding CAC's/PBMC's (%)</i>	4,22 ± 1,64	3,78 ± 1,21	0,601

De p-waarden werden berekend met behulp van de Mann Whitney-U test voor de continue variabelen en met behulp van de chi-square voor de verdeling van het geslacht in beide groepen; significantie bij <0,05

Tabel 11. Obesen (n=7) versus gezonde, niet obesen (n=10): gemiddeld RNA-volume, concentratie, opbrengst en RIN-waarde

	Obesen (n=7)	Gezonde, niet obesen (n=10)	P-waarde
<i>RNA-volume (μl)</i>	27 ± 0,002	27 ± 0,002	N/A
<i>RNA-concentratie (ng/μl)</i>	113,04 ± 18,04	136,76 ± 17,78	0,536
<i>RNA-opbrengst (ng)</i>	3052,12 ± 487,12	3692,52 ± 479,95	0,536
<i>RIN</i>	7,36 ± 0,13	7,47 ± 0,15	0,740

De p-waarden werden berekend met behulp van de Mann Whitney-U test; significantie bij <0,05

Tabel 11 toont gemiddeld een hogere RNA-opbrengst en een hogere RIN-waarde. Hiervoor werden er 7 van de 16 stalen van de obese kinderen en 10 van de 20 van de gezonde, niet obesen gekozen.

Real-time RT-PCR-array

Tabel 12. Onderzochte genen van de JAK/STAT-pathway met een up- (>2) of down (<2) regulatie

mRNA	Proteïne	Fold change	Fold up- of downregulation
SH2B2	SH2B adaptor protein 2	9,36	9,36
SOCS4	Suppressor of cytokine signaling 4	0,32	-3,10
NOS2	Stikstofoxide synthase 2	53,71	53,71
CCND1	Cycline D1	4,83	4,83
F2	Trombine	4,04	4,04
IL-20	Interleukine 20	19,96	19,96
MMP3	Matrix metalloproteïnase 3	15,91	15,91
PDGFR α	Platelet derived growth factor receptor α	4,31	4,31
FCeR1 α	Ig-E receptor 1 α	0,27	-3,67
GHR	Groeihormoonreceptor	0,14	-7,07

Fold change: $2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{-\Delta Ct_{(samples\ obese)}} / 2^{-\Delta Ct_{(samples\ gezonde)}}$; Fold regulation: >1 (upregulatie), <1 (downregulatie)

De expressie van 84 genen van de JAK/STAT-pathway werd onderzocht. Deze die een significante up- of downregulatie (respectievelijk >2 en <2) vertoonden, staan vermeld in tabel 12. Het verschil in expressie tussen de 2 groepen weergegeven door de fold change en de fold up- of downregulatie zijn ook weergegeven in tabel 12. Het mRNA van deze met een significante up- of downregulatie zijn respectievelijk weergegeven in het groen en in het rood. SOCS4, FCER1 α en GHR vertonen een downregulatie in de CAC's van de obese kinderen. Hiertegenover is de expressie van SH2B2, NOS2, F2, IL-20, MMP3 en PDGFR α in de CAC's van de obese kinderen verhoogd.

Tabel 13. Specifiek onderzochte genen van de JAK/STAT-pathway zonder relevante up- of downregulatie

mRNA	Proteïne	Fold change	Fold up- of downregulation
SH2B1	SH2B adaptor protein 1	0,63	-1,60
PTP-1B	Proteïne tyrosine fosfatase 1B	0,69	-1,46
JAK2	Janus kinase 2	0,78	-1,29
SOCS3	Suppressor of cytokine signaling 3	0,83	-1,20

Fold change: $2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{-\Delta Ct_{(samples\ obese)}} / 2^{-\Delta Ct_{(samples\ gezonde)}}$; Fold regulation: >1 (upregulatie), <1 (downregulatie)

Tabel 13 geeft een aantal van de onderzochte factoren weer die geen relevant verschil tonen in expressie tussen de 2 groepen kinderen. Deze worden verder besproken in de discussie.

Discussie

Hyperleptinemie en de JAK/STAT-pathway

Obese kinderen hebben duidelijk een hoger leptinegehalte dan gezonde, niet obese kinderen. Deze hyperleptinemie wordt toegeschreven aan het feit dat obesen een grotere hoeveelheid vetweefsel hebben. Leptine heeft enerzijds pro-angiogene effecten, waarbij men zou verwachten dat deze effecten bij obesen door het hoger leptinegehalte zeker tot uiting zouden komen. Zowel hypothalamuscellen als CAC's vertonen een leptineresistentie. Bij het binden van leptine op de leptinereceptor wordt de JAK/STAT-pathway geactiveerd. De JAK/STAT-pathway vindt men terug in signaalcascades downstream van veel cytokines; deze pathway speelt een belangrijke rol in een aantal belangrijke biologische reacties zoals immuniteit, inflammatie, celgroei, celdifferentiatie en hematopoëse (Cooney, 2002). De leptine-pathway gemedieerd door JAK/STAT wordt bij obesen echter door een aantal factoren geblokkeerd. Deze factoren (PTP-1B en SOCS3) vertonen volgens Heida et al. een upregulatie in de CAC's van obese volwassenen (Heida et al., 2010).

Inhibitie van de JAK/STAT-pathway

SH2B2

Een eerste factor van de JAK/STAT-pathway die onderzocht werd en die een upregulatie vertoonde bij de obese kinderen is SH2B2. Dit proteïne kan binden met JAK2 en met SH2B1. Deze laatste beïnvloedt de JAK/STAT-pathway op een positieve manier door te binden met JAK2 en de activatie hiervan te bevorderen. SH2B1 vertoont echter geen relevant verschil in expressie tussen de obese en de gezonde, niet obese kinderen. Wanneer SH2B2 met SH2B1 bindt, wordt SH2B1 verhinderd. JAK2 kan ook rechstreeks geblokkeerd worden wanneer deze een binding aangaat met SH2B2 (Li et al., 2007). Dit suggereert dat SH2B2 zou kunnen bijdragen aan een mogelijke leptineresistentie in CAC's van obese kinderen.

PTP-1B

Het is geweten dat een hyperleptinemie, zoals men deze terugvindt bij obese volwassenen, gepaard gaat met een verhoogd gehalte aan PTP-1B dat fungeert als een inhibitor van de JAK/STAT-pathway. PTP-1B treedt op door JAK2 te defosforyleren, waardoor de functie van dit kinase verhinderd wordt. PTP-1B treedt in fysiologische omstandigheden op als een negatief feedback mechanisme (Cheng et al., 2002). De expressie van deze factor wordt met andere woorden positief beïnvloed door leptine. Een overexpressie van PTP-1B vindt men echter zowel terug in de cellen van de hypothalamus als in CAC's van obese volwassenen. Blokkering van de JAK/STAT-pathway downstream van leptine resulteert in verzwakking van het pro-angiogeen effect van leptine op CAC's. In de literatuur wordt beschreven dat deze factor kan bijdragen tot leptineresistentie, zowel ter hoogte van de hypothalamus (Bence et al., 2006) als in CAC's (Heida et al., 2010; Iwasaki et al., 2010). PTP-1B vertoont echter tussen de obese en de gezonde, niet obese kinderen geen relevant verschil in fold change. Ook voor JAK2 werd er geen relevant verschil gevonden tussen de 2 groepen. Activatie van JAK2 kan echter niet beoordeeld worden, dit dient gekwantificeerd te worden door de gefosforyleerde en de niet-gefosforyleerde vorm van het eiwit JAK2 te bepalen met behulp van Western blot.

SOCS-3

Nog een merkwaardig verschil met wat er reeds in de literatuur is beschreven, is dat onze bevindingen suggereren dat er geen relevant verschil heerst in de expressie van SOCS-3 tussen de 2 groepen kinderen. Het is namelijk geweten dat deze factor eveneens zoals PTP-1B optreedt als een

inhibitor van de JAK/STAT-pathway en dus ook een overexpressie vertoont bij obese volwassenen. Deze inhibitie kan bewerkstelligd worden doordat SOCS-3 een binding aangaat met JAK2 of met de leptinereceptor. De expressie van SOCS-3 wordt gestimuleerd door leptine zelf. Deze factor dient met andere woorden, net zoals PTP-1B, als een negatief feedback mechanisme om een overactivatie van de JAK/STAT-pathway downstream van de leptinereceptor te voorkomen (Iwasaki et al., 2010).

SOCS-4

SOCS-4 of CIS7 behoort eveneens tot de groep van de suppressors of the cytokine signaling. SOCS-4 vertoont bij de obese kinderen een verminderde expressie. Behalve Tan et al. is er weinig geweten welke cytokines de expressie van deze factor beïnvloeden, alsook wat de functie is van SOCS-4. Deze factor inhibeert volgens Tan et al. wel een aantal pro-inflammatoire cytokines waaronder IL-4 en IL-6 (Tan et al., 2005).

Proliferatie, differentiatie en migratie van circulerende angiogene cellen

NOS2

NOS2 codeert voor stikstofoxide synthase 2 of induceerbaar stikstofoxide synthase en is een enzyme dat de productie van NO katalyseert (Alderton et al., 2001). iNOS is induceerbaar en is dus niet continu aanwezig. De productie van dit enzyme ondermeer ook door neutrofielen en macrofagen, wordt geïnduceerd door inflammatie. Afhankelijk van de verhouding iNOS/endotheel stikstofoxide synthase (eNOS) wordt er bepaald of het geproduceerde NO eerder gunstige of negatieve effecten zal hebben op het endotheel (Naseem, 2005; Umar en van der Laarse, 2010; Jenkins et al., 2011). iNOS katalyseert de vorming van NO en een grote hoeveelheid aan NO kan reageren met zuurstofradicalen in een aflopende reactie met als product peroxy-nitriet (Thomas et al., 2008) dat zelf de expressie van iNOS bevordert en deze van eNOS vermindert. Peroxy-nitriet is een merker voor oxidatieve stress en een hoog gehalte gaat gepaard met endotheeldisfunctie (Cooke en Davidge, 2002). De expressie van NOS2 ligt bij de obese kinderen hoger dan bij de gezonde, niet obese kinderen. Deze verhoogde expressie wordt geassocieerd met een verhoogde oxidatieve stress in CAC's, waardoor deze cellen hoogstwaarschijnlijk hun functie niet optimaal kunnen uitvoeren. Volgens Heiss et al., heeft NO nog andere effecten op CAC's. NO blijkt een invloed te hebben op de motiliteit en dus op de migratie van CAC's naar chemokines (Heiss et al., 2010). Dit is interessant aangezien cardiovasculaire risicofactoren (hypercholesterolemie, T2DM en hypertensie) de NO-productie negatief beïnvloeden (Heiss et al., 2006). Deze bevindingen suggereren dat een verstoorde migratie van CAC's toegeschreven kan worden aan een verminderde NO-productie door een lager eNOS-gehalte.

CCND1

Er bestaat een correlatie tussen het aantal CAC's in de bloedbaan en de aanwezigheid van cardiovasculaire risicofactoren. Het aantal CAC's is lager bij patiënten die een groter risico hebben om cardiovasculaire aandoeningen te ontwikkelen. Obesen hebben effectief, onder andere door hun pro-inflammatoire status, een verhoogd risico op dergelijke ziekten. Men zou dus verwachten (Vasa et al., 2001; Heida et al., 2010) dat het aantal CAC's bij de obese kinderen lager zou liggen dan bij de gezonde, niet obese kinderen. Van de 84 onderzochte factoren van de JAK/STAT-pathway is er 1 die de celcyclus regelt en dus mogelijks enige verduidelijking zou kunnen geven omtrent de mate waarin CAC's van de obese kinderen delen. Het mRNA (CCND1) voor cycline D1 vertoont een upregulatie in CAC's van de obese kinderen. Cycline D1 is een activator van de celcyclus. Het komt voor in de celkern wanneer de celcyclus start (G₁-fase) en het verdwijnt weer wanneer de cellen in de S-fase komen. Deze vermindering in cycline D1 is wel noodzakelijk, anders kunnen cellen niet doorgaan naar de S-fase en kan met andere woorden de celcyclus niet voortgezet worden. Een verhoogde

expressie van CCND1 in CAC's is reeds beschreven geweest in de literatuur en komt tot stand doordat STAT5 en peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) samen als transcriptioneel complex de expressie van cycline D1 induceert (Dentelli et al., 2009). Hierop gebaseerd zou cycline D1 een positieve invloed kunnen hebben op de celdeling van CAC's, hoewel deze cellen een verminderd proliferatief vermogen hebben vergeleken met EOC's (Yoon et al., 2005; Heida et al., 2010). Behalve een functie in de celcyclus blijkt cycline D1 de JAK/STAT-pathway ook te inhiberen door te binden met STAT3. Zoals eerder aangehaald is CCND1 upgereguleerd in CAC's van obese adolescenten. Dit was een zeer opmerkelijke bevinding, aangezien leptineresistentie in CAC's van obese adolescenten nu ook toegeschreven kan worden aan een verhoogde expressie van cycline D1 in deze cellen (Bienvenu et al., 2001).

F2

Naast de vorming van fibrine en de activatie van bloedplaatjes, speelt trombine ook een rol in de angiogenese. Trombine heeft een effect op CAC's door te binden met protease activated receptor (PAR)-1. Trombine heeft zowel een invloed op de differentiatie, migratie als op de proliferatie van CAC's (Tarzami et al., 2006). Volgens Witkowsky et al. heeft trombine een impact op de expressie van een aantal genen in CAC's die een rol spelen in celdifferentiatie en celproliferatie. CCND1 en CCNA2, die respectievelijk coderen voor cycline D1 en cycline A2, worden door trombine upgereguleerd. Beiden factoren zijn van belang voor de celcyclus. Hiertegenover staat p27, een inhibitor van de celcyclus, waarvan de expressie onderdrukt wordt door trombine (Witkowsky et al., 2011). Trombine wordt zelf gecodeerd door F2 en de expressie hiervan in CAC's ligt bij de obese kinderen hoger dan bij de gezonde, niet obese kinderen. Deze bevindingen komen overeen met de verhoogde expressie van CCND1 in de CAC's van de obese kinderen, maar komen niet overeen met wat er in de literatuur wordt beschreven, namelijk dat cardiovasculaire risicofactoren (zoals obesitas) een negatief effect hebben op het aantal CAC's.

Factoren met ongekende functie in circulerende angiogene cellen

GHR

Volgens Fleissner en Thum heeft het groeihormoon (GH) een positieve invloed op de expressie van eNOS in endotheelcellen en in EOC's. Het gevormde NO bevordert de migratie van EOC's naar beschadigd endotheel (Fleissner en Thum, 2011). Anderzijds suggereren Thum et al. dat GH ook via insulin-like growth factor (IGF)-1 een bevorderend effect heeft op het aantal EOC's; eveneens door eNOS-expressie te verhogen. Volgens hen kan GH door het IGH-1-gehalte te verhogen, EOC's die niet meer optimaal hun functie kunnen uitvoeren, weer "herstellen" (Thum et al., 2003; Thum et al., 2007). De rechtstreekse effecten van GH op EOC's treden op door de binding van GH op de GH-receptor (GHR). De effecten van GH worden ook gemedieerd via de JAK/STAT-pathway, waarbij SOCS en fosfatasen als inhibitoren van deze pathway, de effecten van GH op EOC's regelen (Herrington en Carter-Su, 2001). Er is echter weinig geweten over de expressie van GHR op CAC's en wat voor effecten GH zou hebben op deze cellen. De expressie van het mRNA voor GHR in CAC's ligt bij de obese kinderen lager dan bij de gezonde, niet obese kinderen.

MMP3

MMP (matrix metalloproteïnase)³ behoort tot de groep van zink-bevattende endopeptidasen. MMP's staan in voor de afbraak van de extracellulaire matrix (ECM). MMP9 bijvoorbeeld vergemakkelijkt op deze manier de vrijstelling van EOC's vanuit het beenmerg in de bloedbaan (Ahn en Brown, 2008). Zo zou MMP3 de migratie en adhesie van EOC's eveneens kunnen bevorderen. MMP3 vertoont in CAC's van de obese kinderen een upregulatie vergeleken met de gezonde, niet

obese kinderen. Naast de rol van MMP3 in tumormetastasering, angiogenese, wondherstel en atherosclerose, is er in de literatuur niets geweten over mogelijke effecten van MMP3 op CAC's.

FCεR1α

FCεR1α is de receptor die bindt met Ig-E. Het mRNA voor deze receptor is in CAC's van de obese kinderen downgereguleerd. Ig-E speelt een belangrijke rol in allergische reacties en in de afweer tegen parasieten. Verder is het niet geweten wat de rol is van deze receptor in CAC's.

PDGFRα

Platelet-derived growth factor receptor bevindt zich op de celmembraan van talrijke cellen (bindweefselcellen, endotheelcellen en neuronen) en bindt met PDGF. Deze groeifactor regelt celgroei en celdeling ondermeer tijdens angiogenese. Deze receptor zou met andere woorden de proliferatie van CAC's kunnen beïnvloeden, maar daarover is er in de literatuur nog niets van geweten. Uit de resultaten is gebleken dat PDGFRα een downregulatie vertoont in CAC's van de obese kinderen en dit zou kunnen betekenen dat PDGFRα een negatief effect zou hebben op de proliferatie van CAC's.

IL-20

IL-20 is gekend als een pro-inflammatoir cytokine. Volgens Tritsaris et al. zou IL-20 de migratie van EOC's kunnen beïnvloeden en zou op deze manier kunnen fungeren als een pro-angiogeen cytokine. Hun resultaten tonen ook aan dat IL-20 een aantal pathways activeert die te maken hebben met angiogenese. Deze pathways worden gemedieerd door JAK2/STAT5 (Tritsaris et al., 2007). IL-20 is in CAC's van de obese kinderen upgereguleerd. Gebaseerd op voorgaande zou men kunnen speculeren dat IL-20 een positief effect zou kunnen hebben op CAC's, maar verder kan er geen concrete verklaring worden gegeven voor de verhoogde expressie van dit cytokine. Behalve deze bevindingen, is het nog niet gekend welke invloed dit cytokine heeft op CAC's.

Conclusie

Obese kinderen hebben effectief te maken met een hyperleptinemie. De leptineresistentie in CAC's van obese volwassenen werd door Heida et al. deels toegeschreven aan de overexpressie van een aantal inhibitoren (PTP-1B, SOCS-3) van de JAK/STAT-pathway. Deze factoren vertonen tegen de verwachting in geen verschil in expressie tussen de obese en de gezonde, niet obese kinderen. PTP-1B en SOCS-3 zijn immers wel upgereguleerd in CAC's van obese volwassenen (Heida et al., 2010). Hiertegenover is de expressie van SH2B2 als inhibitor wel relevant verschillend tussen de 2 groepen kinderen. Deze factor zou eventueel kunnen bijdragen aan de leptineresistentie in CAC's van obese kinderen. De verhoogde expressie van iNOS leidt tot een verhoogde oxidatieve stress en een aantasting van de motiliteit van CAC's. Opmerkelijk was cycline D1, want deze blijkt de JAK/STAT-pathway ook te inhiberen door te binden met STAT3. Dit wordt nog eens bevestigd door de verhoogde fold change van trombine bij de obese kinderen. Deze bevindingen suggereren dat in CAC's van de obese kinderen niet alle spelende factoren die geacht worden een negatief effect te hebben op CAC's, effectief meedoen. Hier is het weliswaar enkel op mRNA-niveau onderzocht geweest. Aan de hand van een Western blot zouden deze resultaten al dan niet bevestigd kunnen worden. Ook werden de effecten van deze factoren op CAC's niet uitgetest. Verder onderzoek is dus zeker noodzakelijk om uitsluitsel te kunnen geven over de mogelijke bijdrage van deze factoren aan de verstoorde functie van CAC's vastgesteld bij obesen.

Samenvatting

Obesitas vormt een zeer groot gezondheidsprobleem, waarvan de prevalentie bij kinderen ook zeer hoog ligt. Obesitas wordt gekenmerkt door een onbalans tussen de voedingsinname en het energieverbruik, wat resulteert in een te grote hoeveelheid vetweefsel. De oorzaken die hier aan de basis liggen zijn in zekere mate met elkaar verbonden. Deze zijn onder meer genetische en biologische factoren, levensstijl en familiale voorgeschiedenis.

Belangrijk hierbij is dat obesitas geassocieerd is met een verhoogd risico op cardiovasculaire aandoeningen en een pro-inflammatoire status. Veel van de met obesitas verbonden comorbiditeiten leveren een rechtstreekse bijdrage tot endotheelschade met als resultaat endotheeldisfunctie wat een eerste stap is in de ontwikkeling van atherosclerose. Obesitas op jonge leeftijd gaat gepaard met een verhoogd risico op cardiovasculaire ziekten, waarbij er reeds endotheelschade optreedt. Deze endotheeldisfunctie is zowel afhankelijk van de hoeveelheid schade als van de mate van mogelijk herstel.

Het endotheelherstel wordt naast de mature endotheelcellen, eveneens in stand gehouden door endothelial outgrowth cells (EOC) die afkomstig zijn van het beenmerg en na stimulatie vrijgesteld worden in de bloedbaan. De early endotheel progenitorcellen (EPC) of circulerende angiogene cellen (CAC) spelen ook een rol in het endotheelherstel; deze cellen oefenen namelijk een paracrine functie uit waarbij zowel mature endotheelcellen als EOC's gestimuleerd worden in hun rol in het endotheelherstel. Uit de literatuur blijkt dat het endotheelherstel gemedieerd door dergelijke cellen negatief beïnvloed wordt bij patiënten met cardiovasculaire risicofactoren, onder meer bij obesen.

Een mogelijke link tussen obesitas en cardiovasculaire ziekten is leptine. Dit is een adipocytokine dat vrijgesteld wordt in de bloedbaan door adipocyten. Leptine oefent zowel pro-angiogene als pro-atherogene effecten uit op het endotheel. Leptine beïnvloedt de functie van CAC's door ondermeer hun migratie naar het endotheel te bevorderen.

Het is al geweten dat obese volwassenen en kinderen te maken hebben met een hyperleptinemie en een leptineresistentie ter hoogte van de hypothalamus. Deze hyperleptinemie gaat gepaard met een aantal pro-atherogene effecten gemedieerd door leptine. Deze effecten zorgen ervoor dat de pro-inflammatoire status vastgesteld bij obesen worden onderhouden met endotheeldisfunctie als gevolg.

Het doel van deze thesis was om bij obese kinderen een mogelijke leptineresistentie in CAC's na te gaan. De factoren, betrokken in de JAK/STAT-pathway, die het pro-angiogeen effect van leptine mediëren werden onderzocht. Er werd effectief een hyperleptinemie vastgesteld bij de obese kinderen. De resultaten van de Real-time RT-PCR-array suggereren dat er een verschil bestaat tussen obese kinderen en obese volwassenen qua mechanisme dat mogelijk verantwoordelijk is voor de leptineresistentie in CAC's.

Referenties

- Ahn, G.O., Brown, J.M. (2008) Matrix metalloproteinase-9 is required for tumor vasculogenesis but not for angiogenesis: role of bone marrow-derived myelomonocytic cells. *Cancer Cell*. 13, 193-205
- Aoki, N., Yokoyama, R., Asai, N., Ohki, M., Ohki, Y., Kusubata, K., Heissig, B., Hattori, K., Nakagawa, Y., Matsuda, T. (2010) Adipocyte-derived microvesicles are associated with multiple angiogenic factors and induce angiogenesis in vivo and in vitro. *Endocrinology* 151, 2567-2576
- Alderton, W.K., Cooper, C.E., Knowles, R.G. (2001) Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J*. 357, 593-615
- Asahara, T., Masuda, H., Takahashi, T., Kalka, C., Pastore, C., Silver, M., Kearne, M., Magner, M., Isner, J.M. (1999) Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res*. 85, 221-228
- Asahara T., Murohara T., Sullivan A., Silver M., van der Zee R., Li T., Witzenbichler B., Schatteman G., Isner J.M. (1997) Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 275, 964-967
- Biennvenu, F., Gascan, H., Coqueret, O. (2001) *J. Biol. Chem.* 276, 16840-16847
- Bays, H.E. (2011) Adiposopathy. *J. Am. Coll. Cardiol.* 57, 2461-2473
- Bence, K.K., Delibegovic, M., Xue, B., Gorgun, C.Z., Hotamisligil, G.S., Neel, B.G., Kahn, B.B. (2006) Neuronal PTP1B regulates body weight, adiposity and leptin action. *Nat Med*. 12, 917-924
- Berg, A.H., Scherer, P.E. (2005) Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease. *Circ Res*. 96, 939-949
- Biro, F.M., Wien, M. (2010) Childhood obesity and adult morbidities. *Am. J. Clin. Nutr.* 91, 1499S-1505S
- Brug, J., van Stralen, M.M., Te Velde, S.J., Chinapaw, M.J., De Bourdeaudhuij, I., Lien, N., Bere, E., Maskini, V., Singh, A.S., Maes, L., Moreno, L., Jan, N., Kovacs, E., Lobstein, T., Manios, Y. (2012) Differences in Weight Status and Energy-Balance Related Behaviors among Schoolchildren across Europe: The ENERGY-Project. *PLoS One* 7, e34742
- Buxton, J.L., Walters, R.G., Visvikis-Siest, S., Meyre, D., Froguel, P., Blakemore, A.I. (2011) Childhood obesity is associated with shorter leukocyte telomere length. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 96, 1500-1505
- Cassidy, A.E., Bielak, L.F., Zhou, Y., Sheedy, P.F., Turner, S.T., Breen, J.F., Araoz, P.A., Kullo, I.J., Lin, X., Peyser, P.A. (2005) Progression of subclinical coronary atherosclerosis: does obesity make a difference? *Circulation* 111, 1877-1882
- Celermajer, D.S., Ayer, J.G. (2006) Childhood risk factors for adult cardiovascular disease and primary prevention in childhood. *Heart* 92, 1701-1706

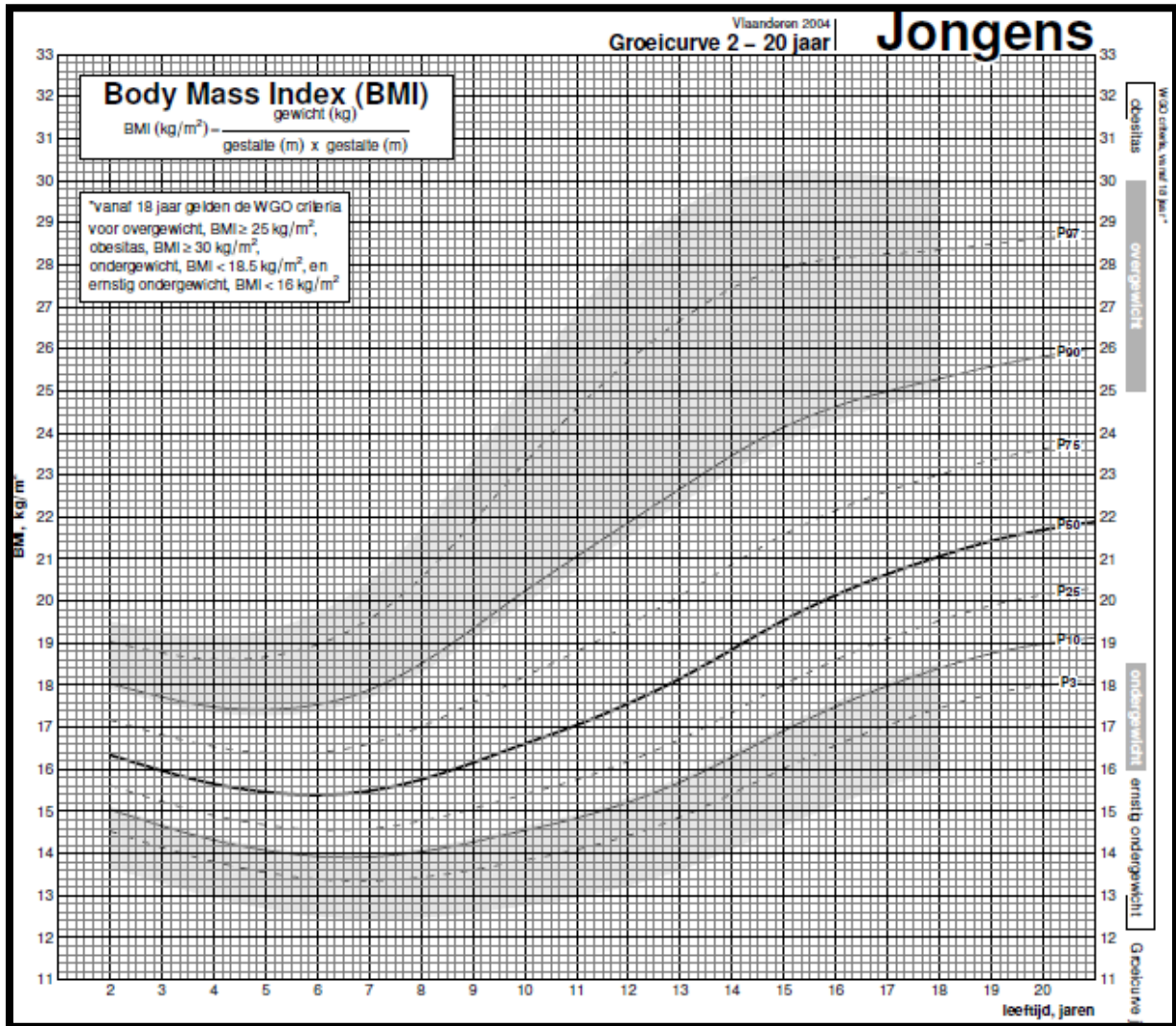
- Cheng, A., Uetani, N., Simoncic, P.D., Chaubey, V.P., Lee-Loy, A., McGlade, C.J., Kennedy, B.P., Tremblay, M.L. (2002) Attenuation of leptin action and regulation of obesity by protein tyrosine phosphatase 1B. *Dev Cell.* 2, 497-503
- Cooke, C.L., Davidge, S.T. (2002) Peroxynitrite increases iNOS through NF-kappaB and decreases prostacyclin synthase in endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 282, C395-402
- Cooney, R.N. (2002) Suppressors of cytokine signaling (SOCS): inhibitors of the JAK/STAT pathway. *Shock* 17, 83-90
- Deanfield, J.E., Halcox, J.P., Rabelink, T.J. (2007) Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance. *Circulation* 115, 1285-1295
- Dentelli, P., Trombetta, A., Togliatto, G., Zeoli, A., Rosso, A., Uberti, B., Orso, F., Taverna, D., Pegoraro, L., Brizzi, M.F. (2009) Formation of STAT5/PPARgamma transcriptional complex modulates angiogenic cell bioavailability in diabetes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 29, 114-120
- Enriori, P.J., Evans, A.E., Sinnayah, P., Jobst, E.E., Tonelli-Lemos, L., Billes, S.K., Glavas, M.M., Grayson, B.E., Perello, M., Nilni, E.A., Grove, K.L., Cowley, M.A. (2007) Diet-induced obesity causes severe but reversible leptin resistance in arcuate melanocortin neurons. *Cell. Metab.* 5, 181-194
- Fisher, E.A. (2010) Focus on Obesity. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 30, 135
- Fleissner, F., Thum, T. (2011) Critical role of the nitric oxide/reactive oxygen species balance in endothelial progenitor dysfunction. *Antioxid Redox Signal.* 15, 933-948
- Giannotti G., Doerries, C., Mocharla, P.S., Mueller, M.F., Bahlmann, F.H., Horvath T., Jiang, H., Sorrentino, S.A., Steenken, N., Manes, C., Marzilli, M., Rudolph, K.L., Lüscher, T.F., Drexler, H., Landmesser, U. (2010) Impaired Endothelial Repair Capacity of Early Endothelial Progenitor Cells in Prehypertension - Relation to Endothelial Dysfunction. *Hypertension* 55, 1389-1379
- Glavas, M.M., Kirigiti, M.A., Xiao, X.Q., Enriori, P.J., Fisher, S.K., Evans, A.E., Grayson, B.E., Cowley, M.A., Smith, M.S., Grove, K.L. (2010) Early overnutrition results in early-onset arcuate leptin resistance and increased sensitivity to high-fat diet. *Endocrinology* 151, 1598-1610
- Heida, N-M., Müller, J.-P., Cheng, I.-F., Leifheit-Nestler, M., Faustin, V., Riggert, J., Hasenfuss, G., Konstantinides, S., Schäfer, K. (2010) Effects of Obesity and Weight Loss on the Functional Properties of Early Outgrowth Endothelial Progenitor Cells. *J. Am. Coll. Cardiol.* 55, 357-367
- Heida, N.M., Leifheit-Nestler, M., Schroeter, M.R., Müller, J.P., Cheng, I.F., Henkel, S., Limbourg, A., Limbourg, F.P., Alves, F., Quigley, J.P., Ruggeri, Z.M., Hasenfuss, G., Konstantinides, S., Schäfer, K. (2010) Leptin enhances the potency of circulating angiogenic cells via src kinase and integrin (alpha)vbeta5: implications for angiogenesis in human obesity. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 30, 200-206
- Heiss, C., Lauer, T., Dejam, A., Kleinbongard, P., Hamada, S., Rassaf, T., Matern, S., Feelisch, M., Kelm, M. (2006) Plasma nitroso compounds are decreased in patients with endothelial dysfunction. *J Am Coll Cardiol.* 47, 573-579

- Heiss, C., Schanz, A., Amabile, N., Jahn, S., Chen, Q., Wong, M.L., Rassaf, T., Heinen, Y., Cortese-Krott, M., Grossman, W., Yeghiazarians, Y., Springer, M.L. (2010) Nitric oxide synthase expression and functional response to nitric oxide are both important modulators of circulating angiogenic cell response to angiogenic stimuli. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 30, 2212-2218
- Herrington, J., Carter-Su, C. (2001) Signaling pathways activated by the growth hormone receptor. *Trends Endocrinol Metab.* 12, 252-257
- Hirschi, K.K., Ingram, D.A., Yoder, M.C. (2008) Assessing identity, phenotype, and fate of endothelial progenitor cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 28, 1584-1595
- Iwasaki, H., Kovacic, J.C., Olive, M., Beers, J.K., Yoshimoto, T., Crook, M.F., Tonelli, L.H., Nabel, E.G. (2010) Disruption of protein arginine N-methyltransferase 2 regulates leptin signaling and produces leanness in vivo through loss of STAT3 methylation. *Circ. Res.* 107, 992-1001
- Jenkins, N.T., Landers, R.Q., Prior, S.J., Soni, N., Spangenburg, E.E., Hagberg, J.M. (2011) Effects of acute and chronic endurance exercise on intracellular nitric oxide and superoxide in circulating CD34⁺ and CD34⁻ cells. *J Appl Physiol.* 111, 929-937
- Juonala, M., Juhola, J., Magnussen, C.G., Würtz, P., Viikari, J.S., Thomson, R., Seppälä, I., Hernesniemi, J., Kähönen, M., Lehtimäki, T., Hurme, M., Telama, R., Mikkilä, V., Eklund, C., Räsänen, L., Hintsanen, M., Keltikangas-Järvinen, L., Kivimäki, M., Raitakari, O.T. (2011) Childhood environmental and genetic predictors of adulthood obesity: the cardiovascular risk in young Finns study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 96, E1542-E1549
- Khan, S.S., Solomon, M.A., McCoy, J.P. Jr. (2005) Detection of circulating endothelial cells and endothelial progenitor cells by flow cytometry. *Cytometry B. Clin. Cytom.* 64, 1-8
- Landmesser, U., Dikalov, S., Price, S.R., McCann, L., Fukai, T., Holland, S.M., Mitch, W.E., Harrison, D.G. (2003) Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension. *J Clin Invest.* 111, 1201-1209
- Laufs, U., Werner, N., Link, A., Endres, M., Wassmann, S., Jürgens, K., Miche, E., Böhm, M., Nickenig, G. (2004) Physical training increases endothelial progenitor cells, inhibits neointima formation, and enhances angiogenesis. *Circulation*, 109, 220-226
- Lavie, C.J., Milani, R.V., Ventura, H.O. (2011) Impact of Obesity on Outcomes in Myocardial Infarction. *J. Am. Coll. Cardiol.* 58, 2651-2653
- Li, M., Li, Z., Morris, D.L., Rui, L. (2007) Identification of SH2B2beta as an inhibitor for SH2B1- and SH2B2alpha-promoted Janus kinase-2 activation and insulin signaling. *Endocrinology* 148, 1615-1621
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 25, 402-408
- Lobstein, T., Baur, L., Uauy, R.; IASO International Obesity TaskForce. (2004) Obesity in children and young people: a crisis in public health. 5, 4-104

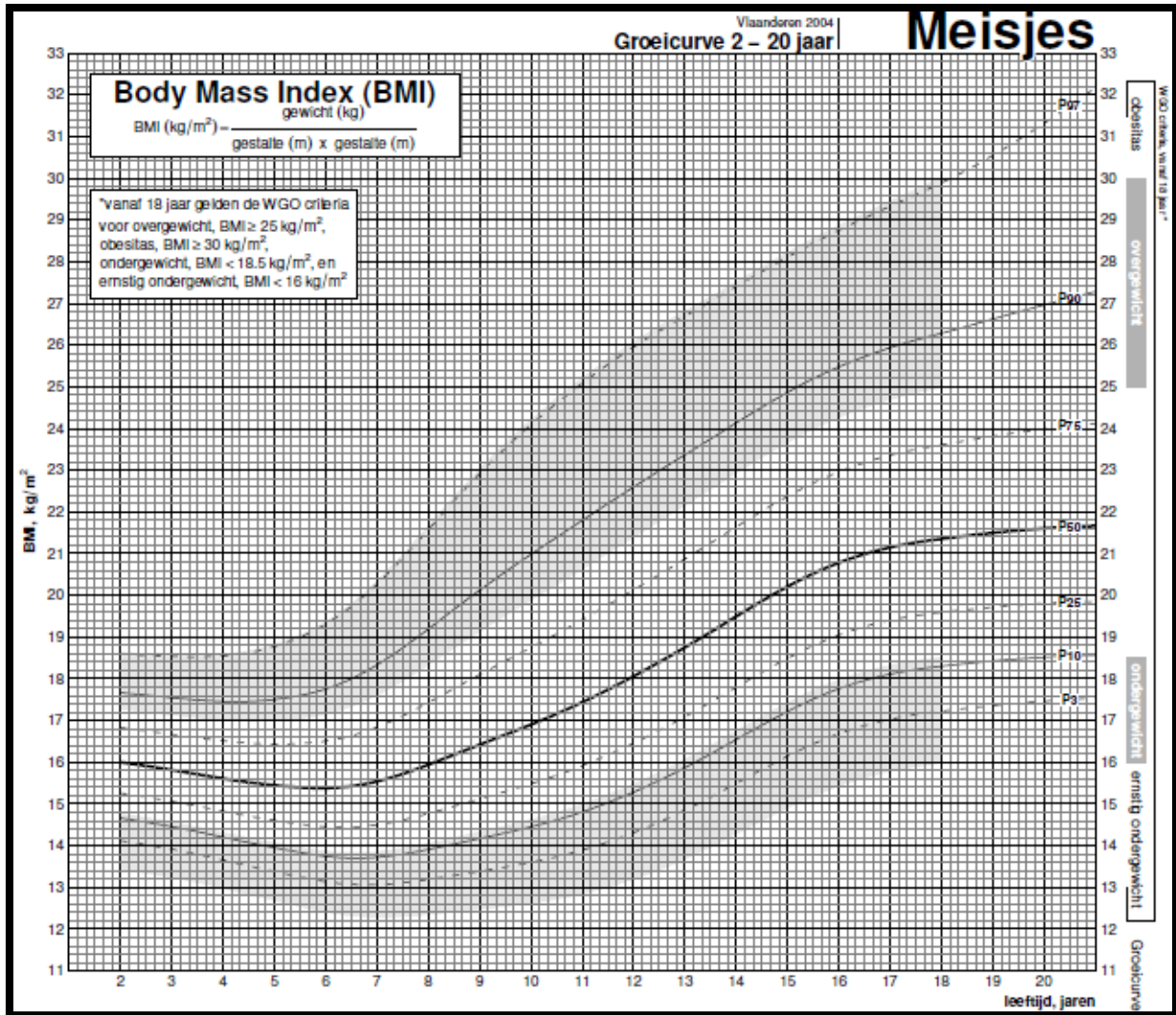
- Lockard, M.M., Witkowski, S., Jenkins, N.T., Spangenburg, E.E., Obisesan, T.O., Hagberg, J.M. (2010) Thrombin and exercise similarly influence expression of cell cycle genes in cultured putative endothelial progenitor cells. *J Appl Physiol.* 108, 1682-1690
- Moon, H.S., Matarese, G., Brennan, A.M., Chamberland, J.P., Liu, X., Fiorenza, C.G., Mylvaganam, G.H., Abanni, L., Carbone, F., Williams, C.J., De Paoli, A.M., Schneider, B.E., Mantzoros, C.S. (2011) Efficacy of metreleptin in obese patients with type 2 diabetes: cellular and molecular pathways underlying leptin tolerance. *Diabetes* 60, 1647-1656
- Morris, D.L. en Rui, L. (2009) Recent advances in understanding leptin signaling and leptin resistance. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 297, E1247-E1259
- Must, A., Jacques, P.F., Dallal, G.E., Bajema, C.J., Dietz, W.H. (1992) Long-term morbidity and mortality of overweight adolescents. A follow-up of the Harvard Growth Study of 1922 to 1935. *N Engl J Med* 327, 1350-1355
- Naseem, K.M. (2005) The role of nitric oxide in cardiovascular diseases. *Mol Aspects Med.* 26, 33-65
- Ozcan, L., Ergin, A.S., Lu, A., Chung, J., Sarkar, S., Nie, D., Myers, M.G. Jr., Ozcan, U. (2009) Endoplasmic reticulum stress plays a central role in development of leptin resistance. *Cell. Metab.* 9, 35-51
- Raghuveer, G. (2010) Lifetime cardiovascular risk of childhood obesity. *Am. J. Clin. Nutr.* 91, 1514S-1519S
- Reed, A.S., Unger, E.K., Olofsson, L.E., Piper, M.L., Myers, M.G. Jr., Xu, A.W. (2010) Functional role of suppressor of cytokine signaling 3 upregulation in hypothalamic leptin resistance and long-term energy homeostasis. *Diabetes* 59, 894-906
- Rehman, J., Li, J., Orschell, C.M., March, K.L. (2003) Peripheral blood "endothelial progenitor cells" are derived from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors. *Circulation* 107, 1164-1169
- Sánchez, J., Priego, T., Picó, C., Ahrens, W., De Henauw, S., Fraterman, A., Mårild, S., Molnár, D., Moreno, L.A., Peplies, J., Russo, P., Siani, A., Tornaritis, M., Veidebaum, T., Palou, A. (2012) Blood Cells as a Source of Transcriptional Biomarkers of Childhood Obesity and Its Related Metabolic Alterations: Results of the IDEFICS Study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 97, 0-0
- Sarigianni, M., Bekiari, E., Tsapas, A., Kaloyianni, M., Koliakos, G., Paletas, K. (2010) Effect of leptin and insulin resistance on properties of human monocytes in lean and obese healthy participants. *Angiology* 61, 768-774
- Takahashi, T., Kalka, C., Masuda, H., Chen, D., Silver, M., Kearney, M., Magner, M., Isner, J.M., Asahara, T. (1999) Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat Med.* 5, 434-438
- Tarzami, S.T., Wang, G., Li, W., Green, L., Singh, J.P. (2006) Thrombin and PAR-1 stimulate differentiation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *J Thromb Haemost.* 4, 656-663

- Thomas, D.D., Ridnour, L.A., Isenberg, J.S., Flores-Santana, W., Switzer, C.H., Donzelli, S., Hussain, P., Vecoli, C., Paolocci, N., Ambs, S., Colton, C.A., Harris, C.C., Roberts, D.D., Wink, D.A. (2008) The chemical biology of nitric oxide: implications in cellular signaling. *Free Radic Biol Med.* 45, 18-31
- Thum, T., Tsikas, D., Frölich, J.C., Borlak, J. (2003) Growth hormone induces eNOS expression and nitric oxide release in a cultured human endothelial cell line. *FEBS Lett.* 555, 567-571
- Thum, T., Hoeber, S., Froese, S., Klink, I., Stichtenoth, D.O., Galuppo, P., Jakob, M., Tsikas, D., Anker, S.D., Poole-Wilson, P.A., Borlak, J., Ertl, G., Bauersachs, J. (2007) Age-dependent impairment of endothelial progenitor cells is corrected by growth-hormone-mediated increase of insulin-like growth-factor-1. *Circ Res.* 100, 434-443
- Tups, A. (2009) Physiological Models of Leptin Resistance. *J. Neuroendocrinol.* 21, 961-971
- Umar, S., van der Laarse, A. (2010) Nitric oxide and nitric oxide synthase isoforms in the normal, hypertrophic, and failing heart. *Mol Cell Biochem.* 333, 191-201
- Van Craenenbroeck, E.M., Hoymans, V.Y., Beckers, P.J., Possemiers, N.M., Wuyts, K., Paelinck, B.P., Vrints, C.J., Conraads, V.M. (2010) Exercise training improves function of circulating angiogenic cells in patients with chronic heart failure. *Basic Res. Cardiol.* 105, 665-676
- Vasa, M., Fichtlscherer, S., Aicher, A., Adler, K., Urbich, C., Martin, H., Zeiher, A.M., Dimmeler, S. (2001) Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. *Circ Res.* 89, E1-7
- Wannamethee, S.G., Sharper, A.G., Whincup, P.H., Lennon, L., Sattar, N. (2011) Obesity and Risk of Incident Heart Failure in Older Men With and Without Pre-Existing Coronary Heart Disease. *J. Am. Coll. Cardiol.* 58, 1870-1877
- Witkowski, S., Jenkins, N.T., Hagberg, J.M. (2011) Enhancing treatment for cardiovascular disease: exercise and circulating angiogenic cells. *Exerc Sport Sci Rev.* 39, 93-101
- Wolk, R., Berger, P., Lennon, R.J., Brilakis, E.S., Somers, V.K. (2003) Body mass index: a risk factor for unstable angina and myocardial infarction in patients with angiographically confirmed coronary artery disease. *Circulation* 108, 2206-2211
- Yoon, C.H., Hur, J., Park, K.W., Kim, J.H., Lee, C.S., Oh, I.Y., Kim, T.Y., Cho, H.J., Kang, H.J., Chae, I.H., Yang, H.K., Oh, B.H., Park, Y.B., Kim, H.S. (2005) Synergistic neovascularization by mixed transplantation of early endothelial progenitor cells and late outgrowth endothelial cells: the role of angiogenic cytokines and matrix metalloproteinases. *Circulation* 112, 1618-1627
- Yusuf, S., Hawken, S., Ounpuu, S., Bautista, L., Franzosi, M.G., Commerford, P., Lang, C.C., Rumboldt, Z., Onen, C.L., Lisheng, L., Tanomsup, S., Wangai, P. Jr., Razak, F., Sharma, A.M., Anand, S.S.; INTERHEART Study Investigators. (2005) Obesity and the risk of myocardial infarction in 27,000 participants from 52 countries: a case-control study. *Lancet* 366, 1640-1649

Bijlage



Figuur 6. Aangepaste BMI-waarden voor jongens (2-18jaar). (www.vub.ac.be)



Figuur 7. Aangepaste BMI-waarden voor meisjes (2-18jaar). (www.vub.ac.be)