

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik II
Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. med. B. Göke

**Untersuchung der Effekte des GLP-1 Systems auf Komponenten des
Metabolischen Syndrom in vivo**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Katja Piotrowski, geb. Rabe

aus Oschatz

2013

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Klaus G. Parhofer

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Jochen Seißler

Priv. Doz. Dr. Norbert Lotz

Mitbetreuung durch die
promovierten Mitarbeiter:

PD Dr. med. Michael Lehrke

PD Dr. med. Uli C. Brödl

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 11.02.2013

Ehrenwörtliche Versicherung:

Ich versichere hiermit, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und nur unter Anwendung der angegebenen Hilfsmittel und Quellen angefertigt habe. Diese Dissertation wurde weder in der jetzigen noch einer ähnlichen Form bei einer anderen Hochschule eingereicht.

Unterschleißheim, 16. Februar 2013

Katja Piotrowski

Für meine Familie

Alles Wissen und alles Vermehren unseres Wissens
endet nicht mit einem Schlusspunkt, sondern mit einem Fragezeichen.

Hermann Hesse (1877–1962)

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	I	
TABELLENVERZEICHNIS	VII	
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	IX	
I	EINLEITUNG	1
1	Adipositas und Metabolisches Syndrom	1
1.1	Diabetes Mellitus Typ 2	2
1.2	Dyslipoproteinämie	5
1.3	Nicht-alkoholische Fettlebererkrankung.....	9
1.4	Atherosklerose.....	10
2	Inkretine.....	11
2.1	Glucagon-like Peptide-1	12
2.1.1	Synthese und Sekretion	12
2.1.2	Metabolismus	14
2.1.3	Physiologische Wirkungen des GLP-1	15
2.1.3.1	Pankreatische Wirkungen.....	16
2.1.3.2	Extrapankreatische Wirkungen.....	17
2.2	GLP-1 in der Therapie des Typ 2 Diabetes	20
2.2.1	GLP-1 Rezeptor-Agonisten.....	21
2.2.2	DPP4-Inhibitoren	23
3	Adeno-assoziierte Viren	25
3.1	Genomorganisation	25
3.2	Infektionsbiologie	27
3.3	Serotypen	27
3.4	Produktion rekombinanter AAV.....	28
3.5	AAV als Vektor in der Gentherapie	30
4	Zielsetzung der Arbeit.....	32

INHALTSVERZEICHNIS

II	MATERIAL UND METHODEN	34
1	Material.....	34
2	Methoden.....	45
2.1	Mikrobiologische Methoden	45
2.2	Molekularbiologische Methoden	45
2.2.1	Transformation kompetenter <i>E.coli</i>	45
2.2.2	Isolierung und Reinigung von DNA.....	46
2.2.3	Enzymatische Modifikation von DNA.....	48
2.2.4	Isolierung von Gesamt-RNA	50
2.2.5	PCR-Methoden.....	52
2.3	Zellkultur	58
2.3.1	Kultivierung.....	59
2.3.2	Passagieren und Zellaussaat	59
2.3.3	Kryokonservierung und Auftauen	60
2.4	Herstellung von rAAV	60
2.4.1	Plasmide und Vektoren	61
2.4.2	Klonierung der Transgen-tragenden Vektorplasmide	63
2.4.3	Transfektion.....	67
2.4.4	Aufreinigung und Konzentrierung	67
2.4.5	Titerbestimmung.....	69
2.5	<i>In-vitro</i> Versuche.....	71
2.6	Proteinchemische Methoden	71
2.6.1	Proteinisolierung.....	71
2.6.2	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	72
2.6.3	Western Blot.....	72
2.6.3.1	SDS-Polyacrylamidgel Elektrophorese.....	72
2.6.3.2	Immunoblotting	73

INHALTSVERZEICHNIS

2.6.3.3	Detektion	74
2.6.3.4	Stripping	75
2.6.4	Enzyme-linked Immunosorbent Assay	75
2.7	<i>In-vivo</i> Modelle.....	78
2.7.1	Versuchstiere.....	78
2.7.2	Versuchsdieten.....	78
2.7.3	Studienmodelle.....	79
2.7.4	Funktionelle Untersuchungen.....	82
2.7.4.1	Glukosetoleranztest.....	82
2.7.4.2	Insulintoleranztest.....	83
2.7.5	Blut- und Organentnahme	83
2.7.6	Serumanalysen.....	85
2.7.6.1	Lipidstatus	85
2.7.6.1.1	Gesamtcholesterin.....	85
2.7.6.1.2	Triglyzeride	85
2.7.6.1.3	HDL-Cholesterin	86
2.7.6.1.4	Freie Fettsäuren	86
2.7.6.2	Fast Protein Liquid Chromatography	86
2.7.6.3	Alanin-Aminotransferase und Aspartat-Aminotransferase	87
2.7.6.4	DPP4-Aktivitätsbestimmung	88
2.7.7	Lipidstatus Leber	88
2.7.8	Hydroxyprolin-Bestimmung.....	89
2.7.9	Histologische Methoden	89
2.7.9.1	X-Gal-Färbung der Leber	89
2.7.9.2	Sudan IV-Färbung der Aorta.....	89
2.7.9.3	Oil Red O-Färbung der Herzklappen	90
2.7.9.4	Sirius Red-Färbung der Leber	90

INHALTSVERZEICHNIS

2.7.10	Quantitative Bestimmung der aortalen Plaquefläche.....	91
2.7.11	Quantitative Bestimmung Lipid-reicher Plaques der Herzklappen.....	91
3	Statistik.....	91
III	ERGEBNISSE	92
1	Nachweis der Transfektionseffizienz des Polyethylenimin in HEK-293-Zellen.....	92
2	Nachweis der AAV-vermittelten Transgenexpression <i>in vitro</i>	92
3	Akutes Inflammationsmodell: Exendin-4.....	93
3.1	Gewichtsverlauf der BALB/c Mäuse unter Exendin-4	93
3.2	Einfluss des Exendin-4 auf Inflammationsparameter	94
4	Chronisches Inflammationsmodell (NASH): GLP-1	94
4.1	Nachweis der AAV-vermittelten Transgenexpression in C57BL/6 Mäusen.....	94
4.2	Gewichtsverlauf der C57BL/6 Mäuse mit Diät-induzierter NASH unter GLP-1 (7-37) und (9-37)	95
4.3	Einfluss des GLP-1 (7-37) und (9-37) auf den Lipidstoffwechsel in C57BL/6 Mäusen mit Diät-induzierter NASH	96
4.4	Bestimmung der Effekte des GLP-1 (7-37) und (9-37) auf Inflammationsparameter in C57BL/6 Mäusen mit Diät-induzierter NASH.....	98
4.5	Analyse der hepatischen Fibrose in C57BL/6 Mäusen unter GLP-1 (7-37) und (9-37).....	99
5	Atherosklerosemodell: DPP4-Inhibition	100
5.1	Gewichtsverlauf der LDL-Rezeptor ^{-/-} Mäuse unter PKF275-055.....	101
5.2	Bestimmung der Effekte des PKF275-055 auf den Glukosemetabolismus in LDL-Rezeptor ^{-/-} Mäusen.....	101
5.3	Einfluss des PKF275-055 auf den Lipidstoffwechsel in LDL-Rezeptor ^{-/-} Mäusen	103

INHALTSVERZEICHNIS

5.4	Bestimmung der Effekte des PKF275-055 auf die Entstehung der Atherosklerose und Inflammationsparameter in LDL-Rezeptor ^{-/-} Mäusen.....	104
6	Atherosklerosemodell: GLP-1.....	106
6.1	Nachweis der AAV-vermittelten Transgenexpression in LDL-Rezeptor ^{-/-} Mäusen.....	106
6.2	Gewichtsverlauf der LDL-Rezeptor ^{-/-} Mäuse unter GLP-1 (7-37) und (9-37).....	107
6.3	Bestimmung der Effekte des GLP-1 (7-37) und (9-37) auf den Glukosemetabolismus in LDL-Rezeptor ^{-/-} Mäusen.....	108
6.4	Einfluss des GLP-1 (7-37) und (9-37) auf den Lipidstoffwechsel in LDL-Rezeptor ^{-/-} Mäusen	111
6.5	Bestimmung der Effekte des GLP-1 (7-37) und (9-37) auf Inflammationsparameter in LDL-Rezeptor ^{-/-} Mäusen	116
6.6	Analyse der Entstehung der Atherosklerose in LDL-Rezeptor ^{-/-} Mäusen unter GLP-1 (7-37) und (9-37)	117
IV	DISKUSSION	120
1	Adeno-assoziierte-virale Vektoren für die Genexpression.....	121
2	Mausmodelle	123
3	Effekte der DPP4-Inhibition	126
3.1	PKF275-055 verbessert den Glukosemetabolismus.....	127
3.2	PKF275-055 bewirkt keinen Unterschied im Lipidprofil.....	128
3.3	PKF275-055 hat keinen Effekt auf Inflammation und Atherosklerose.....	129
3.4	Limitationen der Studie	131
4	Effekte des GLP-1 Systems.....	132
4.1	Klonierung und Expressionslevel.....	132
4.2	Expression des GLP-1 Rezeptors.....	134
4.3	GLP-1 (7-37) hat keinen Effekt auf das Körpergewicht, während GLP-1 (9-37) eine Gewichtszunahme in Wildtypmäusen bewirkt	134

INHALTSVERZEICHNIS

4.4	GLP-1 (7-37) verbessert die Glukosetoleranz in LDL-Rezeptor ^{-/-} Mäusen.....	135
4.5	Aktives und metabolisiertes GLP-1 bewirken eine Diät-abhängige divergente Modulation des Lipidprofils.....	137
4.6	Anti-inflammatorische Effekte des Exendin-4, GLP-1 (7-37) und GLP-1 (9-37).....	141
4.7	GLP-1 (9-37) induziert Atherosklerose in LDL-Rezeptor ^{-/-} Mäusen.....	143
4.8	GLP-1 (9-37) ist ein aktiver Metabolit des GLP-1 (7-37).....	145
4.9	Limitationen der Studie	146
V	ZUSAMMENFASSUNG.....	148
VI	LITERATURVERZEICHNIS.....	150
VII	ANHANG	186
1	Abkürzungsverzeichnis.....	186
2	Zusätzliche Daten.....	191
3	Publikationen.....	196
4	Danksagung	198

TABELLENVERZEICHNIS

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1:	Eigenschaften und Zusammensetzung der Lipoproteine	7
Tabelle 2:	zugelassene DPP4-Inhibitoren	24
Tabelle 3:	Primer zur Klonierung der GLP-1 Konstrukte	41
Tabelle 4:	Sequenzierprimer	41
Tabelle 5:	PCR-Primer	41
Tabelle 6:	TaqMan® Gene Expression Assays	41
Tabelle 7:	LightCycler Primer Sets.....	42
Tabelle 8:	Reaktionsansatz für die DNasebehandlung isolierter Gesamt-RNA.....	52
Tabelle 9:	Reaktionsansatz für eine Standard-PCR-Reaktion	53
Tabelle 10:	PCR-Protokoll für eine Standard-PCR-Reaktion	53
Tabelle 11:	Reaktionsansatz für eine Kolonie-Screening-PCR.....	54
Tabelle 12:	PCR-Protokoll für eine Kolonie-Screening-PCR.....	54
Tabelle 13:	Reaktionsansatz für die reverse Transkription	55
Tabelle 14:	Reaktionsansatz für eine quantitative Real-Time PCR.....	57
Tabelle 15:	Reaktionsansatz für eine quantitative Real-Time PCR unter Verwendung vorgefertigter TaqMan® Gene Expression Assays.....	57
Tabelle 16:	Zusammensetzung des 2x TaqMan® PCR Mastermix	57
Tabelle 17:	PCR-Protokoll für eine quantitative Real-Time PCR	58
Tabelle 18:	Vektor- und Helferplasmide.....	61
Tabelle 19:	Reaktionsansatz für die Amplifikation der jeweiligen GLP-1 Sequenz aus der cDNA des Glukagon.....	64
Tabelle 20:	PCR-Protokoll für die Amplifikation der jeweiligen GLP-1 Sequenz aus der cDNA des Glukagon.....	64
Tabelle 21:	Restriktionsmuster der klonierten Vektorplasmide	66
Tabelle 22:	Reaktionsansatz für den DNase-Verdau der rAAV-Vektoren	70

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 23:	Reaktionsansatz für die Real Time PCR zur Quantifizierung der rAAV.....	70
Tabelle 24:	Primärantikörper.....	74
Tabelle 25:	Sekundärantikörper.....	74
Tabelle 26:	Arbeitskonzentration für Primär- und Sekundärantikörper.....	77
Tabelle 27:	Übersicht über verwendete Mausstämme	78
Tabelle 28:	Übersicht über eingesetzte Futtermittel.....	79
Tabelle 29:	Gewicht der BALB/c Mäuse unter Exendin-4 Behandlung	93
Tabelle 30:	Gewichtsabnahme, Lebergewicht und anteiliges Lebergewicht nach vier Wochen MCD-Diät der C57BL/6 Mäuse	96
Tabelle 31:	hepatischer Cholesteringehalt, hepatischer Triglyzeridgehalt, Serumlevel ASAT und ALAT nach vier Wochen MCD-Diät der C57BL/6 Mäuse	98
Tabelle 32:	hepatischer Triglyzeridgehalt, Serumspiegel der freien Fettsäuren und Serumspiegel des Adiponectin nach 18 Wochen PKF275-055 Intervention der LDL-Rezeptor ^{-/-} Mäuse	103
Tabelle 33:	hepatischer Cholesterin- und Triglyzeridgehalt der LDL-Rezeptor ^{-/-} Mäuse nach 20wöchiger Transgenexpression	113

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1:	Zusammenhang zwischen Insulinresistenz und diabetischer Dyslipoproteinämie.....	8
Abbildung 2:	Inkretineffekt bei gesunden Personen.....	12
Abbildung 3:	gewebespezifische posttranslationale Prozessierung des Proglukagon.....	13
Abbildung 4:	physiologische Effekte des GLP-1.....	16
Abbildung 5:	Aminosäuresequenz des physiologischen GLP-1, Liraglutide und Exendin-4 / Exenatide.....	22
Abbildung 6:	Genomorganisation und Transkripte des AAV.....	26
Abbildung 7:	Schematische Darstellung von Wildtyp AAV-Genom, Helferplasmid und rAAV Vektor.....	29
Abbildung 8:	Fließschema zur Herstellung von rAAV ohne Adenoviren.....	30
Abbildung 9:	<i>TaqMan</i> -System.....	56
Abbildung 10:	Plasmidmappen der Vektorplasmide.....	62
Abbildung 11:	Plasmidmappen der klonierten Vektorplasmide.....	63
Abbildung 12:	Aufbauschema für das Immunoblotting.....	73
Abbildung 13:	Versuchsplan des NASH-Inflammationsmodells.....	80
Abbildung 14:	Versuchsplan des Atherosklerosemodells mit DPP4-Inhibition.....	81
Abbildung 15:	Versuchsplan des Atherosklerosemodells GLP-1.....	82
Abbildung 16:	repräsentative GFP-Transfektion in HEK-293-Zellen.....	92
Abbildung 17:	AAV-vermittelte Transgenexpression <i>in vitro</i>	93
Abbildung 18:	mRNA Expression des Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α) und Interleukin-1 β (IL-1 β) in Leukozyten und Serumspiegel des Interleukin-6 (IL-6) nach LPS-Stimulation der Exendin-4 behandelten BALB/c Mäuse.....	94
Abbildung 19:	Transgenexpression in C57BL/6 Mäusen auf MCD-Diät.....	95
Abbildung 20:	Gewichtsverlauf der C57BL/6 Mäuse auf MCD-Diät.....	96

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 21:	Lipidprofil der C57BL/6 Mäuse auf MCD-Diät	97
Abbildung 22:	hepatische mRNA Expression der Fettsäure-Synthase (Fasn), des Sterol Regulatory Element Binding Factor 1 (Srebf-1), des CD36 und des Liver X Receptor- α (LXR- α) bei C57BL/6 Mäusen auf MCD-Diät.....	98
Abbildung 23:	hepatische mRNA Expression des Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α), Monocyte Chemotactic Protein-1 (MCP-1) und Transforming Growth Factor-1 β (TGF-1 β) bei C57BL/6 Mäusen auf MCD-Diät	99
Abbildung 24:	Quantifizierung der hepatischen Fibrose bei C57BL/6 Mäusen auf MCD-Diät	100
Abbildung 25:	Gewichtsverlauf der LDL-Rezeptor ^{-/-} Mäuse unter PKF275-055 Intervention	101
Abbildung 26:	Nüchternblutglukose, oGTT, HOMA-IR, DPP4-Aktivität im Serum sowie hepatische mRNA Expression der Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (PEPCK) und der Glukose-6-Phosphatase (G6P) der LDL-Rezeptor ^{-/-} Mäuse unter PKF275-055 Intervention	102
Abbildung 27:	Expression von pAkt und Akt1 in Leber und Muskulatur der LDL-Rezeptor ^{-/-} Mäuse unter PKF275-055 Intervention.....	103
Abbildung 28:	Lipidprofil der LDL-Rezeptor ^{-/-} Mäuse unter PKF275-055 Intervention	104
Abbildung 29:	Quantifizierung der Atherosklerose der LDL-Rezeptor ^{-/-} Mäuse nach PKF275-055 Intervention.....	105
Abbildung 30:	hepatische mRNA Expression des Monocyte Chemotactic Protein-1 (MCP-1) und Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α) bei LDL-Rezeptor ^{-/-} Mäusen unter PKF275-055 Intervention	105
Abbildung 31:	mRNA Expression des Monocyte Chemotactic Protein-1 (MCP- 1) und Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α) in der A. carotis der LDL-Rezeptor ^{-/-} Mäuse unter PKF275-055 Intervention.....	106
Abbildung 32:	Transgenexpression in LDL-Rezeptor ^{-/-} Mäusen.....	107

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 33:	Gewichtsverlauf der LDL-Rezeptor ^{-/-} Mäuse	107
Abbildung 34:	Verlauf der Nüchternblutglukose der LDL-Rezeptor ^{-/-} Mäuse.....	108
Abbildung 35:	ipGTT der LDL-Rezeptor ^{-/-} Mäuse.....	109
Abbildung 36:	ipITT der LDL-Rezeptor ^{-/-} Mäuse.....	110
Abbildung 37:	Auswertung AUC des ipGTT und des ipITT	110
Abbildung 38:	hepatische Expression von pAkt und Akt1 der LDL-Rezeptor ^{-/-} Mäuse	111
Abbildung 39:	Lipidprofil der LDL-Rezeptor ^{-/-} Mäuse	112
Abbildung 40:	hepatisches Expressionsprofil der LDL-Rezeptor ^{-/-} Mäuse	115
Abbildung 41:	mRNA Expression des Monocyte Chemotactic Protein-1 (MCP- 1) und des Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α) in der Leber sowie mRNA Expression des MCP-1 und des TNF- α in der A. carotis der LDL-Rezeptor ^{-/-} Mäuse.....	116
Abbildung 42:	Quantifizierung der Artherosklerose in der Gesamtaorta der LDL-Rezeptor ^{-/-} Mäuse.....	117
Abbildung 43:	Oil-Red-O gefärbte Herzklappenpräparationen der LDL- Rezeptor ^{-/-} Mäuse.....	118
Abbildung 44:	Quantifizierung der Atherosklerose auf Herzklappenebene der LDL-Rezeptor ^{-/-} Mäuse.....	118
Abbildung 45:	mRNA Expression des Abca-1 und CD36 in der A. carotis der LDL-Rezeptor ^{-/-} Mäuse.....	119

I EINLEITUNG

1 ADIPOSITAS UND METABOLISCHES SYNDROM

Übergewicht und Adipositas/Obesitas (*lat.*: *obesus* = fett; Fettleibigkeit) breiten sich in der Weltbevölkerung epidemisch aus und stellen ein wachsendes Problem dar. Nach Angaben der Weltgesundheitsorganisation (WHO) waren im Jahr 2008 weltweit über 1,5 Milliarden Erwachsene übergewichtig, davon 500 Millionen adipös [1]. Alarmierend ist die Zunahme des Übergewichts vor allem im jungen Kindesalter [2]. Waren Übergewicht und Adipositas früher noch ein Problem der industrialisierten Länder, so hat sich in den letzten 20 Jahren die Prävalenz in Schwellen- und Entwicklungsländern mit Übernahme des westlichen Lebensstils dramatisch vervielfacht [1, 3]. Daten für Deutschland zeigen, dass 2003 jeder zweite Erwachsene übergewichtig (Männer: 57,7 %; Frauen: 41,2 %) und ca. 13 % (Männer: 13,6 %; Frauen: 12,3 %) adipös waren [4]. Das nationale Gesundheitswesen wird jährlich durch Adipositas und deren assoziierte Erkrankungen mit Kosten in Höhe von 13 Milliarden Euro belastet [5].

Die Klassifizierung von Übergewicht und Adipositas basiert auf dem Body Mass Index (BMI), der als Quotient aus dem Körpergewicht (kg) und der quadrierten Körpergröße (m^2) berechnet wird. Übergewicht besteht ab einem BMI von 25 kg/m^2 während von Adipositas bei einem BMI von $\geq 30 \text{ kg/m}^2$ gesprochen wird [4].

Adipositas ist assoziiert mit metabolischen Erkrankungen wie Insulinresistenz, Diabetes Mellitus Typ 2, arterieller Hypertonie, Störungen des Fettstoffwechsels (Dyslipidämie), Atherosklerose, Fettlebererkrankung und bestimmten Karzinomen [6-7]. Eine bedeutende Rolle kommt der Adipositas im komplexen Krankheitsbild, das als „metabolisches Syndrom“ (MetS) beschrieben wird, zu. Bereits 1988 konstatierte Reaven, dass die kardiovaskulären Risiken Hyperglykämie, Hypertonie und Dyslipidämie häufig gemeinsam auftreten und fasste diese Trias als „Syndrom X“ oder auch „metabolisches Syndrom“ zusammen [8]. Über die Zeit wurden verschiedene Definitionen des MetS erarbeitet [9]. Vor allem die abdominale Adipositas wurde zunehmend als Kriterium diskutiert und als Kernstück des MetS identifiziert [9-11]. Das MetS stellt einen Komplex aus Risikofaktoren dar und ist mit einem zweifach erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen und einem fünffach höherem Risiko für Diabetes mellitus Typ 2 assoziiert. Personen mit MetS haben außerdem eine 1,5fach erhöhte Gesamtsterblichkeit [9, 12-13]. Nach aktueller Definition der IDF (International Diabetes Federation) und

EINLEITUNG

AHA/NHLBI (American Heart Association; National Heart, Lung, and Blood Institute) liegt das MetS bei einer Person vor, wenn drei oder mehr der fünf folgenden Kriterien erfüllt sind [9]:

- abdominale Adipositas (Taillenumfang populations- und länderspezifisch definiert)
- Hypertriglyzeridämie (≥ 150 mg/dl, 1,7 mmol/l)
- erniedrigte HDL-Cholesterinspiegel
(Männer: < 40 mg/dl, 1 mmol/l; Frauen: < 50 mg/dl, 1,3 mmol/l)
- Bluthochdruck (systolisch: ≥ 130 mmHg und / oder diastolisch: ≥ 85 mmHg)
- erhöhte Nüchtern-Plasmaglukose (≥ 100 mg/dl, 5,6 mmol/l)

[bei Punkt zwei bis fünf gilt die medikamentöse Behandlung des jeweiligen Risikofaktors als alternativer Indikator]

Die zentrale Bedeutung der abdominalen Adipositas ist auf die verstärkte Freisetzung von Fettsäuren und die divergente Expression endokriner Botenstoffe im viszeralen Fettgewebe im Vergleich zum subkutanen zurückzuführen [10, 14]. Bei vorliegender Adipositas ist das Fettgewebe per se histologisch durch eine gesteigerte Infiltration mit Immunzellen, insbesondere Makrophagen, gekennzeichnet, die eine vermehrte Inflamationsreaktion bedingen [15-16]. Sowohl Adipozyten als auch Makrophagen sezernieren Hormone und Zytokine, die als „Adipokine“ bezeichnet werden und maßgeblich Körpergewicht, Lipidmetabolismus, Blutdruck, Entzündungen sowie die Entstehung von Insulinresistenz und Atherosklerose beeinflussen. Beispielhafte Vertreter der Adipokine sind Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α), Interleukin-6 (IL-6), C-reaktives Protein (CRP), Adiponectin, Leptin, Chemerin, Omentin und Resistin [7, 17]. Vor allem Personen mit viszeraler Adipositas weisen erhöhte Serumspiegeln der Entzündungsmarker CRP, TNF- α und IL-6 auf [10, 18]. Diese systemische Entzündung, die ihren Ursprung im Fettgewebe hat, ist assoziiert mit endothelialer Dysfunktion, kardiovaskulären Erkrankungen, Insulinresistenz sowie einem erhöhten Diabetesrisiko [7, 17].

1.1 Diabetes Mellitus Typ 2

Diabetes mellitus ist eine durch chronische Hyperglykämie gekennzeichnete komplexe Regulationsstörung des Stoffwechsels, die auf eine Störung der Insulinsekretion und /

EINLEITUNG

oder Insulinwirkung zurückzuführen ist. Als primäres Diagnostikum wird der HbA1c herangezogen, sofern mit keiner Verfälschung des Wertes zu rechnen ist. Ein manifester Diabetes liegt ab einem HbA1c von 6,5 % vor sowie bei HbA1c-Werten zwischen 5,7 % und 6,4 % wenn gleichzeitig die venöse Plasmaglukose nüchtern 126 mg/dl (7 mM) und postprandial 200 mg/dl (11,1 mM, zwei Stunden nach oraler Glukosebelastung von 75 g) überschreitet [19]. Zurzeit sind weltweit 366 Millionen Menschen von der Stoffwechselerkrankung betroffen und anhand der steigenden Tendenz wird eine Zunahme auf über 500 Millionen für das Jahr 2030 prognostiziert [20].

Nach nosologischer Klassifikation werden folgende Typen des Diabetes mellitus unterschieden: Typ 1 Diabetes (immunologisch vermittelt oder idiopathisch), Typ 2 Diabetes, andere spezifische Diabetes-Typen (z.B. vermittelt durch genetische Defekte der β -Zell-Funktion oder der Insulinwirkung) und Gestationsdiabetes [21].

Der Typ 2 Diabetes (T2D) stellt mit 85-90 % die häufigste Form des Diabetes mellitus dar [22]. Die Mehrheit der Patienten mit T2D ist übergewichtig oder adipös. Die weltweite Zunahme des T2D ist somit über eine Zunahme der Adipositas-Prävalenz zu erklären [3]. Die Manifestation eines T2D ist abhängig von der genetischen Prädisposition eines Menschen im Zusammenspiel mit Umwelt- und Lebensstilfaktoren. Die Bedeutung der genetischen Determinante zeigt sich in Beobachtungsstudien mit eineiigen Zwillingen, die in 90 % der Fälle beide einen T2D entwickeln [23]. In den letzten Jahren wurden im Rahmen genomweiter Assoziationsstudien Sequenzvarianten (SNP: single nucleotide polymorphism) identifiziert, die das Risiko für die Entstehung eines T2D erhöhen (TCF7L2, SLC30A8, IGF2BP2, KCNQ1) [24-26]. Eine falsche Ernährung, mangelnde körperliche Aktivität, Übergewicht und ein zunehmendes Lebensalter bestimmen somit in Kombination mit der genetischen Prädisposition das Gesamtrisiko für einen T2D [27].

Die Pathophysiologie des T2D beruht auf einer bestehenden Insulinresistenz, die als verminderte Sensitivität von Muskulatur, Leber und Fettgewebe auf Insulin definiert ist, sowie einer gestörten Insulinsekretion. Im Frühstadium der Erkrankung kompensiert die pankreatische β -Zelle über eine gesteigerte Insulinsekretion (Hyperinsulinämie) die mangelnde Insulinwirkung an den Zielorganen zur Gewährleistung der Glukosehomöostase [28]. Eine dauerhafte Mehrsekretion an Insulin kann nicht aufrechterhalten werden, so dass es zu einer fortschreitenden β -Zell-Dysfunktion kommt, die über die Zeit in einer gestörten Glukosetoleranz, einer erhöhten Nüchternglukose und schließlich in der Manifestation des T2D resultiert [29]. Die dem T2D zugrunde liegende Insulinre-

EINLEITUNG

sistenz wird unter anderem über Mediatoren des Fettgewebes induziert. Eine hohe lipolytische Aktivität im viszeralen Fettgewebe bedingt bei Personen mit abdominaler Adipositas die vermehrte Freisetzung von Fettsäuren in die Zirkulation [14, 30-31]. Untersuchungen zeigen, dass die akute als auch chronische Erhöhung dieser freien Fettsäuren im Plasma zur Ausbildung einer Insulinresistenz führt. Dabei wurde eine Hemmung des Glukosetransport, der Glykogensynthese und der Glukoseoxidation beobachtet [28, 31-32]. Zudem führen chronisch erhöhte Plasmakonzentrationen an Glukose (Hyperglykämie) und freien Fettsäuren über eine Induktion der Apoptose in den β -Zellen zur Zerstörung der β -Zell-Masse und damit zur beeinträchtigen Insulinsekretion (Glukotoxizität und Lipotoxizität) [33]. Die Adipokine TNF- α und IL-6 sind ebenfalls an der Ausbildung einer Insulinresistenz über die Aktivierung der c-Jun N-terminale Kinase (JNK) und I κ B-Kinase- β (IKK- β) beteiligt [34]. Die Insulinwirkung wird über die Bindung an den Insulinrezeptor vermittelt, wodurch neben einer Autophosphorylierung eine Tyrosin-Phosphorylierung verschiedener intrazellulär gelegener Insulin-Rezeptor-Substrate vermittelt wird. Eine dadurch induzierte Aktivierung der Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) führt über die Phosphorylierung der Proteinkinase B (Akt) zur Translokation des Glukosetransporter GLUT4 in die Zellmembran [35-36]. Dieser Insulin vermittelte Signalprozess wird durch die genannten inflammatorischen Stimuli, die eine inhibitorische Serin-Phosphorylierung des Insulin-Rezeptor-Substrat-1 bewirken, gehemmt [6, 37-39]. Als Konsequenz dieser Insulinresistenz entsteht eine verminderte Glukoseverwertung in Muskulatur und Fettgewebe, sowie eine Steigerung der Lipolyse und der hepatischen Glukoneogenese [22, 28].

Die beim nicht oder unzureichend therapierten Diabetes mellitus vorliegende Hyperglykämie ist in Kombination mit assoziierten Komorbiditäten (Bluthochdruck und Dyslipidämie) ein Risikofaktor für Gefäßkomplikationen. Unterschieden wird bei diesen in Schäden der großen (Makroangiopathie) und der kleinen Blutgefäße (Mikroangiopathie). Mikroangiopathien betreffen vor allem Augen, Nieren und Nervensystem (diabetische Retinopathie, Nephropathie und Neuropathie). Zu den makrovaskulären Folgeerkrankungen zählen die koronare Herzkrankheit, periphere arterielle Verschlusskrankheit und zerebrovaskuläre Insuffizienz [40]. Die Therapie des T2D wird in Deutschland entsprechend den Leitlinien der Deutschen Diabetes Gesellschaft durchgeführt (DDG). Nach Diagnose der Erkrankung erfolgt neben einer Ernährungs- und Bewegungstherapie die Medikation mit dem oralen Antidiabetikum Metformin. Als Therapie-

EINLEITUNG

ziel wird in Deutschland ein HbA1c von $\leq 6,5$ % angestrebt. Zur Erreichung dessen ist ein Stufenplan mit verschiedenen oralen Antidiabetika bis hin zur Insulintherapie vorgesehen [41].

1.2 Dyslipoproteinämie

Der T2D ist häufig von einer Fettstoffwechselstörung (diabetische Dyslipoproteinämie) begleitet. Charakteristisch für diese diabetische Dyslipoproteinämie sind erhöhte Triglyzerid- und erniedrigte HDL-Cholesterin-Konzentrationen im Plasma sowie ein vermehrter Anteil „kleiner-dichter“ LDL-Partikel („small dense“ LDL) und funktionell veränderte HDL-Partikel [42-44]. Der näheren Erläuterung der Ursachen der diabetischen Dislipoproteinämie ist ein kurzer Überblick über die Lipoproteine und deren Metabolismus beim gesunden Menschen vorangestellt.

Lipoproteine und Lipoproteinmetabolismus

Lipide zirkulieren im Blut in Form von Plasmalipoproteinen. Diese Lipid-Protein-Komplexe lassen sich entsprechend ihrer Zusammensetzung an Triglyzeriden, Cholesterin, Phospholipiden und Proteinen (Apolipoproteinen) sowie Dichte und Größe in verschiedene Fraktionen einteilen (Tabelle 1). Chylomikronen und VLDL-Partikel (VLDL: very low density lipoprotein) zählen zu den triglyzeridreichen Lipoproteinen. Die LDL- (LDL: low density lipoprotein) und HDL-Partikel (HDL: high density lipoprotein; HDL₂, HDL₃) zeichnen sich durch einen niedrigen Triglyzeridgehalt aus. Apolipoproteine (Apo) nehmen über die Stabilisierung der Lipoproteine, die Vermittlung von Rezeptorbindungen und die Aktivierung von Enzymen eine wichtige Funktion im Metabolismus der Lipoproteine ein [45].

Der Stoffwechsel der Lipoproteine gliedert sich in eine exogene und eine endogene Kaskade. Mit der Nahrung zugeführte Triglyzeride und Cholesterin werden in den Enterozyten zusammen mit ApoB-48 zu Chylomikronen synthetisiert und anschließend in die Lymphe abgegeben. Die gefäßendothelständige Lipoproteinlipase (LPL) hydrolysiert die Triglyzeride der Chylomikronen zu freien Fettsäuren, die von Muskulatur und Fettgewebe aufgenommen werden. Es verbleiben cholesterinreiche Chylomikronen-Remnants, deren Aufnahme in die Leber mittels LDL-Rezeptor oder LDL-

EINLEITUNG

Receptor-related Protein (Lrp) erfolgt. Bei Bedarf (Nahrungskarenz) erfolgt in der Leber die Synthese von VLDL-Partikeln, die extrahepatische Gewebe mit endogen synthetisiertem Cholesterin und Triglyzeriden versorgen. Eine entscheidende Rolle bei der VLDL-Synthese übernimmt das microsomal triglycerid transfer protein (MTP) [46]. In der Zirkulation werden 90 % der Triglyzeride des VLDL unter Abgabe freier Fettsäuren durch die LPL hydrolysiert. Die verbleibenden VLDL-Remnants werden direkt über die Leber eliminiert oder zu IDL (intermediate density lipoprotein) und LDL unter Einwirkung der LPL und der hepatischen Lipase (HL) überführt. LDL-Partikel sind die Haupttransporter des Cholesterins im Plasma und werden über die Bindung von ApoB-100 an LDL-Rezeptoren und Lrp von den Gewebszellen internalisiert. Über eine negative Rückkopplung werden bei steigendem intrazellulärem Cholesteringehalt die *de novo* Cholesterinsynthese und der LDL-Uptake supprimiert [47]. Beim Vorliegen hoher LDL-Plasma-Konzentrationen oder nach Modifikationen (z.B. oxidiertes LDL) können die LDL-Partikel ebenfalls über Scavenger-Rezeptoren aufgenommen werden. Im Gegensatz zum LDL-Rezeptor unterliegt dieser Transportweg keinem Cholesterin-abhängigen Rückkopplungsmechanismus, sodass eine Überladung der Zellen mit Cholesterin auftreten kann [48-49]. Der Rücktransport des Cholesterins aus peripheren Geweben und Makrophagen zur Leber wird als „reverser Cholesterintransport“ (rCT) bezeichnet und über HDL-Partikel realisiert. Vorstufen des HDL (naszierendes HDL), die als Apolipoproteine A-1, A-2 und E enthalten, werden vorwiegend unter Einwirkung des ATP-binding cassette transporter-1 (Abca-1) mit zellulärem Cholesterin beladen (Cholesterin-Efflux). In die Reifung des naszierenden HDL zu größeren HDL₃- und HDL₂-Partikeln ist die Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase (LCAT), welche freies Cholesterin verestert, beteiligt. Die Cholesterinester des HDL₂ werden durch das Cholesterinester-Transferprotein (CETP) im Austausch gegen Triglyzeride auf ApoB-haltige Lipoproteine transferiert und auf diesem Wege über hepatische LDL-Rezeptoren aufgenommen. In der Leber kann das Cholesterin über den Umbau zu Gallensäuren eliminiert oder in geringerer Menge in freier Form ausgeschieden werden [45, 50-51]. Die HDL-Partikel wirken über ihre Rolle im rCT maßgebend atheroprotektiv. Zudem werden für das HDL anti-inflammatorische, anti-oxidative und anti-apoptotische Effekte beschrieben [52-55].

EINLEITUNG

Tabelle 1: **Eigenschaften und Zusammensetzung der Lipoproteine**; VLDL = very low density lipoprotein, IDL = intermediate density lipoprotein, LDL = low density lipoprotein, HDL = high density lipoprotein; [45]

	Chylomikronen	VLDL	IDL	LDL	HDL ₂	HDL ₃
Dichte [kg/l]	<1,000	<1,005	<1,019	<1,063	<1,125	<1,210
Durchmesser [nm]	<10 ⁴	50	30	21	10	8
MG [MDa]	>150	5-130	3,5	2,5	0,36	0,2
Haupt-Apolipoprotein	B48, C, E	B100, C, E	B100, E	B100	A1, A2	A1, A2
Protein [%]	2	10	17	23	42	56
Triglyzeride [%]	90	54	20	4	5	3
Cholesterin gesamt [%]	3	20	43	52	18	18

Diabetische Dyslipoproteinämie

In der Pathogenese der diabetischen Dyslipoproteinämie spielt die Insulinresistenz eine zentrale Rolle. Die erhöhten Triglyzeridkonzentrationen sind das Resultat einer gesteigerten Synthese und Sekretion triglyzeridreicher VLDL-Partikel. In den VLDL-Partikeln wird neben Triglyzeriden auch Cholesterin transportiert, so dass ebenso eine Erhöhung des Gesamtcholesterins zu beobachten ist. Infolge der reduzierten Insulinwirkung im Fettgewebe kommt es zur verminderten Suppression der Lipolyse und damit zu einer erhöhten Freisetzung freier Fettsäuren in die Zirkulation. Eine hepatische Akkumulation dieser begünstigt die Entstehung einer Fettleber (nicht-alkoholische Fettlebererkrankung) [42, 56]. Gleichzeitig führen die freien Fettsäuren über die Induktion des MTP zur gesteigerten VLDL Synthese [57-59]. Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass die Expression von MTP bei Adipositas und Hypertriglyzeridämie sowie Diabetes mellitus erhöht ist [60-61]. Darüber hinausgehend hemmt Insulin die VLDL-Synthese und -Sekretion bei Insulin-sensitiven Personen über eine vermehrte ApoB Degradierung und Inhibition des MTP [62-63]. Folglich ist die vermehrte Sekretion triglyzeridreicher VLDL Ausdruck einer hepatischen und peripheren Insulinresistenz, die über den verstärkten Zufluss freier Fettsäuren vermittelt wird (Abbildung 1).

EINLEITUNG

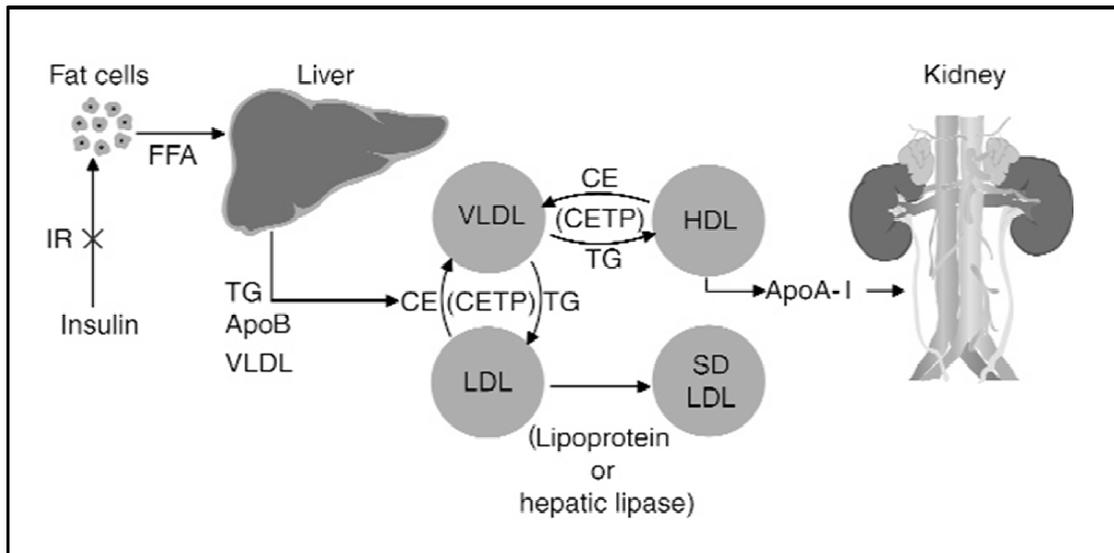


Abbildung 1: **Zusammenhang zwischen Insulinresistenz und diabetischer Dyslipoproteinämie**; entnommen aus [56]; IR = Insulinresistenz, FFA = free fatty acid, TG = Triglyzeride, CE = Cholesterinester, SD = small dense

Die Hypertriglyzeridämie bildet die Basis für die erniedrigten HDL-Cholesterinspiegel und die Erhöhung der „small dense“ LDL-Partikel bei der diabetischen Dyslipoproteinämie. Im Rahmen des übermäßigen VLDL Angebotes werden Triglyzeride vermehrt im Austausch gegen Cholesterinester über das CETP von den VLDL- auf die HDL- und LDL-Partikel übertragen. Die hierdurch entstehenden TG-reichen HDL- und LDL-Partikel stellen ein gutes Substrat für die HL dar, die über eine Metabolisierung des Triglyzeridanteiles eine Verkleinerung der Lipoproteinpartikel bewirkt, sodass „small dense“ Lipoproteine zurückbleiben [42, 44, 56]. „Small dense“ HDL-Partikel unterliegen einem beschleunigten Abbau, der schließlich zu einem erniedrigten HDL-Cholesterinspiegel führt [64-66] (Abbildung 1). Zudem bewirkt der erhöhte TG-Gehalt des HDL und eine vermehrte Glykosylierung des ApoA eine Einschränkung der Lipoproteinfunktion (HDL-Dysfunktion) [43]. Entsprechend ist das HDL von Typ 2 Diabetikern nur bedingt in der Lage einen Cholesterin-Efflux zu induzieren und weist eine reduzierte anti-oxidative Aktivität auf [67-69]. Die „small dense“ LDL-Partikel gelten als besonders atherogene Lipidfraktion. Abgeleitet wird das atherogene Profil dieser Partikel aus deren verminderter LDL-Rezeptor-Bindung bei gleichzeitig erhöhter Penetration in die Gefäßintima und verstärkter Anfälligkeit für Oxidation [70-72]. Die beschriebenen Charakteristika der diabetischen Dyslipoproteinämie bedingen somit ein erhöhtes Risiko für die Entstehung der Atherosklerose.

1.3 Nicht-alkoholische Fettlebererkrankung

Nicht-alkoholische Fettlebererkrankungen (NAFLD: non-alcoholic fatty liver disease) weisen eine starke Assoziation mit Adipositas, Dyslipoproteinämie, Insulinresistenz, T2D sowie Bluthochdruck auf und werden demnach als hepatische Manifestation des MetS erachtet [73-75]. Der Begriff der nicht-alkoholischen Fettlebererkrankung umfasst sowohl die Lebersteatose (NAFL: non-alcoholic fatty liver) als auch die Steatohepatitis (NASH: non-alcoholic steatohepatitis), welche unabhängig vom Alkoholkonsum entstehen und die langfristig die Ausbildung einer Zirrhose oder eines hepatischen Karzinoms bedingen können. Die Arbeitsdiagnose einer NAFLD kann sonographisch anhand einer Lebervergrößerung sowie anhand erhöhter Leberenzymkonzentrationen (ALAT, ASAT, GGT) im Serum gestellt werden. Jedoch weisen 80 % der Patienten eine asymptomatische NAFLD auf, so dass lediglich eine Leberbiopsie das Vorliegen der Erkrankung gesichert belegt. Als Ursachen der Steatose sind die durch Insulinresistenz bedingte Akkumulation freier Fettsäuren und das gleichzeitig bestehende Ungleichgewicht zwischen *de novo* Lipidsynthese und hepatischem Fettsäure-Katabolismus (β -Oxidation) bekannt. Periphere und hepatische Insulinresistenz führen zu einer chronischen Hyperglykämie und Hyperinsulinämie, welche synergistisch die Umwandlung der Glukose in Fettsäuren (*de novo* Lipogenese) forcieren [74-77]. Der durch die Steatose („first hit“) induzierte oxidative Stress mit Ausbildung einer mitochondrialen Dysfunktion, verstärkter Lipidperoxidation und Inflammation („second hits“) kann zur Entstehung einer NASH führen („two hit model“) [75, 78]. Das übermäßige Angebot an freien Fettsäuren überschreitet hierbei die oxidative Kapazität der Mitochondrien, so dass Fettsäuren zudem in den Peroxisomen (β -Oxidation) und dem endoplasmatischen Retikulum (Cytochrom P450 Enzyme: CYP2E1 und CYP4A; ω -Oxidation) oxidiert werden. Im Zuge dieser alternativen Oxidationswege kommt es zur verstärkten Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS: reactive oxygen species), welche wiederum eine vermehrte Lipidperoxidation bedingen. Oxidativer Stress der Zellen (ROS und Lipidperoxidation) führt bei ungenügender antioxidativer Kapazität zur Zerstörung von zellulären Makromolekülen (nukleäre und mitochondriale DNA) sowie Phospholipidmembranen und induziert Inflammation, Nekrose und Apoptose. ROS induzieren NF κ B-abhängig die Produktion von TNF- α und weiteren pro-inflammatorischen Zytokinen [74-75]. Entsprechend weisen Patienten mit einer NASH im Vergleich zu denen mit einer Steatose signifikant höhere TNF- α Spiegel auf [79]. Eine direkte Aktivierung der Kupfferschen Sternzellen

EINLEITUNG

durch ROS und Lipidperoxidation kommt in der verstärkten Freisetzung von Kollagen und fibrinogenen Zytokinen (z.B. TGF-1 β) zum Tragen. Des Weiteren induziert der oxidative Stress eine hepatozytäre Apoptosereaktion, die über eine Kupfferzell-abhängige Phagozytose ebenfalls die Fibrogenese fördert [74-75].

1.4 Atherosklerose

Die Atherosklerose stellt eine progressive chronisch-entzündliche Erkrankung dar [80], die zu Gefäßschädigungen in Form von Verhärtung, Verdickung, Lumeneinengung und Elastizitätsverlust führt. Atherosklerotische Veränderungen manifestieren sich klinisch in Form von koronarer Herzkrankheit sowie zerebrovaskulären Erkrankungen, welche die führenden Todesursachen in den Industrienationen darstellen [81-83]. Die Entstehung der Atherosklerose (Atherogenese) wird durch eine Vielzahl an Risikofaktoren, wie Alter, familiäre Disposition, Adipositas, Diabetes, Hypercholesterinämie (insbesondere erhöhtes LDL- und erniedrigtes HDL-Cholesterin), Hypertonie und Rauchen begünstigt [82]. Gekennzeichnet ist die Atherosklerose durch Lipideinlagerungen und Ansammlungen glatter Muskelzellen in der Gefäßintima bei gleichzeitiger Infiltration dieser mit Makrophagen, die zur Formation atherosklerotischer Plaques führen.

Das Frühstadium der Atherogenese ist geprägt von einer endothelialen Dysfunktion [80], die sich durch eine Risikofaktoren-bedingte Endothelschädigung mit erhöhter Permeabilität und Einlagerung von LDL-Cholesterin in der subendothelialen Matrix auszeichnet. Die LDL-Partikel können über Oxidationsreaktionen modifiziert werden, wodurch eine Entzündungsreaktion ausgelöst wird [82, 84]. Oxidiertes LDL (oxLDL) induziert die Expression von Adhäsionsmolekülen, chemotaktischen Faktoren (z.B. MCP-1: Monocyte Chemotactic Protein-1) sowie Wachstumsfaktoren und hemmt die Produktion des gefäßprotektiven NO [82, 85-86]. „Advanced glycosylation endproducts“ (AGEs), die beim Diabetes mellitus durch nichtenzymatische Glykierung von Proteinen entstehen, sind ebenfalls in der Lage entzündliche Prozesse der Gefäßwand zu induzieren [87-88]. Selektine (P-selectin, E-selectin), chemotaktische Faktoren sowie die Adhäsionsmoleküle ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1) und VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1) vermitteln die Rekrutierung von Monozyten und deren Migration in die Intima. Unter dem Einfluss von M-CSF (macrophage colony-stimulating factor) differenzieren die Monozyten anschließend zu Makrophagen [82, 86, 89]. Die Gewebs-

EINLEITUNG

makrophagen nehmen das oxLDL über Scavenger Rezeptoren (z.B. SR-A und CD36), deren Expression unter anderem durch Zytokine wie TNF- α reguliert wird, auf [82, 90]. Die daraus folgende Anhäufung von Cholesterin in den Makrophagen führt zur Schaumzellenbildung, es entstehen makroskopisch sichtbare „fatty streaks“. Begleitet wird dieser Vorgang von einer Proliferation glatter Muskelzellen und einer Bindegewebsneubildung, hervorgerufen durch die von Makrophagen und T-Lymphozyten freigesetzten Zytokine und Wachstumsfaktoren. Glatte Muskelzellen migrieren aus der Media in die Intima und bilden zusammen mit Fibroblasten und extrazellulärer Matrix eine fibröse Kappe über der Läsion. Im weiteren Verlauf kann es zur Degradierung von extrazellulärer Matrix und der fibrösen Kappe infolge proteolytischer Enzyme (z.B. Metalloproteinasen) kommen. Eine erhöhte Instabilität und Rupturneigung des Plaques ist die Folge. Eine Ruptur geht mit der Aggregation von Thrombozyten einher und führt über den thrombotischen Gefäßverschluss zu einem Myokardinfarkt oder Schlaganfall [80, 82, 91-93].

2 INKRETINE

Inkretine sind gastrointestinale Hormone, die infolge der Nahrungsaufnahme von enteroendokrinen Zellen sezerniert werden und die Insulinfreisetzung stimulieren [94]. Bereits zu Beginn des 20. Jahrhunderts gab es Hinweise auf die Existenz von im Darm gebildeten Faktoren, die die Sekretion des endokrinen Pankreas fördern und darüber den Blutzuckerspiegel regulieren können [95-96]. Erst 1960 mit der Entwicklung des Radioimmunoassays zur exakten Bestimmung von Insulin konnte die Wirkung der Inkretine und damit das Bestehen der entero-insulären Achse bestätigt werden [94, 97]. Es wurde gezeigt, dass bei Erzielung gleicher Blutglukosespiegel eine orale Gabe von Glukose in einer stärkeren Insulinantwort resultiert als eine intravenöse Gabe [98-99]. Das beobachtete Phänomen wurde als „Inkretineffekt“ bezeichnet [100] (Abbildung 2). Man geht davon aus, dass 50-70 % der Insulinsekretion nach einer oralen Glukosebelastung auf die insulinotrope Wirkung der Inkretine an der β -Zelle entfallen [101-102]. Unter den bisher identifizierten Inkretinen stellen GIP (Glucose-dependent insulinotropic Polypeptide) und GLP-1 (Glucagon-like Peptide-1) die wichtigsten Vertreter dar und nehmen eine bedeutende Rolle in der Stimulation der Insulinsekretion beim Menschen ein [103-104].

EINLEITUNG

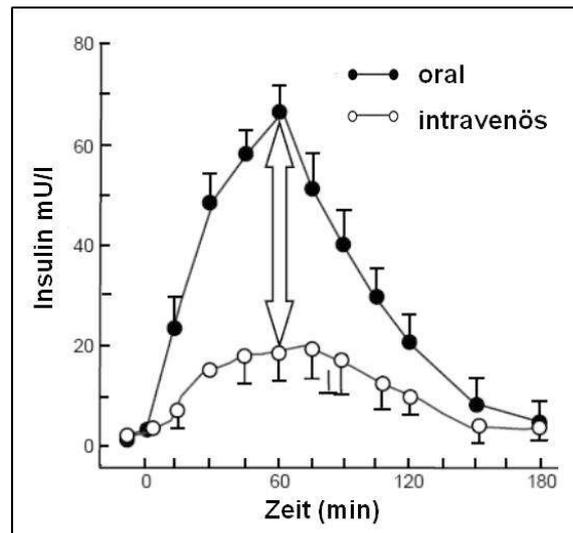


Abbildung 2: **Inkretineffekt** bei gesunden Personen; Insulinspiegel nach oraler und intravenöser Glukosegabe; entnommen aus [105]

2.1 Glucagon-like Peptide-1

2.1.1 Synthese und Sekretion

Synthese

Die Sequenz des GLP-1 ist im Proglukagon-Gen kodiert [106-107]. Dieses Gen ist auf dem langen Arm des Chromosoms 2 lokalisiert und wird im endokrinen Pankreas, Darm und Gehirn exprimiert. Die posttranslationale Prozessierung des Proglukagonmoleküls unterscheidet sich gewebespezifisch [108-111] (Abbildung 3). In den α -Zellen des Pankreas werden durch die Prohormonconvertase 2 (PC2) aus dem Proglukagon glicentin-related pancreatic peptide (1-30) (GRPP), Glukagon (33-61), intervening peptide 1 (64-69) (IP1) und das major pancreatic proglucagon fragment (72-158) (MPGF) gebildet [112]. Die PC2 gilt als essentielles Enzym für die Generierung von Glukagon [113-114]. Das MPGF beinhaltet die Sequenzen des GLP-1 sowie GLP-2 (Glucagon-like Peptide-2) und wird unter normalen Bedingungen im Pankreas nicht weiter zu diesen Peptiden aufgespalten [112]. Die Hauptmenge an GLP-1 wird in den enteroendokrinen L-Zellen distaler Darmabschnitte gebildet [115]. Im Darm als auch in verschiedenen Neuronen des Gehirns erfolgt die Prozessierung des Proglukagon über die Prohormonconvertase 1/3 (PC1/3) [111, 116]. Die Spaltung durch die PC1/3 führt zur Generierung von Glicentin (1-69), GLP-1 (72-108), intervening peptide 2 (111-123) (IP2) und GLP-2 (126-158). Aus Glicentin entsteht nachfolgend GRPP (1-30) und Oxynto-

EINLEITUNG

zung von GLP-1 stimulieren [124-125]. Welcher molekulare Mechanismus der GLP-1 Sekretion zu Grunde liegt, ist noch nicht vollständig verstanden. Für die biphasische Sekretion wird ein Zusammenspiel aus neuronalen Signalen, hormonalen Mediatoren und den Nahrungskomponenten diskutiert [125-127]. Die rasche Freisetzung des GLP-1 nach der Nahrungsaufnahme (15-30 min) wird vermutlich über neuronale Signale und hormonale Mediatoren vermittelt [120]. Die Dichte der GLP-1 produzierenden L-Zellen im Dünndarm- und Dickdarm steigt von proximal nach distal an [128]. Auf dieser Beobachtung aufbauend basiert die Annahme, dass der direkte Kontakt der L-Zellen mit den Nahrungskomponenten den zweiten verzögerten Peak der GLP-1 Sekretion (30-60 min) bewirkt [120]. In Ratten L-Zellen konnte eine Steigerung der GLP-1 Freisetzung durch Darmpeptide (GIP, CGRP: calcitonin gene related peptide, GRP: gastrin releasing peptide) und den Neurotransmitter Bethanecol gezeigt werden. Eine Inhibition der Sekretion ist dahingegen unter Somatostatin zu verzeichnen [129-130]. Die Stimulation der GLP-1 Ausschüttung durch GIP, wie sie in L-Zellkulturen [129-130] und *in vivo* bei Ratten [131] beschrieben wird, lies sich bisher noch nicht für den Menschen nachweisen [132-133]. Es bedarf weiterer Untersuchungen zur ganzheitlichen Aufklärung der nutritiven, endokrinen und neuralen Regulation der GLP-1 Sekretion.

2.1.2 Metabolismus

Das aktive GLP-1 (7-36amid und 7-37) besitzt eine sehr kurze Plasmahalbwertszeit von ein bis zwei Minuten [134-135]. Sowohl GLP-1 als auch GIP werden von der Dipeptidylpeptidase-4 (DPP4) degradiert [136]. Mentlein *et al.* zeigten 1993 erstmals, dass beide Inkretine *in vitro* durch humane Plazenta-DPP4 der Abspaltung von zwei N-terminalen Aminosäuren unterliegen. Aus der Inkubation der Peptide mit humanem Serum resultierten die gleichen Spaltprodukte, deren Bildung durch spezifische DPP4-Inhibitoren blockiert werden konnte [137]. Diese Daten wurden von Deacon *et al.* (1995) gestützt, die nach intravenöser und subkutaner Gabe von GLP-1 (7-36amid) den Metaboliten GLP-1 (9-36amid) im menschlichen Serum nachweisen konnten [138]. Sowohl GLP-1 als auch GIP weisen in der Aminosäuresequenz Alanin an zweiter Position auf und stellen daher ein geeignetes Substrat für die DPP4 dar [136]. Entsprechend entstehen nach DPP4-abhängiger Abspaltung von Histidin und Alanin aus den aktiven GLP-1 Formen (7-36amid und 7-37) die Metabolite GLP-1 (9-36amid) und GLP-1 (9-37) [137, 139-140].

EINLEITUNG

Die DPP4, auch bekannt als CD26, wird als membrangebundenes Enzym in unterschiedlichen Geweben exprimiert (Niere, Plazenta, Leber, Pankreas) und existiert zudem als lösliche Form im Plasma [136]. Das Vorkommen der DPP4 in der Bürstensaummembran der Enterozyten im Darm, im vaskulären Endothelium und im Plasma erklärt den schnellen Abbau des aktiven GLP-1 und damit die Tatsache, dass der Großteil des in der Blutbahn zirkulierenden GLP-1 in metabolisierter Form vorliegt [140]. Weniger als 25 % des sezernierten GLP-1 erreicht in aktiver Form die Leber, wo weitere 40-50 % degradiert werden, so dass lediglich 10-15 % des gebildeten aktiven GLP-1 in die posthepatische Zirkulation gelangt [112, 134]. Neben der Spaltung durch DPP4 kann aktives GLP-1 auch durch die Endopeptidase 24.11 (NEP 24.11), einer membrangebundenen Ektopeptidase, inaktiviert werden [141]. Der Metabolit GLP-1 (9-36amid), der eine sehr geringe Affinität zum GLP-1 Rezeptor aufweist, zeigt *in vitro* eine schwache antagonistische Wirkung an diesem [142], die sich jedoch beim Menschen nicht nachweisen lässt [143-144]. Eine weitere Ursache der kurzen Plasmahalbwertszeit des aktiven GLP-1 liegt in der Ausscheidung des Hormons über die Niere. Es werden sowohl aktives als auch metabolisiertes GLP-1 renal eliminiert [135, 145].

2.1.3 Physiologische Wirkungen des GLP-1

Gemäß den Kriterien für ein klassisches Inkretinhormon stimuliert GLP-1 die Insulinsekretion. Dieser insulintrophe Effekt ist Glukose-abhängig, wie erstmals 1985 von Schmidt *et al.* beschrieben und seitdem mehrfach bestätigt wurde [146-149]. Weiterhin trägt GLP-1 über die Inhibierung von Appetit, Magenentleerung und Glukagonsekretion zur Regulation der Glukosehomöostase bei [123]. Vermittelt werden diese Wirkungen über den GLP-1 Rezeptor, der zur Superfamilie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren mit sieben Transmembranregionen gehört [150]. Der GLP-1 Rezeptor wird in den α -, β - und δ -Zellen des Pankreas [151-153], in Magen, Lunge, Niere, Herz und in verschiedenen Bereichen des zentralen und peripheren Nervensystems exprimiert [154-156]. Die Existenz des GLP-1 Rezeptors in Leber, Skelettmuskel und Fettgewebe ist umstritten und vermutlich Spezies-abhängig [154-160]. Der Rezeptor weist eine hochspezifische Bindung für GLP-1 auf [150, 161] und ist zwischen Mensch und Ratte zu über 90 % homolog [162]. Ein Knockout des GLP-1 Rezeptors führt zu einer gestörten Nüchternglukose und einer verminderten Glukosetoleranz infolge einer reduzierten In-

EINLEITUNG

sulinsekretion [163]. Im Speichel der Echse *Heloderma suspectum* wurden zwei Peptide (Exendin-4 (1-39) und Exendin (9-39) identifiziert, die ebenfalls mit hoher Spezifität vom GLP-1 Rezeptor gebunden werden. Exendin-4 (1-39) wurde als starker Agonist und Exendin (9-39) als Antagonist des Rezeptors charakterisiert [162, 164-165].

Im Folgenden werden die pankreatischen und extrapancreatischen Wirkungen des GLP-1 näher beschrieben (Abbildung 4).

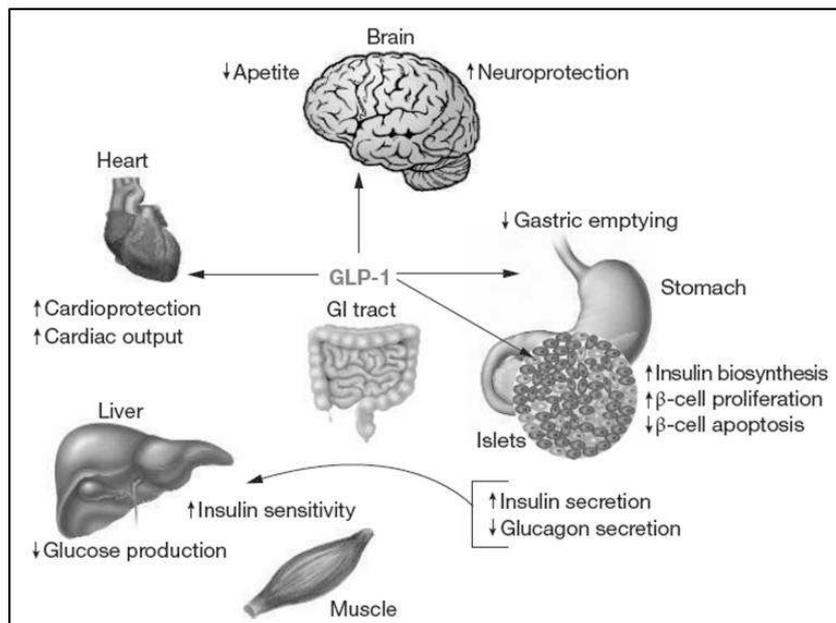


Abbildung 4: **physiologische Effekte des GLP-1**; GI = gastrointestinal; entnommen aus [115]

2.1.3.1 Pankreatische Wirkungen

Die Bindung des GLP-1 an den Rezeptor der β -Zelle stimuliert über eine G-Protein-Interaktion die Adenylat-Cyclase. Die daraus resultierende gesteigerte Konzentration des „second messenger“ cAMP (cyclisches Adenosinmonophosphat) führt zur Aktivierung der Proteinkinase A (PKA) und des Epac2 (cAMP-regulated guanine nucleotide exchange factor II). Eine Modulation der Ionenkanäle, mit nachfolgender Membrandepolarisierung und einem Calcium-Einstrom in die Zelle sind die Folge. Erhöhte Calcium-Konzentrationen führen in der β -Zelle zur Exozytose der Insulingranula [112, 166-167]. Neben der Insulinsekretion stimuliert GLP-1 ebenfalls Glukose-abhängig die Insulinproduktion über eine verstärkte Genexpression des Proinsulin [168]. Die Effekte des GLP-1 auf den Insulinpromotor werden über PKA-abhängige und -unabhängige Signalwege

EINLEITUNG

vermittelt [112, 169]. Ferner inhibiert GLP-1 die Glukagon- und aktiviert die Somatostatinsekretion [170]. Die Hemmung der Glukagonfreisetzung ist noch nicht vollständig geklärt. Neben den parakrinen inhibitorischen Effekten von Insulin und Somatostatin [171] wird eine direkte Hemmung der Glukagonsekretion durch GLP-1 diskutiert [112]. Die Hemmung der Glukagonfreisetzung erfolgt ebenfalls in Abhängigkeit vom Blutglukosespiegel. Bei Absinken in hypoglykämische Bereiche entfällt die inhibitorische Wirkung des GLP-1 und die homöostatische Gegenregulation des Glukagon bleibt erhalten [172]. Weiterhin werden positive Effekte des GLP-1 auf die β -Zellmasse beschrieben. Versuche mit humanen Inselzellen [173] und *in vivo* Studien mit Nagern [174-175] zeigen eine Stimulation der β -Zellproliferation sowie anti-apoptotische Effekte unter GLP-1. Es konnte außerdem mehrfach gezeigt werden, dass GLP-1 die Differenzierung embryonaler Stammzellen in Insulin-produzierende Zellen initiiert [176-178]. Der Transkriptionsfaktor PDX-1 (pancreatic and duodenal homeobox gene 1) nimmt sowohl bei der Vermittlung der proliferativen und zellprotektiven Effekte, als auch bei der Induktion von Zelldifferenzierung und Proinsulin-Transkription eine zentrale Rolle ein [176, 179-181]. Die Expression des PDX-1 und dessen Promotorbindung werden durch GLP-1 verstärkt [182]. Die zahlreichen durch GLP-1 Rezeptor-Aktivierung induzierten Signalwege in den pankreatischen Zellen werden im Einzelnen an dieser Stelle nicht näher erläutert.

2.1.3.2 Extrapankreatische Wirkungen

Gastrointestinaltrakt und Hypothalamus

Neben der Funktion des endokrinen Pankreas beeinflusst GLP-1 die gastrointestinale Motilität und das Sättigungsgefühl. GLP-1 verzögert die Magenentleerung [183] durch gleichzeitige Relaxation des Magenfundus, Stimulation des Pylorus und Hemmung der antroduodenalen Motilität [184-186]. Der Effekt wird vermutlich über vagale Afferenzen vermittelt [112, 187]. Die Verzögerung der Magenentleerung trägt zur Regulation der postprandialen Glukosespiegel durch GLP-1 bei [188]. Es konnte gezeigt werden, dass eine intrazerebroventrikuläre Administration von GLP-1 bei Nagern zu einer verminderten Nahrungsaufnahme führt und dieser Effekt durch Exendin (9-39) blockiert werden kann [189-190]. Unter chronischer GLP-1 Gabe ist dabei ein Gewichtsverlust zu verzeichnen [191]. Die durch GLP-1 induzierte Sättigung wird sowohl direkt als auch indi-

EINLEITUNG

rekt über die Magenentleerung vermittelt [192]. In Bereichen des Hypothalamus, die an Regulation von Appetit und Sättigung beteiligt sind, konnte der GLP-1 Rezeptor als auch die lokale Synthese des GLP-1 nachgewiesen werden [111, 190, 193-196]. Eine Beteiligung vagaler Affärenzen bei der Vermittlung des anorektischen Signals vom Gastrointestinaltrakt zum Hypothalamus wird ebenfalls diskutiert [197]. Die im Tiermodell beschriebenen Effekte wurden in klinischen Studien bestätigt. Unter GLP-1 Gabe wird das Sättigungsgefühl verstärkt und die zugeführte Nahrungsmenge vermindert [198-199].

Leber, Muskel und Fettgewebe

Für das GLP-1 werden „Insulin-ähnliche“ (insulinomimetische) Wirkungen, die unabhängig von der induzierten Insulinsekretion auftreten, in Leber, Skelettmuskulatur und Fettgewebe beschrieben. *In vitro* Versuche an isolierten Ratten-Hepatozyten zeigen eine durch GLP-1 stimulierte Glykogensynthese, die über eine Induktion der Glykogen Synthase-A vermittelt wird [200-201]. Sowohl im Mensch als auch beim Hund steigert eine GLP-1-Infusion Insulin-unabhängig die hepatische Glukoseaufnahme [202-203]. Die Überexpression von GLP-1 Rezeptor-Agonisten in adipösen Mausmodellen resultiert in der Suppression von Enzymen der Glukoneogenese (PEPCK, G6P) und der Fettsäuresynthese [204-205]. Im Skelettmuskel und in kultivierten Myocyten stimuliert GLP-1 ebenfalls die zelluläre Glukoseaufnahme und Glykogensynthese [206-208]. Neben dem erhöhten „Glukose-Uptake“ ist unter Einwirkung des Inkretinhormon in Adipozyten eine Modulation von Lipogenese und Lipolyse zu verzeichnen [157, 209-211]. Inwieweit die genannten Effekte über den bekannten „pankreatischen“ GLP-1 Rezeptor vermittelt werden, wird kontrovers diskutiert. Die Expression des Rezeptors in Leber, Muskel und Fettgewebe ist bisher nicht einheitlich geklärt [154-160]. Zudem werden mehrfach für GLP-1 Rezeptor-Agonisten induzierte Signaltransduktionswege in diesen Geweben beschrieben, die auf einen vom bekannten GLP-1 Rezeptor verschiedenen Mechanismus hindeuten [207, 209-214]. Hiermit übereinstimmend zeigen Versuche in Muskelzellen agonistische Wirkungen des Exendin (9-39) hinsichtlich Glukoseaufnahme und Glykogensynthese [206-207, 214]. Auf diesen *in vitro* Daten aufbauend basiert die Hypothese für die Existenz weiterer Rezeptoren für GLP-1, die jedoch bisher noch nicht identifiziert und charakterisiert wurden. Gestärkt wird diese Vermutung durch die extrapankreatischen Effekte des GLP-1 Metaboliten (9-36amid). So verbessert der

EINLEITUNG

GLP-1 Metabolit (9-36amid) die Glukose-Eliminationsrate nach Glukose-Infusion in Schweinen und führt zur Absenkung postprandialer Glukosespiegel beim Menschen. Dieser Effekt lässt sich jedoch nicht über einer Veränderung der Insulin- und Glukagonsekretion oder eine unveränderte Magenentleerung erklären [183, 215]. Elahi *et al.* (2008) konnten in Clamp-Versuchen durch die Administration von GLP-1 (9-36amid) eine 50 %ige Reduktion der hepatischen Glukoseproduktion in übergewichtigen Insulin-resistenten Personen nachweisen [216]. In anderen Studien ließ sich eine Wirkung des GLP-1 Metaboliten auf den Glukosemetabolismus jedoch nicht bestätigen [143, 217]. Zu untersuchen bleibt, ob GLP-1 Insulin-unabhängig die Glukosehomöostase reguliert, in wieweit dies über die metabolisierten Formen vermittelt wird und ob in diesem Zusammenhang die Beteiligung verschiedener Rezeptoren für GLP-1 (7-36amid, 7-37, 9-36amid, 9-37) eine Rolle spielen.

Herz und Gefäßsystem

Eine Expression des GLP-1 Rezeptor in kardiovaskulären Geweben und in autonomen Nuklei des zentralen Nervensystem ist belegt [156, 218-219]. GLP-1 Rezeptor Knock-out-Mäuse weisen eine myokardiale Hypertrophie, diastolische Dysfunktion und Veränderungen der Ruheherzfrequenz auf [220-221]. Zudem führt sowohl die periphere als auch zentrale Gabe von GLP-1 Rezeptor-Agonisten über das autonome Nervensystem zu einem Anstieg der Herzfrequenz und des Blutdrucks [218, 222]. Aktuelle Studien verweisen auf kardioprotektive Wirkungen des GLP-1, die unabhängig vom autonomen Nervensystem vermittelt werden [221, 223]. GLP-1 verbessert sowohl im akuten Ischämie/Reperfusion- als auch in chronischen Kardiomyopathie-Modellen die Pumpfunktion des Herzens und führt zu einer Reduktion der Infarktgröße [219, 224-227]. Auch unter klinischen Bedingungen konnte gezeigt werden, dass eine GLP-1 Administration für 72 Stunden nach akutem Myokardinfarkt und Angioplastie kardioprotektiv wirkt [221, 228]. Ban *et al.* (2008) gehen davon aus, dass die Vermittlung der kardiovaskulären Wirkungen des GLP-1 über zwei Signalwege erfolgt [219]. Die Aktivierung des GLP-1 Rezeptors bewirkt hierbei eine Verbesserung der myokardialen Funktion über eine verbesserte Glukoseaufnahme der Kardiomyozyten [229], eine ischämische Präkonditionierung und leichte vasodilatatorische Wirkungen. Interessanterweise wirkt das metabolisierte GLP-1 über eine postischämische Konditionierung und NO-vermittelte Vasodilatation ebenfalls kardioprotektiv. Entsprechend verbessert GLP-1 (9-36amid) bei

EINLEITUNG

postischemischer Gabe in gleicher Weise wie GLP-1 (7-36amid) die myokardiale Funktion, was unverändert in GLP-1 Rezeptor Knockout-Mäusen nachweisbar ist. Die durch GLP-1 (9-36amid) induzierte Vasodilatation wird über eine cGMP (cyclisches Guanosinmonophosphat) abhängige NO Freisetzung realisiert [219]. Die für den GLP-1 Metaboliten (9-36amid) beschriebenen kardioprotektiven Effekte [219, 227, 230] sprechen erneut für die Existenz eines weiteren bisher nicht identifizierten Rezeptors.

2.2 GLP-1 in der Therapie des Typ 2 Diabetes

Bereits 1986 wurde von Nauck *et al.* gezeigt, dass der Inkretineffekt bei Typ 2 Diabetikern deutlich vermindert oder nicht existent ist [99]. Zur Erklärung dieser Beobachtung wurden die Sekretion, Wirkung und Metabolisierung von GLP-1 und GIP bei Patienten mit T2D näher untersucht. Für GIP zeigte sich bei unveränderter bis leicht erhöhter Sekretion eine Störung der insulinotropen Wirkung [231-232]. Eine Runterregulation und / oder Desensibilisierung der GIP-Rezeptoren werden hierfür als Ursachen diskutiert [232-233]. Unterschiede in der Eliminationsrate von GIP und GLP-1 wurden beim T2D nicht gefunden [135, 234]. Für GLP-1 konnte eine verminderte postprandiale Sekretion bei Patienten mit T2D festgestellt werden [235-236]. Jüngste Studien liefern darüber hinausgehend Hinweise für eine verminderte Wirkung des GLP-1 bei Typ 2 Diabetikern, die im Zusammenhang mit Varianten oder einer verminderten Expression des Transkriptionsfaktor 7-like-2 (TCF7L2) steht. Polymorphismen im TCF7L2-Gen sind mit gestörter Insulinsekretion und T2D assoziiert [237-238]. Es wurden Varianten des TCF7L2 identifiziert, die mit einer verminderten GLP-1-Sensitivität der β -Zelle einhergehen [239-240]. Weiterhin wird eine Korrelation zwischen erniedrigten Konzentrationen des TCF7L2 und der Runterregulation der GIP und GLP-1 Rezeptoren beschrieben [241]. Adipositas und chronische Hyperglykämie induzieren zudem einen Anstieg der DPP4-Aktivität im Plasma [242-243]. Demnach ist der verminderte Inkretineffekt beim T2D in einem Sekretionsdefekt, einer verstärkten Degradierung und / oder einer relativen Inkretinresistenz begründet. Um zu prüfen, ob über eine pharmakologische Modulation des Inkretinsystems eine Verbesserung des Glukosemetabolismus erreicht werden kann, wurde bei Typ 2 Diabetikern sowohl eine kontinuierliche Infusion von GIP als auch GLP-1 als therapeutische Option erprobt. Eine Verbesserung der prandialen Insulinsekretion konnte dabei selbst unter supraphysiologischen Dosen an GIP nicht erzielt

werden [244]. Hingegen bewirkte die kontinuierliche Applikation (intravenös oder subkutan) von GLP-1 eine Absenkung der Nüchtern- und postprandialen Glukosespiegel sowie eine Verbesserung der β -Zell-Funktion und des HbA1c [245-246]. Eine Langzeittherapie mit nativen GLP-1 würde jedoch infolge der kurzen Halbwertszeit des Inkretins eine kontinuierliche Applikation erfordern, die auf Dauer klinisch inpraktikabel ist. Demnach wurden einerseits GLP-1 Rezeptor-Agonisten mit deutlich längerer Halbwertszeit als auch DPP4-Inhibitoren entwickelt.

2.2.1 GLP-1 Rezeptor-Agonisten

Exenatide (Byetta[®], Lilly Pharma) wurde als erster GLP-1 Rezeptor-Agonist 2005 von der Food and Drug Administration (FDA) in der Therapie des T2D zugelassen [192]. Als synthetische Form des Exendin-4 besitzt es eine 53 %ige Homologie zum humanen aktiven GLP-1 [247] (Abbildung 5). Exendin-4 weist in der Aminosäuresequenz Glycin an zweiter Position auf, so dass eine Resistenz gegen eine DPP4-Degradierung besteht, die in einer erhöhten Plasmahalbwertszeit *in vivo* im Vergleich zu GLP-1 resultiert [247-249]. GLP-1 Rezeptor-Agonisten werden als Injektionslösung subkutan appliziert. Nach Injektion des Exenatide sind über fünf-sechs Stunden erhöhte Plasmaspiegel zu verzeichnen, so dass eine zweimalige Administration pro Tag erforderlich ist [248]. Ein weiterer zugelassener GLP-1 Rezeptor-Agonist mit einmaliger täglicher Administration ist Liraglutide (Victoza[®], Novo Nordisk). Liraglutide ist ein Analog des körpereigenen aktiven GLP-1 (7-37), das eine Aminosäuresubstitution (Arginin³⁴ statt Lysin) und Fettsäureaddition (Lysin²⁶, Palmitinsäure) aufweist (Abbildung 5). Über diese Modifikationen wird die Bindung des zirkulierenden Peptides an Serum-Albumin gewährleistet. Die dadurch erzielte Verminderung der renalen Elimination und DPP4 Degradierung [250-251] resultiert in einer Plasmahalbwertszeit des Liraglutide von 13 Stunden [252]. Liraglutide sowie Exenatide binden mit gleicher oder höherer Affinität als aktives GLP-1 an den GLP-1 Rezeptor [164, 250]. Übereinstimmend mit der bekannten GLP-1 Physiologie bewirkt die einmalige Gabe beider Komponenten eine Stimulation der Glukose-abhängigen Insulinsekretion, eine Hemmung der Glukagonausschüttung und eine Verzögerung der Magenentleerung [248, 253]. In klinischen Studien wurden Exenatide und Liraglutide als Mono- und Kombinationstherapie bezüglich Wirkspektrum, Effizienz und Sicherheit geprüft. In Kombinationstherapie mit einem oralen Antidiabetikum senkt

EINLEITUNG

Exenatide den HbA1c durchschnittlich um 1 % [192, 254] und Liraglutide um bis zu 1,5 % [249]. Beide Substanzen führen zu einer Reduktion der nüchternen und postprandialen Glukosespiegel, zur Gewichtsabnahme sowie zur milden Absenkung des systolischen und diastolischen Blutdrucks [255-258]. Eine Verbesserung der β -Zellfunktion, erfasst über Proinsulin-Insulin-Ratio, HOMA-Index, C-Peptid sowie Clamp-Technik, wird unter der Behandlung mit Exenatide als auch Liraglutide beobachtet [256-257, 259-260]. Unter der Therapie beider GLP-1 Rezeptor-Agonisten zeigt sich eine Verbesserung des Lipidprofils bei Typ 2 Diabetikern. Während Liraglutide zur Absenkung der Triglyzeridspiegel führt [261], ist unter Exendin-4 zudem eine Senkung des Gesamtcholesterins und LDL-Cholesterins als auch eine Erhöhung des HDL-Cholesterins zu verzeichnen [256, 262-263]. Interessanterweise zeigen GLP-1 Rezeptor-Agonisten auch anti-inflammatorische Effekte, die sich sowohl in Makrophagen, Endothelzellen als auch Inselzellen nachweisen lassen [264-266].

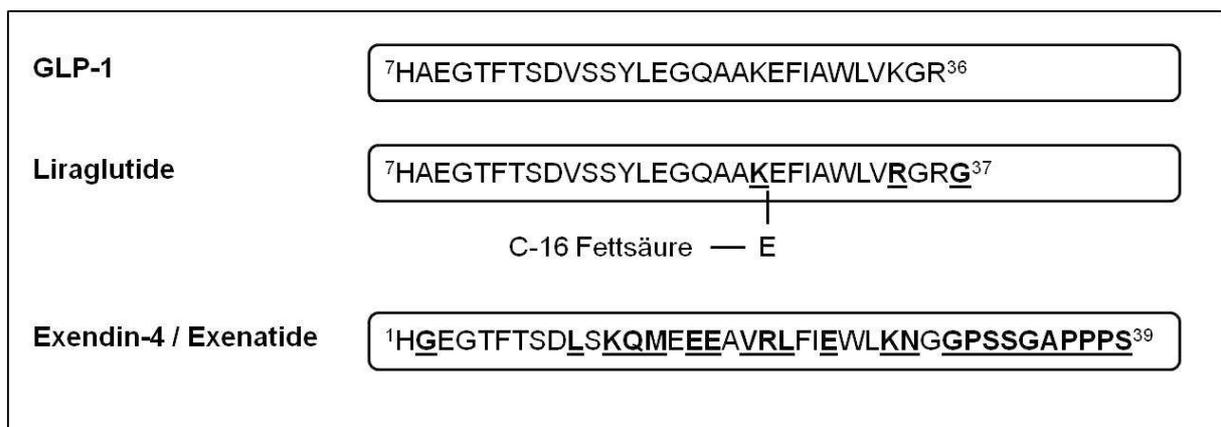


Abbildung 5: **Aminosäuresequenz des physiologischen GLP-1, Liraglutide und Exendin-4 / Exenatide**; Peptidsequenz im Ein-Buchstaben-Code; Unterschiede zwischen den Sequenzen sind unterstrichen und fett dargestellt; entnommen aus [267]

Nebenwirkungen, die vorübergehend bei der Anwendung der genannten GLP-1 Rezeptor-Agonisten auftreten können, sind von mildem Ausmaß und betreffen den Gastrointestinaltrakt (Übelkeit, Erbrechen und Diarrhö) [249, 255, 257]. Die Gefahr einer Hypoglykämie ist unter der Behandlung mit GLP-1 Rezeptor-Agonisten gering. Eine Metaanalyse ergab, dass Monotherapien zu keiner Erhöhung des Hypoglykämie-Risiko führen, erwartungsgemäß jedoch eine erhöhte Inzidenz der Hypoklykämie bei Kombinationstherapien mit Sulfonylharnstoffen zu verzeichnen ist [268].

EINLEITUNG

Kürzlich erhielt Exenatide LAR (LAR: long-acting release oder Exenatide once weekly; Bydureon[®], Lilly Pharma) die Zulassung der europäischen Arzneimittelbehörde [269]. In dieser Injektionslösung liegt der Wirkstoff Exenatide verkapselt in Microspheres (Mikrokugeln) vor, die subkutan aggregieren und eine kontinuierliche Freisetzung und damit gleichmäßige Plasmakonzentration des Exenatide gewährleisten. Der Vorteil dieser Formulierung besteht vor allem darin, dass lediglich eine Injektion pro Woche notwendig ist [270]. Weitere sich zurzeit in der Entwicklung und Prüfung befindende GLP-1 Rezeptor-Agonisten sind Lixisenatide und Albiglutide. Während Lixisenatide einer täglichen Administration bedarf, ist bei Albiglutide infolge dessen sehr langer Halbwertszeit lediglich eine einmalige Injektion pro Woche notwendig [270-271]. In Vergleichsstudien wurde gezeigt, dass Behandlungen mit GLP-1 Rezeptor-Agonisten mit gleicher Effizienz wie eine Insulintherapie den HbA1c senken [268]. Der positive Effekt auf das Körpergewicht zeichnet die GLP-1 Rezeptor-Agonisten im Vergleich zu Sulfonylharnstoffen, Glitazonen sowie Insulin aus und macht diese somit zu einer effektiven Substanzklasse mit sehr gutem Wirkspektrum in der Therapie des T2D.

2.2.2 DPP4-Inhibitoren

Die DPP4 ist über die Spaltung des GLP-1 und GIP in die Regulation der Glukosehomöostase involviert [272]. Der genetische Knockout der DPP4 in Nagern resultiert in einer verbesserten Glukosetoleranz, einer gesteigerten Glukose-stimulierten Insulinsekretion und erhöhten Spiegeln an aktivem GLP-1 [273]. Basierend auf den anti-diabetischen Effekten des GLP-1 wurden verschiedene Inhibitoren der DPP4, sogenannte „Gliptine“, entwickelt. Bisweilen sind vier Vertreter (Tabelle 2) dieser neuen Substanzklasse der oralen Antidiabetika auf dem europäischen Markt zugelassen. Die Gliptine sind oral aktiv und führen zur kompetitiven sowie reversiblen Hemmung der DPP4 [274-278]. Vildagliptin und Saxagliptin werden in der Leber größtenteils metabolisch inaktiviert beziehungsweise aktiviert und anschließend über die Niere ausgeschieden. Der DPP4-Inhibitor Sitagliptin wird nahezu vollständig in unveränderter Form renal eliminiert, so dass eine Niereninsuffizienz mit der Erhöhung der Serumspiegel des Gliptin einhergeht [277]. Linagliptin erhielt erst kürzlich (August 2011) die Zulassung in Europa und weist den Vorteil auf, dass es bei einer vorliegenden Nierenfunktionsstörung infolge der überwiegend biliären Exkretion keiner Dosisanpassung bedarf [278-279].

EINLEITUNG

Tabelle 2: **zugelassene DPP4-Inhibitoren**

Sitagliptin (MK-0431)	Januvia®	Merck
Vildagliptin (LAF237)	Galvus®	Novartis
Saxagliptin (BMS-477118)	Onglyza®	Bristol-Myers-Squibb / Astra Zeneca
Linagliptin (BI-1356)	Tradjenta®	Boehringer Ingelheim

Präklinische und klinische Studien belegen eine effiziente Hemmung der DPP4-Aktivität unter Gliptingabe [280-282]. Daraus resultiert beim Menschen eine Erhöhung der aktiven GLP-1 Spiegel auf 15-25 pM sowohl postprandial als auch über 24 Stunden [280, 283]. Basierend darauf ist unter DPP4-Inhibitoren eine gesteigerte Insulin- und reduzierte Glukagonsekretion und demzufolge ein Hemmung der hepatischen Glukoseproduktion zu verzeichnen [280, 283-288]. In verschiedenen Diabetes- und Insulinresistenz-Tiermodellen wurde gezeigt, dass Gliptine neben der Verbesserung der Glukosetoleranz die β -Zellmasse erhöhen [281, 286-287]. In Humanstudien konnten diese trophischen und regenerativen Effekte auf die β -Zelle bisher nicht nachgewiesen werden. Als Monotherapie bei Patienten mit T2D eingesetzt bewirken die DPP4-Inhibitoren eine Absenkung der Nüchternglukose (um durchschnittlich 18 mg/dl) und postprandialer Glukoselevel (18-27 mg/dl) [289-290]. Eine Metaanalyse von Monami *et al.* (2009) belegt für Therapien mit Vildagliptin und Sitagliptin eine durchschnittliche Verbesserung des HbA1c um 0,7 % [268]. In der ersten klinischen Monotherapie-Studie mit Saxagliptin wurde mit verschiedenen Dosen eine vergleichbare Absenkung des HbA1c (0,45 %-0,73 %) erreicht [290]. Weiterhin erweisen sich DPP4-Inhibitoren in Kombination mit Metformin, Thiazolidindionen, Sulfonylharnstoffen und Insulin als effektive und sichere anti-diabetische Therapie. Wesentliche Vorteile der DPP4-Inhibitoren im Vergleich zu anderen oralen Antidiabetika bestehen in ihrer „Gewichtsneutralität“ und guten Verträglichkeit sowie dem fehlenden Hypoglykämie-Risiko [277, 279]. Im Tiermodell bewirken DPP4-Inhibitoren eine Reduktion der Serum-Triglyzeride [286, 291]. Bestätigt wurde dieser Effekt von Matikainen *et al.* (2006), die nach 4wöchiger Vildagliptin-Behandlung bei Typ 2 Diabetikern eine Absenkung postprandialer Triglyzeridspiegel aufzeigten [292]. Klinisch wurde zudem unter Gliptinbehandlung eine Reduktion des Gesamtcholesterins festgestellt [293]. Für Sitagliptin ergaben sich bereits Hinweise auf kardioprotektive Effekte in einem akuten Kardiomyopathiemodell bei Nagern [294] und anhand einer Dobutamin- Stress- Echokardiographie bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit [295]. Nebenwirkungen, die unter chronischer Gliptinbehandlung vermehrt

EINLEITUNG

auftreten, sind Entzündungen des Nasen-Rachen Raumes und Harnwegsinfektionen [279, 296]. Eine Expression der DPP4 auf Lymphozyten und damit deren Beteiligung an immunologischen Prozessen wirft Bedenken bezüglich der Langzeittherapie mit DPP4-Inhibitoren auf. Bisher konnten jedoch keine immundepressiven Effekte unter Gliptinbehandlung nachgewiesen werden [136]. Begründet in der Tatsache, dass die DPP4 eine Vielzahl an gastrointestinalen Hormonen, Neuropeptiden und Chemokinen (z.B. GLP-2, Neuropeptid Y, PYY, CCL22, RANTES, SDF-1) spaltet [136, 297], wird eine Funktion der Gliptine über die Regulation der Glukosehämöostase und das GLP-1 System hinausgehend angenommen [277].

3 ADENO-ASSOZIIERTE VIREN

Adeno-assoziierte Viren (AAV) wurden 1965 als Kontamination von Adenoviruspräparationen entdeckt [298]. Als Vertreter der Gattung Dependovirus gehören sie zur Familie der Parvoviridae. Für die Replikation und Einleitung eines produktiven Infektionszyklus sind AAV auf die Koinfektion der Wirtszelle durch Helferviren angewiesen. Als Helferviren können dabei Adenoviren und Vertreter der Herpesvirusgruppe fungieren [299-301]. In Abwesenheit der Helferfunktionen wird eine Zelle zwar mit AAV infiziert, jedoch ruht das übertragene AAV-Genom integriert im Wirtsgenom (latente Infektion) [302]. Die Funktion der Helferviren kann zumindest teilweise durch chemische Substanzen oder UV-Bestrahlung ersetzt werden [303-304]. AAV haben eine hohe Seroprävalenz beim Menschen. Rund 80 % der Bevölkerung sind seropositiv für den AAV des Serotyp 2 [305]. Dennoch sind diese Infektionen bisher mit keiner bekannten Krankheit beim Menschen assoziiert [306].

3.1 Genomorganisation

Die AAV sind einzelsträngige DNA-Viren. Das 4,7 kb große Genom wird von einem unbehüllten ikosaedrischen Kapsid umgeben und trägt zwei offene Leserahmen (open reading frame, ORF) „rep“ und „cap“ (Abbildung 6). Der Leserahmen „rep“ kodiert für vier regulatorische Rep-Proteine (Rep78, Rep68, Rep52, Rep40), die an der spezifischen Integration, der Replikations- und Transkriptionskontrolle sowie an der Verpackung der DNA beteiligt sind [302, 307]. Die Strukturproteine VP1, VP2 und VP3 sind im

EINLEITUNG

3'-gelegenen Leserahmen „cap“ kodiert und bilden das rund 22 nm große Kapsid (Cap-Proteine). Gesteuert wird die Transkription der AAV-Gene von drei Promotoren. Den Promotoren p5 und p19 unterliegen die Rep-Proteine. Die Cap-Proteine stehen unter der Kontrolle des p40 Promotor, haben ein gemeinsames Stopkodon und werden über alternatives Spleißen generiert. Die hauptsächlich vorliegende Spleißvariante kodiert für die Proteine VP2 und VP3. Die Translation von VP3 startet vom ATG Startkodon, während die von VP2 an einem weiter stromaufwärts gelegenen in wenigen Fällen benutzen ACG Kodon startet. Die seltenere Spleißvariante VP1 umfasst den gesamten ORF „cap“. Daraus ergibt sich ein Mengenverhältnis für VP1:VP2:VP3 von 1:1:10, wie es auch in den Kapsiden vorliegt [301, 306, 308].

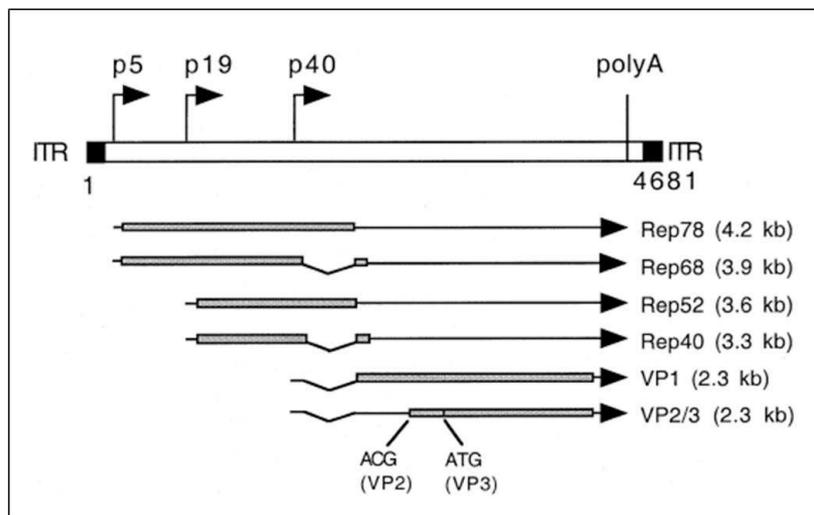


Abbildung 6: **Genomorganisation und Transkripte des AAV**; Wildtyp AAV Genom: Promotoren (p5, p19 und p40), Polyadenylierungsstelle (PolyA) und ITR's (inverted terminal repeat); darunter mRNA's: dicke Balken sind codierende Bereiche, dünne Linien sind untranslatierte Bereiche, Zacken = Introns; entnommen aus [309]

Das AAV-Genom wird beidseitig von invertierten terminalen Wiederholungen (ITR: inverted terminal repeat) flankiert. Die ITR's bilden infolge palindromischer Sequenzabschnitte charakteristische Haarnadelstrukturen aus [310]. Sie dienen als Replikationsstart und sind bedeutsam für Verpackung der Virus-DNA und spezifische Integration. Durch Zerstörung der Palindrom-Sequenzen kann das Genom nicht mehr repliziert werden [306-308].

3.2 Infektionsbiologie

Die virale Infektion umfasst die rezeptorvermittelte Endozytose des Virus, den intrazellulären Transport und die im Zellkern stattfindende Replikation oder Integration des viralen Genoms. Am besten charakterisiert ist der Infektionsprozess des AAV Serotyp 2 (AAV-2) [302]. Als Primärrezeptor für AAV-2 fungiert das Heparansulfat-Proteoglykan (HSPG) [311]. Zur Unterstützung der Internalisation finden weitere Kontakte mit Ko-Rezeptoren statt. Als solche identifiziert wurden Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptor 1 (FGFR-1), Hepatozyten-Wachstumsfaktor-Rezeptor (HGFR), Laminin-Rezeptor und Integrine ($\alpha V\beta 5$, $\alpha 5\beta 1$). Vermutlich verstärken FGFR-1, HGFR und Laminin-Rezeptor die Bindung des Virus an HSPG, während die Integrine die Clathrin-vermittelte Endozytose induzieren [312-315]. Die nachfolgenden intrazellulären Prozesse sind noch nicht vollständig verstanden. Es gibt Hinweise, dass eine Reorganisation von Mikrofilamenten und Mikrotubuli stattfindet, welche den Transport des AAV-2 zum Zellkern initiiert [313]. Die Freisetzung des Virus aus den Endosomen erfolgt über eine Konformationsänderung der viralen Kapselproteine durch Absenkung des endosomalen pH-Wertes. Ob die im perinukleären Raum akkumulierenden Viren vor, während oder nach Kerneintritt ihr Genom aus dem Kapsid freisetzen, bedarf weiteren Untersuchungen. Im Zellkern erfolgt in Anwesenheit eines Helfervirus die Replikation (lytischer Zyklus). Ohne Helfervirus wird der latente Lebenszyklus des AAV-2 mit spezifischer Integration des Genoms auf Chromosom 19 initiiert. Integrierte AAV können über eine Infektion mit Helferviren aktiviert und in den lytischen Zyklus überführt werden [302]. Man geht davon aus, dass die viralen Vektoren, die auf AAV-2 beruhen, Zellen analog zum Wildtyp transduzieren.

3.3 Serotypen

Es wurden bisher 14 Serotypen der AAV, die als Kontamination aus Adenoviruspräparationen oder aus Geweben von Nagern, Affen oder Menschen isoliert wurden, beschrieben. Die Serotypen unterscheiden sich in ihrer Gewebespezifität und ihrer Reaktion auf neutralisierende Antikörper. Dies ist auf Unterschiede im viralen Kapsid, das für die Infektionsspezifität und Antigenpräsentation verantwortlich ist, zurückzuführen [302]. In Abhängigkeit vom Kapsid variiert die zelluläre Aufnahme und der intrazelluläre Transport [301]. AAV-2 transduziert eine Vielzahl von Geweben (Muskel, Lunge, zentra-

EINLEITUNG

les Nervensystem, Leber), jedoch mit moderater Effizienz [301]. Im Vergleich zeigen die Serotypen eins und sieben im Skelettmuskel eine sehr viel höhere Transduktionseffizienz [316]. Gut geeignet sind AAV-4 für Gehirn, AAV-5 für Lunge, Augen, Leber und zentrales Nervensystem sowie AAV-6 für Muskel, Herz und Lungenepithel. AAV-8 transduziert Muskel, Pankreas sowie Herz [302] und weist eine 16-110fach höhere Effizienz in der Transduktion von Leberzellen im Vergleich zu anderen Serotypen auf [316-317]. Infolge dessen haben sich die Methoden der „Pseudotypisierung“, „Mosaik-rAAV“, „Chimär-rAAV“ und der „Target-rAAV“ zur gezielten Modifikation des Gewebetropismus entwickelt. Bei der „Pseudotypisierung“ („Cross-Packaging“) des AAV-2-Vektors wird das rekombinante AAV-2 Genom in das Kapsid eines anderen Serotyps mit gewünschter Gewebespezifität verpackt. Dabei entstammen die ITR's und Rep-Proteine dem AAV-2, die Cap-Proteine (Kapsid) werden von einem anderen Serotypen zur Verfügung gestellt. Bei den „Mosaik-rAAV“ und „Chimär-rAAV“ stellt das Kapsid eine Mischung aus Cap-Proteinen verschiedener Serotypen dar oder wird durch den Austausch von Domänen erzeugt. Um gezielt und spezifisch Gewebe zu transduzieren, werden „Target-rAAV“ eingesetzt. Die Kapside dieser Vektoren werden über Insertion (genetisch, Peptid-Ligand) oder Ankopplung eines Liganden (nichtgenetisch) modifiziert. Über die Liganden soll eine spezifische Rezeptorbindung im Zielgewebe realisiert werden [302].

3.4 Produktion rekombinanter AAV

Der erste AAV-2 Vektor wurde 1982 von Samulski *et al.* [318] entwickelt, seitdem basieren die am häufigsten verwendeten Vektorsysteme auf dem AAV Serotyp 2 [301, 306]. Für die Replikation und Verpackung von AAV-Vektoren ist es notwendig, dass neben den Helferviren die invertierten terminalen Wiederholungen sowie die viralen Replikations- und Kapsid-Proteine vorhanden sind. AAV-Vektoren werden generiert, indem alle AAV-Sequenzen, mit Ausnahme der ITR's (*cis* Elemente) deletiert und durch das gewünschte Transgen ersetzt werden (rAAV: rekombinante AAV). Die Rep- und Cap-Gene (*trans* Elemente) werden auf einem Helferplasmid zur Verfügung gestellt (Abbildung 7) [308]. Die Größe der insertierten Transgenexpressionskassette ist limitiert. Übersteigt die Gesamtgröße des AAV-Genom 110-119 % des Wildtyp-Genom, ist ein Abfall der Virusausbeute zu verzeichnen [319-320]. Ursprünglich wurde die Produktion von rAAV über eine Koinfektion mit Adenoviren realisiert. Diese machte eine auf-

EINLEITUNG

wendige Aufreinigung der rAAV Präparation zur Entfernung der Immunreaktion auslösenden Adenoviren notwendig. Basierend auf den Vorarbeiten von Xiao *et al.* (1998) [321] ist es heute möglich Adenovirus-Helferplasmide, die alle notwendigen Helfergene tragen, zu verwenden. Für die Herstellung der adenovirusfreien rAAV sind folgenden Komponenten notwendig [301]:

- AAV-Vektor mit Transgenexpressionskassette flankiert von zwei ITR's
- AAV-Helferplasmid mit Leserahmen „rep“ und „cap“
- Adenovirus-Helferplasmid mit den Genen E2A, E4 und VA-RNA [321-322]
- HEK-293-Zellen (HEK: human embryonic kidney; Expression des Adenovirusgen E1) [321-322]

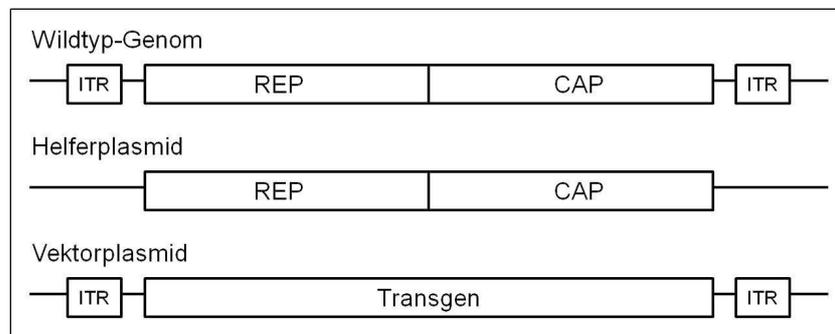


Abbildung 7: **Schematische Darstellung von Wildtyp AAV-Genom, Helferplasmid und rAAV Vektor**

Die drei Plasmide werden in HEK-293-Zellen, eine humane Nierenzelllinie, kotransfiziert (Abbildung 8). Die Sequenzen der AAV-Gene im Helferplasmid werden in den transfizierten Zellen transkribiert und zu Rep- und Cap-Proteinen translatiert. Das therapeutische Gen des Vektors wird als Einzelstrang in das Viruskapsid verpackt. Die Vektoren können anschließend aus den HEK-293-Zellen isoliert und über Dichtegradientenzentrifugation (Cäsiumchlorid, Iodixanol) oder Säulenchromatographie aufgereinigt werden [302].

EINLEITUNG

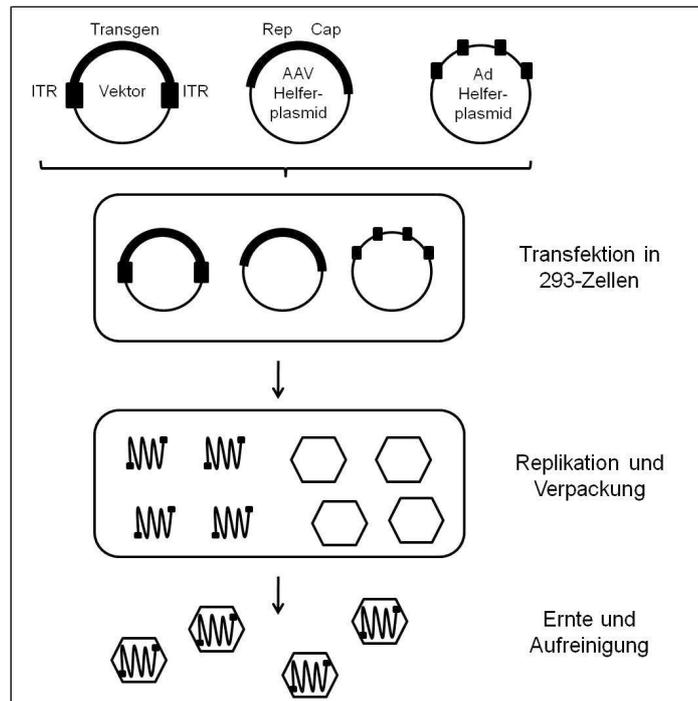


Abbildung 8: **Fließschema zur Herstellung von rAAV ohne Adenoviren**; Vektorplasmid mit ITR-flankiertem Transgen, AAV-Helferplasmid mit Leserahmen „rep“ und „cap“ und Adenovirus-Helferplasmid

3.5 AAV als Vektor in der Gentherapie

Die Gentherapie entwickelt sich auf dem Konzept, genetisch-bedingte Fehlfunktionen über das Einbringen therapeutischer Gene zu korrigieren. Realisiert wird der Gentransfer über nicht-virale Vehikel (z.B. Liposomen) oder virale Vektoren, die sich durch eine erheblich bessere Transduktionseffizienz auszeichnen [323]. Im Vergleich zu anderen viralen Vektoren besitzen AAV-2 Vektoren viele Vorteile, die im Folgenden angeführt sind:

- fehlende Pathogenität [301]
- geringe Immunogenität: rAAV lösen eine humorale Immunantwort aus. Eine zelluläre Immunantwort (zytotoxische T-Lymphozyten) wird lediglich minimal induziert. Begründet ist dies in der geringen Infektionseffizienz Antigen-präsentierender Zellen und dem weitestgehenden Fehlen viraler Gene und Genprodukte [324-327].
- Infektion proliferierender und postmitotischer Zellen verschiedener Gewebe [308, 328-329]

EINLEITUNG

- sicheres Vektorsystem: Über Trennung von trans- (Rep- und Cap-Proteine) und cis-aktiven Elementen (ITR) kann eine Rekombination nahezu ausgeschlossen werden.
- Langzeitexpression des Transgens *in vivo*: Genexpression mittels rAAV über ein Jahr hinaus realisierbar [324, 330-331]
- geringe Integration des rAAV-Genoms in das Genom der Wirtszelle: Nach intramuskulärer Injektion von Mäusen lagen mehr als 99,5 % der AAV-DNA episomal vor [332].
- Über „Pseudotypisierung“ kann eine bessere Transduktion des Zielgewebes erreicht und die Produktion neutralisierender Antikörper gegen das AAV-2 Genom umgangen werden [308].

Von Nachteil ist die limitierende Größe des AAV-2 Vektors, die auf eine geringe Flexibilität der Kapsel zurückzuführen ist [308]. Weiterhin kommt es *in vivo* nach Applikation des Virus zu einer Verzögerung von Transkription und Translation, infolge der zunächst notwendigen Synthese des komplementären Doppelstranges zum einzelsträngigen Virusgenom. Eine maximale Transgenexpression ist somit erst nach ein bis drei Wochen zu verzeichnen [329].

Zunehmend werden rAAV in klinischen Studien eingesetzt. Die meisten Anwendungen finden sich in der Behandlung monogenetischer Erkrankungen wie Cystischer Fibrose, Alpha-1-Antitrypsin Mangel und Hämophilie B sowie zur Behandlung von Krebserkrankungen [302, 333].

4 ZIELSETZUNG DER ARBEIT

Das MetS ist ein Riskofaktorenkomplex für die Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen, der führenden Todesursache der industrialisierten Länder. Die rapide steigenden Inzidenzen der Adipositas und des T2D, als zentrale Komponenten des MetS, stellen weltweit ein wachsendes Problem dar. Während die Therapie der Adipositas über Lebensstilinterventionen erfolgt, ist diese beim T2D primär als diätetische und medikamentöse Behandlung angelegt. Die in den letzten Jahren entwickelten Inkretin-basierenden Therapien sind hinsichtlich ihrer anti-diabetischen Wirkungen sehr gut charakterisiert und zeichnen sich im Vergleich zu anderen Antidiabetika durch ihre positiven Effekte auf das Körpergewicht aus. Die Charakterisierung des Effektes Inkretin-basierter Therapien auf das kardiovaskuläre Gesamtrisiko ist bisher nur ansatzweise erfolgt. Insbesondere ist die Bedeutung des GLP-1 Metaboliten in diesem Rahmen kaum verstanden.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Effekte des GLP-1 Systems auf den Lipidmetabolismus, Inflammation und Atherosklerose *in vivo* zu untersuchen.

Es wurden folgende Hypothesen mit Hilfe verschiedener Versuchsansätze geprüft:

1. Das aktive GLP-1 und der GLP-1 Rezeptor-Agonist Exendin-4 sind anti-inflammatorisch wirksam.

Zur Prüfung der Hypothese wurden ein akutes und ein chronisches Inflamationsmodell herangezogen. Im akuten Inflamationsmodell mit BALB/c Mäusen erfolgte die Administration des GLP-1 Rezeptor-Agonisten Exendin-4. Ein Diät-induziertes NASH-Mausmodell diente zur Untersuchung einer AAV-vermittelten Überexpression des GLP-1 (7-37) im chronisch metabolischen Inflamationsmodell.

2. Das aktive GLP-1 führt zur Verbesserung des Lipidprofils und vermindert die Ausprägung atherosklerotischer Plaques.

Die Effekte des aktiven GLP-1 auf die Serumlipide und das Ausmaß der Atherosklerose wurden in zwei Studien mit LDL-Rezeptor-defizienten Mäusen untersucht. Zum einen

EINLEITUNG

erfolgte die Gabe eines DPP4-Inhibitors zur Stabilisierung der endogenen Inkretinspiegel und andererseits erfolgte die Überexpression des GLP-1 (7-37) mittels AAV.

3. GLP-1 (9-37) besitzt eine eigenständige metabolische Wirkung, die sich komplementär zur Wirkung des aktiven GLP-1 (7-37) in Bezug auf Glukosestoffwechsel, Lipidmetabolismus, Inflammation und Atherosklerose verhält.

Die Wirkungen des GLP-1 Metaboliten (9-37) wurden parallel zum aktiven GLP-1 (7-37) in den AAV-Versuchsmodellen zur Inflammation und Atherosklerose (Hypothese eins und zwei) untersucht.

II MATERIAL UND METHODEN

1 MATERIAL

Chemikalien

Acrylamid (Rotiphorese® Gel 30)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Agar Agar	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Agarose, LE	Cambrex Bio Science, Rockland, USA
Albumin Fraktion V, proteasefrei	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ampicillin	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt, Deutschland
Calciumchlorid Dihydrat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Cäsiumchlorid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Chloramin T	Merck, Darmstadt, Deutschland
Chloramphenicol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Complete, Protease-Inhibitor-Cocktail	Roche, Mannheim, Deutschland
DEPC-Wasser	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Dimethylaminobenzaldehyd	Merck, Darmstadt, Deutschland
Dimethylformamid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Diprotin A	Sigma, Steinheim, Deutschland
Dithiothreitol (DTT)	Sigma, Steinheim, Deutschland
DMSO	Roth, Karlsruhe, Deutschland
DNA-Marker (1 kb)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
DNA-Marker (100 bp)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
dNTP Set (100 mM)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
EDTA	Roth, Karlsruhe, Deutschland
EGTA	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Eisessig	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol absolut	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethidiumbromid (1 %)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Exendin-4	Bachem AG, Bubendorf, Schweiz
GLP-1 (7-37)	Bachem AG, Bubendorf, Schweiz
Glukoselösung steril (20 %)	DeltaSelect, Pfullingen, Deutschland
Glukoselösung steril (40 %)	DeltaSelect, Pfullingen, Deutschland
Glutaraldehydlösung (25 %)	Sigma, Steinheim, Deutschland

MATERIAL UND METHODEN

Glycerin (> 98 %)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glycerol Gelatin	Sigma, Steinheim, Deutschland
Glycin	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Heparin-Natrium-25000 (5000 I. E./ml)	Ratiopharm, Ulm, Deutschland
Hepes	Roth, Karlsruhe, Deutschland
H-Gly-Pro-pNa HCL	Bachem AG, Bubendorf, Schweiz
Isofluran	Abott, Wiesbaden, Deutschland
Isopropanol (> 99,8 %)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kalibrator TruCal HDL/LDL	DiaSys, Holzheim, Deutschland
Kalibrator TruCal U	DiaSys, Holzheim, Deutschland
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumhexacyanoferrat(II)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumhexacyanoferrat(III)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kanamycinsulfat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
LB Medium	Roth, Karlsruhe, Deutschland
LPS (Lipopolysaccharide)	Sigma, Steinheim, Deutschland
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Methanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Milchpulver	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchloridlösung steril (0,9 %)	B.Braun, Melsungen, Deutschland
Natrium-Desoxycholat	Sigma, Steinheim, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva, Heidelberg, Deutschland
Natriumfluorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumorthovanadat (Na_3VO_4)	Sigma, Steinheim, Deutschland
Natronlauge	Merck, Darmstadt, Deutschland
NEFA Standard FS	DiaSys, Holzheim, Deutschland
NuPAGE [®] Transferpuffer (20x)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Oil Red O	Sigma, Steinheim, Deutschland
Paraformaldehyd (PFA)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
peqGold prestained Protein-Marker V	Peqlab, Erlangen, Deutschland
PermOUNT	Fisher Scientific, New Jersey, USA
Pikrinsäure	Sigma, Steinheim, Deutschland
p-Nitroanilin	Sigma, Steinheim, Deutschland
Polyethylenimin (PEI), linear (25 kDa)	Polysciences Inc., Warrington, USA

MATERIAL UND METHODEN

Protein Assay (Bradford)	Bio-Rad, München, Deutschland
Protein Standard IgG	Bio-Rad, München, Deutschland
Roti [®] -Histofix (10 %)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Roti [®] -Histokit	Roth, Karlsruhe, Deutschland
ROX Reference Dye	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
S.O.C Medium	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Saccharose	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Salzsäure (37 %)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Schwefelsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
Sirius Red	Polysciences Inc., Warrington, USA
Streptavidin-HRP	R & D Systems, Minneapolis, USA
Substrate Reagent Pack	R & D Systems, Minneapolis, USA
Sudan IV	Sigma, Steinheim, Deutschland
SuperSignal [®] West Dura Extended Duration Substrate	Thermo Scientific, Rockford, USA
Temed	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tissue-Tek [®] , O.C.T [™]	Sakura Finetek, Zoeterwoude, Niederlande
T-Per [®] Tissue Protein Extraction Reagent	Thermo Scientific, Rockford, USA
Tris	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Triton X-100	Sigma, Steinheim, Deutschland
Tween-20	Roth, Karlsruhe, Deutschland
X-Gal (5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Galactopyranosid)	Peqlab, Erlangen, Deutschland
Xylencyanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Xylol	Merck, Darmstadt, Deutschland
β -Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland

Lösungen und Puffer

Alle Lösungen und Puffer wurden, wenn nicht anders vermerkt, mit bidestilliertem Wasser (H_2O_{dd}) hergestellt. Bei fehlender Angabe des pH-Wertes handelt es sich um ein neutrales Milieu.

APS (10 %)	10 % (m/v) APS, Aliquots bei -20 °C gelagert
Blockinglösung	5 % (w/v) Milchpulver in TBS-T
Cäsiumchlorid (1,41 g/ml)	128,47 g CsCl in 196,53 ml Wasser, Refraktionsindex: 1,370, steril filtriert
Cäsiumchlorid (1,61 g/ml)	168 g CsCl in 156,975 ml Wasser, steril filtriert
Complete Stocklösung (25x)	1 Tablette Complete (w/v)
Desoxycholsäure (1 %)	1 % (w/v)
Desoxycholsäure (10 %)	10 % (w/v), steril filtriert
Diprotin A (Stocklösung)	3 mM Diprotin A (w/v)

MATERIAL UND METHODEN

DPP4 Substratlösung	1 mM H-Gly-Pro-pNa HCL in 50 mM Tris Puffer (pH 7,5)
DTT-Stocklösung	6,5 M, Aliquots bei -20°C gelagert
Ehrlich-Reagenz	2 % Dimethylaminobenzaldehyd in 20 % Salzsäure
FPLC-Eluent	154 mM NaCl, 1 mM EDTA
Glutaraldehydlösung (0,5 %)	2 % (v/v) Glutaraldehydlösung (25 %) in PBS (1x; +MgCl ₂)
Homogenisationspuffer A	250 mM Saccharose, 20 mM Tris, 2 mM EGTA 4 % Complete
Homogenisationspuffer B	50 mM Hepes, 1 % Triton X-100, 1 mM DTT, 4 % Complete
Kaliumhexacyanoferratlösung (20x)	100 mM K ₃ Fe(CN) ₆ , 100 mM K ₄ Fe(CN) ₆ in PBS (1x; +MgCl ₂)
Ladepuffer DNA (6x)	10 mM Tris (pH 7,6), 0,03 % (w/v) Bromphenolblau, 0,03 % (w/v) Xylencyanol, 60 % (v/v) Glycerin, 60 mM EDTA
Laufpuffer SDS-PAGE (pH 8,3)	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1 % SDS
LPS-Stocklösung	1 mg/ml (w/v), steril
Lysepuffer T-Per mit Inhibitoren	4 % Complete, 10 mM NaF, 1 mM Na ₃ VO ₄
Natriumfluorid-Stocklösung	200 mM (w/v)
Natriumhydrogencarbonat-Lösung (pH 9,6)	0,1 M NaHCO ₃ (w/v)
Natriumorthovanadat (Na ₃ VO ₄)-Stocklösung	200 mM (w/v)
Oil Red O-Arbeitslösung	60 % (v/v) Oil-Red-O-Stocklösung
Oil Red O-Stocklösung	0,5 % (w/v) in Isopropanol
Paraformaldehydlösung (4 %)	4 % (w/v) Paraformaldehyd in PBS
PBS (10x; pH 7,4)	1,37 M NaCl, 26,8 mM KCl, 81 mM Na ₂ HPO ₄ , 14,7 mM KH ₂ PO ₄
PBS (1x; +MgCl ₂)	10 % (v/v) PBS (10x), 1 mM MgCl ₂
PBS (1x; pH 7,4)	10 % (v/v) PBS (10x)
PEI-Lösung (pH 4,5)	1 mg/ml in PBS (1x), steril filtriert
p-Nitroalinin Standard	1 mM p-Nitroanilin in 50 mM Tris Puffer (pH 7,5), er hitzt
Reagent Diluent (pH 7,4)	10 % (v/v) PBS (10x), 1 % (w/v) BSA
Sammelgelpuffer (pH 6,8)	0,5 M Tris
SDS-Lösung (10 %)	10 % (w/v)
SDS-Probenpuffer (6x; Laemmli)	0,375 M Tris-HCL (pH 6,8), 12 % (w/v) SDS, 60 % (v/v) Glycerin, 0,012 % (w/v) Bromphenolblau, 65 mM DTT
Sirius Red Färbelösung (0,1 %)	0,1 % (w/v) in Pikrinsäure (kalt, gesättigt), filtriert
Stripping Lösung 1 (pH 2,05)	25 mM Glycin, 1 % SDS
Stripping Lösung 2	176 mM NaCl in PBS (1x)

MATERIAL UND METHODEN

Sudan IV-Lösung	13 mM in 70 % Isopropanol
TAE (1x)	2 % (v/v) TAE (50x)
TAE (50x)	2 M Tris, 1 M Eisessig, 0,05 M EDTA
TBS (10x; pH 7,6)	200 mM Tris, 1,37 M NaCl
TBS-T (1x)	10 % (v/v) TBS (10x), 0,1 % Tween-20
TMN-Puffer	20 mM Tris (pH 7,4), 1 mM MgCl ₂ , 150 mM NaCl, steril filtriert
Transferpuffer (1x)	5 % (v/v) NuPAGE® Transferpuffer (20x)
Trenngelpuffer (pH 8,8)	1 M Tris
Tris-HCL Puffer (50 mM; pH 7,5)	50 mM Tris (w/v)
Waschpuffer ELISA (pH 7,4)	10 % (v/v) PBS (10x), 0,05 % (w/v) Tween-20
X-Gal Färbelösung	Kaliumhexacyanoferratlösung (1x), X-Gal-Lösung (1x) in PBS (1x; +MgCl ₂)
X-Gal-Lösung (40x)	97,9 mM in Dimethylformamid

SDS-Gele

	Trenngel (12 %)	Sammelgel (5 %)
Wasser	1,65 ml	1,7 ml
Acrylamid (30 %)	2 ml	0,415 ml
Trenngelpuffer (pH 8,8)	1,25 ml	-
Sammelgelpuffer (pH 6,8)	-	0,315 ml
SDS (10 %)	0,05 ml	0,025 ml
APS (10 %)	0,05 ml	0,025 ml
TEMED	0,005 ml	0,0025 ml

Medien und Zusätze für Bakterienkultur

Medien für die Kultivierung von Bakterien wurden durch Autoklavieren für 20 Minuten sterilisiert und nach Abkühlung auf weniger als 50 °C mit Antibiotika versetzt. Die Zugabe der Antibiotikastocklösungen zum Medium erfolgte im Verhältnis 1:1000. Agarplatten und Flüssigmedien wurden bei 4 °C gelagert.

Agarplatten (LB₀-Platten) 1,5 % (w/v) Agar Agar in LB-Medium

LB Medium 2 % (w/v) in Wasser (H₂O_{dd})

Antibiotikastocklösungen wurden unter sterilen Bedingungen hergestellt, aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

Ampicillin-Stocklösung 5 % (w/v) in Wasser (H₂O_{dd})

Chloramphenicol-Stocklösung 3,4 % (w/v) in Ethanol

Kanamycin-Stocklösung 1 % (w/v) in Wasser (H₂O_{dd})

MATERIAL UND METHODEN

Antibiotikum	Konzentration in Medium und Platte
Ampicillin	50 µg/ml
Chloramphenicol	30 µg/ml
Kanamycin	100 µg/ml

Bakterienstämme

MAX Efficiency [®] Stb12 [™]	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Subcloning Efficiency [™] DH5α	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

Medien und Zusätze für Zellkultur

Kulturmedien wurden bei 4 °C, Zellkulturzusätze bei -20 °C und PBS bei Raumtemperatur gelagert.

DMEM, 4,5 g/l Glukose, mit L-Glutamin	PAA, Pasching, Österreich
Dulbecco's PBS (1x), ohne Ca & Mg	PAA, Pasching, Österreich
fötales bovines Serum (FBS)	Biochrom, Berlin, Deutschland
Penicillin/Streptomycin (100x, P/S)	PAA, Pasching, Österreich
Trypsin EDTA (1x; 0,05 %; 0,02 %)	PAA, Pasching, Österreich

angesetzte Medien

DMEM, 10 % FBS (Komplettmedium)	10 % (v/v) FBS, 1 % (v/v) P/S
DMEM, 50 % FBS	50 % (v/v) FBS, 1 % (v/v) P/S
DMEM, serumfrei	1 % (v/v) P/S
Einfriermedium	10 % DMSO (steril) in Komplettmedium

Zelllinien

HEK-293	Gene Therapy Program, University of Pennsylvania, Philadelphia, USA
---------	---

Kits

Bei den angewendeten Kits wurde nach Protokoll des Herstellers mit den gelieferten Lösungen und Puffern gearbeitet.

Alanin Aminotransferase (ALAT) - OSR6107	Beckman Coulter, Brea, USA
Aspartat Aminotransferase (ASAT) - OSR6109	Beckman Coulter, Brea, USA
Cholesterin FS	DiaSys, Holzheim, Deutschland
E.Z.N.A. Plasmid Miniprep Kit I	Omega Bio-Tek, Norcross, USA
HDL-C Immuno FS	DiaSys, Holzheim, Deutschland
NEFA FS (fFS)	DiaSys, Holzheim, Deutschland
NucleoBond [®] PC 2000 EF	Macherey Nagel, Düren, Deutschland

MATERIAL UND METHODEN

NucleoSpin® Extract II	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
QIAamp® RNA Blood Mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Quick Ligation™ Kit	New England Biolabs, Ipswich, USA
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
SuperScript III First-Strand Synthesis System	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
TOPO-TA-Cloning® Kit	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Triglyzeride FS	DiaSys, Holzheim, Deutschland

Enzyme

Bei der Verwendung von Enzymen wurden die vom Hersteller empfohlenen und gelieferten Lösungen und Puffer eingesetzt.

AmpliTaq Gold® DNA Polymerase (5 U/μl)	Applied Biosystems, Carlsbad, USA
Benzonase® Nuclease ultrapure grade (250 U/μl)	Sigma, Steinheim, Deutschland
Berlinsulin® H, human Insulin (100 I.E./ml)	Berlin-Chemie, Berlin, Deutschland
Deoxyribonuclease I, Amplification Grade (1 U/μl)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
DNase I recombinant, RNase-frei (10 U/μl)	Roche, Mannheim, Deutschland
Hind III (20.000 U/ml)	New England Biolabs, Ipswich, USA
Restriktionsenzym Kpn I (10.000 U/ml)	New England Biolabs, Ipswich, USA
Restriktionsenzym Not I (10.000 U/ml)	New England Biolabs, Ipswich, USA
Restriktionsenzym Sal I (20.000 U/ml)	New England Biolabs, Ipswich, USA
Restriktionsenzym Xba I (20.000 U/ml)	New England Biolabs, Ipswich, USA
Taq DNA Polymerase, recombinant (5 U/μl)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

Antikörper

Anti-Akt1 aus Hase (C73H10)	Cell Signaling, Danvers, USA
Anti-Aktin aus Hase (A2066)	Sigma, Steinheim, Deutschland
Anti-GLP-1 (HYB 147-12B)	BioPorto, Gentofte, Dänemark
Anti-GLP-1, C-terminal specific (ABS 046-03)	BioPorto, Gentofte, Dänemark
Anti-pAkt (Thr308) aus Hase (C31E5)	Cell Signaling, Danvers, USA
Anti-Rabbit (IgG, HRP-linked)	Cell Signaling, Danvers, USA

ELISA

mouse Insulin, ultrasensitive	Alpco Diagnostics, Salem, USA
<u>DuoSet® ELISA Development System Kits:</u>	
mouse Adiponectin (DY1119)	R & D Systems, Minneapolis, USA
mouse IL-6 (DY406)	R & D Systems, Minneapolis, USA

MATERIAL UND METHODEN

Oligonukleotide

Tabelle 3: **Primer zur Klonierung der GLP-1 Konstrukte**; Kozaksequenz (**rot**), Signalsequenz der SEAP (**blau**), Stopcodon (**grün**), **homologe Sequenz**; (Eurofins MWG Operon, Ebersberg)

	Forward (5'-3')
pAAV2.1-TBG-GLP-1 (7-37) pAAV2.1-CMV-GLP-1 (7-37)	CGCCC ACC ATGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG GGCCTGCGCCTGCAGCTGAGCCTGGGC CATGCTGAAGGGACCTTTACC
pAAV2.1-TBG-GLP-1 (9-37) pAAV2.1-CMV-GLP-1 (9-37)	CGCCC ACC ATGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG GGCCTGCGCCTGCAGCTGAGCCTGGGC GAAGGGACCTTTACCAGTGAT
	Reverse (5'-3')
alle GLP-1 Vektoren	ACGCGT TTA TCTCCTCGGCCTTTCACC

Tabelle 4: **Sequenzierprimer**; (Eurofins MWG Operon, Ebersberg)

	Primer Forward (5'-3')
pAAV2.1-TBG-SEAP-GLP-1 (7-37)	TTTGCCTTTCTCTCCACAGG
pAAV2.1-TBG-SEAP-GLP-1 (9-37)	CGTTTCTGATAGGCACCTAT

Tabelle 5: **PCR-Primer**; (Eurofins MWG Operon, Ebersberg)

	Sequenz (5'-3')
GAPDH (mm) forward	CCCTTCATTGACCTCAACTA
GAPDH (mm) reverse	AGATCCACGACGGACACATT

Tabelle 6: **TaqMan® Gene Expression Assays**; (Applied Biosystems, Carlsbad)

Zielgen	Spezies	Referenz	Bestellnummer
Abca-1	Maus	NM_013454.3	Mm01350760_m1
Abcg-1	Maus	NM_009593.2	Mm00437390_m1
Acat-2	Maus	NM_009338.3	Mm00782408_s1
CD36	Maus		Mm01135198_m1
Fasn	Maus	NM_007988.3	Mm01253292_m1
G6pc	Maus	NM_008061.3	Mm00839363_m1
Glp1r	Maus	NM_021332.2	Mm00445292_m1
Hmgcr	Maus	NM_008255.2	Mm01282492_m1
Lrp1	Maus	NM_008512.2	Mm00464608_m1
Lss	Maus	NM_146006.1	Mm00461312_m1
Nr1h3 (LXR-α)	Maus	NM_013839.3	Mm00443454_m1
Pck1	Maus	NM_011044.2	Mm00440636_m1
Scarb-1	Maus	NM_016741.1	Mm00450234_m1
Sqle	Maus	NM_009270.3	Mm00436772_m1

MATERIAL UND METHODEN

Srebf-1	Maus	NM_011480.3	Mm01138344_m1
Srebf-2	Maus	NM_033218.1	Mm01306294_m1
Tgf-b1	Maus	NM_011577.1	Mm01178819_m1
Tnf	Maus	NM_013693.2	Mm00443258_m1

Tabelle 7: **LightCycler Primer Sets**; (Eurofins MWG Operon, Ebersberg)

Zielgen	Primer / Sonde	Sequenz (5'-3')	Referenz
AAV-BGH-PolyA	forward	TCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGT	
	reverse	TGGGAGTGGCACCTTCCA	
	Sonde	FAM-TCCCCCGTGCCTTCCTTGACC-TAM	
Abcg-5 (mm)	forward	GCGAGACGTTGCGATACACA	[334]
	reverse	TGACTGCCTCTACCTTCTTGTTGT	
	Sonde	FAM-TGCTGGCCCTCTGCCGA-TAM	
Cyp7A1 (mm)	forward	CTGATCCGTCTACGCATGTTTC	[334]
	reverse	CAGGAATGGTGTTTGCTTGAGA	
	Sonde	FAM-CGCACCTTGTGATCCTCTGGGCA-TAM	
IL-1 β (mm)	forward	CAACCAACAAGTGATATTCTCCATG	[335]
	reverse	GATCCACACTCTCCAGCAGCA	
	Sonde	FAM-CTGTGTAATGAAAGACGGCACACCCACC-TAM	
MCP-1 (mm)	forward	CTTCTGGGCCTGCTGTTCA	[335]
	reverse	CCAGCCTACTCATTGGGATCA	
	Sonde	FAM-CTCAGCCAGATGCAGTTAACGCCCC-TAM	
NPC1L1 (mm)	forward	ATCCTCATCCTGGGCTTTGC	[336]
	reverse	GCAAGGTGATCAGGAGGTTGA	
	Sonde	FAM-CCCAGCTTATCCAGATTTTCTTCTTCCGC-TAM	
18S (mm)	forward	CGGCTACCACATCCAAGG	
	reverse	GCTGCTGGCACCAGACTT	
	Sonde	FAM-CAAATTACCCACTCCCGACCCG-TAM	

Plasmide

pDNR-LIB-hGlucagon (IRAU969H0742D)

imaGenes GmbH, Berlin, Deutschland

Computerprogramme und Web tools

ApE A Plasmid Editor 1.13

<http://biologylabs.utah.edu/jorgensen/wayned/ape/>

Axiovision 3.1

Carl Zeiss MicroImaging, Jena, Deutschland

Chromas Lite Version 2.01

<http://www.meddownloads.com/download-Chromas-Lite-92007.htm>

MATERIAL UND METHODEN

ClustalW	European Bioinformatics Institute: EMBL-EBI; http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/
ImageJ	http://rsbweb.nih.gov/ij/download.html
Magellan™ 2 Data Analysis Software	Tecan, Crailsheim, Deutschland
Nis Elements D 3.0	Nikon Instruments, Kingston, Großbritannien
Geräte	
70.1 Ti Rotor	Beckman Coulter, Brea, USA
Alcyon 300 Analyzer	Abbott, Wiesbaden, Deutschland
AxioCam MRc	Carl Zeiss MicroImaging, Jena, Deutschland
Bio Photometer plus	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Branson Sonifier B15	Branson Sonic Power, Schwäbisch Gmünd, Deutschland
Curix 60 Entwicklermaschine	AGFA, Mortsel, Belgien
Electrophoresis power supply	Consort, Turnhout, Belgien
Elektrophoresekammer	C.B.C. Scientific.Co, California, USA
Fluoreszenzmikroskop Axiovert 100	Carl Zeiss MicroImaging, Jena, Deutschland
FPLC System	GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Schweden
Kryotom CM 3050	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Mastercycler® ep Realplex	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Microprocessor pH Meter	Hanna Instruments, Bedfordshire, Großbritan- nien
Mini-Protean 3 Elektrophorese Modul	Bio-Rad, München, Deutschland
MultiDoc-It™ Imaging System	UVP, Cambridge, Großbritannien
Olympus AU2700	Beckman Coulter, Brea, USA
PCR Sprint Thermal Cycler	Thermo Electron Corporation, Dreieich, Deutschland
PowerPac Basic	Bio-Rad, München, Deutschland
Sunrise™ ELISA-Reader	Tecan, Crailsheim, Deutschland
Superose 6 10/300 GL Säule	GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Schweden
SW 32 Ti Rotor	Beckman Coulter, Brea, USA
Tischzentrifuge Heraeus Pico 17	Thermo Electron Corporation, Dreieich, Deutschland
Tischzentrifuge Mikro 200R	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland
Ultrazentrifuge Beckman Optima XL-70	Beckman Coulter, Brea, USA
X Cell II™ Blot Module	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Zoom-Stereomikroskop SMZ 1000	Nikon Instruments, Kingston, Großbritannien

MATERIAL UND METHODEN

Verbrauchsmaterial / sonstiges

15 und 50 ml Falcons	Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz
Amicon UltraFree 100 K Filter	Millipore, Billerica, USA
Austerlitz Insect Pins [®] (0,1 mm)	Fine Science Tools, Foster City, USA
Blutzuckermessgerät Contour [®]	Bayer Consumer Care, Basel, Schweiz
Contour Sensoren zur Blutzuckermessung	Bayer Consumer Care, Basel, Schweiz
Einbetttschälchen	Polysciences Inc., Warrington, USA
Einmalkanülen 16G, 20G, 30G	B.Braun, Melsungen, Deutschland
Einmal-Küvetten, Plastikbrand [®] , PMMA	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Einmalspritzen 1 ml	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Fuji Medinal X-Ray	Fujifilm Europe, Düsseldorf, Deutschland
Gavage ("Feeding Needle"), 18 G, 55 mm	Fine Science Tools, Foster City, USA
Kryoröhrchen Nalgene 5 ml	VWR, Bruchsal, Deutschland
Microvette CB 300 (Heparin-beschichtet)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Na-Heparin-Kapillarpipetten	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, Deutschland
Nunc-Immuno [™] Platten	Nunc GmbH, Langenselbold, Deutschland
Objektträger SuperFrost Plus	Thermo Scientific, Rockford, USA
Open-Top Polyallomer Tube	Beckman Coulter, Brea, USA
PCR-Softtubes 0,5 ml	Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Präparierbesteck	Fine Science Tools, Foster City, USA
PVDF Membran	Zefa-Laborservice GmbH, Harthausen, Deutschland
Quick-Seal [®] Polyallomer Tube	Beckman Coulter, Brea, USA
Reaktionsgefäße 1,5 ml; 2 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Rotilabo [®] -Mikrotest-Platten	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Safelock tubes 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Stößel 1,5 ml	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Transfermembran Immobilon-P	Zefa-Laborservice, Harthausen, Deutschland
Twin.tec PCR plate 96, skirted	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
UVette [®] 220-1600 nm	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zellkulturschalen / -platten	Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz
Zellschaber	Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz

2 METHODEN

2.1 Mikrobiologische Methoden

Bei allen mikrobiologischen Arbeiten wurden sterile Geräte und Lösungen verwendet.

Plattenkultur:

Agarplatten wurden vor dem Gießen entsprechend der Resistenz der zu kultivierenden Bakterien mit Antibiotikum versetzt. Die Anzucht der *E.coli* Stämme erfolgte durch Animpfen aus einer kryokonservierten Glycerinkultur oder einer Einzelkolonie und direkt durch Ausplattieren von 100-200 µl Transformationsansatz. Die Platten wurden anschließend über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Flüssigkultur:

Flüssiges LB Medium wurde nach Bedarf mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt. Für Mini-Plasmid-DNA-Präparationen wurden 3-5 ml LB Medium mit einer Einzelkolonie angeimpft. Größere Volumina von 500 ml für Mega-Plasmid-DNA-Präparationen wurden aus frischen Übernachtskulturen in einer Verdünnung von 1:500 hergestellt. Die Kultivierung erfolgte für 12-16 h bei 37 °C und 225 rpm.

Lagerung von *E.coli* Kulturen:

Zur Langzeitlagerung wurden die Kulturen im entsprechenden Selektionsmedium als Glycerinkultur bei -20 °C gelagert. Bei der Herstellung wurden 800 µl einer frischen Übernachtskultur mit 1,5 ml sterilem Glycerin in einem Kryoröhrchen versetzt, unter zeitweiligem Invertieren 2 h bei Raumtemperatur (RT) sowie 1 h bei 4 °C gelagert und anschließend bei -20 °C aufbewahrt.

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Transformation kompetenter *E.coli*

Die Transformation ist ein Vorgang, bei dem Zellen nackte DNA aus ihrer Umgebung aufnehmen und die auf dem DNA-Molekül codierten Gene exprimieren [337].

Transformation DH5 α

Die Transformation der kompetenten DH5 α Zellen (Invitrogen) erfolgte mittels Hitzeschock. Dabei wurden 25 μ l Zellsuspension auf Eis aufgetaut und mit 1-10 ng / 2-5 μ l gereinigtem Plasmid / Ligationsprodukt versetzt. Nach 30 Minuten Inkubation auf Eis erfolgte der Hitzeschock bei 42 °C für 20 Sekunden. Anschließend wurden die Zellen für 2 Minuten auf Eis abgekühlt und nach Zugabe von 900 μ l vorgewärmten S.O.C. Medium bei 37 °C unter leichtem Schütteln (225 rpm) 60 Minuten inkubiert. Bei Ligationsreaktionen wurden die Bakterien anschließend für 1 Minute bei 6000 rpm zentrifugiert, das Pellet in 200 μ l S.O.C. Medium resuspendiert und die Suspension mittels Drygalski-Spatel auf Selektionsplatten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert. Im Fall einer einfachen Transformation zur Plasmidvermehrung wurde die Zellsuspension 1:10-1:100 mit S.O.C Medium verdünnt und zu 100 μ l auf die Selektionsplatte gebracht.

Transformation Stb12

Die Transformation von Plasmiden > 10 kb (Helferplasmid pAd-delta-F6) erfolgte in MAX Efficiency[®] Stb12[™] kompetenten Zellen (Invitrogen). Stb12[™] *E.coli* zeichnen sich durch eine hohe Transformationseffizienz (> 10⁹ cfu/ μ g) aus. Der Ablauf der Transformation entspricht dem für die DH5 α Zellen. Unterschiedlich durchgeführt wurde der Hitzeschock. Dieser erfolgte bei den Stb12[™] *E.coli* bei 42 °C für 25 Sekunden. Da keine Ligationsreaktionen mit diesen Zellen transformiert wurden, erfolgte die 1stündige Inkubation wie bei den DH5 α Zellen bei 37 °C.

2.2.2 Isolierung und Reinigung von DNA

Isolierung von Plasmid-DNA aus *E.coli*

Protokolle für die Plasmid-DNA Isolierung aus Bakterienkulturen basieren auf einer modifizierten alkalischen Lyse. Chromosomale bakterielle DNA und Plasmid DNA denaturieren infolge des alkalischen Milieus. Durch Zugabe von Kaliumacetat präzipitiert die chromosomale DNA und kann von der Plasmid-DNA abgetrennt werden. Eine Aufreinigung der Plasmid-DNA erfolgt anschließend mittels Silica-Membran- oder Anionen-Tauscher-Säulen.

MATERIAL UND METHODEN

Die Präparation kleiner Plasmid-DNA Mengen für Sequenzierung, Klonierung oder Restriktionsverdau wurde mit dem Plasmid Mini Kit I der Firma Omega Bio-Tek durchgeführt. Für die Isolierung wurden 1-2 ml einer frischen Übernachtskultur bei $10.000 \times g$ zentrifugiert und das Bakterienpellet anschließend nach Angaben des Herstellers weiter verarbeitet. Die Eluierung erfolgte mit vorgegebenem Elutionspuffer oder sterilem deionisiertem Wasser. Zur Präparation größerer Mengen Endotoxin freier Plasmid-DNA für die Transfektion wurde das NucleoBond Kit (PC 2000 EF) der Firma Macherey-Nagel verwendet. Die Pelletierung der Bakterien aus 500 ml LB Selektionsmedium erfolgte bei $6000 \times g$ und $4 \text{ }^\circ\text{C}$ für 15 Minuten. Entsprechend dem Protokoll des Herstellers wurde die Isolierung durchgeführt und die Präparation abschließend in 1 ml Endotoxin freiem TE-Puffer resuspendiert.

Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ist eine einfache Methode zur Analyse von PCR Reaktionen (PCR: polymerase chain reaction), Konzentrationsabschätzung, zur präparativen Reinigung von DNA-Fragmenten und zur Überprüfung von Restriktionsschnittstellen. Bei der Elektrophorese werden die negativ geladenen Nukleinsäuren entlang eines elektrischen Gradienten in einer Polymermatrix (Agarose) nach Molekülgröße aufgetrennt. Wenn nicht anders vermerkt, wurden 0,7-1,5 %ige Agarosegele in Abhängigkeit der Größe der zu untersuchenden Fragmente verwendet. Für die Herstellung der Gele wurde Agarose durch Aufkochen in TAE-Puffer (1x) gelöst und nach Abkühlung mit $0,5 \mu\text{g/ml}$ Ethidiumbromid (1 %) versetzt. Die DNA-Proben, mit Ladepuffer (6x) angesetzt, wurden unter Mitführung eines 100 bp oder 1 kb DNA-Größenstandards (Invitrogen) auf das erstarrte Gel aufgetragen und mit TAE (1x) als Laufpuffer bei 120 V elektrophoretisch aufgetrennt. Unter UV-Beleuchtung konnten die DNA-Fragmente sichtbar gemacht und mittels Dokumentationssystem analysiert werden.

Reinigung von DNA aus Agarosegelen

Um linearisierte Plasmide, DNA-Fragmente oder PCR-Produkte zu reinigen, wurden diese in präparativen Agarosegelen der Größe nach aufgetrennt. Die zu isolierenden DNA-Banden wurden unter UV-Belichtung mit einem Skalpell aus dem Gel herausgeschnitten und in ein Reaktionsgefäß überführt. Nach dem Auflösen des Gelstückes erfolgte die Aufreinigung der DNA mittels Silica-Membran-Säulen aus dem NucleoSpin®

MATERIAL UND METHODEN

Extract II Kit von Macherey-Nagel. Die Elution wurde in 30 µl durchgeführt, die DNA direkt verwendet oder bei -20 °C gelagert

Konzentrationsmessung von DNA

Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte spektralphotometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm (Bio Photometer plus, Eppendorf). Eine E_{260} mit dem Wert 1 entspricht 50 µg doppelsträngiger DNA pro Milliliter Probe. Das Verhältnis zwischen der Messung bei 260 nm und 280 nm ermöglicht eine Abschätzung der Reinheit von Nukleinsäuren. Reine DNA sollte ein E_{260}/E_{280} Verhältnis von 1,8 aufweisen. Verunreinigungen mit Protein reduzieren diesen Richtwert [338-339].

Sequenzanalyse von DNA

Die Sequenzierungen von gereinigter Plasmid DNA wurde von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg) durchgeführt. In Abhängigkeit vom DNA-Fragment wurden eigene Sequenzierprimer mitgeliefert oder Standardprimer ausgewählt. Die Analyse der erhaltenen Chromatogramme erfolgte unter Anwendung von Chromas Lite Version 2.01. Alignment-Analysen wurden mittels ClustalW durchgeführt.

2.2.3 Enzymatische Modifikation von DNA

DNA-Spaltung durch Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen sind in der Lage spezifische Abschnitte einer DNA-Sequenz zu erkennen, daran zu binden und zu hydrolysieren. Die Erkennungssequenzen dieser bakteriellen Enzyme bestehen meist aus palindromischen Sequenzen von vier bis acht Basenpaaren. Generiert werden, in Abhängigkeit vom Enzym, überlappende Enden (sticky ends, klebrige Enden) oder stumpfe Enden (blunt ends, glatte Enden). Durch Verwendung eines Enzyms, das an zwei verschiedenen Positionen schneidet, oder mittels Doppelverdau (zwei Enzyme gleichzeitig oder nacheinander) können Bereiche gezielt ausgeschnitten und anschließend ersetzt werden („Klonierung“). Die enzymatische Aktivität wird in Units (U) angegeben, wobei 1 U Enzym 1 µg DNA in einer Stunde spaltet.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Restriktion zur Klonierung und für analytische Verdau eingesetzt. Nach einer Klonierung wurden die Vektoren neben der Sequenzanaly-

MATERIAL UND METHODEN

se über verschiedene Restriktionsmuster auf das eingebrachte Insert und die Richtigkeit der mutationsanfälligen ITR's geprüft. Eine Restriktionskontrolle von Vektoren und Helferplasmiden (pA-delta-F6 und pAAV-2/8) erfolgte nach jeder Plasmid-DNA-Präparation. Die Restriktionen wurden mit den Enzymen der Firma New England Biolabs nach Herstellerangaben und mit den gelieferten Puffern und BSA (bovine serum albumin)-Lösungen durchgeführt. Generell wurde 1 µg DNA mit bis zu 20 U Enzym in 50 µl Endvolumen für mindestens zwei Stunden verdaut. Reaktionsbedingungen (Temperatur, Puffer und BSA-Konzentration) wurden an das jeweilige Enzym angepasst. Bei den Klonierungen wurden die Enzyme Not I, Hind III, Kpn I und Xba I, die jeweils überstehende Enden generieren und damit die Ligation vereinfachen, verwendet. Dabei erfolgte die Reaktion jeweils mit zwei Enzymen simultan im Doppelverdau (Not I und Hind III, Kpn I und Xba I) unter Anpassung der Pufferbedingungen. Nach der Reaktion wurden die Restriktionsansätze mittels Agarosegelen analysiert.

Ligation

Die Ligation dient der kovalenten Verknüpfung von DNA-Fragmenten. Mittels Ligasen wird die Bildung der Phosphodiester-Bindung zwischen 5`Phosphatgruppe und 3`Hydroxylgruppe katalysiert. Die Ligationsreaktion wurde mit dem Quick Ligation™ Kit der Firma New England Biolabs anhand des mitgelieferten Protokolls durchgeführt. In allen Klonierungen wurden 50 ng Vektor im Verhältnis 1:3 mit dem Insertkonstrukt ligiert. Die eingesetzte DNA Menge des Inserts wurde nach folgender Formel berechnet, wobei die Masse in ng und die Größe in bp eingesetzt wird:

$$m(\text{Insert}) = m(\text{Vektor}) \times \text{Größe}(\text{Insert}) / \text{Größe}(\text{Vektor}) \times \text{Verhältnissfaktor}$$

Die berechneten Mengen an Vektor und Insert wurden zusammengegeben und das Volumen der Mischung auf 10 µl mit ddH₂O aufgefüllt. Nach Zugabe von 10 µl Ligations Puffer (2x) und 1 µl Quick Ligase erfolgte die Reaktion für 5-10 Minuten bei 25 °C. Die Ligationsprodukte wurden direkt weiter verwendet oder bei -20 °C gelagert.

Topo-TA-Klonierung

Die Topo-TA-Klonierung ist eine Methode, bei der ein *Taq*-Polymerase amplifiziertes PCR-Produkt direkt und zeitsparend in einen Vektor kloniert wird. Man macht sich das Prinzip zu Nutze, dass die *Taq*-Polymerase mittels Matrizen-unabhängiger terminaler Transferase-Aktivität einen 3'-Desoxyadenosin (A)-Überhang generiert. Der linearisierte

MATERIAL UND METHODEN

pCR[®]2.1-TOPO Vektor (TOPO TA Cloning Kit, Invitrogen) besitzt 3'-Desoxythymidin (T)-Überhänge sowie eine kovalent gebundene Topoisomerase I. Die Ligaseaktivität der Topoisomerase I gewährleistet eine effiziente spontane Ligation des PCR-Produkts mit dem Vektor. Es schließt sich die Transformation des Vektors in *E.coli* an.

Für die Reaktion wurden entsprechend den Herstellerangaben 2 µl frisch hergestelltes PCR-Produkt mit 1 µl pCR2.1-TOPO Vektor, 1 µl Salzlösung und 2 µl Wasser für 5 Minuten bei RT inkubiert und anschließend sofort auf Eis platziert. Die Transformation erfolgte in kompetente DH5α (Subcloning Efficiency™ DH5α, Invitrogen). Die auf Eis aufgetauten Zellen wurden mit 2 µl TOPO-Reaktion versetzt und für 25 Minuten auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte bei 42 °C für 30 Sekunden. Danach wurden die Zellen sofort wieder auf Eis gestellt und anschließend mit 250 µl vorgewärmtem S.O.C. Medium für eine Stunde bei 37 °C unter leichtem Schütteln (225 rpm) inkubiert. Die erhaltenen Transformanten wurden auf Ampicillinplatten, versetzt mit 40 µl X-Gal (40 mg/ml), ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Das im TOPO-Vektor enthaltene LacZ-Gen mit beta-Galaktosidase-Aktivität ermöglicht eine Blau-Weiß-Selektion der Bakterienkolonien. Das Galactoseanalog X-Gal wird von der beta-Galaktosidase zu einem blauen Farbstoff umgesetzt. Bei erfolgreicher Insertion des PCR-Produktes in den TOPO Vektor wird das LacZ-Gen unterbrochen, die Blaufärbung der Kolonien bleibt aus. Erhaltene weiße Kolonien wurden mittels Kolonie-Screening-PCR (Abschnitt II2.2.5) auf ihr Insert überprüft. Von positiven Klonen wurde eine Übernacht-LB-Kultur für Plasmid-DNA-Präparationen zur Restriktionskontrolle und Sequenzanalyse angesetzt.

2.2.4 Isolierung von Gesamt-RNA

Bei allen Arbeiten mit RNA wurden RNase-freie Plastikwaren, Filterspitzen und DEPC-Wasser verwendet, um eine Degradierung der RNA zu vermeiden. Die Isolierung und Reinigung von RNA aus Gewebe erfolgte mit dem RNeasy Mini Kit der Firma Qiagen entsprechend den Anweisungen des Herstellers. Das Prinzip umfasst die Freisetzung der RNA aus den Zellen unter gleichzeitiger Inaktivierung von RNasen und die Bindung von RNA Molekülen > 200 Nukleotiden an eine Silica-Membran der RNeasy Mini spin Säule mit anschließender Reinigung. Adhärente Zellen wurden direkt in den Zellkulturgefäßen auf Eis lysiert. Hierzu wurden die Zellen nach Entfernung des Zellkulturmedi-

MATERIAL UND METHODEN

ums einmal mit sterilem PBS (1x; phosphate buffered saline) gewaschen und mit 500 µl Lysepuffer (RLT-Puffer mit 1 % β-Mercaptoethanol) pro Well versetzt. In Stickstoff gefrorenes Gewebe wurde zu 10-20 mg abgewogen, sofort mit 350 µl Lysepuffer (RLT-Puffer mit 1 % β-Mercaptoethanol) versetzt und mittels Stößel auf Eis homogenisiert. Zum Ende der Isolierung erfolgte die Elution in 50 µl RNase-freiem Wasser. Eine Reagenzienkontrolle wurde bei jeder RNA-Extraktion mitgeführt.

Isolierung von RNA aus Blut

Die Isolierung von RNA aus Gesamtblut (Leukozyten) erfolgte mit dem QIAamp[®] RNA Blood Mini Kit der Firma Qiagen. Dem Prozess der Isolierung vorangestellt ist eine Lyse der Erythrozyten. Aus den intakten Leukozyten erfolgt anschließend die Freisetzung der RNA unter gleichzeitiger Inaktivierung von RNasen. An den nachfolgenden Homogenisationsschritt mit QIAshredder-Säulen schließen die Bindung der RNA Moleküle (> 200 Nukleotiden) an eine Silica-Membran und mehrmalige Reinigungsschritte an. Die Isolation erfolgte aus 400 µl Vollblut entsprechend dem Herstellerprotokoll. Die Elution der RNA wurde mit 30 µl RNase-freiem Wasser durchgeführt.

Konzentrationsmessung von RNA

Die Konzentrationsmessung der RNA erfolgte spektralphotometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm (Bio Photometer plus, Eppendorf). Eine E_{260} mit dem Wert 1 entspricht 40 µg RNA pro Milliliter Probe. Um den Reinheitsgrad der Lösung zu kontrollieren, wurde weiterhin die Extinktion bei 280 nm gemessen. Ein Quotient der Extinktionen (E_{260}/E_{280}) von 1,9-2,1 lässt auf reine, gut gelöste RNA schließen. Verunreinigungen mit Protein und schlecht gelöste RNA reduzieren diesen Richtwert [338-339].

DNasebehandlung von RNA

Zur Entfernung von Spuren genomischer DNA wurden alle RNA-Proben einer DNase-Behandlung (Deoxyribonuclease I Amplification Grade, Invitrogen) unterzogen. Bei Proben, die im späteren Verlauf mittels quantitativer PCR analysiert und verglichen werden sollten, erfolgte der Einsatz gleicher RNA Mengen. Für die Reaktion wurde soweit möglich maximal 1 µg RNA eingesetzt. Der Reaktionsansatz nach Herstellerangaben ist Tabelle 8 zu entnehmen.

MATERIAL UND METHODEN

Tabelle 8: **Reaktionsansatz (einfach) für die DNasebehandlung** isolierter Gesamt-RNA

RNA-Probe	x μ l
10x DNase I Puffer	1 μ l
DNase I (1 U/ μ l)	1 μ l
DEPC-Wasser	8-x μ l
	Σ 10 μ l

Der DNase-Verdau erfolgte über 15 Minuten bei RT mit anschließender Inaktivierung des Enzyms durch Zugabe von 1 μ l EDTA und 10minütiger Inkubation bei 65 °C. Die RNA wurde anschließend direkt verwendet oder bei -80 °C gelagert.

2.2.5 PCR-Methoden

Die Polymerase-Kettenreaktion ist eine Methode zur schnellen und gezielten Amplifikation von DNA-Fragmenten. Jede PCR basiert auf drei Schritten: Denaturierung, Hybridisierung und Elongation. Die Abfolge dieser Schritte stellt einen Zyklus der PCR dar und wird 20-40mal in Abhängigkeit von der gewünschten Vervielfältigung wiederholt. Als Denaturierung wird das Aufschmelzen der doppelsträngigen DNA zu Einzelsträngen bei 94-96 °C bezeichnet. Bei einer Temperatur von 50-65 °C wird die Anlagerung der Primer, die als Startpunkt für die Replikation dienen, an die komplementären Sequenzen der DNA gewährleistet. Im letzten Schritt synthetisiert die DNA-Polymerase über das Anknüpfen von freien Nukleotiden den fehlenden Strang anhand des komplementären Einzelstranges. Die Temperatur hängt vom Optimum der verwendeten Polymerase ab (68-72 °C).

PCR Amplifikation von DNA

Für alle PCR-Arbeiten wurden ausschließlich sterile Pipettenspitzen und Reaktionsgefäße sowie steriles deionisiertes Wasser verwendet. Bei jeder PCR-Technik wurde eine Reagenzienkontrolle (Wasserkontrolle) mitgeführt. Die verwendeten Primer wurden von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg) bezogen. Mit Ausnahme der Primer für die Klonierung, welche anhand der Zielsequenz entworfen wurden (Tabelle 3), erfolgte das Primerdesign unter Verwendung des Programm ApE A Plasmid Editor 1.13.

MATERIAL UND METHODEN

Für Standard-PCR-Reaktionen (GAPDH: Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) wurde nachfolgender Reaktionsansatz (Tabelle 9) gewählt und entsprechend dem Programm in Tabelle 10 in einen PCR Thermocycler (Thermo Electron Corporation) durchgeführt. Verwendet wurde die *Taq*-Polymerase (recombinant, 5 U/μl) der Firma Invitrogen mit den dazu bereitgestellten Reaktionskomponenten.

Tabelle 9: **Reaktionsansatz (einfach) für eine Standard-PCR-Reaktion** mit Verwendung der *Taq*-Polymerase

10x PCR-Puffer ohne MgCl ₂	2,5 μl
MgCl ₂ (50 mM)	0,75 μl
dNTP's (10 mM)	0,5 μl
Primer forward (10 μM)	1,25 μl
Primer reverse (10 μM)	1,25 μl
<i>Taq</i> -Polymerase (5 U/μl)	0,25 μl
ddH ₂ O	17,5-18 μl
Template (cDNA)	0,5-1 μl
	Σ 25 μl

Tabelle 10: **PCR-Protokoll für eine Standard-PCR-Reaktion** mit Verwendung der *Taq*-Polymerase

Schritt	Zeit	Temperatur	Zyklen
Initialisierung	3 min	94 °C	
Denaturierung	45 sec	94 °C	20-40x
Hybridisierung	30 sec	55 °C	
Elongation	60-90 sec	72 °C	
Finale Elongation	10 min	72 °C	
	5 min	20 °C	
		4 °C	

Kolonie-Screening-PCR

Dies ist eine Variante der PCR, in der keine gereinigte DNA als Template eingesetzt wird. Die Methode wurde angewandt, um *E.coli*-Kolonien, welche ein Plasmid mit dem gewünschten Insert tragen, zu identifizieren. Hierfür wurde die Kolonie mit einer sterilen Pipettenspitze gepickt, kurz in PCR-Reaktionsmix (Tabelle 11) getaucht und anschließend zum Animpfen einer LB-Übernachtskultur verwendet. Für die PCR wurden die Pri-

MATERIAL UND METHODEN

mer aus der jeweiligen Klonierung eingesetzt (Tabelle 3) und das in Tabelle 12 dargestellte Programm verwendet. Die PCR-Produkte wurden im Anschluss mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft.

Tabelle 11: **Reaktionsansatz (einfach) für eine Kolonie-Screening-PCR**

10x PCR-Puffer ohne MgCl ₂	1,6 µl
MgCl ₂ (50 mM)	0,32 µl
dNTP's (10 mM)	0,16 µl
Primer forward (10 µM)	1 µl
Primer reverse (10 µM)	1 µl
Taq-Polymerase (5 U/µl)	0,08 µl
ddH ₂ O	11,84 µl
	Σ 16 µl

Tabelle 12: **PCR-Protokoll für eine Kolonie-Screening-PCR** mit Verwendung der Taq-Polymerase

Schritt	Zeit	Temperatur	Zyklen
Initialisierung	5 min	94 °C	
Denaturierung	30 sec	94 °C	30x
Hybridisierung	30 sec	60 °C	
Elongation	30 sec	72 °C	
Finale Elongation	7 min	72 °C	
	5 min	20 °C	
		4 °C	

Reverse Transkription-PCR (RT-PCR)

RNA kann nicht direkt als Template für die PCR eingesetzt werden. Für mRNA-Expressionsanalysen (Transkriptionsuntersuchungen) muss RNA zunächst in komplementäre DNA (complementary DNA: cDNA) zurück geschrieben werden (reverse Transkription). Die RT-PCR ist eine kombinierte Methode bei der sich unmittelbar an die reverse Transkription eine PCR Amplifikation der resultierenden cDNA anschließt.

Zur reversen Transkription wurde das SuperScript™ III First Strand Synthesis System von Invitrogen verwendet. Die Reaktionen erfolgten nach Angaben des Herstellerprotokolls in einem PCR Thermocycler (Thermo Electron Corporation). Zunächst wurden

MATERIAL UND METHODEN

DNase-verdaute RNA, Random Hexamer Primer und dNTP's für 5 Minuten bei 65 °C denaturiert. Nach 1minütiger Abkühlung der Proben auf Eis erfolgte die Zugabe des SuperScript-Masternmix bestehend aus den Komponenten 10x RT Puffer, 25 mM MgCl₂, 0,1 M Dithiothreitol (DTT), RNaseOut™ und SuperScript™ reverse Transkriptase (Tabelle 13). Nach einer 10minütigen Annealingphase bei 25 °C erfolgte die Synthese der cDNA für 50 Minuten bei 50 °C und die Termination anschließend für 5 Minuten bei 85 °C. Die cDNA wurde direkt verwendet oder bei -20 °C gelagert. Eine Kontrolle der reversen Transkription erfolgte über eine anschließende Standard-PCR mit GAPDH.

Tabelle 13: **Reaktionsansatz (einfach) für die reverse Transkription** mit dem SuperScript™ III First Strand Synthesis System

DNase verdaute RNA	8 µl
Random Hexamers	1 µl
dNTP's (10 mM)	1 µl
10x RT Puffer	2 µl
MgCl ₂ (25 mM)	4 µl
DTT (0,1 M)	2 µl
RNaseOUT™	1 µl
SuperScript™ RT	1 µl
	Σ 20 µl

Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)

Die qRT-PCR beruht auf dem Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion und ermöglicht gleichzeitig über die Messung von Fluoreszenzsignalen die Quantifizierung der PCR-Produkte in Echtzeit. In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Fluoreszenzdetektion über den Einsatz von *TaqMan*[®]-Sonden.

Bei dieser Methode binden ein spezifisches Primerpaar und eine Sonde an gewünschte Sequenzabschnitte der DNA. Die *TaqMan*[®]-Sonden sind Oligonukleotide markiert mit einem Reporter-(FAM; 6-Carboxyfluorescein) und einem Quencher-(TAMRA; 6-Carboxytetramethylrhodamin) Fluoreszenzfarbstoff. Im Ruhezustand absorbiert der Quencher die Emission des Reporters, ein Fluoreszenzsignal wird supprimiert. Während der Polymerisation wird die zwischen den Primern gebundene Sonde durch die 5'-

MATERIAL UND METHODEN

3'-Exonukleaseaktivität der *Taq*-Polymerase gespalten (Abbildung 9). Der dabei vom Quencher abgetrennte Reporter ist nun in der Lage seine Fluoreszenz (FAM 518 nm) zu emittieren [340]. Die Intensität der Fluoreszenz ist direkt proportional zur Anzahl PCR-amplifizierter DNA-Fragmente. Über die Erfassung der Fluoreszenz mit entsprechenden Filtersystemen und einer Computer Software wird das Signal als ΔRn [$\Delta Rn = Rn^+ - Rn^-$] berechnet. Dabei wird die emittierte Ausgangs-Fluoreszenz von der Emission des Produkts zu jedem Zeitpunkt subtrahiert. Das Fluoreszenzsignal ΔRn wird gegen die Zyklenanzahl graphisch aufgetragen und beschreibt einen logarithmischen Verlauf. Nach der Startphase, in der das Signal die Hintergrundfluoreszenz nicht überschreitet, folgt die exponentielle Phase, in der sich die Zielsequenz unter optimalen Bedingungen verdoppelt. Zum Ende der PCR ist die Menge der Zielsequenz so stark angestiegen, dass Produkte miteinander hybridisieren und die PCR hemmen (Plateauphase). Der Anfang der exponentiellen Phase wird zur Quantifizierung benutzt. Dabei wird der Zyklus, bei dem das gemessene Fluoreszenz-Signal die Hintergrundfluoreszenz übersteigt, als CT-Wert (Threshold Cycle, Schwellenwert) angegeben [335, 341].

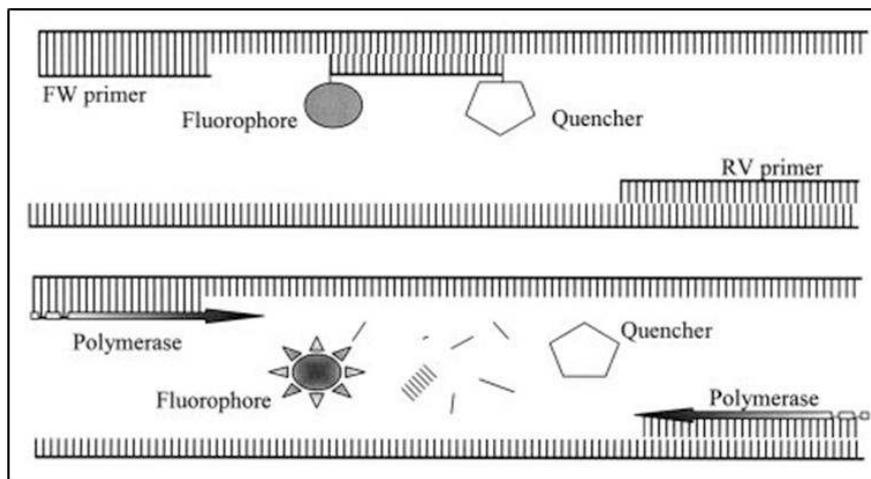


Abbildung 9: **TaqMan-System**; FW (forward), RV (reverse); entnommen aus [335]

Die Quantifizierungen in dieser Arbeit erfolgten mittels *AmpliTaq Gold*[®]-Polymerase (Applied Biosystems) sowohl relativ im Zuge durchgeführter Genexpressionsanalysen als auch absolut zur Bestimmung der AAV-Genom-Kopien (Titer). Bei der relativen Quantifizierung wurde GAPDH als Referenzgen (housekeeping gene) zur Normalisierung der Expression des Zielgens eingesetzt. Es wurden sowohl fertige *TaqMan*[®] Gene Ex-

MATERIAL UND METHODEN

pression Assays (GEA) der Firma Applied Biosystems (Mix aus Primerpaar und Sonde) als auch einzelne Primerpaare und Sonden eingesetzt (Tabelle 6 und Tabelle 7). Im Folgenden sind die Komponenten der beiden PCR-Ansätze (Tabelle 14 und Tabelle 15) und die Zusammensetzung des *TaqMan*[®] PCR Mastermix (Tabelle 16) aufgeführt.

Tabelle 14: **Reaktionsansatz (einfach) für eine quantitative Real-Time PCR**; Primerpaar und Sonde separat vorliegend

	Konzentration	µl pro Ansatz
forward Primer (25 µM)	1 µM	1 µl
reverse Primer (25 µM)	1 µM	1 µl
Sonde (10 µM)	0,4 µM	1 µl
<i>TaqMan</i> [®] PCR Mastermix (2x)	1x	12,5 µl
steriles deionisiertes Wasser	-	8,5 µl
cDNA	-	1 µl
		Σ 25µl

Tabelle 15: **Reaktionsansatz (einfach) für eine quantitative Real-Time PCR** unter Verwendung vorgefertigter *TaqMan*[®] Gene Expression Assays

	Konzentration	µl pro Ansatz
<i>TaqMan</i> [®] Gene Expression Assay (20x)	1x	1,25 µl
<i>TaqMan</i> [®] PCR Mastermix (2x)	1x	12,5 µl
steriles deionisiertes Wasser	-	10,25 µl
cDNA	-	1 µl
		Σ 25µl

Tabelle 16: **Zusammensetzung des 2x *TaqMan*[®] PCR Mastermix**

10x PCR Gold Puffer	1000 µl
MgCl ₂ (25 mM)	600 µl
dNTP's (10 mM)	200 µl
ROX	200 µl
Ampli <i>Taq</i> Gold [®] (5 U/µl)	50 µl
DEPC	2950 µl
Σ 5000 µl	

MATERIAL UND METHODEN

Zur Minimierung von Ungenauigkeiten wurde ein Mastermix aus Primern, Sonde, TaqMan[®] PCR-Mix und Wasser (8,5-4 µl oder 10,25-4 µl) zu 20 µl vorgelegt und dann mit 5 µl cDNA (1 µl+4 µl Wasser) versetzt. Die Proben wurden in Duplikaten gemessen, ein Reagenzienblindwert wurde immer mitgeführt. Die Messungen erfolgten am Mastercycler[®] ep *Realplex* der Firma Eppendorf in 96-Well Platten oder PCR-Strips. Die Zyklenzahl wurde auf 40 festgesetzt, das PCR-Programm ist in Tabelle 17 beschrieben.

Tabelle 17: **PCR-Protokoll für eine quantitative Real-Time PCR**

Schritt	Zeit	Temperatur	Zyklen
Aktivierung AmpliTaq Gold	10 min	95 °C	
Denaturierung	15 sec	95 °C	40x
Elongation	60 sec	60 °C	
		4 °C	

Die Analyse der Daten wurde mit der Software des Mastercycler[®] ep *Realplex* durchgeführt. Mit der Wahl eines geeigneten Thresholds (Schwellenwert) wurden die CT-Werte der gemessenen Proben definiert. Bei der absoluten Quantifizierung wurden die Genom-Kopien berechnet, indem der CT der Probe mit dem CT eines Standards in Beziehung gebracht wurde. Zur Berechnung der relativen Expression wurde die vergleichende delta delta CT-Methode ($2^{-\Delta\Delta CT}$) angewendet. ΔCT ist die Differenz aus dem CT des Referenzgens und des Zielgens. Das mittlere ΔCT der Kontrolle (Nicht-Intervention) wird anschließend vom ΔCT der Intervention subtrahiert, es ergibt sich $\Delta\Delta CT$. Die Änderung der RNA-Expression im Vergleich zur Kontrolle wird durch Delogarithmieren zur Basis zwei berechnet.

2.3 Zellkultur

Alle Zellkulturarbeiten erfolgten unter sterilen Bedingungen an einer Sicherheitswerkbank. Es wurden ausschließlich sterile Materialien, Lösungen und Medien eingesetzt. Die verwendeten Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Vor Arbeitsbeginn wurden Medien und Lösungen auf 37 °C temperiert.

2.3.1 Kultivierung

Kultivierung der HEK-293-Zellen

Die humane embryonale Nierenzelllinie, welche stabil mit dem Adenovirus Typ 5 E1-Gen transfiziert ist, wurde freundlicherweise von Prof. James M. Wilson (Gene Therapy Program, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA, USA) zur Verfügung gestellt. Als Nährlösung der HEK-293 diente DMEM *high Glucose* (Glukose: 4,5 g/l, mit L-Glutamin), angereichert mit 10 % FBS (fötales bovines Serum) und 1 % Penicillin/Streptomycin. Medienwechsel erfolgten 2mal wöchentlich. Die Zellen wurden im Verhältnis 1:2-1:10 passagiert, bevor sie 90 % Konfluenz erreichten. Es wurde darauf geachtet, dass die Zellen nicht überwuchern, da dies die Transfektionseffizienz negativ beeinflusst.

2.3.2 Passagieren und Zellaussaat

Die Zellen wurden über Trypsinierung geerntet. Nach vollständiger Entfernung des Zellkulturmediums und dem Waschen der Zellen mit PBS (1x) erfolgte die Inkubation mit Trypsin/EDTA-Lösung (0,05 % / 0,02 %; 1/10 des Kulturmediumvolumens) für 2-5 Minuten bei 37 °C. Infolge der proteolytischen Aktivität des Trypsins und der Fähigkeit des EDTA zur Komplexbildung von Kationen kommt es zum Ablösen der adhären Zellen. Die Zellen wurden währenddessen unter dem Lichtmikroskop kontrolliert. Nach 5 Minuten nicht abgelöste Zellen wurden vorsichtig mit einem Zellschaber von der Zellkulturplatte gelöst. Anschließend erfolgte die Zugabe der doppelten Menge an Kulturmedium, um das Trypsin mit dem enthaltenen Serum zu inaktivieren. Zur weiteren Kultivierung wurden die Zellen mit der notwendigen Menge an Nährmedium verdünnt und im oben angegebenen Verhältnis in frische Kulturgefäße überführt. Die Bestimmung der Gesamtzellzahl zur Aussaat definierter Zellmengen erfolgte unter Verwendung der Neubauer Zählkammer. Hierzu wurde die Zellsuspension (nach Inaktivierung des Trypsins) gut gemischt und in einer Verdünnung von 1:10-1:50 gezählt. Die Auszählung erfolgte in allen Feldern der vier Außenquadrate. Berechnet wurde die Gesamtzellzahl nach folgender Formel:

$$\text{Summe der gezählten Zellen} / 4 \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4 = \text{Zellen} / \text{ml}$$

MATERIAL UND METHODEN

Die zur Aussaat notwendige Menge an Zellsuspension wurde bei 1200 rpm für 3 Minuten bei RT zentrifugiert. Das Zellpellet wurde anschließend mit Kulturmedium vorsichtig resuspendiert und die Zellen in der entsprechenden Zahl in die Kulturgefäße überführt.

2.3.3 Kryokonservierung und Auftauen

Zur Langzeitaufbewahrung wurden die Zellen eingefroren und in Stickstofftanks bei -196 °C gelagert. Hierfür erfolgte zunächst die Trypsinierung der Zellen (II2.3.2), mit anschließender Zentrifugation bei 1200 rpm über 3 Minuten (RT). Das Zellpellet wurde anschließend in Einfriermedium (10 % DMSO in Kulturmedium) resuspendiert und in ein Kryoröhrchen überführt. Nach 24 Stunden bei -80 °C wurden die Zellen in den Stickstofftank umgelagert.

Zum zügigen Auftauen der Zellen wurden die Kryoröhrchen im Wasserbad bei 37 °C erwärmt und die Zellen anschließend in Kulturgefäße mit vorgelegtem Nährmedium überführt. Nach 24 Stunden erfolgte zur Entfernung des DMSO aus dem Einfriermedium ein Mediumwechsel.

2.4 Herstellung von rAAV

Die rAAV Vektoren wurden nach einem im Gentherapie Programm der Universität Pennsylvania etablierten Protokoll mit einigen wenigen Modifikationen erstellt. In der vorliegenden Arbeit wurden AAV-2/8 Hybridvektoren durch „Cross-Packaging“ zur Gewährleistung einer hohen hepatischen Transduktion erzeugt. Der Unterschied zwischen den verwendeten AAV-2/8 Hybridvektoren und einem AAV-2 Vektor besteht darin, dass das AAV-2 Genom in das Kapsid des AAV-8 verpackt wird. Die eingesetzten replikationsdefizienten AAV-2 Vektoren sind nicht humanpathogen und daher von der ZKBS in die Sicherheitsstufe eins eingestuft. Zur Produktion der rAAV wurden der jeweilige Transgen-tragende Vektor und zwei Helferplasmide mittels Polyethylenimin (PEI) in einer „Triple-Transfektion“ in HEK-293-Zellen kotransfiziert. Die Konzentrierung und Aufreinigung des Virus wurden über drei aufeinanderfolgende Cäsiumchlorid-Dichtegradienten mit anschließender Dialyse vorgenommen.

2.4.1 Plasmide und Vektoren

Die verwendeten Vektor- und Helferplasmide wurden freundlicherweise von Prof. J. M. Wilson (Gene Therapy Program, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA, USA) zur Verfügung gestellt und sind in Tabelle 18 sowie in Abbildung 10 aufgeführt.

Tabelle 18: **Vektor- und Helferplasmide**

Vektorplasmid (cis)	Beschreibung
pAAV2.1-TBG-MCS I und II	Vektorplasmid: 4752 bp, TBG-Promotor, 2 intakte AAV-2 ITR's, MCS (I und II: MCS in umgekehrter Orientierung), SV-40, PolyA Signal, Ampicillinresistenz
pAAV2.1-CMV-MCS	Vektorplasmid: 5426 bp, CMV-Promotor, 2 intakte AAV-2 ITR's, MCS, PolyA Signal, Ampicillinresistenz
pAAV2.1-TBG-LacZ pAAV2.1-CMV-LacZ	Transgen-tragende Vektorplasmide: LacZ unter Kontrolle des TBG- oder CMV-Promotor (7412 bp, 7142 bp), 2 intakte AAV-2 ITR's, PolyA Signal, SV-40 (bei TBG), Ampicillinresistenz
pAAV2.1-CMV-eGFP	Transgen-tragendes Vektorplasmid: 5504 bp, eGFP unter Kontrolle des CMV-Promotor, 2 intakte AAV-2 ITR's, PolyA Signal, Kanamycinresistenz
Helferplasmid	Beschreibung
pAAV-2/8 (trans-Plasmid)	Expression Rep-Gene des AAV-2 und Cap-Gene des AAV-8, Ampicillinresistenz
pAd-delta-F6	Adenovirus-Helferplasmid: Expression adenoviraler Helfergene: VA-RNA, E2A, und E4, Ampicillinresistenz

Die Expression der Transgene, die in die Vektorplasmide eingefügt wurden, wird von den ITR's des AAV-2, sowie über den Promotor des humanen Thyroxin-bindenden Globulins (TBG-Promotor) oder des Cytomegalovirus (CMV-Promotor) kontrolliert. Auf den Vektorplasmiden befinden sich weiterhin eine flexible Klonierungsstelle (MCS: multiple cloning site), die Terminationssequenz BGH-PolyA (bovine growth hormone polyadenylation signal) und zum Teil eine DNA-Sequenz des Affenvirus SV-40 (simian virus type 40). Zur Verpackung des Virus benötigte isolierte Replikationsbestandteile entstammen dem AAV-2 und werden isoliert von den ITR's (cis-Plasmid) auf einem Helferplasmid (pAAV-2/8) zur Verfügung gestellt. Das Helferplasmid pAAV-2/8 enthält neben den Rep-Genen des AAV-2 die Cap-Gene des AAV-8 (trans-Plasmid). Auf dem Helferplasmid pAd-delta-F6 sind die adenoviralen Helfergene E2A, E4 und VA-RNA co-

MATERIAL UND METHODEN

diert. Während E4, vor allem das Produkt des offenen Leserahmens 6 (ORF6), an der Replikation beteiligt ist, unterstützen E2A und VA-RNA die Stabilität der viralen mRNA sowie die Effizienz der Translation [321]. Bei den Transgenen handelt es sich um die Reportergene LacZ (beta-Galaktosidase) und eGFP (enhanced green fluorescent protein), sowie GLP-1 (7-37) und GLP-1 (9-37). Die im Rahmen dieser Arbeit klonierten Vektorplasmide, zur Expression des aktiven und metabolisierten GLP-1, werden ausführlich in Abschnitt II.2.4.2 behandelt.

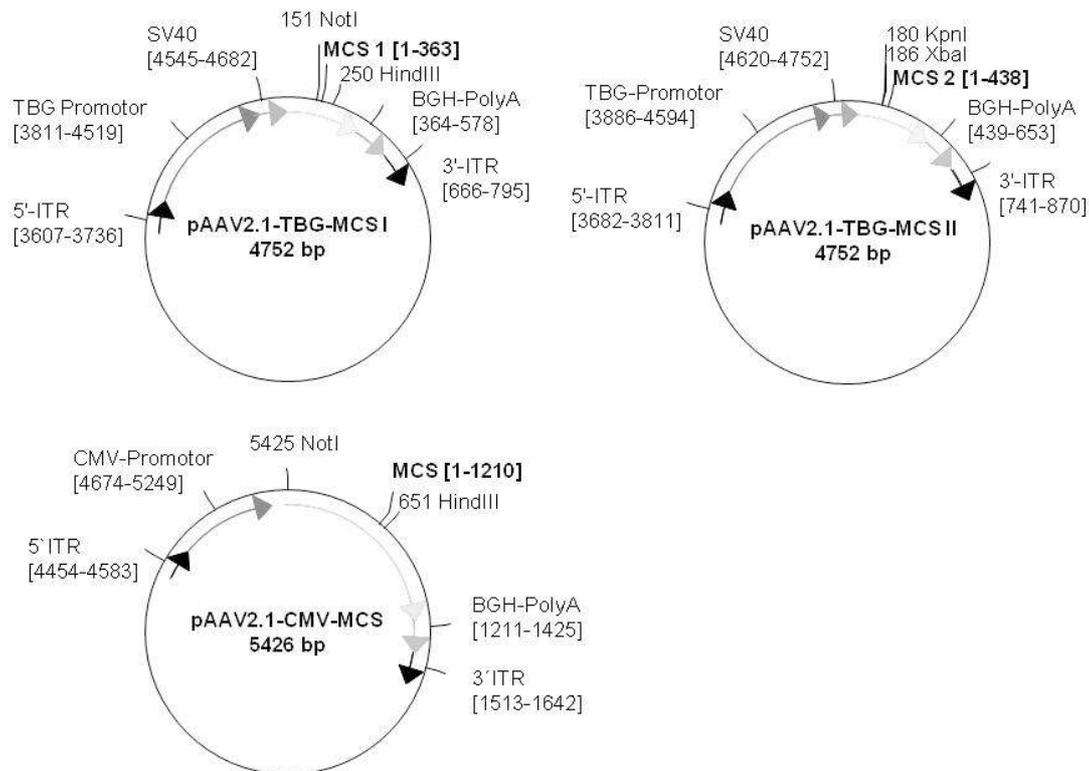


Abbildung 10: **Plasmidmappen der Vektorplasmide**

Für eine effiziente Replikation und Verpackung des Transgens sind intakte ITR's der Vektorplasmide von großer Bedeutung. Die ITR's neigen bei der Vermehrung der Vektorplasmide in *E.coli* zur Ausbildung von Mutationen [342]. Zur Kontrolle der Integrität der ITR's wurden die Vektorplasmide nach jeder Vermehrung in *E.coli* mit dem Restriktionsenzym Sma I verdaut. Sma I schneidet zweifach im zentralen, mutationsanfälligen Bereich der ITR's [308, 329]. Standardmäßig erfolgten nach Plasmidpräparation für alle Vektor- und Helferplasmide ein bis zwei Restriktionskontrollen mit den in Tabelle A 1 angeführten Enzymen. Erst nach einer Kontrolle und Bestätigung der Richtigkeit des

MATERIAL UND METHODEN

Restriktionsmusters mittels Agarose-Gelelektrophorese wurden die Plasmide zur Herstellung der rAAV eingesetzt.

2.4.2 Klonierung der Transgen-tragenden Vektorplasmide

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden folgende Vektorplasmide (Abbildung 11) hergestellt:

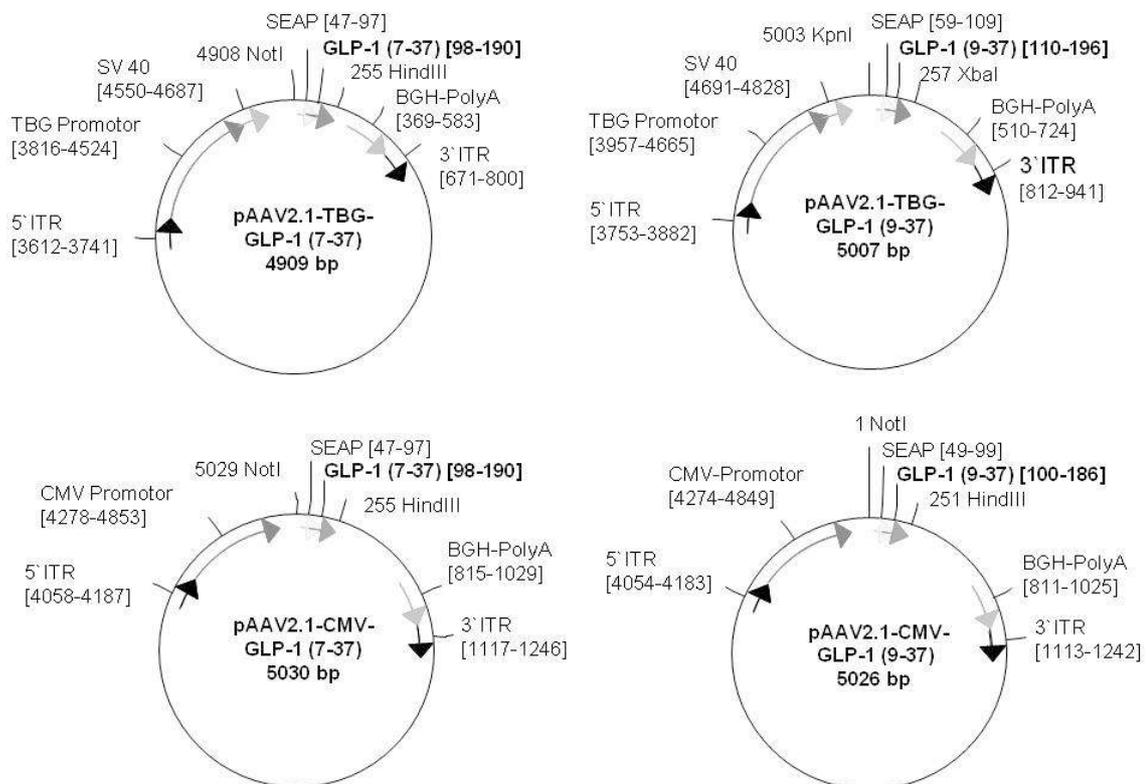


Abbildung 11: **Plasmidkarten der klonierten Vektorplasmide**

Bei dem Transgen GLP-1 (7-37) handelt es sich um eine der zwei aktiven Formen des GLP-1. GLP-1 (9-37) stellt die metabolisierte Variante des aktiven GLP-1 (7-37) nach Abspaltung der zwei N-terminalen Aminosäuren durch die DPP4 dar. Da GLP-1 durch posttranslationale Prozessierung aus Proglukagon generiert wird, besitzt das GLP-1 kein eigenes Startcodon und keinerlei Information zur Sekretion. Demnach wurden die Transgene mit einem Startcodon (ATG) und einem Stopcodon (TAA) versehen, um Initiierung und Termination von Transkription und Translation zu ermöglichen. Zur Gewährleistung der Sekretion in ektopischen nicht-endokrinen Geweben wurde den GLP-

MATERIAL UND METHODEN

Sequenzen die Signalsequenz der sekretierten alkalischen Phosphatase (SEAP) angefügt. Die Signalsequenz begünstigt die Einschleusung des erzeugten Peptides in den sekretorischen Pathway und wird über ubiquitär vorkommende Signalpeptidasen posttranslational wieder entfernt. Die Modifikation der Transgene erfolgte nach Parsons *et al.* (2007) [343].

Als Template für die Klonierung diente die cDNA des humanen Glukagon, welche über ein Expressionsplasmid (pDNR-LIB) der Firma imaGenes bezogen wurde (IRAU969H0742D, Referenzsequenz: BC005278). Nach Anzucht der Stichkultur auf Chloramphenicolplatten, Kultivierung in LB-Medium und Plasmid-DNA-Präparation erfolgte eine PCR zur Amplifizierung der jeweiligen GLP-1-Sequenz aus der cDNA des Glukagon (Tabelle 19 und Tabelle 20).

Tabelle 19: **Reaktionsansatz für die Amplifikation der jeweiligen GLP-1 Sequenz** aus der cDNA des Glukagon

10x PCR-Puffer ohne MgCl ₂	5 µl
MgCl ₂ (50 mM)	1,5 µl
dNTP's (10 mM)	1 µl
pDNR-LIB-Glukagon	2 µl (= 200 ng)
Primer forward (10 µM)	1 µl
Primer reverse (10 µM)	1 µl
Taq-Polymerase (5 U/µl)	0,5 µl
ddH ₂ O	38 µl
	Σ 50 µl

Tabelle 20: **PCR-Protokoll für die Amplifikation der jeweiligen GLP-1 Sequenz** aus der cDNA des Glukagon

Schritt	Zeit	Temperatur	Zyklen
Initialisierung	2 min	94 °C	
Denaturierung	30 sec	94 °C	25x
Hybridisierung	30 sec	60 °C	
Elongation	30 sec	72 °C	
Finale Elongation	10 min	72 °C	
	5 min	20 °C	
		4 °C	

MATERIAL UND METHODEN

Die verwendeten forward Primer enthalten einen 5'-Überhang, eine Kozaksequenz, die Signalsequenz der SEAP mit Startcodon und 21 Nukleotide des jeweiligen GLP-1. Der reverse Primer enthält einen 3'-Überhang, ein Stopcodon sowie 16 Nukleotide des GLP-1 und wurde für die Klonierung beider Konstrukte verwendet. Die designten Primer sind in Tabelle 3 dargestellt. Die entstandenen PCR-Produkte mit einer Länge von 161 bp für das aktive GLP-1 und 155 bp für den GLP-1-Metaboliten wurden bezüglich ihrer Größe mittels Agarose-Gelelektrophorese kontrolliert. Im Anschluss an die PCR wurde eine TOPO-TA-Klonierung durchgeführt (Abschnitt II2.2.3). Dabei erfolgte die Ligation der frischen PCR-Produkte mittels Topoisomerase I in den pCR2.1-TOPO Vektor (3931 bp). Über ein Blau-Weiß-Screening der Methode können Bakterienkolonien, die Plasmide mit Insert tragen, visuell identifiziert werden. Erhaltene weiße Kolonien wurden zunächst mittels Kolonie-Screening-PCR (Abschnitt II2.2.5) auf ihr Insert überprüft. Von positiven Klonen wurde weiterhin eine Übernacht-LB-Kultur angesetzt, anschließend eine Mini-Plasmid-DNA-Präparation durchgeführt und das Insert via Sequenzanalyse (Standardprimer: *M13 uni (-21)*) kontrolliert. Nach der TOPO-TA-Klonierung ergaben sich folgende Plasmide:

pCR2.1-TOPO-SEAP-GLP-1 (7-37): 4092 bp

pCR2.1-TOPO-SEAP-GLP-1 (9-37): 4086 bp

Zur Umklonierung der Konstrukte SEAP-GLP-1 (7-37) und SEAP-GLP-1 (9-37) aus dem pCR2.1-TOPO Vektor in das Vektorplasmid pAAV2.1-CMV-MCS wurden die Plasmide jeweils mit den Restriktionsenzymen Not I und Hind III geschnitten. Die entstandenen DNA-Fragmente wurden elektrophoretisch aufgetrennt. Die durchgeführte Restriktion ergab aus dem TOPO-Vektor ein Fragment von 248 bp (für SEAP-GLP-1 (9-37)) beziehungsweise von 254 bp (für SEAP-GLP-1 (7-37)). Diese und das Rückgrat des pAAV2.1-CMV-MCS von 4774 bp wurden aus dem Agarosegel aufgereinigt. Die gereinigten Fragmente wurden mittels Quick Ligase im Verhältnis 1:3 (Vektor:Insert) ligiert und die Ligationsprodukte transformiert (Abschnitt II2.2.1). Zur Kontrolle der gewachsenen Kolonien wurde eine Kolonie-Screening-PCR durchgeführt und zeitgleich erfolgte die Kultivierung der gepickten Kolonien in LB-Medium zur Plasmid-DNA-Präparation für Kontrollrestriktion und Sequenzierung. Die Sequenzierung erfolgte mit dem Standardprimer *CMV forward*.

MATERIAL UND METHODEN

Zur Erstellung der Transgen-tragenden Vektorplasmide mit TBG-Promotor wurde aus dem TOPO-Vektor SEAP-GLP-1 (7-37) in pAAV2.1-TBG-MCS I und SEAP-GLP-1 (9-37) in pAAV2.1-TBG-MCS II umkloniert. pCR2.1-TOPO-SEAP-GLP-1 (7-37) und pAAV2.1-TBG-MCS I wurden jeweils mit den Restriktionsenzymen Not I und Hind III geschnitten. Der Restriktionsverdau des pAAV2.1-TBG-MCS II und des pCR2.1-TOPO-SEAP-GLP-1 (9-37) erfolgte mit Kpn I und Xba I. Die entstandenen Fragmente: SEAP-GLP-1 (7-37) 254 bp, pAAV2.1-TBG-MCS I 4653 bp, SEAP-GLP-1 (9-37) 261 bp und pAAV2.1-TBG-MCS II 4746 bp wurden elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend aufgereinigt. Ligation, Transformation und Kontrolle der Klone erfolgten nach gleicher Vorgehensweise wie bei der Klonierung der Vektorplasmide mit CMV-Promotor. Die Inserts wurden mit den Sequenzierprimern aus Tabelle 4 kontrolliert. Restriktionskontrollen der klonierten Vektorplasmide erfolgten mit den in Tabelle 21 aufgeführten Enzymen.

Tabelle 21: **Restriktionsmuster der klonierten Vektorplasmide**

Plasmid	Enzym	Restriktionmuster (bp der Fragmente)
pAAV2.1-TBG-GLP-1 (7-37)	Sma I	2873, 1087, 927, 11, 11
	EcoR I	3204, 1134, 292, 131, 100, 48
pAAV2.1-TBG-GLP-1 (9-37)	Sma I	2873, 1569, 543, 11, 11
	EcoR I	3204, 1103, 292, 235, 125, 48
pAAV2.1-CMV-GLP-1 (7-37)	Sma I	2873, 2135, 11, 11
	EcoR I	3204, 838, 809, 131, 48
pAAV2.1-CMV-GLP-1 (9-37)	Sma I	2873, 2131, 11, 11
	EcoR I	3204, 838, 811, 125, 48

Der Klonierung schließt sich die „Triple-Transfektion“ des Transgen-tragenden Vektorplasmids und der Helferplasmide in HEK-293-Zellen an. Nach Transkription und Translation der Rep- und Cap-Gene erfolgt die Verpackung des Transgens in ein Viruskapsid. Die Viruspartikel („Vektoren“) werden isoliert und über eine Cäsiumchlorid-Dichtegradientenzentrifugation aufgereinigt. Alle nachfolgend aufgeführten Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen unter der Laminar Flow ausgeführt. Es wurde ausschließlich mit sterilen Lösungen gearbeitet.

2.4.3 Transfektion

Die Transfektion erfolgte in Anlehnung an Choi *et al.* (2007) und Durocher *et al.* (2007) nach gründlicher Austestung und Optimierung [329, 344]. Für eine Viruspräparation wurden 50 Zellkulturschalen mit einem Durchmesser von 15 cm eingesetzt. 24 Stunden vor der Transfektion wurden die HEK-293-Zellen im Verhältnis 1:3 gesplittet, um eine 80 %ige Konfluenz am Tag der Transfektion zu erzielen. Ein Mediumwechsel mit der Umstellung auf serumfreies Medium erfolgte zwei Stunden vor der Transfektion (19 ml). Als Transfektionsreagenz wurde PEI (linear, 25 kDa), ein nicht-virales polykationisches Polymer der Firma Polysciences, verwendet. Pro Zellkulturschale wurden 26 µg pAd-delta-F6, 13 µg pAAV2/8 und 13 µg Transgen-tragender Vektorplasmid im Verhältnis 1:2 mit PEI (1 mg/ml) transfiziert [344]. Es wurden 5 Transfektionsansätze für jeweils 10 Zellkulturschalen hergestellt. Pro Ansatz wurden 10 ml serumfreies DMEM mit den Plasmiden versetzt, gemischt, PEI hinzugefügt und sofort gevortext. Die Präzipitatbildung erfolgte in einer 15minütigen Inkubation bei RT. Anschließend wurden pro Platte 1,1 ml der PEI-DNA-Komplex-Lösung vorsichtig und unter Schwenken in das Zellkulturmedium getropft. Interaktionen der PEI-DNA-Komplexe mit Proteoglycanen der Zelloberfläche sind vermutlich bei der zellulären Aufnahme von Bedeutung [345]. Die hohe Transfektionseffizienz des PEI resultiert aus der forcierten Freisetzung der Komplexe aus den Endosomen ins Zytoplasma [346] und dem Schutz der DNA vor Degradierung (DNasen) [347]. Die transfizierten HEK-293-Zellen wurden für 72 Stunden im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ gehalten. Ein Mediumwechsel nach PEI-Transfektion ist nicht notwendig [344]. Über die Zugabe von 5 ml DMEM mit 50 % FBS pro Platte wurde jedoch vier Stunden nach Transfektion eine Konzentration von 10 % FBS im Zellkulturmedium wiederhergestellt. Zur Kontrolle der Transfektionseffizienz wurde bei jeder Transfektion eine Platte HEK-293-Zellen mit pAAV2.1-CMV-eGFP nach dem oben beschriebenen Schema transfiziert.

2.4.4 Aufreinigung und Konzentrierung

Die Konzentrierung und Aufreinigung des Virus wurden über drei aufeinanderfolgende Cäsiumchlorid-Dichtegradienten mit anschließender Dialyse vorgenommen. Die Cäsiumchlorid-Dichtegradientenzentrifugation ermöglicht die Abtrennung von leeren Kapsiden und Verunreinigungen mit einer höheren oder niedrigeren Dichte [348].

MATERIAL UND METHODEN

Die HEK-293-Zellen wurden 72 Stunden nach der Transfektion durch Abschaben geerntet, bei 4000 rpm für 15 Minuten (4 °C) sedimentiert, mit 20 ml PBS (1x) resuspendiert und erneut bei 4000 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde sofort weiterverarbeitet oder bis zur Aufreinigung bei -80 °C gelagert.

Bei -80 °C gelagerte Zellpellets wurden zunächst für 10 Minuten bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut. Das Pellet wurde anschließend in 27 ml TMN-Puffer resuspendiert. Der Zellaufschluss zur Freisetzung der Viruspartikel erfolgte mittels Sonifizierung. Die auf Eis gehaltene Zellsuspension wurde dabei für dreimal 30 Sekunden bei 30 % Output mit dem Branson Sonifier B15 sonifiziert. Um freie RNA und DNA abzubauen, wurde das Zelllysate mit 25 U/ml Benzonase[®] (Nuclease ultrapure grade, Sigma) versetzt, vorsichtig invertiert und für 20 Minuten bei 37 °C inkubiert. Nach 10minütiger Behandlung mit 1,25 ml Desoxycholsäure (10 %) bei 37 °C wurde die Suspension für 10 bis 20 Minuten auf Eis gehalten. Zur Abtrennung von Zellbruchstücken wurde eine Zentrifugation bei 4000 rpm und 4 °C für 15 Minuten durchgeführt. Der geklärte Überstand wurde anschließend mit 0,454 g Cäsiumchlorid (CsCl) pro Milliliter versetzt und durchmischt. Für die Ultrazentrifugation wurden pro Viruspräparation zwei open-top-Zentrifugenröhrchen (Polyallomer Tube, Beckman Coulter) vorbereitet. Dabei wurden je Röhrchen 9 ml 1,41 g/ml CsCl-Lösung mit 9 ml 1,61 g/ml CsCl-Lösung unterschichtet. Jeweils die Hälfte der CsCl-versetzten Suspension wurde vorsichtig auf die vorbereiteten Gradienten gegeben. Die Ultrazentrifugation erfolgte in einem SW 32 Ti Rotor (Beckman Coulter) für 18 bis 20 Stunden bei 25.000 rpm (15 °C). Nach der ersten Zentrifugation reichern sich Lipide an der Oberfläche der Lösung an und in der Mitte des Röhrchens ist die AAV-Bande zu erkennen [329]. Nach Entfernung des Lipidpfropf wurde der Gradient von oben mit einer Pipette in Fraktionen von 1 ml abgenommen. Von allen Fraktionen wurde in 5 µl Aliquots der Brechungsindex mittels Refraktometer bestimmt. Fraktionen mit einem Brechungsindex von 1,362 bis 1,373 wurden in zwei Quick-Seal-Zentrifugenröhrchen (Quick-Seal[®] Polyallomer Tube, Beckman Coulter) vereinigt, luftblasenfrei mit 1,41 g/ml CsCl-Lösung aufgefüllt und bei 60.000 rpm für 20 bis 24 Stunden (15 °C) in einem 70.1 Ti Rotor (Beckman Coulter) zentrifugiert. Auch die Ernte der Fraktionen aus den Quick Seal Tubes erfolgte von oben. Dazu wurde mittels Kanüle und Spritze die erste Fraktion von 1 ml aus dem Tube gezogen und anschließend mit Hilfe eines Skalpell die Kappe des Tube abgetrennt. Die Sammlung der Fraktionen (1 ml) konnte somit erneut mit einer Pipette realisiert werden. Konform zur ersten Fraktionierung wurden die

MATERIAL UND METHODEN

virushaltigen Fraktionen in nun lediglich einem Quick-Seal-Zentrifugenröhrchen vereinigt und ein weiteres Mal im 70.1 Ti Rotor über Nacht zentrifugiert. Nach der dritten Ultrazentrifugation wurden Fraktionen von 500 µl gesammelt und nur jene mit einem Brechungsindex von 1,364 bis 1,371 vereint. Im Anschluss an die Aufreinigung erfolgte eine weitere Aufkonzentrierung und Filtrierung des rAAV. Zur Entfernung des potentiell toxischen Cäsiumchlorids wurden die vereinten Virusfraktionen mit 10 ml PBS (1x) über einen Millipore UltraFree 100K Filter bei 3000 rpm dialysiert. Dieser Waschvorgang wurde noch zweimal mit 12 ml PBS (1x) wiederholt. Der auf ein Gesamtvolumen von 2 ml aufkonzentrierte Virus wurde in ein Kryoröhrchen überführt. Um Verluste über anheftende AAV-Partikel an der Filtermembran zu minimieren, wurde diese viermal vorsichtig mit 100 µl PBS (1x) gewaschen, welches anschließend der AAV-Lösung zugefügt wurde. Die aufgereinigten und konzentrierten AAV's wurden bei 4 °C gelagert. Zur langfristigen Aufbewahrung bei -80 °C erfolgte die Zugabe von sterilem Glycerin (5 % Endkonzentration) zum AAV-Stock.

2.4.5 Titerbestimmung

Die Quantifizierung der rAAV-Vektoren erfolgte mittels Real Time PCR (II2.2.5). Dabei wurde ein Fragment der BGH-Poly(A+) Region des AAV-Vektors mit einem spezifischen Primer-Paar amplifiziert und das PCR-Produkt mittels fluoreszenzmarkierter (FAM) AAV-BGH-PolyA-Sonde fluorimetrisch nachgewiesen. Bei dieser RT-PCR handelt es sich um eine absolute Quantifizierung der AAV-Genom-Kopien. Zur Kalkulation wurde dabei der CT-Wert der Probe mit dem CT-Wert eines Standards in Beziehung gebracht. Als Referenz diente ein mit Sal I linearisiertes Vektorplasmid, das in einer Verdünnungsreihe von 1 ng/µl ($3,84 \cdot 10^8$ Genomkopien) bis 0,001 ng/µl als Standard eingesetzt wurde. Die Anzahl der Genomkopien, die bei der Amplifizierung von 1 ng entstehen, wurden anhand der nachfolgenden Formel berechnet.

$$\text{Genomkopien pro ng} = 1 \cdot 10^{-9} \text{ g} / (\text{Anzahl Basenpaare} \times 660 \text{ g/mol}) \times 6,02 \cdot 10^{23} / \text{mol} \times 2$$

Durchschnittliche Molmasse eines Basenpaares: 660 g/mol

Avogadro-Konstante: $6,02213670 \cdot 10^{23} / \text{mol}$

In Vorbereitung auf die Quantifizierung wurden die rAAV-Vektoren einem DNase-Verdau zum Abbau unverpackter Virus-DNA unterzogen. Der DNase-Verdau erfolgte

MATERIAL UND METHODEN

mit einer RNase-freien DNase I (Roche) für eine Stunde bei 37 °C (Tabelle 22). Eine sich anschließende Inkubation für 5 Minuten bei 95 °C diente zur Inaktivierung der DNase und Freisetzung des AAV-Genoms aus dem Kapsid.

Tabelle 22: **Reaktionsansatz (einfach) für den DNase-Verdau der rAAV-Vektoren**

rAAV-Lösung	5 µl
10x DNase-Puffer	5 µl
DNase I (10 U/µl)	2 µl
steriles deionisiertes Wasser	38 µl
	Σ 50 µl

In der sich anschließenden Real Time PCR wurden die rAAV in zwei Verdünnungen (1:100, 1:1000) mittels *Ampli Taq*[®] Gold-Polymerase (Applied Biosystems) quantifiziert. In Tabelle 23 sind die Komponenten des PCR-Ansatzes aufgeführt.

Tabelle 23: **Reaktionsansatz (einfach) für die Real Time PCR zur Quantifizierung der rAAV**

	Konzentration	µl pro Ansatz
BGH-PolyA forward Primer (25 µM)	1 µM	1 µl
BGH-PolyA reverse Primer (25 µM)	1 µM	1 µl
BGH-PolyA Sonde (10 µM)	0,4 µM	1 µl
<i>TaqMan</i> PCR Mastermix (2x)	1x	12,5 µl
steriles deionisiertes Wasser	-	8,5 µl
Vektor oder Standard	-	1 µl
		Σ 25 µl

Zur Minimierung von Ungenauigkeiten wurde ein Mastermix aus Primern, Sonde, *TaqMan*[®] und Wasser (8,5-4 µl) zu 20 µl vorgelegt und dann mit 5 µl Probe oder Standard (1 µl+4 µl Wasser) versetzt. Ein Reagenzienblindwert und eine Positivkontrolle wurden mitgeführt und analog wie Standard und Proben in Duplikaten gemessen. Das am Mastercycler[®] ep *Realplex* durchgeführte PCR-Programm mit einer Amplifikation über 40 Zyklen ist im Abschnitt II2.2.5 beschrieben. Die Auswertung der Messung erfolgte nach Wahl eines geeigneten Thresholds (Schwellenwert) in der logarithmischen

MATERIAL UND METHODEN

Kurvendarstellung. Es wurden ausschließlich Quantifizierungen ausgewertet, bei denen die Steigung der Geraden („Slope“), die sich aus den CT-Werten der Standardreihe ergibt, zwischen -3,3 und -3,7 lag.

2.5 *In-vitro* Versuche

Zur funktionellen Überprüfung der angewendeten Klonierungsstrategie wurde pAAV2.1-CMV-GLP-1 (7-37) stellvertretend für die angewendete Klonierungsstrategie in HEK-293-Zellen transfiziert. Die Gewährleistung der Expression und vorallem Sekretion des Transgens sollte auf diesem Weg überprüft werden.

Das Vektorplasmid pAAV2.1-CMV-GLP-1 (7-37) wurde mittels PEI in $1 \cdot 10^6$ Zellen pro Ansatz im 6-Well transfiziert. Als Kontrolle dienten mit dem Leervektor pAAV2.1-CMV-MCS transfizierte Zellen. Zwei Stunden vor Transfektion wurden die HEK-293-Zellen auf serumfreies Medium (2 ml DMEM) umgestellt. Pro Ansatz wurde 2 µg Plasmid-DNA mit 400 µl serumfreiem DMEM versetzt, nach Zugabe von 4 µl PEI (DNA:PEI = 1:2) gevortext und anschließend für 15 Minuten bei RT inkubiert. Die PEI-DNA-Komplexe wurden anschließend vorsichtig ins Kulturmedium auf die Zellen getropft. Eine Zugabe von 600 µl 50 % DMEM/FBS zur Anhebung des FBS-Gehaltes auf 10 % erfolgte vier Stunden nach der Transfektion. Das FBS wurde dafür 30 Minuten bei 56 °C hitzeinaktiviert. Nach 72 Stunden wurde das Medium der Zellen für die Bestimmung des Gesamt-GLP-1 (II2.6.4) abgenommen. Die Zellen wurden zur RNA-Extraktion, wie in Abschnitt II2.2.4 beschrieben, geerntet. Nach anschließender cDNA-Synthese wurde eine PCR mit den Primern aus der Klonierung des Vektorplasmids (Tabelle 3) nach dem Ansatz und Programm in Tabelle 9 und Tabelle 20 durchgeführt.

2.6 **Proteinchemische Methoden**

2.6.1 **Proteinisolierung**

Extraktion Gesamtprotein

In Stickstoff gefrorenes Gewebe wurde zu 10-20 mg abgewogen, mit 300 µl kaltem Lysepuffer (T-Per[®] Extraktionsreagenz) versetzt und mittels Stößel auf Eis homogenisiert. Nach einer 20minütigen Inkubation auf Eis wurden unlösliche Zellreste durch

MATERIAL UND METHODEN

Zentrifugation für 20 Minuten bei 14.000 rpm (4 °C) abgetrennt und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Das Zellysate wurde immer auf Eis gehalten, die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

Vor jeder Isolierung wurde das T-Per[®] Reagenz frisch mit Proteaseinhibitoren und bei Bedarf mit Phosphataseinhibitoren versetzt. Eine Complete[®] Tablette von Roche hemmt ein breites Spektrum an Serin- und Cystein- Metalloproteasen. Diese wurde als 25fache Stocklösung angesetzt und zu 4 % im Lysepuffer verwendet. Natriumfluorid (1 mM) und Natriumorthovanadat (1 mM) wurden als Phosphataseinhibitoren eingesetzt.

2.6.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinbestimmung wurde nach der Methode von Bradford [349] mit dem Kit der Firma Bio-Rad (Bio-Rad Protein Assay) vorgenommen. Das Verfahren beruht auf der Bindung des Farbstoffes Coomassie-Brillantblau an Proteine in saurer Lösung. Durch die Bindung wird das Absorptionsmaximum des Farbstoffes von 465 auf 595 nm verschoben und der Proteingehalt kann photometrisch quantifiziert werden. Als Referenzprotein zur Erstellung einer Eichgeraden diente Immunglobulin G (3,1-25,5 µg/ml). Nach Herstellerangaben wurde das Reagenz (Protein Assay Konzentrat) 1:5 mit Aqua bidest verdünnt, im Verhältnis 1:500 mit Proteinlysate 10 Minuten im Dunkeln inkubiert und die Extinktion bei OD₅₉₅ gemessen.

2.6.3 Western Blot

2.6.3.1 SDS-Polyacrylamidgel Elektrophorese

Die SDS-Polyacrylamidgel Elektrophorese (SDS-PAGE) dient der Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht unter denaturierenden Bedingungen in einem elektrischen Feld. Die Auftrennung erfolgte diskontinuierlich durch Verwendung von Sammel- und Trenngel nach einer modifizierten Methode von Laemmli [350].

Bei der Probenvorbereitung wurden zwischen 15-30 µg Protein mit Laemmli-Probenpuffer (6x) versetzt und für 5 Minuten bei 95 °C denaturiert. Der Probenpuffer enthält das anionische Tensid Natriumdodecylsulfat (sodium dodecylsulfat, SDS), welches die Sekundär- und Tertiärstruktur der Proteine zerstört und über die Bildung von

MATERIAL UND METHODEN

SDS-Protein-Komplexen diesen proportional zur Größe eine negative Ladung verleiht. Zur Reduktion der Disulfidbrücken wurde DTT im Probenpuffer verwendet. Die denaturierten Proteinproben und ein vorgefärbter Molekulargewichtsstandard wurden anschließend auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen. Die Wanderungsgeschwindigkeit der Proteine ist reziprok proportional zur eingesetzten Acrylamidkonzentration im Trenngel. Sammelgele wurden mit 5 % und Trenngele mit 12 % Acrylamid hergestellt. Die elektrophoretische Auftrennung in Laufpuffer dauerte 45-60 Minuten bei einer konstanten Stromstärke von 30 mA pro Gel (Gelstärke: 0,75 mm). Verwendet wurde das Mini-Protean 3 Elektrophorese Modul von Bio-Rad.

2.6.3.2 Immunoblotting

Nach der Separation durch SDS-PAGE wurden die Proteine aus dem Gel auf eine PVDF Membran (Transfermembran Immobilon-P, Zefa-Laborservice GmbH) für die Immunodetektion übertragen. Für den Transfer wurde das X Cell II™ Blot Module von Invitrogen verwendet. Zunächst erfolgte die Aktivierung der PVDF Membran. Hierzu wurde diese für eine Minute in Methanol und anschließend eine Minute in Aqua bidest geschwenkt. Vor dem Zusammenbau der Blotapparatur wurden Filterpapier (Whatmanpapier), Schwämmchen und aktivierte Membran in Transferpuffer eingeweicht. Das vom Sammelgel separierte Trenngel wurde wie im unteren Schema (Abbildung 12) angegeben mit der PVDF Membran zwischen feuchtes Whatmanpapier und Schwämmen gepackt.

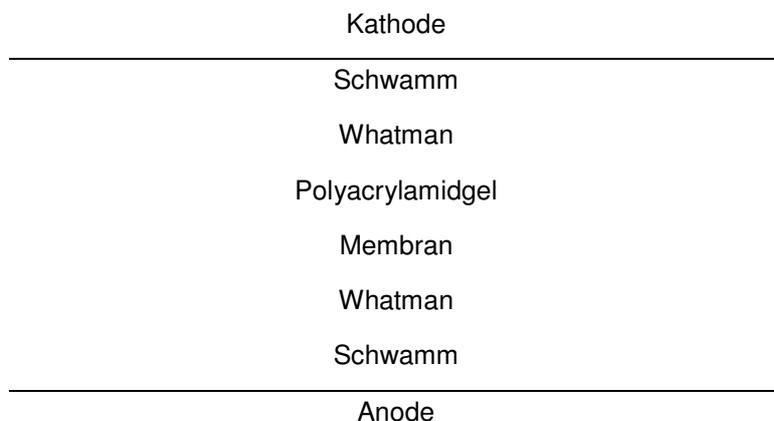


Abbildung 12: **Aufbauschema für das Immunoblotting**

MATERIAL UND METHODEN

Der Transfer erfolgte konstant bei 25 V für 1-2 Stunden mit NuPAGE® Transferpuffer (Invitrogen). Infolge der negativen Ladung wandern die Proteine aus dem Gel zur Membran in Richtung Anode. Im Anschluss wurde die PVDF Membran für mindestens eine Stunde bei RT unter leichtem Schütteln mit 5 % Milchpulver in TBS-Tween (TBS-T) inkubiert. Dabei werden alle unspezifischen Proteinbindungsstellen gesättigt (= Blocken).

2.6.3.3 Detektion

Nach dem Blocken wurde die Membran zunächst dreimal für 5 Minuten mit TBS-T gewaschen. Die anschließende Primärantikörper-Inkubation erfolgte immer bei 4 °C unter leichtem Schütteln über Nacht. Die Antikörper wurden in TBS-T mit Milchpulver oder BSA verdünnt. Die Verdünnungen und jeweiligen Inkubationslösungen sind der Tabelle 24 zu entnehmen.

Tabelle 24: **Primärantikörper: Verdünnung und Inkubationslösung**

Antigen	Molekülmasse (kDa)	Isotyp	Verdünnung
Akt1	60	Hase, monoclonal, IgG	1:1000, 5 % BSA
phospho-Akt (Thr308)	60	Hase, monoclonal, IgG	1:1000, 5 % BSA
β-Aktin	42	Hase, polyclonal	1:2000, 5 % BSA

Nach der Inkubation mit dem Primärantikörper wurde die Membran dreimal für 5 Minuten in TBS-T gewaschen. Der HRP-konjugierte sekundäre Antikörper (HRP: horseradish peroxidase, Meerrettich-Peroxidase) wurde, wie Tabelle 25 zu entnehmen ist, verdünnt und die Membran mit diesem für eine Stunde bei RT schüttelnd inkubiert.

Tabelle 25: **Sekundärantikörper: Verdünnung und Inkubationslösung**

Antikörper	Verdünnung
Goat Anti-Rabbit-IgG, HRP gekoppelt	1:10.000, 5 % Milchpulver

Nach erneuter Waschung der Membran (dreimal 5 Minuten) wurden die Antikörper-Enzym-Konjugate über Chemolumineszenz nachgewiesen. Das verwendete Kit der

MATERIAL UND METHODEN

Firma Thermo Scientific (Chemolumineszenz Detections Kits, Super Signal West Dura Extendet Duration Substrate) enthält eine Luminol- und eine Peroxid-Lösung. Die Membran wurde für eine Minute mit einer 1:1 Mischung dieser Lösungen inkubiert. Die Meerrettich-Peroxidase setzt in Anwesenheit von Wasserstoff-Peroxid Luminol um. Dabei entsteht ein Anion im angeregten Zustand, welches beim Abfall auf den Grundenergiezustand Licht emittiert. Durch das Auflegen eines Röntgenfilms (Fuji Medinal X-Ray) in einer Filmkassette wurde die von der Peroxidase katalysierte Lichtreaktion nachgewiesen. Die Membran wurde im Anschluss daran getrocknet oder in TBS-T bei 4 °C gelagert.

Bei Bedarf erfolgte die densitometrische Auswertung der Blots mittels ImageJ Software. Nach einer Normalisierung der Proteinexpression auf die Ladekontrolle (β -Aktin) wurde das Verhältnis zwischen aktivierter / nicht aktivierter Form des Proteins ermittelt.

2.6.3.4 Stripping

Das Entfernen von Primär- und Sekundärantikörper von der PVDF Membran wird mit dem englischen Begriff „Stripping“ bezeichnet. Der Vorteil des „Stripping“ besteht darin, dass eine Membran zum Nachweis verschiedener Antigene verwendet werden kann. Zur Entfernung der Antikörper wurde die Membran für 30 Minuten in Stripping Lösung 1 (25 mM Glycin, 1 % SDS, pH 2,05) und anschließend für 10 Minuten in Stripping Lösung 2 (157 mM NaCl in PBS) jeweils schüttelnd bei RT inkubiert. Um die Membran erneut mit Primär- und Sekundärantikörper zu versetzen, wird diese zunächst wieder mit 5 % Milchpulver in TBS-T geblockt.

2.6.4 Enzyme-linked Immunosorbent Assay

Analog dem Western Blot ist der Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) ein immunologisches Verfahren zur spezifischen Detektion von Antigenen. Mittels „Sandwich-ELISA“ wurden in dieser Arbeit die Parameter Adiponectin, GLP-1 (gesamt), Insulin und IL-6 bestimmt. Das Prinzip des nicht-kompetitiven Sandwich-ELISA basiert auf der Bindung von zwei Antikörpern an verschiedenen Epitopen des zu quantifizierenden Antigens mit anschließender enzymatisch katalysierter Farbreaktion. Bei dem verwendeten ultrasensitiven Maus-Insulin-ELISA der Firma Alpco Diagnostics erfolgte die Durchfüh-

MATERIAL UND METHODEN

nung entsprechend den Herstellerangaben. Der ELISA zur Bestimmung des Gesamt-GLP-1 wurde nach einem von Herrn Gerald Spöttl (LMU München) entworfenem Protokoll, welches er uns freundlicherweise zur Verfügung gestellt hat, mit einigen wenigen Veränderungen durchgeführt. DuoSet[®] ELISA Development Kits der Firma R&D Systems (Adiponectin und IL-6) wurden für jedes Antigen etabliert und nach dem im Folgenden beschriebenen Schema durchgeführt.

DuoSet[®] ELISA Development Kit

Nach Vorgaben des Herstellers wurden Primär- und Sekundärantikörper in PBS gelöst. Die Arbeitskonzentrationen sind in Tabelle 26 aufgelistet. Rekonstitution des Standards und die Herstellung der Verdünnungsreihe erfolgten mit Reagent Diluent (1 %ige BSA-Lösung). Alle Arbeitsschritte und Inkubationen wurden bei RT ausgeführt. Wenn nicht anders vermerkt, wurden 100 µl der jeweiligen Inkubationslösung pro Well eingesetzt. Sowohl Standards, Proben als auch Kontrollen wurden in Duplikaten gemessen.

In Vorbereitung auf den ELISA wurden 96-Well-Platten mit Primärantikörper in PBS pro Well über Nacht (coating antibody, capture antibody) inkubiert. Dabei erfolgt über hydrophobe Wechselwirkungen eine Absorption des Antikörpers an die Polystyroloberfläche der Platte. Am nächsten Tag wurde die Antikörperlösung verworfen und die Wells dreimal mit 400 µl Waschpuffer gewaschen. Ein Waschvorgang (dreimal 400 µl/ Well) wurde an jede Inkubation angeschlossen. Nach dem Blocken freier Bindungsstellen mit 300 µl 1 %iger BSA-Lösung (Reagent Diluent) für eine Stunde, erfolgte die zweistündige Inkubation mit Probe/Standard/Kontrolle. Die Standardlösungen, Verdünnungen der Proben und Kontrollen wurden in Reagent Diluent angesetzt. Während der Inkubation kommt es zur Ausbildung von Antigen-Antikörper-Komplexen. Im Anschluss daran wurden die Wells für zwei Stunden mit Biotin-konjugiertem-Zweitantikörper (detection antibody), verdünnt in Reagent Diluent, bedeckt. Es entstehen Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplexe („Sandwich“). Bei der nachfolgenden 20minütigen Inkubation im Dunkeln bindet Streptavidin-HRP (Meerrettichperoxidase-konjugiertes-Streptavidin) an das Biotin des Zweitantikörpers. Durch Zugabe eines Peroxidasesubstrates (H₂O₂:3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine = 1:1) wurde die Farbreaktion initiiert und nach 20 Minuten im Dunkeln durch die Zugabe von 100 µl 2 N Schwefelsäure gestoppt. Die Absorptionsmessung erfolgte bei 450 nm (Referenz 620 nm) im ELISA-Plattenreader. Anhand einer mitgeführten Standardverdünnungsreihe wurde eine Standardgerade erstellt und die Konzentration der einzelnen Proben bestimmt.

MATERIAL UND METHODEN

Gesamt-GLP-1

Der Antikörper Anti-GLP-1 (ABS 046-03), der als Primärantikörper verwendet wurde, ist gegen den nicht amidierten C-Terminus gerichtet und detektiert spezifisch GLP-1 (1-37), GLP-1 (7-37) und GLP-1 (9-37). Im mittleren Bereich des GLP-1 bindet der Anti-GLP-1 (HYB 147-12), der in biotiniertes Form (HYB 147-12B) als Zweitantikörper verwendet wurde.

Der Ablauf des ELISA und die verwendeten Lösungen entsprechen denen der DuoSet® ELISA Development Kits. Abweichungen werden im Nachfolgenden erläutert. Die Arbeitskonzentrationen der Antikörper, die von der Firma Bioporto bezogen wurden, sind Tabelle 26 zu entnehmen. Ein Waschvorgang (dreimal 400 µl/ Well) wurde an jede Inkubation angeschlossen. Wenn nicht anders vermerkt, wurden 50 µl der jeweiligen Inkubationslösung pro Well eingesetzt. Zu Beginn erfolgte die Beschichtung der 96-Well Platte mit dem in Natriumhydrogencarbonat (0,1 M) verdünnten Primärantikörper bei 4 °C über Nacht. Nach Verwerfen des Antikörpers und dem Waschen der Platte erfolgte eine zweistündige Inkubation mit 1 %iger BSA-Lösung (Reagent Diluent, 200 µl pro Well) bei RT. Die mit Reagent Diluent (+ 0,05 % Tween) erstellten Standardlösungen (0; 15,63; 31,25; 62,5; 125; 250; 500; 1000 pM) und Probenverdünnungen wurden über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach Entfernung von Standard und Proben sowie Waschung der Platte wurden die Wells mit in Reagent Diluent (+ 0,05 % Tween) verdünntem Sekundärantikörper für vier Stunden bei 4 °C inkubiert. Die nachfolgenden Behandlungen mit Streptavidin-HRP und dem Peroxidasesubstrat (H₂O₂:3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine = 1:1) erfolgten jeweils für 30 Minuten bei RT (dunkel). Abgestoppt wurde die Reaktion mit 100 µl 2 N Schwefelsäure und anschließend die Absorption bei 450 nm (Referenz 620 nm) im ELISA-Plattenreader gemessen.

Tabelle 26: **Arbeitskonzentration für Primär- und Sekundärantikörper**

ELISA	Arbeitskonzentration	
	Primärantikörper (capture)	Sekundärantikörper (detection)
Adiponectin (Maus)	2000 ng/ml	50 ng/ml
IL-6 (Maus)	2000 ng/ml	200 ng/ml
Gesamt-GLP-1	3,3 µg/ml	1 µg/ml

2.7 *In-vivo* Modelle

2.7.1 Versuchstiere

Es wurden zur Beantwortung der unterschiedlichen Fragestellungen verschiedene Mausstämme verwendet (Tabelle 27). Die Experimente wurden ausschließlich an männlichen Tieren durchgeführt. Die Haltung der Mäuse erfolgte nach Genotyp getrennt in Gruppen bis zu 3 Tieren unter geregelter 12 Stunden Tag / Nacht-Rhythmus. Wasser und Futter (Tabelle 28) stand den Tieren ad libitum zur Verfügung. Generell erhielten die Mäuse 7-10 Tage nach Anlieferung eine Nummer per Ohrclip und wurden anschließend anhand von Gewicht und Nüchternlipidprofil gematcht. Die Administration der AAV erfolgte in einer Konzentration von $1 \cdot 10^{12}$ Genomkopien über die Schwanzvene.

Die Genehmigung für die der Arbeit zugrunde liegenden Tierversuche wurde von der Regierung Oberbayern für den Antrag „Untersuchung der vasoprotektiven und antiinflammatorischen Eigenschaften des GLP-1“ (Geschäftszeichen: 55.2-1-54-2531-93-08) erteilt.

Tabelle 27: **Übersicht über verwendete Mausstämme**

Mausstamm	Alter (Versuchsbeginn)	Lieferant
B6.129S7-Ldlr ^{tm1Her/J} , Stock: 002207 [LDL-Rezeptor ^{-/-}]	6-7 Wochen	Jackson Laboratory, Bar Harbor, USA
C57BL/6NCrI (Wildtyp)	6-7 Wochen	Charles River, Sulzfeld, Deutschland
BALB/c AnNCrI	6-7 Wochen	Charles River, Sulzfeld, Deutschland

2.7.2 Versuchsdäten

In den verschiedenen Studienmodellen kamen folgende Versuchsdäten (Tabelle 28) zum Einsatz:

MATERIAL UND METHODEN

Tabelle 28: **Übersicht über eingesetzte Futtermittel**; AF (Alleinfutter), R (Ratte), M (Maus), H (Haltung), EF (Experimentalfutter)

Diät	Artikelnummer	Lieferant
Normaldiät	AF R/M-H V1535-0	ssniff [®] , Soest, Deutschland
Hochfettdiät „Western Diet“ (0,2 % Cholesterin; 21,2 % Rohfett)	EF R/M nach TD88137modifiziert: E15721-34	ssniff [®] , Soest, Deutschland
Methionin-Cholin-defiziente Diät (MCD-Diät: 46 % Saccharose; 10 % Fett)	TD90262	Harlan [™] , Madison, USA

2.7.3 Studienmodelle

Inflammationsmodell: Exendin-4

Zur Prüfung anti-inflammatorischer Effekte des GLP-1 wurde ein akutes Inflammationsmodell mit BALB/c Mäusen verwendet. Dabei wurden fünf Tiere mit dem GLP-1 Rezeptor-Agonisten Exendin-4 über sieben Tage in einer täglichen Dosis von 1 µg/ 20 g (12 nmol/ kg Körpergewicht/ Tag) intraperitoneal injiziert. Die Dosis wurde auf zwei Injektionen pro Tag gesplittet. Das Exendin-4 der Firma Bachem wurde in 0,9 %iger Kochsalzlösung mit 0,1 % BSA appliziert. Eine Kontrollgruppe (n=5) erhielt ebenfalls angepasst an Körpergewicht die 0,1 % BSA-haltige Kochsalzlösung. Die Tiere wurden vor Versuchsbeginn nach Gewicht gematcht und durchgehend auf Normaldiät gehalten. Der akute Inflammationreiz wurde nach sieben Tagen Intervention über eine intraperitoneale LPS-Injektion von 50 ng/ g Körpergewicht realisiert. Beendet wurde der Versuch zwei Stunden nach LPS-Gabe mit einer Blutentnahme.

Inflammationsmodell (NASH): GLP-1

Zur näheren Charakterisierung der anti-inflammatorischen Eigenschaften des aktiven GLP-1 und zur Prüfung möglicher Effekte des metabolisierten GLP-1 auf chronische Entzündungsprozesse, wurde ein Mausmodell mit Diät-induzierter nicht-alkoholischer Steatohepatitis ausgewählt. Mittels AAV wurden GLP-1 (7-37), GLP-1 (9-37) und beta-Galaktosidase (LacZ-Gen, Kontrollgruppe) unter der Kontrolle des TBG-Promotors in C57BL/6 Mäusen hepatisch überexprimiert. Nach einer initialen Blutentnahme und dem Matchen in drei Gruppen zu je 11-12 Tieren erfolgte die Virusinjektion. Zunächst erfolg-

MATERIAL UND METHODEN

te für vier Wochen die Gabe einer Normaldiät, mit anschließender Blutentnahme und Umstellung auf Methionin-Cholin-defiziente Diät (MCD-Diät). Der Versuch wurde nach insgesamt acht Wochen (vier Wochen MCD-Diät) terminiert. (Abbildung 13). MCD-Diäten sind durch einen hohen Gehalt an Saccharose ($\geq 40\%$) und Fett (10%) sowie das Fehlen der essentiellen Aminosäuren Methionin und Cholin gekennzeichnet. Beide Aminosäuren sind bedeutsam für die hepatische β -Oxidation und die VLDL-Synthese. Ein Mangel an Methionin und Cholin führt über eine gestörte Phosphatidylcholinsynthese zu einer Akkumulation von Triglyzeriden in der Leber. Zudem wird die Expression von Cytochrom P450 2E1 (CYP2e1) induziert, was zu einer verstärkten Bildung von ROS führt. Das Fehlen der schwefelhaltigen Aminosäure Methionin, die als Präkursor für die Biosynthese des Glutathion dient, führt zu einer verminderten antioxidativen Kapazität in der Leber. Der sich daraus ergebende oxidative Stress forciert die Expression proinflammatorischer Zytokine und die Fibrogenese [74, 351-352].

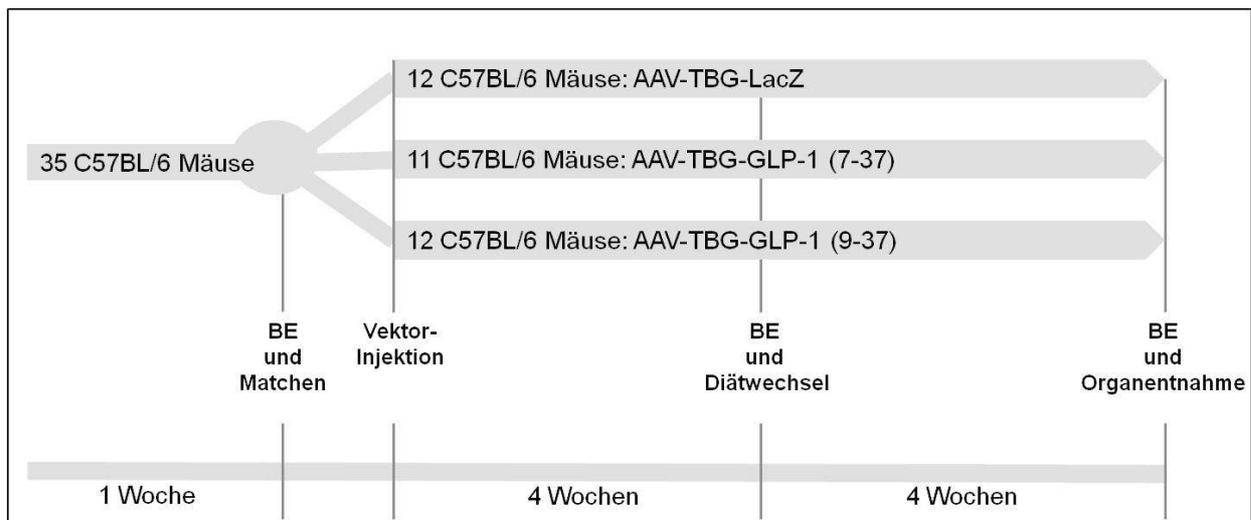


Abbildung 13: **Versuchsplan des NASH-Inflammationsmodells**; Blutentnahme (BE)

Atherosklerosemodell: DPP4-Inhibition

Zur Untersuchung der Effekte einer DPP4-Inhibition auf die Entstehung von Atherosklerose wurden 15 männliche LDL-Rezeptor-defiziente Mäuse (LDL-Rezeptor^{-/-}) mit dem DPP4-Inhibitor PKF275-055 (Novartis Institutes for BioMedical Research, Basel, Schweiz) über 18 Wochen behandelt. PKF275-055, das de-hydroxy Analog einer regio-isomeren Form des Vildagliptin, wurde über das Trinkwasser in einer Dosis von

MATERIAL UND METHODEN

0,3 mg/ml (entspricht 3 μ mol/ Maus/ Tag) zur Gewährleistung einer 80-90 %igen Inhibition der DPP4 verabreicht [285]. Villhauer *et al.* (2003) beschreiben PKF275-055 als potenten DPP4-Inhibitor mit einer dem Vildagliptin vergleichbaren *in vitro* Selektivität und *in vivo* Pharmakodynamik [274]. Eine Kontrollgruppe von 15 Tieren wurde mitgeführt. Nach einer initialen Blutentnahme wurden die Tiere in zwei Gruppen gematcht und die Intervention begonnen. Zunächst erfolgte für zwei Wochen die Gabe einer Normaldiät mit anschließender Blutentnahme und Umstellung auf die cholesterin- und fettreiche „Hochfett-diät“ (HFD) für weitere 16 Wochen. Blutentnahmen erfolgten in regelmäßigen Intervallen, ein oraler Glukosetoleranztest wurde nach 12wöchiger Intervention durchgeführt (Abbildung 14). Der Versuch wurde nach insgesamt 18 Wochen (16 Wochen HFD) terminiert.

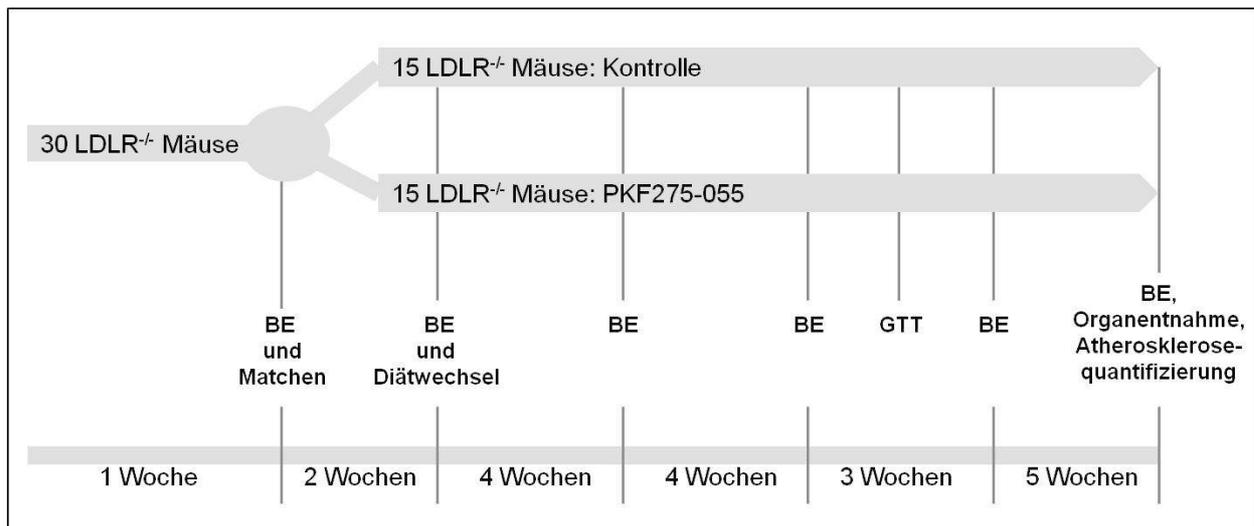


Abbildung 14: **Versuchsplan des Atherosklerosemodells mit DPP4-Inhibition**; LDL-Rezeptor-defiziente Mäuse (LDLR^{-/-} Mäuse), Blutentnahme (BE), Glukosetoleranztest (GTT)

Atherosklerosemodell: GLP-1

Die Effekte des GLP-1 auf Parameter des MetS und die Entstehung von Atherosklerose wurden in LDL-Rezeptor^{-/-} Mäusen untersucht. Dazu wurden mittels AAV aktives GLP-1 (7-37), metabolisiertes GLP-1 (9-37) und beta-Galaktosidase (Kontrollgruppe) unter der Kontrolle des CMV-Promotors überexprimiert. Nach einer initialen Blutentnahme und dem Matchen zu je 15 Tieren in drei Gruppen, erfolgte die Virusinjektion. Nach 4wöchiger Normaldiät wurde eine Blutentnahme durchgeführt und es erfolgte die Um-

MATERIAL UND METHODEN

stellung auf HFD. Neben regelmäßigen Blutentnahmen wurden zwei Tests zur Bestimmung der Glukosetoleranz (Woche 7 und 17) und ein Insulintoleranztest (Woche 19) durchgeführt. Der Versuch wurde nach insgesamt 20 Wochen (16 Wochen HFD) terminiert (Abbildung 15).

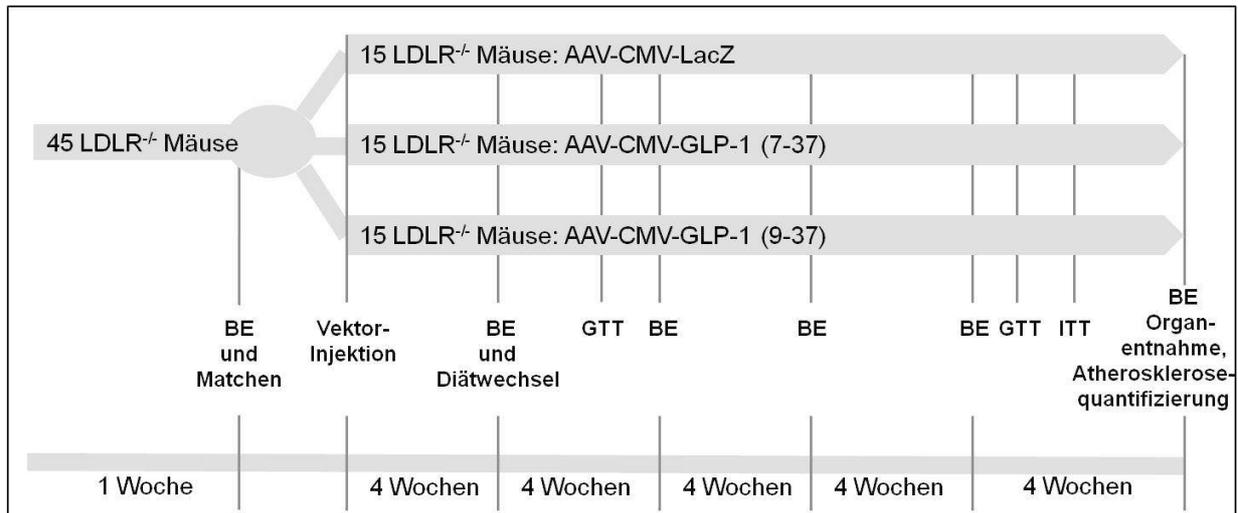


Abbildung 15: **Versuchsplan des Atherosklerosemodells GLP-1**; LDL-Rezeptor-defiziente Mäuse (LDLR^{-/-} Mäuse), Blutentnahme (BE), Glukosetoleranztest (GTT), Insulintoleranztest (ITT)

2.7.4 Funktionelle Untersuchungen

2.7.4.1 Glukosetoleranztest

Beim Glukosetoleranztest (GTT) wird die individuelle Fähigkeit des Organismus getestet, nach Glukoseaufnahme die Glukosehomöostase aufrechtzuerhalten.

Die Mäuse wurden über Nacht für 16 Stunden gefastet. Nach Gewichtsbestimmung und initialer Blutentnahme (Zeitpunkt 0) wurde den Mäusen eine Glukosedosis von 2 g/kg Körpergewicht verabreicht. Die Glukosegabe erfolgte über eine intraperitoneale Injektion (intraperitonealer GTT: ipGTT) oder oral mittels Gavage (oraler GTT: oGTT). Jeweils nach 15, 30, 60 und 120 Minuten wurde über Punktion der Schwanzvene die Blutglukose mit dem Meßgerät Bayer Contour (Bayer Consumer Care, Schweiz) bestimmt. Zur Bestimmung der Insulinspiegel während des GTT wurde zu ausgewählten Zeitpunkten Blut an der Schwanzvene mittels Heparin-beschichteter Microvetten (Microvette CB 300, Sarstedt) abgenommen. Microvetten wurden auf Eis gehalten und zügig das Plasma über Zentrifugation gewonnen. Mittels ultrasensitivem Maus-Insulin-ELISA (Alpco

Diagnostics) wurde Insulin in 5 µl Plasma bestimmt. Anhand der Nüchternspiegel für Insulin und Glukose wurde der HOMA-Index (Homeostasis Model Assessment), als Marker der Insulinresistenz (IR), anhand folgender Formel berechnet:

$$\text{HOMA-IR} = \text{Nüchterninsulin } (\mu\text{U/ml}) * \text{Nüchternglukose } (\text{mg/dl}) / 405$$

2.7.4.2 Insulintoleranztest

Der Insulintoleranztest (ITT) ist ein Test zur Erfassung der Insulinsensitivität/ Insulinresistenz. Bei diesem Verfahren wird der Abfall der Blutglukose nach Insulininjektion gemessen.

Die Mäuse wurden über Nacht für 16 Stunden gefastet. Nach Gewichtsbestimmung und initialer Blutentnahme (Zeitpunkt 0) erfolgte die intraperitoneale Injektion von 0,5 U Insulin/kg Körpergewicht (Berlinsulin® Suspension, Berlin-Chemie). Zu den Zeitpunkten 15, 30, 60 und 120 Minuten wurde die Blutglukose mit dem Meßgerät Bayer Contour (Bayer Consumer Care, Schweiz) bestimmt. Die Blutentnahmen erfolgten über Punktion der Schwanzvene.

2.7.5 Blut- und Organentnahme

Blutentnahme

Blutentnahmen erfolgten nach 16stündiger Fastenperiode. Unter Isofluranbetäubung wurde den Tieren durch Punktion des retrobulbären Venenplexus mittels heparinisierter Kapillare (Na-Heparin-Kapillarpipetten, Hirschmann Laborgeräte) oder durch Anritzen der Schwanzvene Blut abgenommen und sofort auf Eis plaziert. Blutproben von Tieren mit Überexpression des aktiven GLP-1 wurden mit dem DPP4-Inhibitor Diprotin A (Sigma) in einer Konzentration von 0,1 mM versetzt [272, 353]. In der sich anschließenden Zentrifugation für 20 Minuten, bei 3000 rpm und 4 °C wurden die korpuskulären Anteile des Blutes abgetrennt. Das Serum wurde bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C gelagert.

MATERIAL UND METHODEN

Blutentnahme zur Isolierung von RNA

Die Blutentnahme im Rahmen des LPS-Inflammationsmodells zur Isolierung von RNA aus Gesamtblut (Leukozyten) erfolgte nach insgesamt 5stündiger Fastenperiode (drei Stunden Fasten, zwei Stunden LPS). Unter Isofluranbetäubung wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet. Zügig wurde das Blut durch die Punktion des Herzens gewonnen, in mit Heparin-versetzte Tubes (5-10 U) auf Eis überführt und zügig weiterverarbeitet.

Organentnahme

Zur Organentnahme wurden die Mäuse mit Isofluran anästhesiert und durch zervikale Dislokation getötet. Bei Fragestellungen mit Untersuchung der Insulinsignalkaskade erfolgte 15 Minuten vor der Tötung eine Insulininjektion (10 U Insulin / kg Körpergewicht, Berlinsulin[®] Suspension) [354]. Die Organe Leber, Fettgewebe (abdominal), Skelettmuskel (M. soleus / M. gastrocnemius) und Dünndarm wurden zügig entnommen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. In Anlehnung an Davis *et al.* (2004) erfolgte die Entnahme und Reinigung eines Dünndarmfragmentes zwei Zentimeter distal vom Pylorus [336]. Lebersegmente wurden weiterhin mittels Tissue-Tek[®] eingebettet und auf Trockeneis eingefroren. Die Lagerung der Organe erfolgte bei -80 °C. In 4 % Formaldehyd (Roti[®]-Histofix) fixierte Leber wurde bei 4 °C gelagert. Vor der Präparation der Aorta wurden die Tiere über das linke Ventrikel mit PBS perfundiert.

Aortenpräparation

Die Aorta wurde von der Bifurkation bis zur Aortenwurzel unter einem Stereomikroskop (Zoom-Stereomikroskop SMZ 1000, Nikon) frei präpariert. Die Arteria carotis communis dextra wurde abgetrennt und für Expressionsanalysen in Stickstoff schockgefroren. Die restlichen Gefäßabgänge wurden durchtrennt und die Aorta als Ganzes mit dem Herz entnommen. In einer Petrischale mit PBS wurde die Aorta von restlichem Binde- und Fettgewebe befreit, an der Aortenwurzel vom Herz abgetrennt, der Länge nach aufgeschnitten und in 4 % Formaldehyd (Roti[®]-Histofix) fixiert. Die Herzspitze wurde unterhalb der Klappenebene abgetrennt und der verbleibende Korpus in Tissue-Tek[®] eingebettet, auf Trockeneis eingefroren und bei -80 °C gelagert.

2.7.6 Serumanalysen

2.7.6.1 Lipidstatus

Die quantitativen Bestimmungen von Gesamtcholesterin (GC), Triglyzeriden (TG), HDL-Cholesterin (HDL-C) und freien Fettsäuren (fFS) im Serum erfolgten über kolorimetrisch enzymatische Reaktionen bei 37 °C mit Reagenzien der Firma DiaSys. Probenapplikation, Reagenzienzugabe und Extinktionsmessung wurden automatisch über einen Alcyon 300 Analyzer (Abbott) realisiert. Das Serum wurde für die Analysen 1:3 bis 1:5fach mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt eingesetzt.

2.7.6.1.1 Gesamtcholesterin

Cholesterinester und freies Cholesterin wurden mittels CHOD-PAP Methode bestimmt. Das als Ester vorliegende Cholesterin wird im ersten Schritt durch die Cholesterinesterase enzymatisch gespalten. Anschließend wird freies Cholesterin durch *Cholesterin-Oxidase* unter Bildung von H_2O_2 oxidiert. Die Trinder-Reaktion dient als Indikatorreaktion. Dabei wird das entstandene Wasserstoffperoxid in Gegenwart einer Peroxidase mit *Phenol* und *4-Aminophenazon* zu Chinonimin, einem roten Farbstoff, umgesetzt. Die Farbintensität verhält sich proportional zur Cholesterinkonzentration und wurde bei OD_{546} gemessen. Anhand von Kalibratoren (DiaSys: TruCal U) wurde die Cholesterinkonzentration berechnet.

2.7.6.1.2 Triglyzeride

Die durchgeführte quantitative Erfassung der TG beruht auf der Hydrolyse der TG mit Lipoproteinlipase und nachfolgender Bestimmung des entstandenen Glycerins. Die Glycerinkinase katalysiert die Umsetzung von Glycerin in Glycerin-3-Phosphat, welches anschließend unter *Glycerinphosphatoxidase* oxidiert wird (GPO-PAP). Das bei dieser Reaktion frei werdende Wasserstoffperoxid wird ebenfalls über die Trinder-Reaktion (siehe Gesamtcholesterinbestimmung) zum roten Chinonimin umgesetzt. Die Extinktionsmessung erfolgte bei 546 nm. Ein Kalibrator (DiaSys: TruCal U) diente zur Berechnung der Triglyzeridkonzentration.

2.7.6.1.3 HDL-Cholesterin

Das Kit der Firma DiaSys zur Bestimmung von HDL-C basiert auf der Komplexbildung von LDL, VLDL und Chylomikronen über Anti- β -Lipoprotein-Antikörper und anschließender kolorimetrischer Bestimmung des HDL-C. Die enzymatische Reaktion gliedert sich dabei in Hydrolyse der Cholesterinester und Oxidation des freien Cholesterins unter Bildung von H_2O_2 (siehe Gesamtcholesterinbestimmung). Das entstandene Wasserstoffperoxid wird in Gegenwart einer Peroxidase mit F-DAOS (N-Ethyl-N-(2-hydroxy-3-sulfopropyl)-3,5-dimethoxy-4-fluoroanilin, Natriumsalz) und 4-Aminophenazon zu einem blauen Komplex umgesetzt. Die Farbintensität verhält sich proportional zur Konzentration des HDL-C und wurde bei OD_{700} gemessen. Anhand eines Kalibrators (DiaSys TruCal HDL/LDL) wurde die Konzentration errechnet.

2.7.6.1.4 Freie Fettsäuren

Auch die quantitative Erfassung der freien Fettsäuren erfolgte über eine enzymatische Endpunktmessung (DiaSys). Zunächst werden bei dieser Methode die Fettsäuren mit Coenzym A unter Energieverbrauch in Gegenwart der Acyl-CoA-Synthetase zu acyliertem Coenzym A (Acyl-Co A) verestert. Bei der anschließenden Oxidation (Acyl-CoA-Oxidase) des Acyl-Co A wird Wasserstoffperoxid freigesetzt. Gemäß den vorangegangenen Bestimmungen dient auch hier die Trinder-Reaktion als Farbreaktion. Anhand der Extinktionsmessung (546 nm) und einer Eichgeraden wurde die Konzentration der freien Fettsäuren kalkuliert.

2.7.6.2 Fast Protein Liquid Chromatography

Die Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC) ist eine chromatographische Methode und wurde zur Auftrennung der Serum Lipoproteine durchgeführt. Es handelt sich dabei um eine Gelfiltration, ein Verfahren der Größenausschlusschromatographie. Als Trennmittel dient ein Gel aus hydrophilen Makromolekülen, die ein dreidimensionales Netzwerk ausbilden. Die Trennung der Probenmoleküle nach ihrer Größe erfolgt durch wiederholten Austausch der Moleküle zwischen dem fließenden Eluenten (mobile Phase) und dem an die Makromoleküle des Gels fixierten Eluenten (stationäre Phase). Während große Moleküle zügig entlang der Säule wandern, dringen kleinere Moleküle

MATERIAL UND METHODEN

in die Zwischenräume der stationären Phase ein und haben daher eine erhöhte Retention.

Die Auftrennung der Lipoproteine erfolgte über eine Superose 6 10/300 GL Säule (GE Healthcare Bio-Sciences AB), bestehend aus einem vernetzten Agarose-Grundgerüst, an einem FPLC System der Firma GE Healthcare (Uppsala, Schweden). Gepooltes Serum wurde zunächst 1:3 bis 1:5 mit entgastem, sterilem Eluenten (154 mM NaCl, 1 mM EDTA) verdünnt. Nach dem Aufgeben von 250 µl Eluent-Proben-Gemisch erfolgte die Auftrennung bei einer Flußrate (Flow) von 0,4 ml/min. Das Eluat der Säule wurde in 67 Fraktionen zu je 500 µl gesammelt. In den eluierten Fraktionen erfolgte eine Absorptionsmessung bei 280 nm mittels UV-Detektor. Der Kurvenverlauf des Eluat wurde automatisch aufgezeichnet. In den Fraktionen wurde anschließend der Cholesteringehalt bestimmt. Die Messung erfolgte in 96-Well Platten mit dem Kit der Firma DiaSys (Cholesterin FS) nach Herstellerangaben. Die Extinktion wurde bei 492 nm gemessen und die Konzentration anhand eines mitgeführten Standards berechnet (2 µg/ml-200 µg/ml).

2.7.6.3 Alanin-Aminotransferase und Aspartat-Aminotransferase

Die Transaminasen Alanin-Aminotransferase (ALAT) und Aspartat-Aminotransferase (ASAT) wurden in der klinischen Chemie am Klinikum Großhadern in einem modifizierten kinetischen UV-Test nach IFCC (International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine) bestimmt. Die Messung der Transaminasen im Serum erfolgte automatisch bei 37 °C an einem Olympus AU2700 (Beckman Coulter) mit den Reagenzien der Firma Beckman Coulter. Das Meßprinzip basiert auf der durch ASAT und ALAT katalysierten Übertragung der 2-Aminogruppe einer Aminosäure auf eine α-Ketosäure.

ASAT: L-Aspartat + 2-Oxoglutarat \longleftrightarrow L-Glutamat + Oxalacetat

ALAT: L-Alanin + 2-Oxoglutarat \longleftrightarrow L-Glutamat + Pyruvat

Die Zunahme des Oxalacetat oder Pyruvat wird in einer nachfolgenden Indikatorreaktion unter Einwirkung einer zugesetzten Malat- beziehungsweise Lactatdehydrogenase (MDH, LDH) bestimmt.

MDH / LDH: Oxalacetat / Pyruvat + NADH + H⁺ \longleftrightarrow L-Malat / L-Lactat + NAD⁺

Als Messgröße dient die NADH_2 -Abnahme, deren Geschwindigkeit sich proportional zur Aktivität der ASAT / ALAT verhält und photometrisch bei 340 nm ermittelt wird.

2.7.6.4 DPP4-Aktivitätsbestimmung

Die DPP4-Aktivitätsbestimmung basiert auf der durch die DPP4 herbeigeführten Abspaltung von N-terminalen Dipeptiden aus Polypeptidketten, die an zweiter Position ein Alanin oder Prolin aufweisen. Das Protokoll, das auf den Methoden von Underwood *et al.* (1999), Durinx *et al.* (2000) und Nagakura *et al.* (2003) aufbaut [355-357], wurde von der Arbeitsgruppe von Prof. Deacon aus Kopenhagen übernommen. Die kinematische Messung erfolgte dabei mit dem Substrat Gly-Pro-p-Nitroanilid Hydrochlorid (H-Gly-Pro-pNa HCL) der Firma Bachem. Durch die Zugabe von 150 μl einer 1 mM DPP4 Substratlösung zu 5 μl Serum wurde die Umsetzung zu p-Nitroanilin initiiert. Eine Erfassung der Extinktion bei 405 nm erfolgte bei 0; 30; 60 und 120 Minuten. Anhand einer mitgeführten Eichgeraden (p-Nitroanilin: 0; 7,82; 15,63; 31,25; 62,5; 125; 250; 500 μM) wurde die Konzentration des gebildeten p-Nitroanilin zu jedem Zeitpunkt ermittelt.

Mittels nachfolgender Beispielgleichung (30 min) erfolgte die Berechnung der DPP4-Aktivität für die drei Zeitintervalle 0-30 min, 0-60 min und 0-120 min, die anschließend gemittelt wurden:

$$\text{Aktivität [nmol/min/ml]} = (\text{Konz. [30 min]} * 0,155) - (\text{Konz. [0 min]} * 0,155) / 30 * 200$$

2.7.7 Lipidstatus Leber

In der Leber wurden in Abhängigkeit von der Fragestellung Cholesterin und TG bestimmt. Dazu wurde ein Stück Leber mit 3 ml 0,9 % NaCl /g mittels Stößel homogenisiert, das Lysat auf Trockeneis schockgefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C gelagert. Zur Analyse wurden die Homogenisate schnell bei 37 °C aufgetaut und anschließend 1:3-1:10 mit NaCl verdünnt. Die Messungen wurden mit den Kits der Firma DiaSys (Cholesterin FS, Triglyzeride FS) in 96-Well-Platten durchgeführt. In der Platte wurden 10 μl Homogenisat mit 10 μl 1 % Desoxycholsäure für 5 Minuten bei 37 °C inkubiert. Desoxycholsäure dient als Lösungsvermittler. Nach Zugabe von 200 μl Triglyzerid FS- beziehungsweise Cholesterin FS-Reagenz zum Leberhomogenisat er-

folgte eine 10minütige Inkubation bei 37 °C unter leichtem Schütteln. Die Extinktionsmessung wurde bei 492 nm durchgeführt. Eichgeraden (10 mg/dl-100 mg/dl) wurden jeweils aus den gelieferten Standards erstellt.

2.7.8 Hydroxyprolin-Bestimmung

Hydroxyprolin ist eine Aminosäure des Kollagens, deren Quantifizierung freundlicherweise von Dr. Christer Bäck in Aachen in Anlehnung an Karlmark *et al.* (2009) [358] durchgeführt wurde.

Die Bestimmung setzt eine 16stündige Hydrolyse der Leberprobe in 6 M Salzsäure bei 110 °C voraus. Nach anschließender Filterung wird das Lysat mit Methanol versetzt und aufkonzentriert. Die kristalline Probe wird anschließend in 50 %igem Isopropanol gelöst und mit 0,6 % Chloramin T für 10 Minuten oxidiert. Nach Zugabe von frisch hergestelltem Ehrlich-Reagenz erfolgt schüttelnd für 45 Minuten eine Inkubation bei 50 °C. Die Extinktion wird bei 570 nm gemessen und die Konzentration anhand eines mitgeführten Standards berechnet.

2.7.9 Histologische Methoden

2.7.9.1 X-Gal-Färbung der Leber

Zum Nachweis der beta-Galaktosidase-Expression (AAV-TBG-LacZ oder AAV-CMV-LacZ) wurden von in Tissue-Tek[®] eingebetteten Lebersegmenten Gefrierschnitte von 10 µm angefertigt. Nach zunächst 1stündiger Fixierung (RT) mit 0,5 % Glutaraldehyd wurden die Präparate mit X-Gal-Färbelösung (1 mg/ml X-Gal) bei 37 °C über Nacht inkubiert. X-Gal wird von der beta-Galaktosidase zu einem blauen Indigo-Komplex umgesetzt. Die Färbung wurde mikroskopisch überprüft und die Schnitte zur langfristigen Lagerung bei 4 °C mit Roti[®]-Histokitt eingebettet.

2.7.9.2 Sudan IV-Färbung der Aorta

Zur Analyse der fettreichen atherosklerotischen Plaques wurde die Aorta mit Sudan IV gefärbt. Hierfür wurde die fixierte Aorta mit 400 µl Sudan IV (5 mg/ml in 70 % Iso-

propanol) für 40 Minuten im Wasserbad bei 37 °C inkubiert. In einem neuen Reaktionsgefäß erfolgte anschließend die Waschung der Aorta. Diese wurde dazu mit 400 µl 70 % Isopropanol versetzt, 15 Sekunden invertiert und erneut für 5 Minuten im Wasserbad inkubiert.

2.7.9.3 Oil Red O-Färbung der Herzklappen

Von den in Tissue-Tek[®] eingebetteten Herzen wurden Gefrierschnitte von 7 µm Dicke in Serie auf Herzklappenebene angefertigt (n=12-24). Davon ausgewählte Schnitte wurden mittels Oil Red O zur Visualisierung der Verfettung angefärbt. Alle Schritte der Fettfärbung erfolgten bei RT. Nach Fixierung der Schnitte in 4 % PFA und Isopropanolbehandlung (60 %), jeweils für 5 Minuten, wurden diese mit Oil Red O-Arbeitslösung (0,3 %) für 10 Minuten gefärbt. Nach erneuter Isopropanolbehandlung (60 %) für 2 Minuten und kurzer Waschung mit entsalztem Wasser erfolgte die 10sekündige Gegenfärbung der Schnitte mit Hematoxylin. Die Schnitte wurden abschließend kurz mit PBS sowie entsalztem Wasser gewaschen und mit Glycerol-Gelatine eingedeckt.

2.7.9.4 Sirius Red-Färbung der Leber

Die Anfertigung der Paraffinschnitte der Leber und die anschließende Sirius Red-Färbung wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von PD Dr. Frank Tacke in Aachen durchgeführt, so dass die Erläuterung der Methodik lediglich kurz beschrieben wird.

Bei der Ausbildung einer Leberfibrose ist ein erhöhter Anteil an extrazellulärer Matrix zu beobachten, der auf eine verstärkte Synthese und einen verminderten Abbau von Kollagen, Laminin und Proteoglycanen zurückzuführen ist [359]. Kollagen Typ I und III sind wesentlicher Bestandteil dieser extrazellulären Matrix und können mittels Sirius Red-Färbung visualisiert werden.

Vor der Färbung werden die Paraffinschnitte entparaffinisiert und gründlich mit destilliertem Wasser gewässert. Die Färbung erfolgt über 90 Minuten in 0,1 %iger Sirius Red Lösung. Nach einer sich anschließenden zweimaligen Waschung für eine Minute mit 0,01 M Salzsäure erfolgen die Entwässerung der Schnitte mittels aufsteigender Alkoholreihe und die anschließende Einstellung in Xylol. Zum Schluss werden die gefärbten

Schnitte mit Permount Eideckmedium eingebettet. Die Präparate werden digital erfasst und anschließend wird unter Anwendung von ImageJ der Anteil an Kollagen im Verhältnis zum Gesamtpräparat bestimmt.

2.7.10 Quantitative Bestimmung der aortalen Plauefläche

Für die quantitative Auswertung der Plauefläche wurden die längs eröffneten, gefärbten Aorten unter dem Stereomikroskop (Zoom-Stereomikroskop SMZ 1000) in einer Petrischale auf schwarzen Wachs gepinnt. Anhand der Färbung wurde die Plauefläche mit Hilfe der Software NIS-Elements D 3.0 der Firma Nikon vermessen und ins Verhältnis zu der ebenfalls vermessenen Gesamtfläche der Aorta gesetzt.

2.7.11 Quantitative Bestimmung Lipid-reicher Plaques der Herzklappen

Zur Bestimmung des Ausmaß Lipid-haltiger Anteile auf Herzklappenebene, wurden die Oil Red O-gefärbten Schnitte am Axiovert 100 Mikroskop mit einer AxioCam MRc (beides Carl Zeiss) aufgenommen und anschließend mit NIS-Elements D 3.0 analysiert. Die Fläche der Lipid-reichen Ablagerungen und die Gesamtfläche der Herzklappenebene wurden dabei bestimmt und zueinander ins Verhältnis gesetzt.

3 STATISTIK

Für die Berechnung von Mittelwerten (MW), Standardabweichungen (SD, standard deviation), Standardfehlern (SEM, standard error of the mean) und statistischen Differenzen wurde das Programm Microsoft Exel verwendet. Die Angabe der Daten erfolgt, wenn nicht anders vermerkt als Mittelwert (MW) \pm SEM. Statistische Berechnungen fanden unter Anwendung des zweiseitigen ungepaarten t-Tests mit Annahme gleicher Varianzen statt. Unterschiede wurden als signifikant definiert, wenn der p -Wert, als Maß der Irrtumswahrscheinlichkeit, einen Wert unter 0,05 ergab. Die Berechnung der AUC (area under the curve) erfolgte ebenfalls mit Microsoft Exel nach der Trapezformel.

III ERGEBNISSE

1 NACHWEIS DER TRANSFEKTIONSEFFIZIENZ DES POLYETHYLENIMIN IN HEK-293-ZELLEN

Im Rahmen der Herstellung der AAV wurde zu jeder Transfektion eine GFP-Kontrolle mitgeführt. Anhand der Transfektionseffizienz konnte Rückschluss auf den Transfektionsprozess und den Zustand der HEK-293-Zellen gezogen werden. Wie in Abbildung 16 zu sehen, wurde unter Verwendung des Reagenz PEI eine Transfektionseffizienz von ungefähr 60 % erreicht.

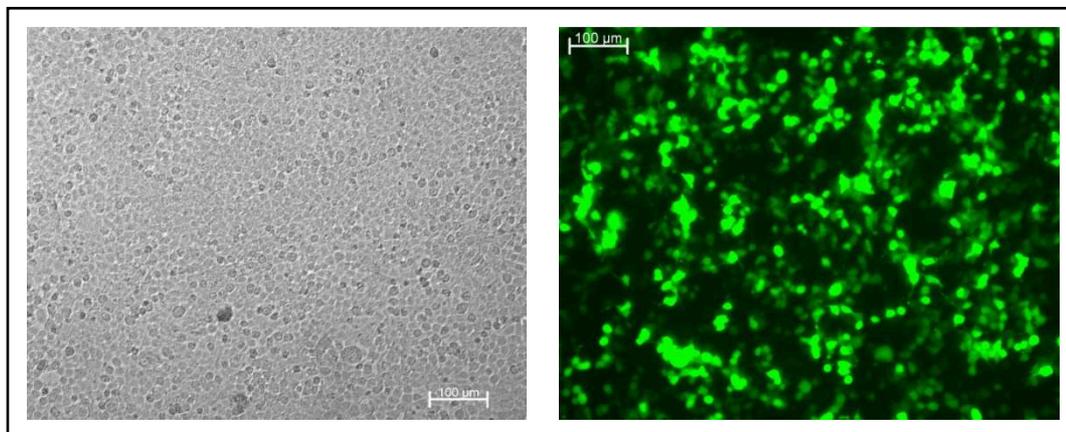


Abbildung 16: **repräsentative GFP-Transfektion** in HEK-293-Zellen 72 Stunden posttransfektional; links: Phasenkontrastaufnahme; rechts: Fluoreszenzaufnahme des entsprechenden Bildausschnittes; Bildgebung über Axiovision 3.1 nach Aufnahme am Axiovert 100 mit AxioCam MRc

2 NACHWEIS DER AAV-VERMITTELTEN TRANSGENEXPRESSION *IN VITRO*

In der vorliegenden Arbeit wurden GLP-1 Fusionsgene, die lediglich für die 31 Aminosäuren des aktiven GLP-1 (7-37) oder die 29 Aminosäuren des metabolisierten GLP-1 (9-37) codieren, konstruiert und in AAV-Vektorplasmide eingebracht. Zur Überprüfung der Expression und Sekretion wurde pAAV2.1-CMV-GLP-1 (7-37) stellvertretend für die angewendete Klonierungsstrategie in HEK-293-Zellen transfiziert. Es konnte sowohl auf mRNA-Ebene als auch auf Proteinebene eine GLP-1 Expression nachgewiesen werden. Die deutlich erhöhte Konzentration des GLP-1 im Zellkulturüberstand (ELISA) spiegelt die gewünschte Sekretion des Transgens wider (Abbildung 17).

ERGEBNISSE

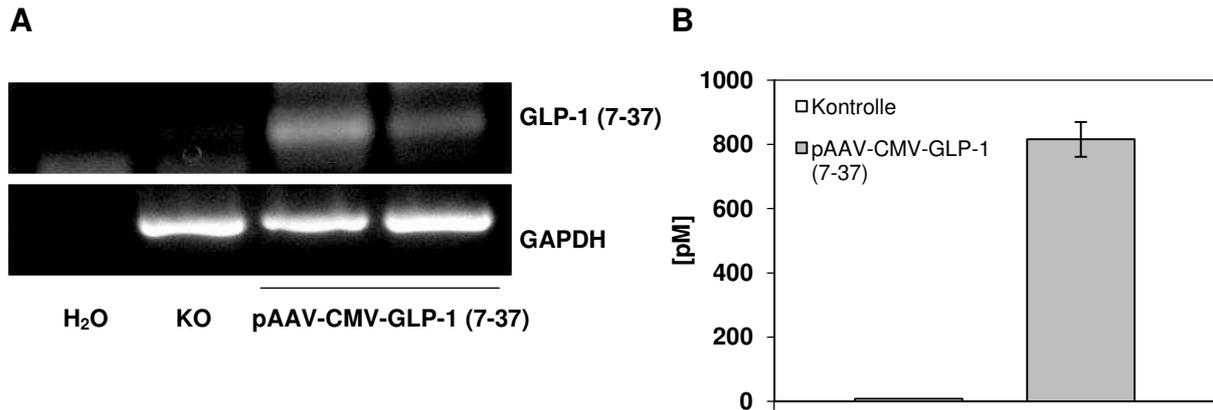


Abbildung 17: **AAV-vermittelte Transgenexpression *in vitro***; (A) **mRNA-Expression des GLP-1 (7-37)** nach RT-PCR mit GAPDH als Ladekontrolle und (B) **Konzentration des Gesamt-GLP-1 im Überstand** erfasst mittels ELISA (n=1-2); MW ± SEM; KO = Kontrolle (transfizierter Leervektor: pAAV2.1-CMV-MCS); H₂O = Reagenzienkontrolle der jeweiligen PCR

3 AKUTES INFLAMMATIONSMODELL: EXENDIN-4

Zur Prüfung der anti-inflammatorischen Effekte des GLP-1 Systems *in vivo* wurde ein akutes Inflammationsmodell mit dem GLP-1 Rezeptor-Agonisten Exendin-4 durchgeführt.

3.1 Gewichtsverlauf der BALB/c Mäuse unter Exendin-4

Die BALB/c Mäuse wurden über sieben Tage mit Exendin-4 in einer Dosis von 12 nmol/kg Körpergewicht/ Tag behandelt. Es wurde kein Gewichtsunterschied zwischen Interventions- und Kontrollgruppe festgestellt (Tabelle 29).

Tabelle 29: **Gewicht der BALB/c Mäuse unter Exendin-4 Behandlung** (n=5/Gruppe); MW ± SEM

	Gewicht [g] Tag 0	Gewicht [g] Tag 7
Kontrolle	22,28 ± 0,44	22,46 ± 0,39
Exendin-4	22,18 ± 0,57	22,16 ± 0,42

3.2 Einfluss des Exendin-4 auf Inflammationsparameter

Der durch LPS-Gabe induzierte akute Inflammationsreiz wurde anhand der mRNA-Expression von TNF- α und Interleukin-1 β (IL-1 β) in Leukozyten sowie der Proteinexpression von IL-6 im Serum untersucht. Die Administration des Exendin-4 resultierte in einer signifikanten Reduktion der mRNA Expression von TNF- α um 69 % (Exendin-4: $0,32 \pm 0,03$; Kontrolle: $1,04 \pm 0,15$) und einer nicht-signifikanten Erniedrigung von IL-1 β . Für die Serumspiegel des IL-6 konnte kein Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt werden (Abbildung 18).

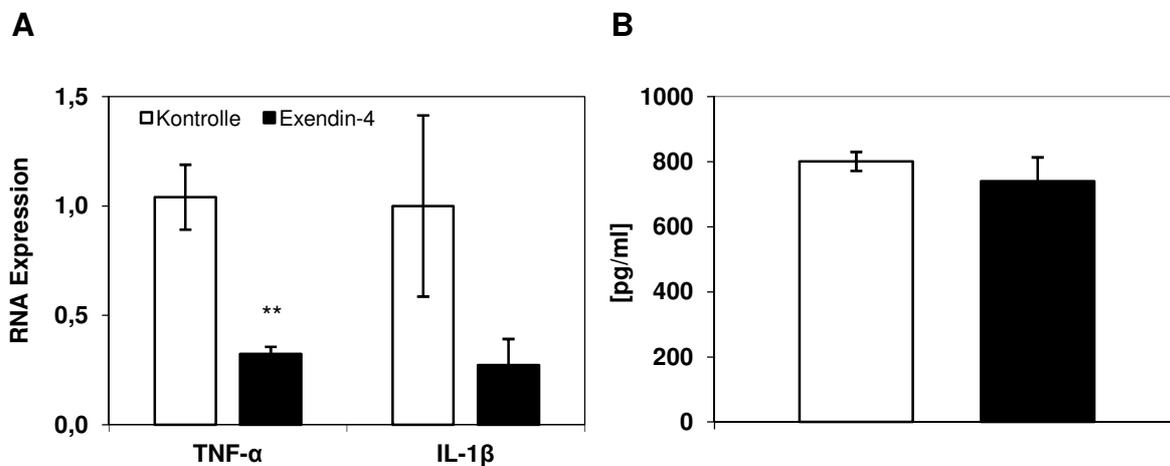


Abbildung 18: (A) mRNA Expression des Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α) und Interleukin-1 β (IL-1 β) in Leukozyten und (B) Serumspiegel des Interleukin-6 (IL-6) nach LPS-Stimulation der Exendin-4 behandelten BALB/c Mäuse (n=4-5/Gruppe); MW \pm SEM; ** $p < 0,01$

4 CHRONISCHES INFLAMMATIONSMODELL (NASH): GLP-1

Als Modell für die Prüfung anti-inflammatorischer Eigenschaften des aktiven GLP-1 (7-37) und möglicher Effekte des metabolisierten GLP-1 bei chronischer Inflammation wurde eine Diät-induzierte nicht-alkoholische Steatohepatitis ausgewählt.

4.1 Nachweis der AAV-vermittelten Transgenexpression in C57BL/6 Mäusen

C57BL/6 Mäuse wurden mit den Vektoren AAV-TBG-GLP-1 (7-37), AAV-TBG-GLP-1 (9-37) und AAV-TBG-LacZ infiziert. Nach 4wöchiger Normaldiät erfolgte zur Induktion

ERGEBNISSE

der NASH eine Diätumstellung auf eine MCD-Diät, die für weitere vier Wochen gegeben wurde. Die Proteinexpression der Transgene wurde nach vier Wochen und am Studienende ermittelt. Weiterhin erfolgte die Kontrolle der beta-Galaktosidase Expression in der Leber. Die AAV-vermittelte Transgenexpression resultierte nach vier Wochen in einer signifikanten Erhöhung der Gesamt-GLP-1 Serumspiegel (GLP-1 (7-37): $27,3 \pm 7,5$ pM; GLP-1 (9-37): $14,7 \pm 6,8$ pM) im Vergleich zur Kontrollgruppe ($0,2 \pm 0,2$ pM). Zu Studienende war eine Abschwächung der Transgenexpression, mit jedoch im Vergleich zur Kontrollgruppe unter GLP-1 (9-37) weiterhin signifikanten und GLP-1 (7-37) tendenziell ($p=0,08$) erhöhten GLP-1 Serumkonzentrationen, zu verzeichnen. Eine hepatische beta-Galaktosidase Expression mit einer Transduktionsrate von 50 % wurde in der Kontrollgruppe nachgewiesen (Abbildung 19).

Im Versuch war insgesamt ein Tierausfall zu verzeichnen, so dass sich folgende Gruppenstärken zu Studienende ergaben: LacZ $n=11$, GLP-1 (7-37) $n=11$, GLP-1 (9-37) $n=12$.

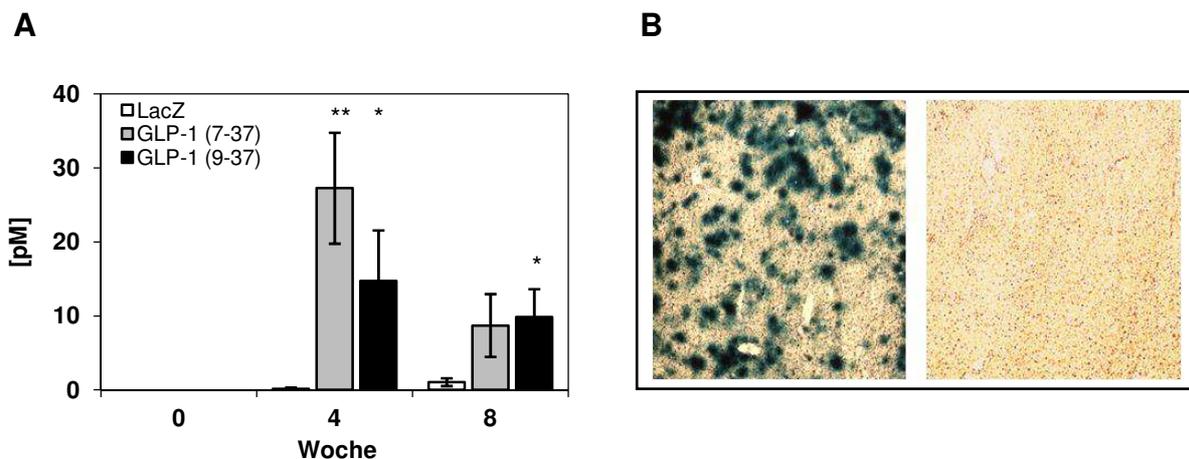


Abbildung 19: **Transgenexpression in C57BL/6 Mäusen auf MCD-Diät; (A) Serumspiegel des Gesamt-GLP-1** erfasst mittels ELISA ($n=10-12$ /Gruppe); $MW \pm SEM$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ versus LacZ, (B) **X-Gal-Färbung der Leber**, links: AAV-TBG-LacZ, rechts: AAV-TBG-GLP-1 (9-37)

4.2 Gewichtsverlauf der C57BL/6 Mäuse mit Diät-induzierter NASH unter GLP-1 (7-37) und (9-37)

Nach 4wöchiger Normaldiät wurde ein signifikant höheres Gewicht unter GLP-1 (9-37; $25,9 \pm 0,3$ g) im Vergleich zur Kontrollgruppe ($25,0 \pm 0,3$ g) konstatiert. Die verabreichte MCD-Diät resultierte in allen Gruppen in einem vergleichbaren Gewichtsverlust, der im

ERGEBNISSE

Mittel $7,3 \pm 0,1$ g (29 %) betrug. Es konnten keine Unterschiede in der mittleren Gewichtsabnahme, dem Lebergewicht und dem Anteil des Lebergewichtes am Körpergewicht zwischen den Gruppen festgestellt werden (Abbildung 20, Tabelle 30).

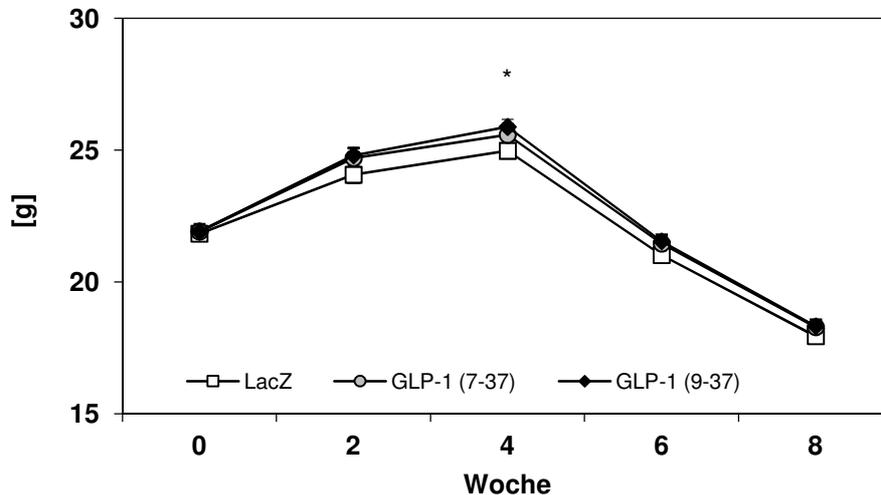


Abbildung 20: **Gewichtsverlauf der C57BL/6 Mäuse auf MCD-Diät** (n=11-12/Gruppe); MW \pm SEM; * $p < 0,05$ versus LacZ

Tabelle 30: **Gewichtsabnahme, Lebergewicht und anteiliges Lebergewicht nach vier Wochen MCD-Diät der C57BL/6 Mäuse** (n=11-12/Gruppe); MW \pm SEM

	Δ g (Woche 4 : Woche 8)	Lebergewicht [g]	Anteil Leber an Körpergewicht [%]
LacZ	$7,03 \pm 0,21$	$0,61 \pm 0,03$	$3,41 \pm 0,15$
GLP-1 (7-37)	$7,30 \pm 0,29$	$0,63 \pm 0,02$	$3,47 \pm 0,11$
GLP-1 (9-37)	$7,57 \pm 0,15$	$0,61 \pm 0,02$	$3,36 \pm 0,12$

4.3 Einfluss des GLP-1 (7-37) und (9-37) auf den Lipidstoffwechsel in C57BL/6 Mäusen mit Diät-induzierter NASH

Die hepatische Überexpression des aktiven GLP-1 (7-37) als auch des GLP-1 (9-37) resultierte unter Normaldiät in einer signifikanten Erhöhung des HDL-C (GLP-1(7-37): $74,5 \pm 1,1$ mg/dl; GLP-1 (9-37): $78,3 \pm 2,2$ mg/dl; LacZ: $70,5 \pm 1,2$ mg/dl). Unter MCD-Diät konnte dieser Effekt nicht bestätigt werden. Die Diätumstellung führte insgesamt zu einem drastischen Abfall der Serumlipide (GC: 51 %; HDL-C: 58 %; TG: 32 %). Die

ERGEBNISSE

Spiegel des GC und der TG zeigten über den gesamten Versuch keine signifikanten Veränderungen zwischen den Gruppen (Abbildung 21).

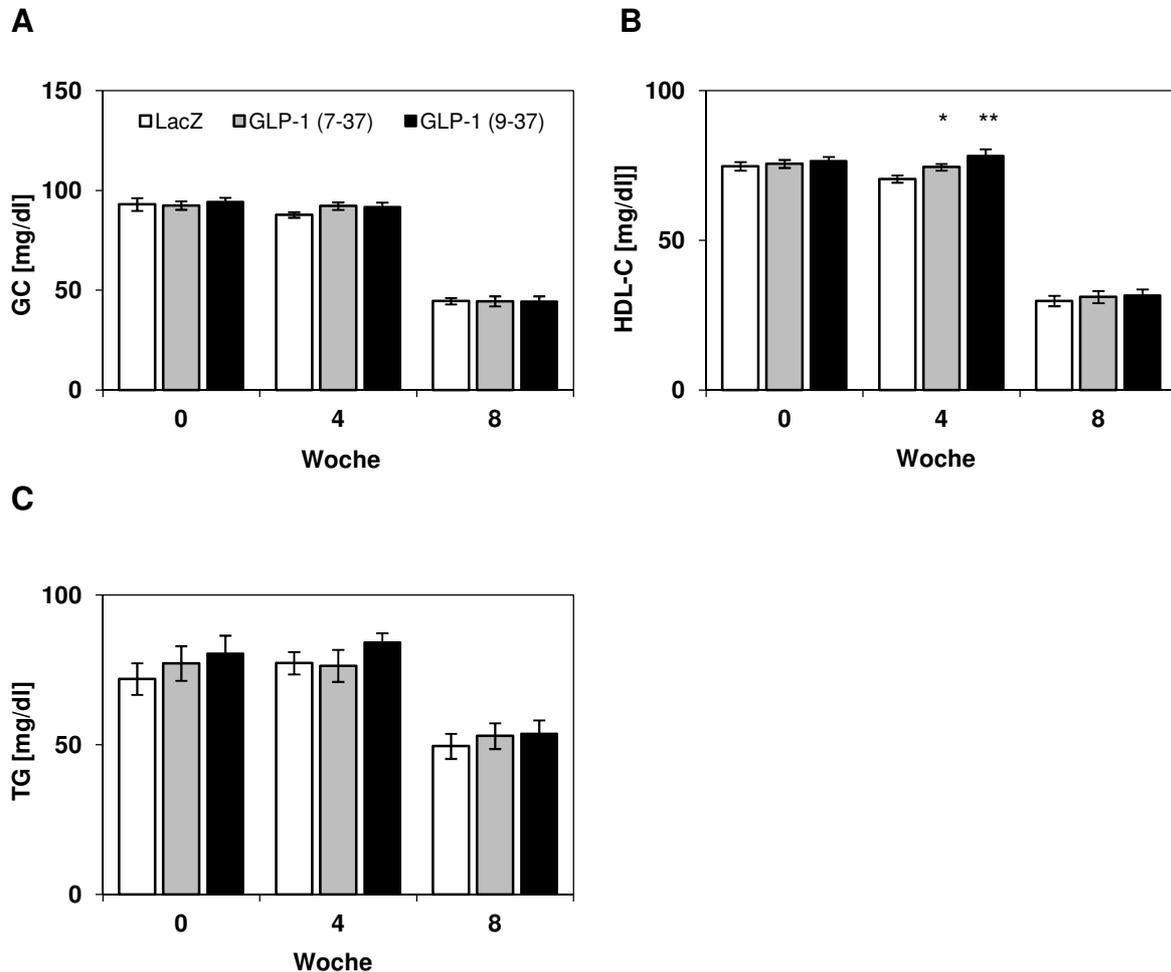


Abbildung 21: **Lipidprofil der C57BL/6 Mäuse auf MCD-Diät; (A) Serumspiegel des Gesamtcholesterin (GC), (B) des HDL-Cholesterin (HDL-C) und (C) der Triglyzeride (TG)** (n=11-12/Gruppe); MW \pm SEM; * p <0,05; ** p <0,01 versus LacZ

Nach 8wöchiger Studiendauer wurden die Tiere getötet und es erfolgte die Bestimmung des Cholesterin- und Triglyzeridgehaltes der Leber. Der hepatische Triglyzeridgehalt unter Überexpression des GLP-1 (9-37) war im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant 1,6fach erhöht. Unter GLP-1 (7-37) zeigte sich eine Tendenz zur Erhöhung des Triglyzerid- ($p=0,09$) und Reduktion des Cholesteringehaltes ($p=0,09$), jedoch mit fehlender statistischer Sicherheit. Für die Serumspiegel der Leberenzyme ASAT und ALAT wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt (Tabelle 31).

ERGEBNISSE

Tabelle 31: **hepatischer Cholesteringehalt, hepatischer Triglyzeridgehalt, Serumlevel ASAT und ALAT nach vier Wochen MCD-Diät der C57BL/6 Mäuse** (n=10/Gruppe); MW ± SEM; *p<0,05 versus LacZ

	Cholesterin [mg/g]	Triglyzeride [mg/g]	ASAT [U/l]	ALAT [U/l]
LacZ	4,32 ± 1,15	5,59 ± 0,91	374,4 ± 39,8	206,5 ± 26,2
GLP-1 (7-37)	2,22 ± 0,26	9,34 ± 1,86	342,4 ± 53,7	258,8 ± 48,5
GLP-1 (9-37)	2,50 ± 0,26	8,92 ± 1,11*	502,9 ± 67,5	241,6 ± 37,7

Die hepatische mRNA Expression der Fettsäure-Synthase (Fasn), des Sterol Regulatory Element Binding Factor 1 (Srebf-1) sowie des CD36 und des Liver X Receptor-α (LXR-α) wurden durch die Transgene nicht signifikant beeinflusst. Im Vergleich zu GLP-1 (9-37) zeigte sich unter GLP-1 (7-37) eine tendenzielle Erhöhung der mRNA Expression des Srebf-1 (p=0,09).

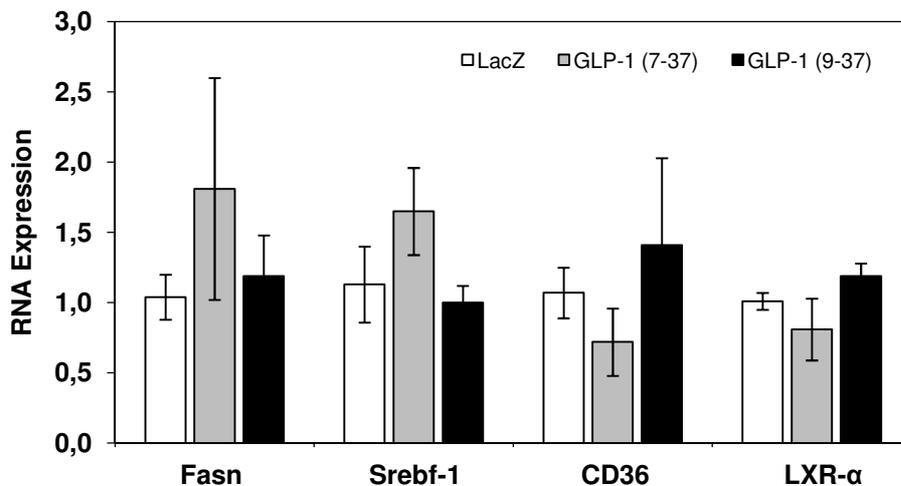


Abbildung 22: (A) **hepatische mRNA Expression der Fettsäure-Synthase (Fasn), des Sterol Regulatory Element Binding Factor 1 (Srebf-1), des CD36 und des Liver X Receptor-α (LXR-α) bei C57BL/6 Mäusen auf MCD-Diät** (n=5/Gruppe); MW ± SEM

4.4 Bestimmung der Effekte des GLP-1 (7-37) und (9-37) auf Inflammationsparameter in C57BL/6 Mäusen mit Diät-induzierter NASH

In der Leber wurden die Inflammationsmarker TNF-α, MCP-1 und TGF-1β (Transforming Growth Factor-1β) quantifiziert. Die mRNA Expression des TNF-α wurde im

ERGEBNISSE

Vergleich zur Kontrollgruppe ($1,06 \pm 0,18$) signifikant durch GLP-1 (7-37) um 60 % ($0,42 \pm 0,06$) und durch GLP-1 (9-37) um 67 % ($0,35 \pm 0,05$) reduziert. Darüber hinaus wurde unter GLP-1 (9-37) eine signifikant auf 36 % erniedrigte mRNA Expression für MCP-1 festgestellt ($0,39 \pm 0,04$ versus LacZ: $1,08 \pm 0,22$). Eine tendenzielle Reduktion des Expressionsniveau von TGF-1 β ergab sich bei der GLP-1 (9-37)-Gruppe ($p=0,07$) (Abbildung 23).

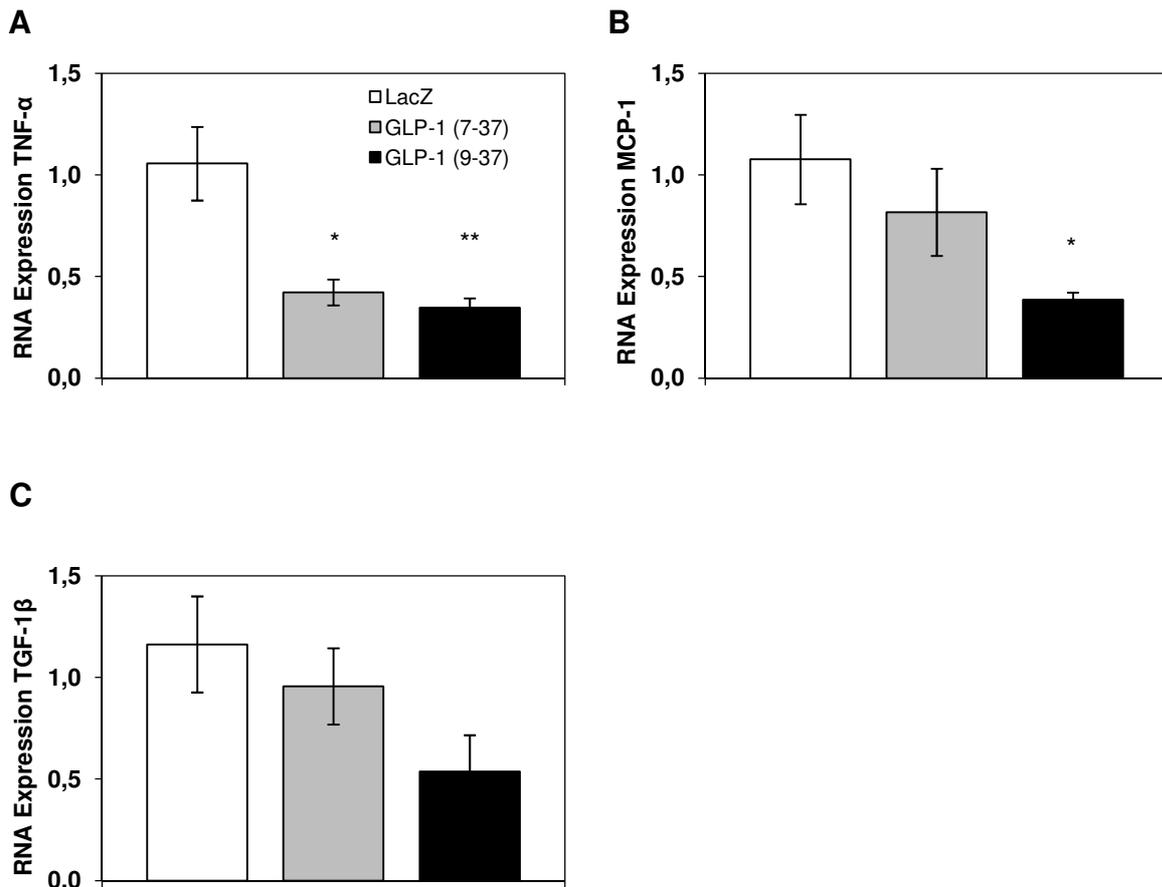


Abbildung 23: (A) hepatische mRNA Expression des Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α), (B) Monocyte Chemotactic Protein-1 (MCP-1) und (C) Transforming Growth Factor-1 β (TGF-1 β) bei C57BL/6 Mäusen auf MCD-Diät (n=5/Gruppe); MW \pm SEM; * p <0,05; ** p <0,01 versus LacZ

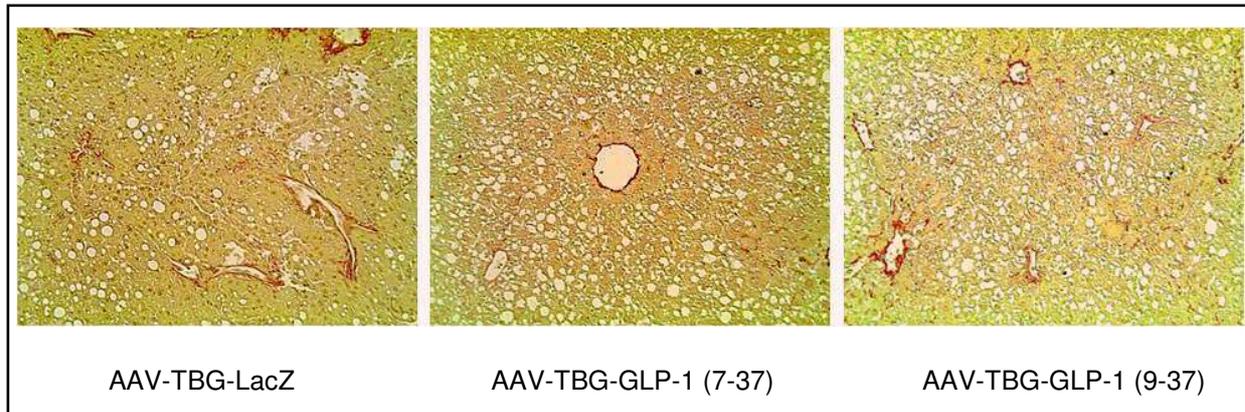
4.5 Analyse der hepatischen Fibrose in C57BL/6 Mäusen unter GLP-1 (7-37) und (9-37)

Die hepatische Fibrose in den C57BL/6 Mäusen wurde anhand einer Sirius Red-Färbung und der Bestimmung des Hydroxyprolinegehaltes untersucht. Kollagenfasern werden bei der Färbung rot dargestellt. Sowohl die quantitative Auswertung der Sirius

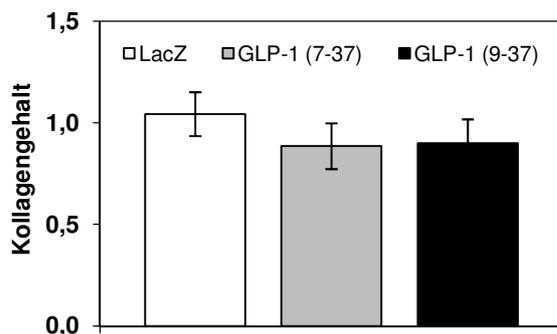
ERGEBNISSE

Red-Färbung (Kollagengehalt) als auch die Bestimmung des Hydroxyprolinegehaltes ergaben keine signifikanten Modifikationen infolge der Transgenexpressionen (Abbildung 24).

A



B



C

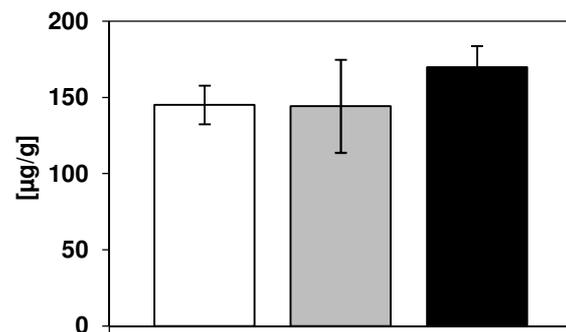


Abbildung 24: **Quantifizierung der hepatischen Fibrose bei C57BL/6 Mäusen auf MCD-Diät; (A) Sirius Red-Färbung der Leber, (B) Quantifizierung der Sirius-Red gefärbten Kollagenfasern** mittels ImageJ (n=11-12/Gruppe), (C) **Hydroxyprolinegehalt der Leber** (n=3/Gruppe); MW ± SEM

5 ATHEROSKLEROSEMODELL: DPP4-INHIBITION

Um zu prüfen, ob die Stabilisierung des endogenen aktiven GLP-1 unter DPP4-Inhibition die Entstehung von Atherosklerose reduziert, wurden LDL-Rezeptor^{-/-} Mäuse mit dem DPP4-Inhibitor PKF275-055 behandelt.

ERGEBNISSE

5.1 Gewichtsverlauf der LDL-Rezeptor^{-/-} Mäuse unter PKF275-055

Die LDL-Rezeptor^{-/-} Mäuse wurden oral mit PKF275-055 über einen Zeitraum von 18 Wochen behandelt. Zwei Wochen erfolgte die Gabe einer Normaldiät mit anschließender Umstellung auf HFD bis zum Ende der Studie. Es wurde kein Gewichtsunterschied zwischen den Gruppen festgestellt (Abbildung 25).

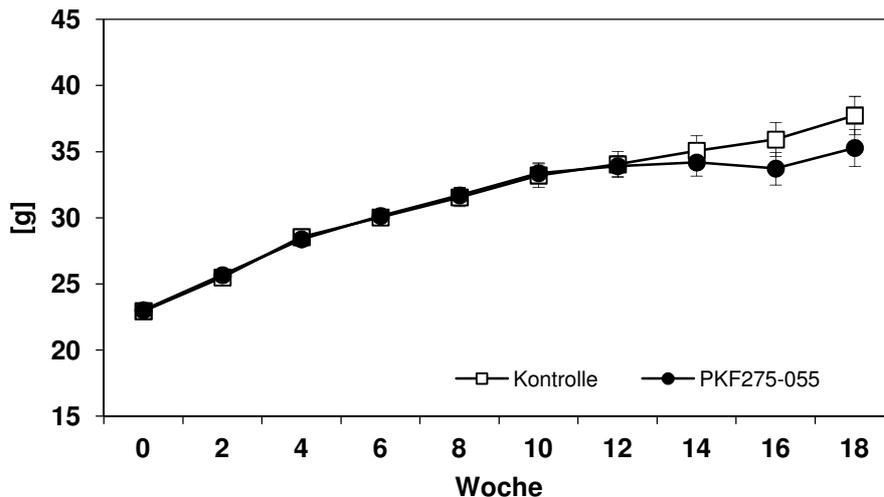


Abbildung 25: Gewichtsverlauf der LDL-Rezeptor^{-/-} Mäuse unter PKF275-055 Intervention (n=15/Gruppe); MW ± SEM

5.2 Bestimmung der Effekte des PKF275-055 auf den Glukosemetabolismus in LDL-Rezeptor^{-/-} Mäusen

Infolge der PKF275-055 Intervention zeigte sich eine signifikante Absenkung der Nüchternblutglukose ab der 12. Studienwoche. Zeitgleich wurden eine signifikant verbesserte Glukosetoleranz und eine tendenzielle Absenkung des HOMA-IR ($p=0,07$) bei den DPP4-Inhibitor behandelten Mäuse konstatiert. Die DPP4-Aktivität wurde zu Beginn der Behandlung sowie nach 10 und 18 Wochen Intervention im Serum bestimmt. Eine signifikante Hemmung der DPP4-Aktivität konnte unter PKF275-055 erzielt werden. Die Bestimmung der hepatischen mRNA Expression der Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (PEPCK) und der Glukose-6-Phosphatase (G6P) ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen beiden Gruppen (Abbildung 26).

ERGEBNISSE

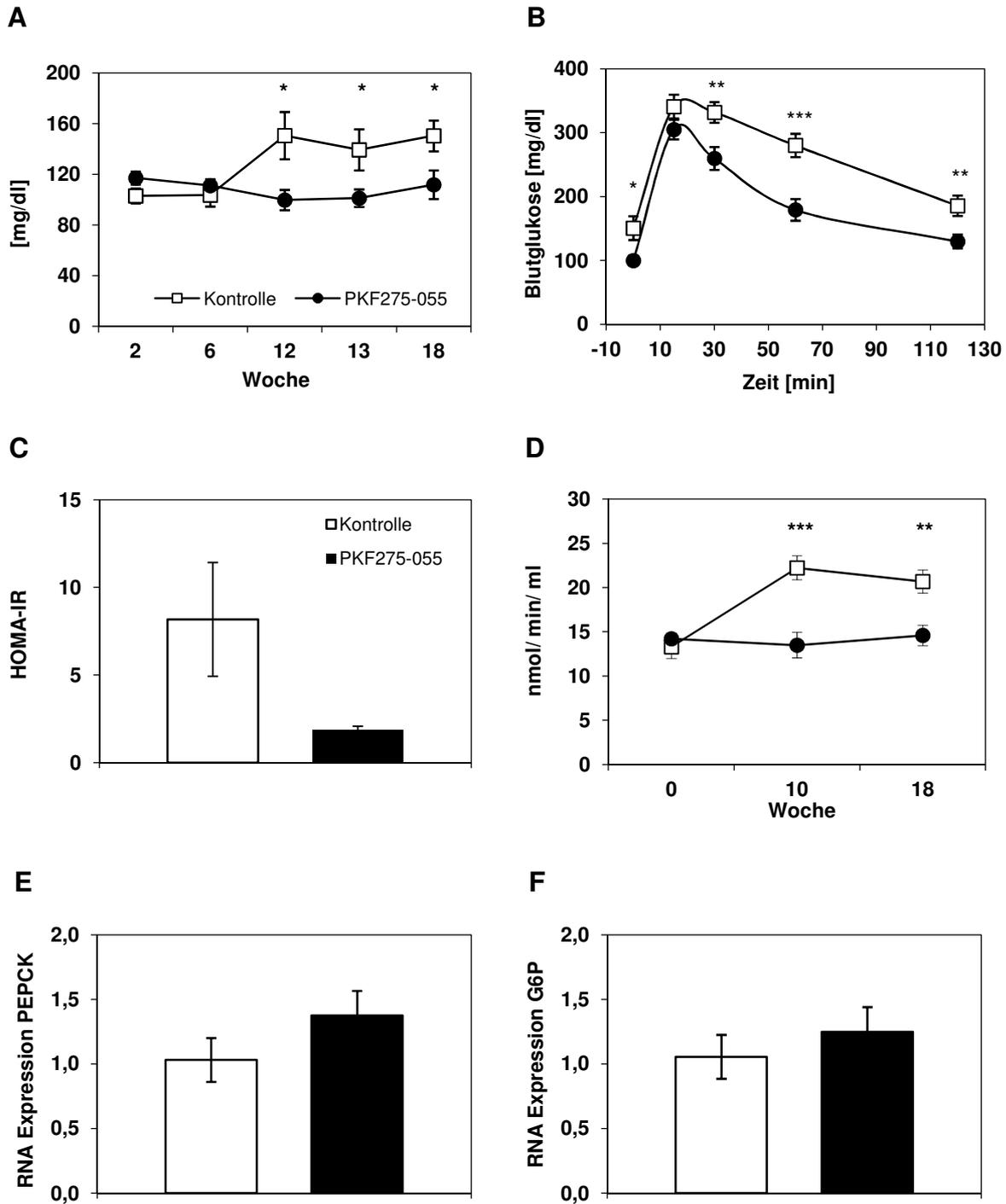


Abbildung 26: (A) **Nüchternblutglukose** (n=15/Gruppe), (B) **oGTT** (n=10/Gruppe), (C) **HOMA-IR** (n=8/Gruppe) zum Zeitpunkt 12 Wochen, (D) **DPP4-Aktivität** im Serum (n=10/Gruppe) sowie **hepatische mRNA Expression der Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (PEPCK)** (E) und **der Glukose-6-Phosphatase (G6P)** (F) der **LDL-Rezeptor^{-/-}** Mäuse unter **PKF275-055 Intervention** (n=5/Gruppe); MW \pm SEM; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

ERGEBNISSE

Zum Studienende erfolgte eine Analyse der Insulinwirkung auf die Insulinsignalkaskade in Leber und Muskulatur. Mittels Western Blot wurde nach *in vivo* Insulininjektion die Aktivierung der Proteinkinase B (Akt) untersucht. Es wurde kein Unterschied im Ausmaß der Phosphorylierung der Proteinkinase B zwischen beiden Gruppen festgestellt (Abbildung 27).

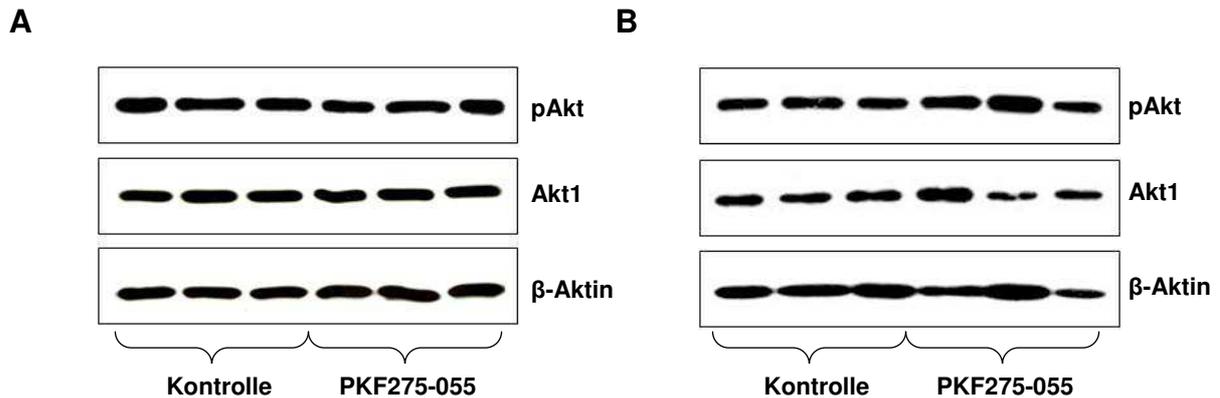


Abbildung 27: Expression von pAkt und Akt1 in Leber (A) und Muskulatur (B) der LDL-Rezeptor^{-/-} Mäuse unter PKF275-055 Intervention (n=3/Gruppe); Western Blot mit β -Aktin als Ladekontrolle

5.3 Einfluss des PKF275-055 auf den Lipidstoffwechsel in LDL-Rezeptor^{-/-} Mäusen

Zu Beginn der Studie wurden die Gruppen anhand der Serumlipide gematcht. Die Spiegel des GC, des HDL-C und der TG zeigten über 18 Wochen keine signifikanten Veränderungen infolge der DPP4-Inhibitor Intervention (Abbildung 28, Abbildung A 2). Eine FPLC-Analyse zum Studienende spiegelt ein identisches Lipoprotein-Verteilungsmuster beider Gruppen wider (Abbildung 28). Die Behandlung mit PKF275-055 zeigte keinen Effekt auf den Triglyzeridgehalt der Leber, die Konzentration an freien Fettsäuren im Serum oder den Adiponectinserumspiegel (Tabelle 32).

Tabelle 32: hepatischer Triglyzeridgehalt, Serumspiegel der freien Fettsäuren und Serumspiegel des Adiponectin nach 18 Wochen PKF275-055 Intervention der LDL-Rezeptor^{-/-} Mäuse (n=15/Gruppe); MW \pm SEM

	Triglyzeride [mg/g]	freie Fettsäuren [mmol/l]	Adiponectin [μ g/ml]
Kontrolle	18,27 \pm 0,68	0,36 \pm 0,03	3,57 \pm 0,18
PKF275-055	19,78 \pm 2,21	0,34 \pm 0,03	3,84 \pm 0,17

ERGEBNISSE

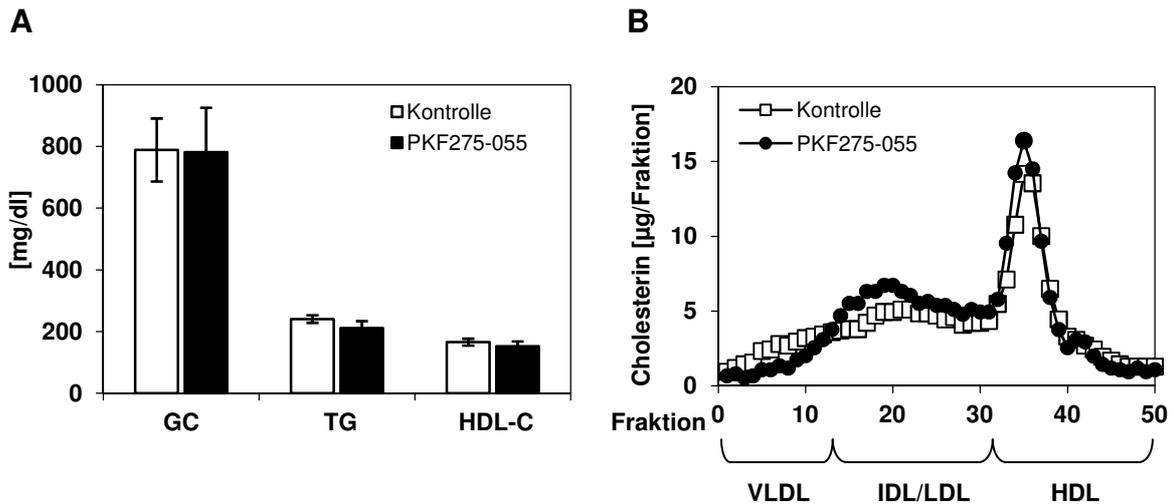


Abbildung 28: **Lipidprofil der LDL-Rezeptor^{-/-} Mäuse unter PKF275-055 Intervention**; (A) **Serumspiegel des Gesamtcholesterin (GC), der Triglyzeride (TG) und des HDL-Cholesterin (HDL-C)** nach 18 Wochen Intervention (n=15/Gruppe); MW ± SEM, (B) **FPLC-Analyse** nach 18 Wochen Intervention, Serum jeweils von der gesamten Versuchsgruppe gepoolt; VLDL: very low density lipoprotein; IDL: intermediate density lipoprotein; LDL: low density lipoprotein; HDL: high density lipoprotein

5.4 Bestimmung der Effekte des PKF275-055 auf die Entstehung der Atherosklerose und Inflamationsparameter in LDL-Rezeptor^{-/-} Mäusen

Nach 16 Wochen HFD wurden die LDL-Rezeptor^{-/-} Mäuse getötet und atherosklerotische Läsionen quantifiziert. Es konnte kein Unterschied im Ausmaß der Atherosklerose zwischen beiden Gruppen festgestellt werden (Abbildung 29). Die Intervention mit dem DPP4-Inhibitor zeigte in der Leber (Abbildung 30) als auch in der A. carotis (Abbildung 31) keinen Effekt auf die mRNA Expression der Inflamationsparameter MCP-1 und TNF- α .

ERGEBNISSE

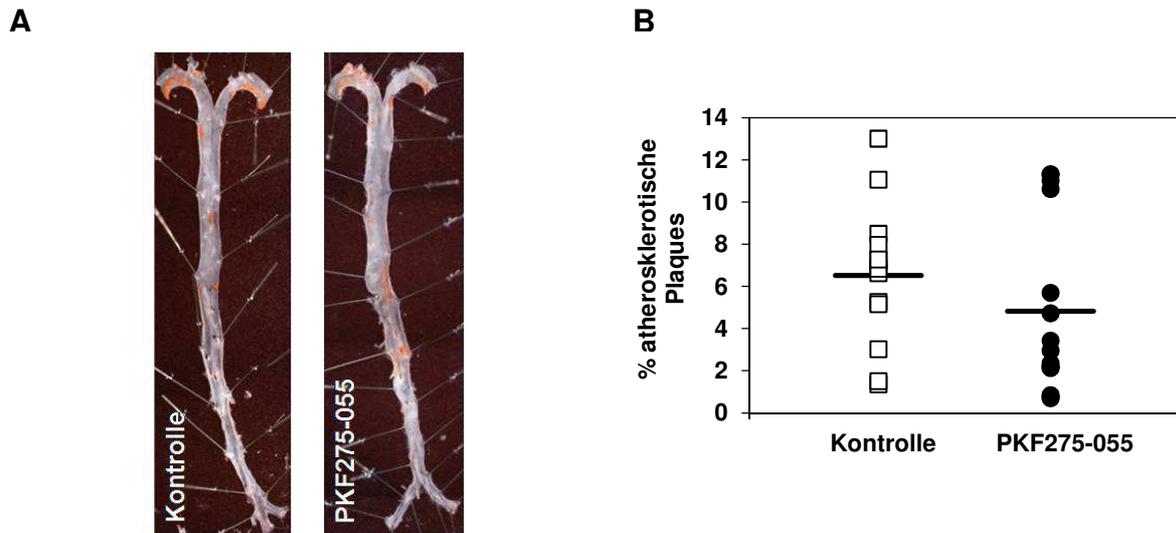


Abbildung 29: **Quantifizierung der Atherosklerose der LDL-Rezeptor^{-/-} Mäuse nach PKF275-055 Intervention;** (A) **Sudan-IV-gefärbte Aortenpräparationen** und (B) **prozentualer Anteil der Plaqueläche an der Gesamtaortafläche** (Kontrollgruppe n=13; PKF275-055 n=15)

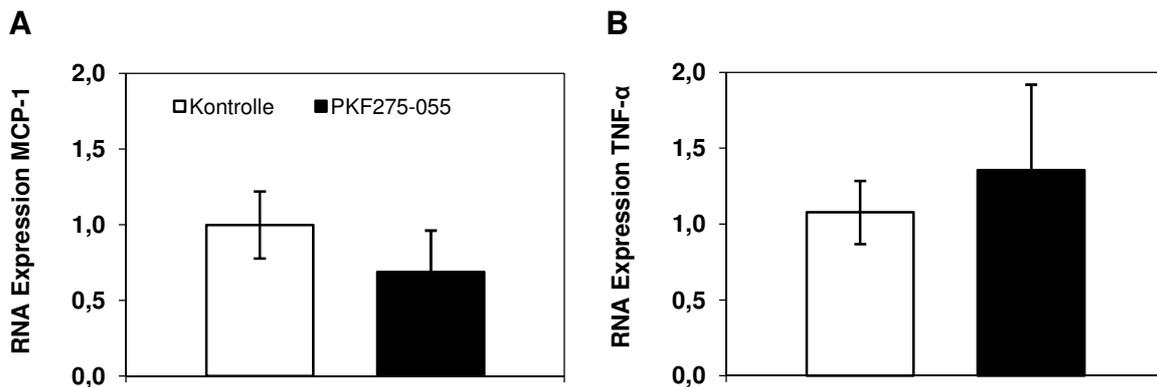


Abbildung 30: (A) **hepatische mRNA Expression des Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1)** und (B) **Tumor-Nekrose-Faktor-α (TNF-α)** bei LDL-Rezeptor^{-/-} Mäusen unter PKF275-055 Intervention (n=5/Gruppe); MW ± SEM

ERGEBNISSE

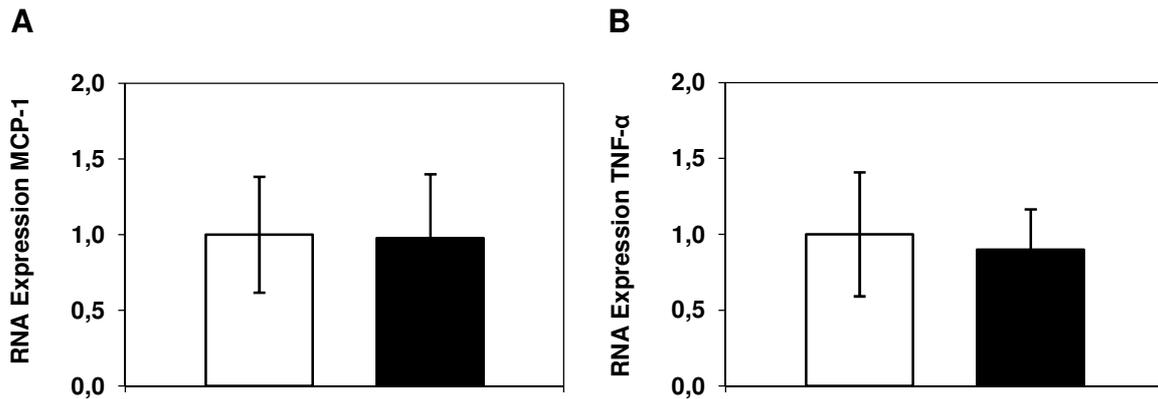


Abbildung 31: (A) mRNA Expression des Monocyte Chemotactic Protein-1 (MCP-1) und (B) Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α) in der A. carotis der LDL-Rezeptor^{-/-} Mäuse unter PKF275-055 Intervention (n=6/Gruppe); MW \pm SEM

6 ATHEROSKLEROSEMODELL: GLP-1

Um zu prüfen, ob eine chronische Erhöhung der Spiegel des aktiven GLP-1 (7-37) und des metabolisierten GLP-1 (9-37) zu einer Modifikation der Atherosklerose führen, wurden LDL-Rezeptor^{-/-} Mäuse mit den Vektoren AAV-CMV-GLP-1 (7-37), AAV-CMV-GLP-1 (9-37) und AAV-CMV-LacZ infiziert.

6.1 Nachweis der AAV-vermittelten Transgenexpression in LDL-Rezeptor^{-/-} Mäusen

Nach einer Versuchsdauer von 20 Wochen wurde die Proteinexpression der Transgene kontrolliert. Die AAV-vermittelte Transgenexpression führte im Vergleich zur Kontrollgruppe zu einer deutlichen Erhöhung der Gesamt-GLP-1 Serumspiegel (GLP-1 (7-37): 244,1 \pm 68,5 pM; GLP-1 (9-37): 409,2 \pm 36,7 pM; LacZ: 28,9 \pm 12,3 pM). In der Kontrollgruppe wurde eine positive beta-Galaktosidase-Expression mit einer AAV-Transduktionsrate von 60 % bestätigt (Abbildung 32).

Im Versuch waren sieben Tieraufälle zu verzeichnen, so dass sich folgende Gruppenstärken zu Studienende ergaben: LacZ n=13, GLP-1 (7-37) n= 10, GLP (9-37) n=15.

ERGEBNISSE

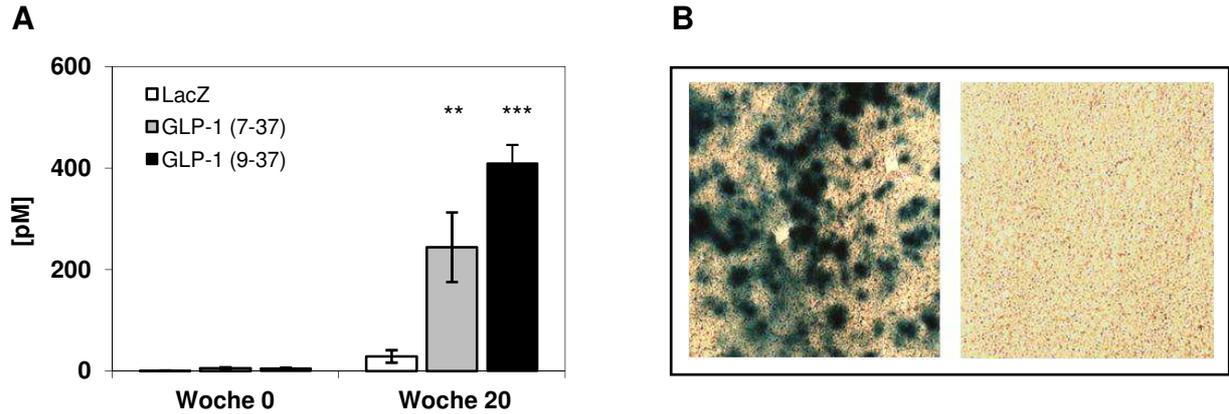


Abbildung 32: **Transgenexpression in LDL-Rezeptor^{-/-} Mäusen**; (A) **Serumspiegel des Gesamt-GLP-1** erfasst mittels ELISA (n=10-15/Gruppe); MW ± SEM; **p<0,01; ***p<0,001 versus LacZ, (B) **X-Gal-Färbung der Leber**, links: AAV-CMV-LacZ, rechts: AAV-CMV-GLP-1 (7-37)

6.2 Gewichtsverlauf der LDL-Rezeptor^{-/-} Mäuse unter GLP-1 (7-37) und (9-37)

Die Überexpression des aktiven GLP-1 (7-37) als auch des metabolisierten GLP-1 (9-37) hatte während der 20wöchigen Versuchsdauer keinen Effekt auf das Gewicht der LDL-Rezeptor^{-/-} Mäuse. In Abbildung 33 sind die Gewichtskurven für die geraden und im Anhang (Abbildung A 3) für alle Studienwochen dargestellt.

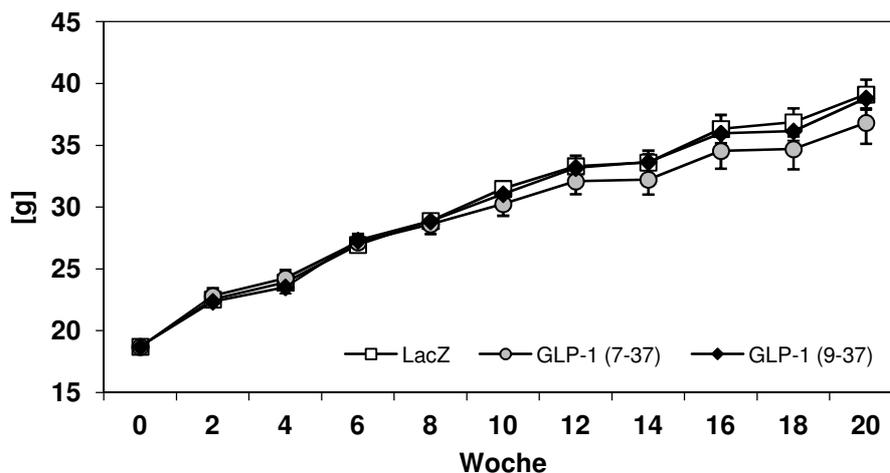


Abbildung 33: **Gewichtsverlauf der LDL-Rezeptor^{-/-} Mäuse** (n=10-15/Gruppe); MW ± SEM

6.3 Bestimmung der Effekte des GLP-1 (7-37) und (9-37) auf den Glukosemetabolismus in LDL-Rezeptor^{-/-} Mäusen

Im Verlauf der Studie wurde im Rahmen der Blutentnahmen die Nüchternblutglukose bestimmt. Weiterhin erfolgte die Durchführung von zwei Glukose- (Woche 7 und 17) und einem Insulin-Toleranztest (Woche 19). Die Umstellung der LDL-Rezeptor^{-/-} Mäuse von Normaldiät auf HFD spiegelt sich im Anstieg der Nüchternblutglukose ab der vierten Versuchswoche wieder (Abbildung 34). Die Überexpression von GLP-1 (7-37) resultierte in einer tendenziellen Erniedrigung der Nüchternblutglukose in Woche 4 und 12 ($p=0,05$ und $p=0,07$) bei gleichzeitiger Verbesserung der Glukosetoleranz. Für GLP-1 (9-37) konnte im Vergleich zur Kontrollgruppe kein Effekt auf Nüchternblutglukose und Glukosetoleranz festgestellt werden (Abbildung 34, Abbildung 35 und Abbildung 37). Gegenüber der Gruppe mit Expression des aktiven GLP-1 zeigte die GLP-1 (9-37)-Gruppe eine signifikant erhöhte Nüchternblutglukose ab der achten Versuchswoche (Abbildung 34) und eine schlechtere Glukosetoleranz in Woche sieben auf. Der GTT nach 17 Studienwochen ergab in der GLP-1 (9-37)-Gruppe in Bezug zur GLP-1 (7-37)-Gruppe lediglich zum Zeitpunkt 30 und 120 Minuten eine tendenziell schlechtere Glukosetoleranz ($p=0,05$ und $p=0,08$) (Abbildung 35). Die Auswertung der AUC zeigt jedoch in beiden GTTs einen signifikanten Unterschied zwischen GLP-1 (7-37) und GLP-1 (9-37) (Abbildung 37).

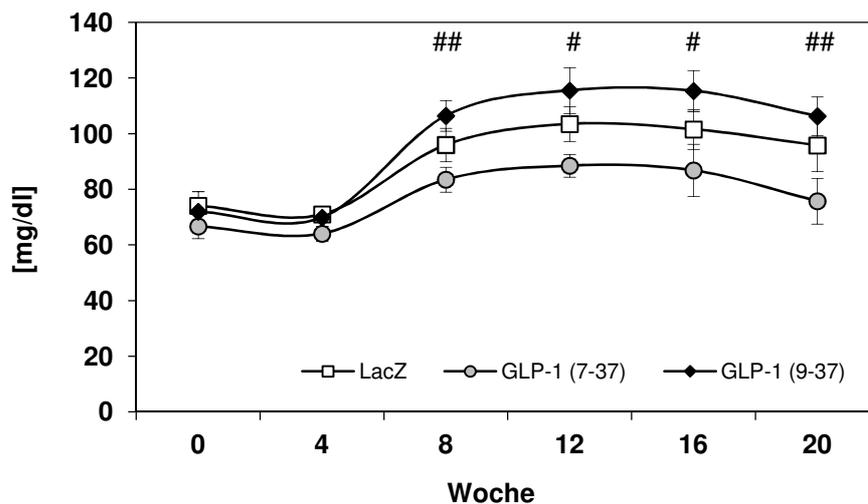


Abbildung 34: Verlauf der Nüchternblutglukose der LDL-Rezeptor^{-/-} Mäuse (n=10-15/Gruppe); MW ± SEM; # $p<0,05$; ## $p<0,01$ GLP-1 (7-37) versus GLP-1 (9-37)

ERGEBNISSE

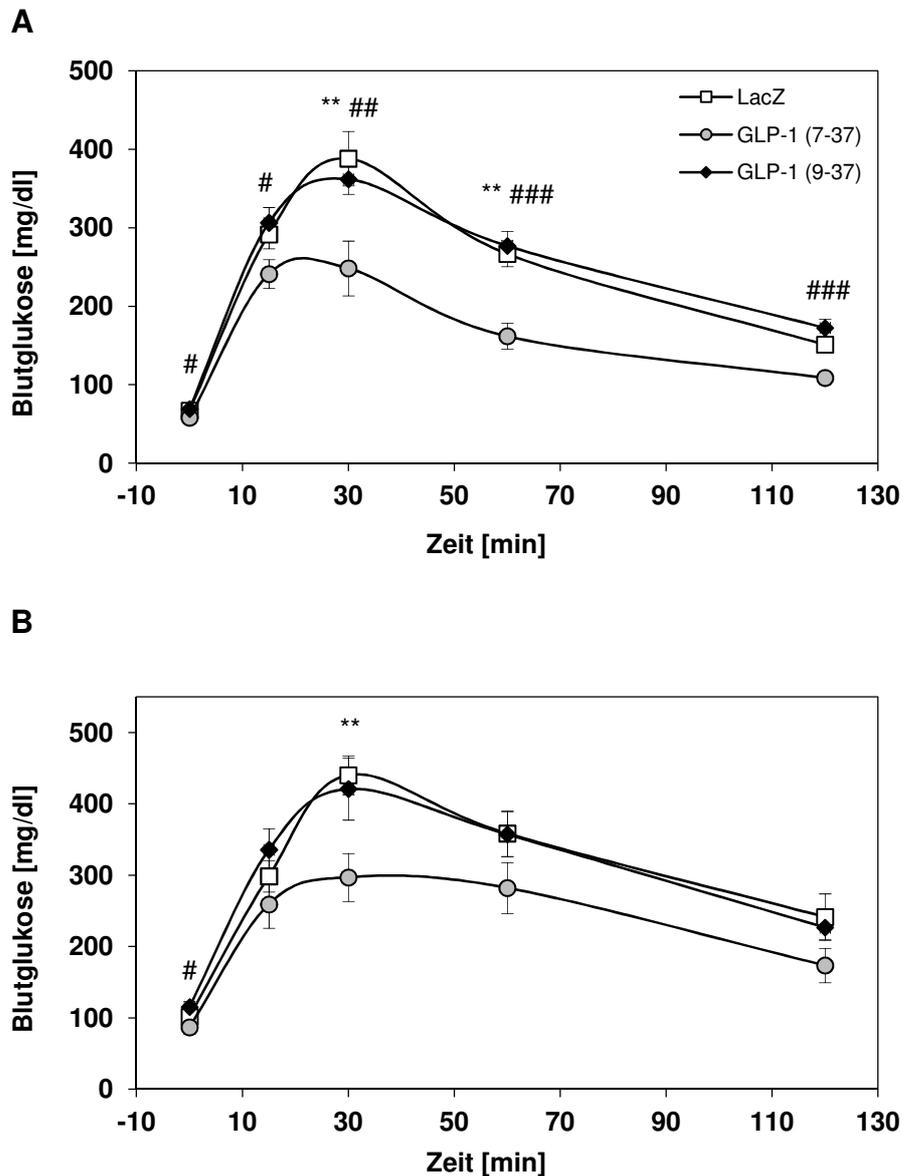


Abbildung 35: ipGTT der LDL-Rezeptor^{-/-} Mäuse (n=6-10/Gruppe) nach (A) 7 Wochen und (B) 17 Wochen; MW ± SEM; ** $p < 0,01$ GLP-1 (7-37) versus LacZ; # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$ GLP-1 (7-37) versus GLP-1 (9-37)

Im ITT ließ sich kein Unterschied als Hinweis für eine veränderte Insulinsensitivität zwischen der GLP-1 (7-37)- und der LacZ-Gruppe feststellen. Unter GLP-1 (9-37) wurde jedoch eine tendenziell höhere Blutzuckerkonzentration im Vergleich zur Kontrollgruppe nach 15 und 60 Minuten ermittelt ($p=0,08$ und $p=0,08$) (Abbildung 36 und Abbildung 37).

ERGEBNISSE

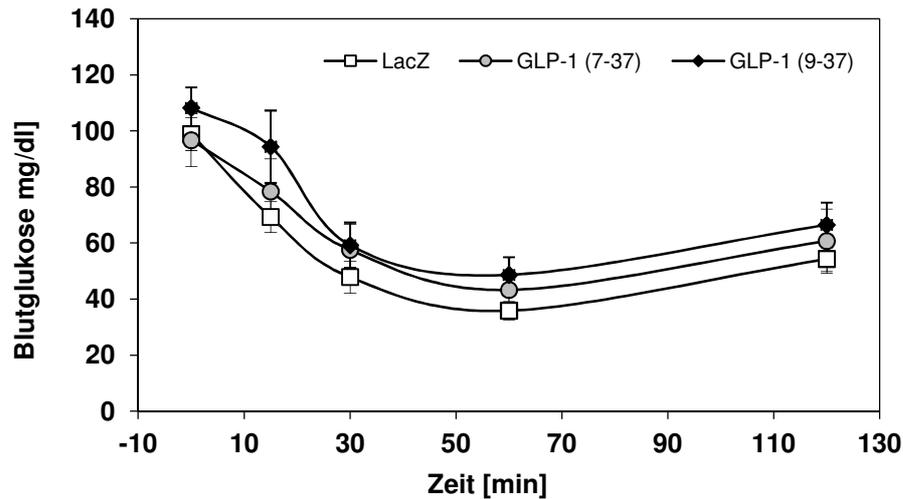


Abbildung 36: ipITT der LDL-Rezeptor^{-/-} Mäuse (n=7-9/Gruppe) nach 19 Wochen; MW ± SEM

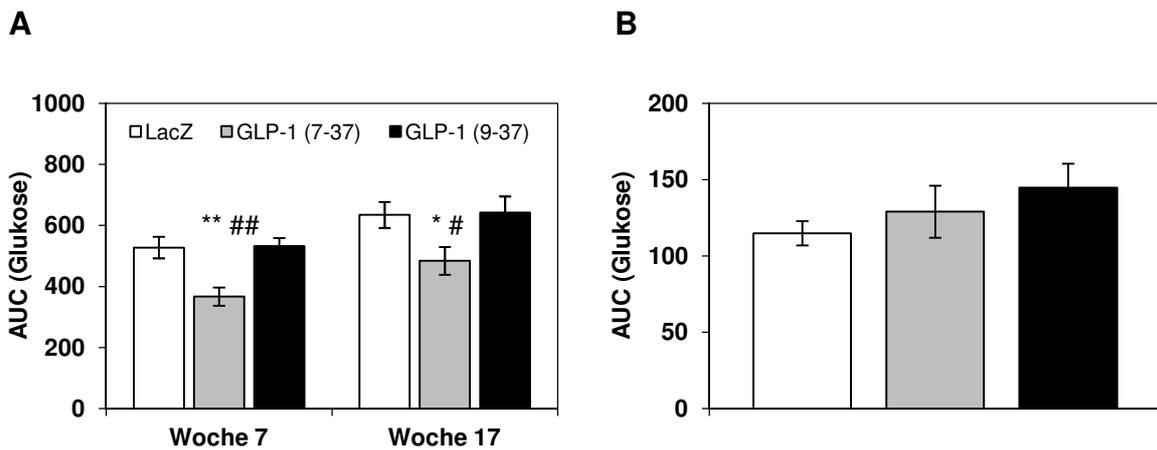


Abbildung 37: (A) Auswertung AUC des ipGTT aus Woche 7 und 17 (n=6-10/Gruppe) und (B) Auswertung AUC des ipITT aus Woche 19 (n=7-9/Gruppe); MW ± SEM; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ versus LacZ; # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$ versus GLP-1 (9-37)

Zur Bestimmung der Insulinsensitivität erfolgte vor der Tötung der Tiere eine Insulininjektion. Die Aktivierung der Proteinkinase B (Akt) in der Leber wurde mittels Western Blot untersucht. Eine nicht signifikant verminderte Phosphorylierung der Proteinkinase B ergab sich unter Überexpression des GLP-1 (9-37) (Abbildung 38).

ERGEBNISSE

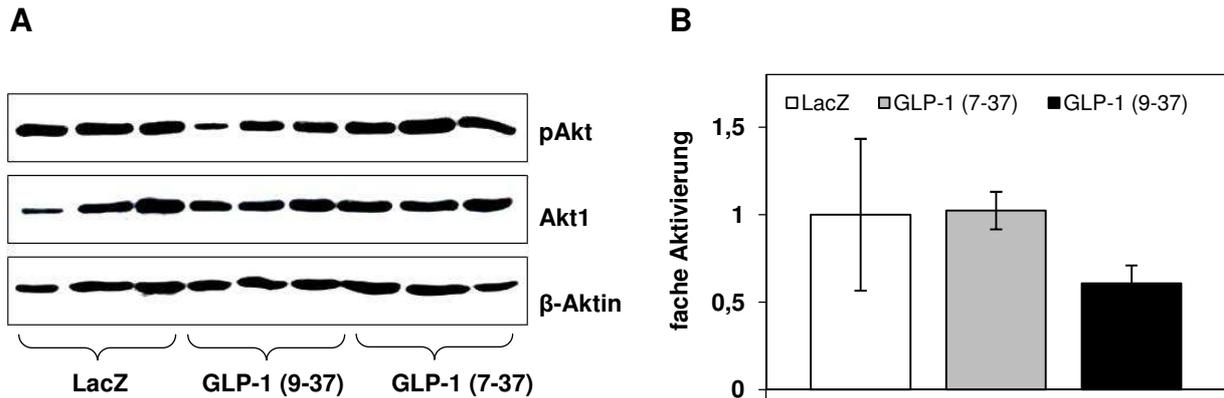


Abbildung 38: hepatische Expression von pAkt und Akt1 der LDL-Rezeptor^{-/-} Mäuse (n=3/Gruppe); (A) Western Blot und (B) densitometrische Auswertung der Aktivierung der Proteinkinase B; β-Aktin als Ladekontrolle; MW ± SEM

6.4 Einfluss des GLP-1 (7-37) und (9-37) auf den Lipidstoffwechsel in LDL-Rezeptor^{-/-} Mäusen

Zu Beginn der Studie wurden die Gruppen anhand der Serumlipide gematcht. Nach vier Wochen Normaldiät zeigte sich unter beiden Transgenexpressionen eine Absenkung des GC und der TG. Darüber hinaus wurde für das aktive GLP-1 (7-37) ein signifikanter und für das metabolisierte GLP-1 (9-37) ein tendenzieller Anstieg ($p=0,08$) des HDL-C konstatiert (Abbildung 39). Mit Umstellung auf HFD wurde eine Erhöhung des GC und des HDL-C unter GLP-1 (9-37) beobachtet. Die Überexpression des GLP-1 (7-37) resultierte nach der Diätumstellung im Vergleich zur Kontrollgruppe in keiner weiteren Modifikation der Cholesterinwerte. Die Triglyzeridspiegel zeigten ab der achten Studienwoche bis zum Versuchsende keine signifikanten Veränderungen infolge der Transgenexpressionen (Abbildung 39 und Abbildung A 5 im Anhang mit GC, HDL-C und TG aus Woche 12 und 16).

ERGEBNISSE

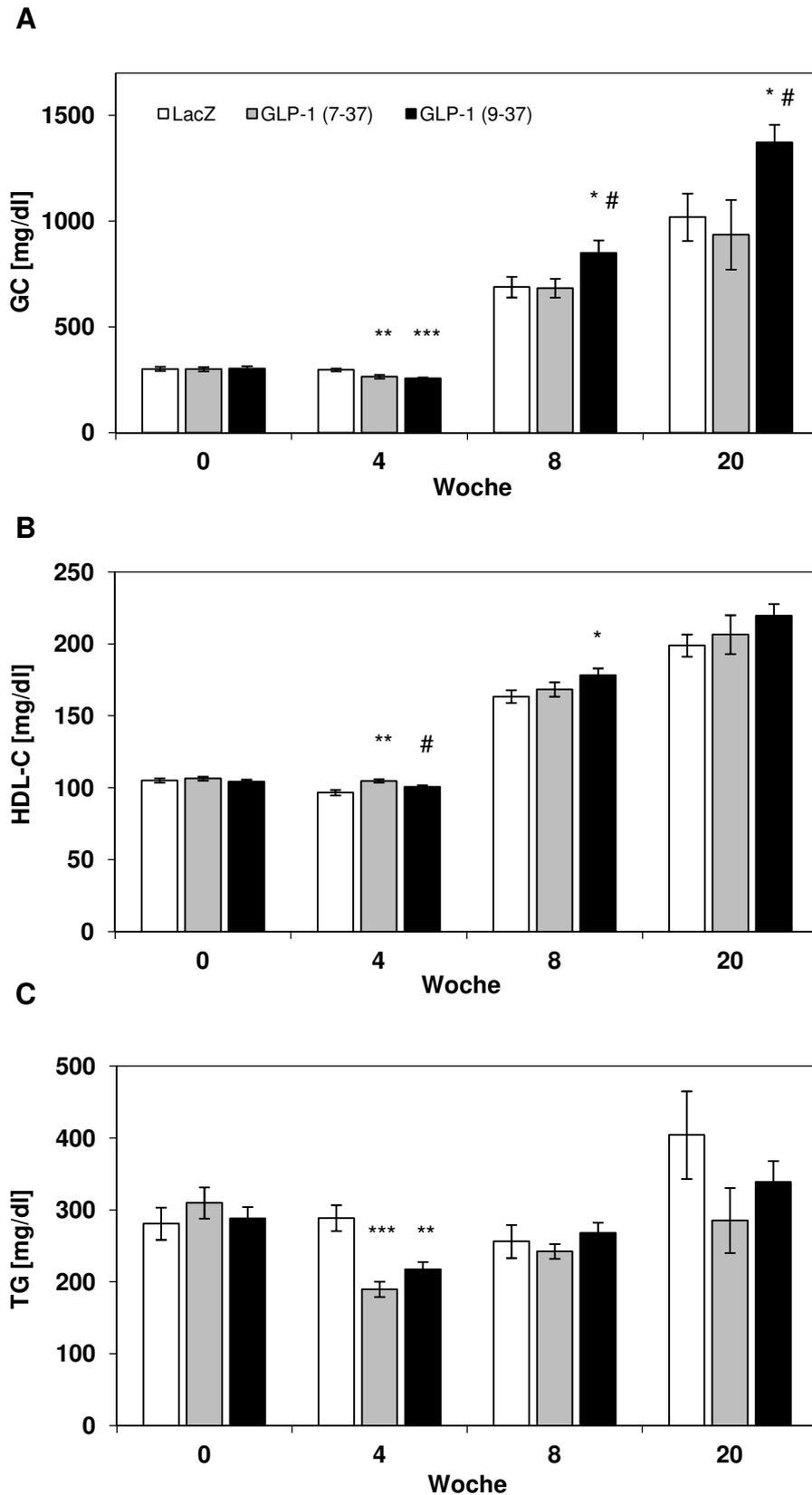


Abbildung 39: Lipidprofil der LDL-Rezeptor^{-/-} Mäuse; (A) Serumspiegel des Gesamtcholesterin (GC), (B) des HDL-Cholesterin (HDL-C) und (C) der Triglyzeride (TG) nach 4, 8 und 20 Wochen post-Vektorinjektion (n=10-15/Gruppe); MW ± SEM; **p*<0,05; ***p*<0,01; ****p*<0,001 versus LacZ; #*p*<0,05 versus GLP-1 (7-37)

ERGEBNISSE

Die Bestimmung des hepatischen Triglyzeridgehaltes ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen (Tabelle 33). Die Überexpression des GLP-1 (7-37) führte im Vergleich zur Kontrollgruppe zu einer tendenziellen ($p=0,1$) und im Vergleich zur GLP-1 (9-37)-Gruppe zu einer signifikanten Erniedrigung des Cholesteringehaltes in der Leber.

Tabelle 33: **hepatischer Cholesterin- und Triglyzeridgehalt der LDL-Rezeptor^{-/-} Mäuse nach 20wöchiger Transgenexpression** (n=10-14/Gruppe); MW \pm SEM; ## $p<0,01$ versus GLP-1 (9-37)

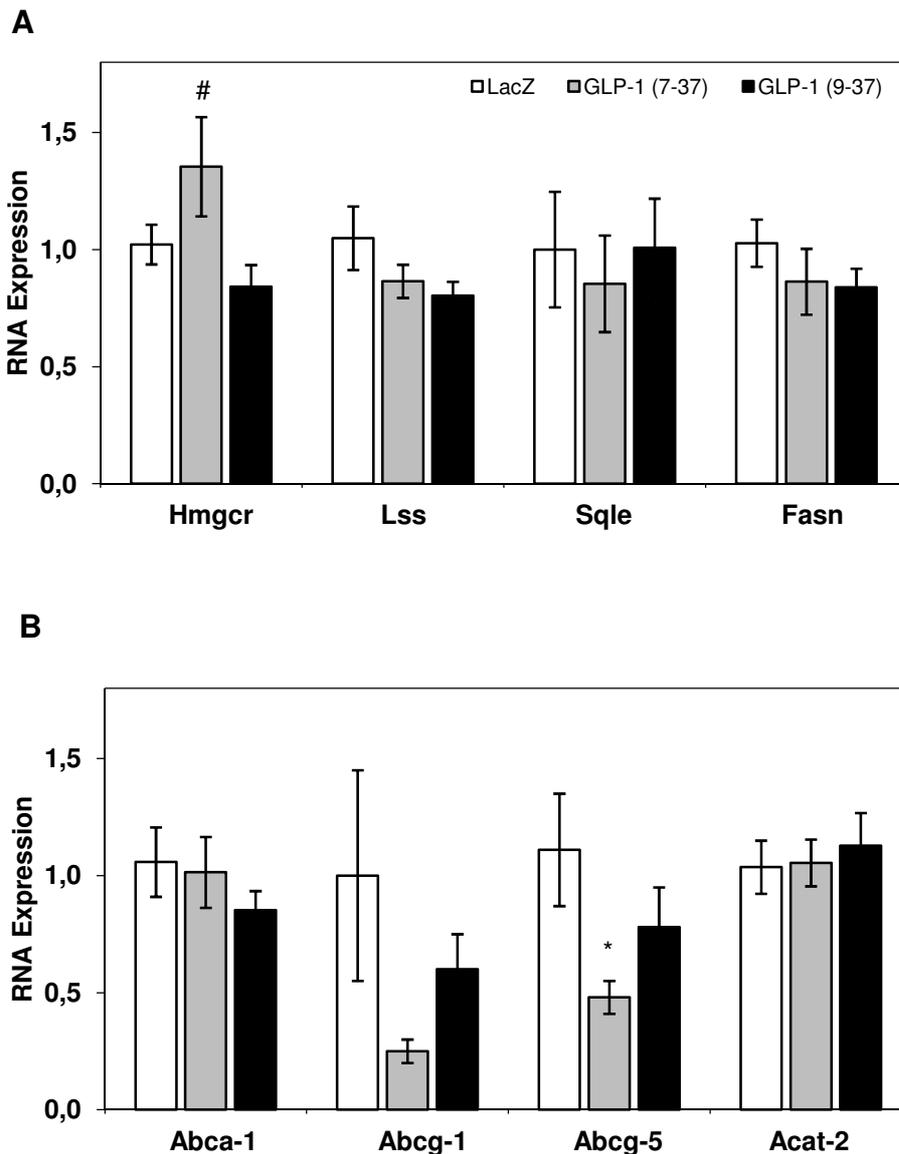
	Cholesterin [mg/g]	Triglyzeride [mg/g]
AAV-CMV-LacZ	5,84 \pm 0,42	27,84 \pm 2,31
AAV-CMV-GLP-1 (7-37)	4,91 \pm 0,31##	23,77 \pm 2,64
AAV-CMV-GLP-1 (9-37)	6,25 \pm 0,29	23,03 \pm 2,05

Zur näheren Charakterisierung des Lipidstoffwechsels wurde die hepatische mRNA Expression folgender Gene quantifiziert: HMG-CoA-Reduktase (3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase, Hmgcr), Lanosterol Synthase (Lss) und Squalen Epoxidase (Sqle) als stellvertretende Enzyme der Cholesterinbiosynthese. Weitere Expressionsanalysen fanden statt für die Fettsäure-Synthase (Fasn), die Cholesterol-Transporter Abca-1, Abcg-1 sowie Abcg-5, die Acyl-CoA-Cholesterin-Acyltransferase-2 (Acat-2), den Fettsäuretransporter CD36, die Cholesterol 7 α -Hydroxylase (Cyp7A1), den Sterol Regulatory Element Binding Factor 2 (Srebf-2), den Lixer X Rezeptor- α (LXR- α), das LDL-Rezeptor-related Protein 1 (Lrp1) und den Scavenger Rezeptor Class B Member 1 (Scarb-1). Die intestinale mRNA Expressionsrate wurde für das Niemann-Pick C1 Like 1 Protein (NPC1L1) bestimmt. Weiterhin wurde die Expression des GLP-1 Rezeptor (GLP-1R) geprüft.

Dabei zeigte sich unter GLP-1 (7-37) im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikant verminderte Expression des Abcg-5 um 57 % (0,48 \pm 0,07 versus LacZ: 1,11 \pm 0,24) und für den Fettsäuretransporter CD36 um 39 % (0,66 \pm 0,09 versus LacZ: 1,08 \pm 0,15). Gegenüber der GLP-1 (9-37)-Gruppe wurde ebenfalls eine signifikante Verminderung der Expressionsrate des CD36 (GLP-1 (7-37): 0,66 \pm 0,09 versus GLP-1 (9-37): 1,31 \pm 0,14) sowie eine Steigerung der HMG-CoA-Reduktase mRNA Expression (GLP-1 (7-37): 1,35 \pm 0,21 versus GLP-1 (9-37): 0,84 \pm 0,09) infolge der Überexpression des aktiven GLP-1 festgestellt. Für die Expression der Cyp7A1 zeigte sich eine Transgen-

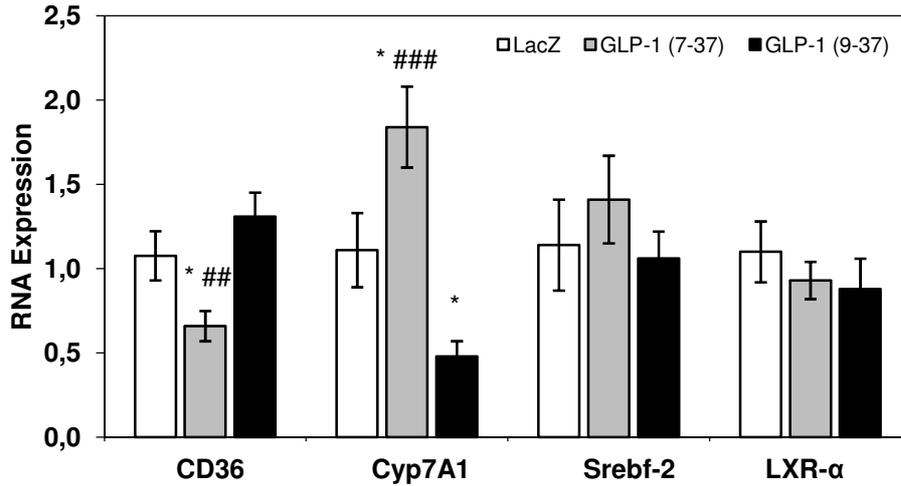
ERGEBNISSE

abhängige divergente Regulation. Aktives GLP-1 (7-37) bewirkte in Bezug zur Kontrollgruppe eine signifikante Steigerung der Cyp7A1 mRNA Expression um das 1,7fache, wohingegen diese durch GLP-1 (9-37) um 56 % gesenkt wurde (LacZ: $1,11 \pm 0,22$; GLP-1 (7-37): $1,84 \pm 0,24$; GLP-1 (9-37): $0,48 \pm 0,09$). Die Expression des GLP-1 Rezeptors wurde in der GLP-1 (7-37)-Gruppe tendenziell im Vergleich zur LacZ-Gruppe erniedrigt ($p=0,07$). Für alle weiteren Gene wurde kein statistisch gesicherter Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt (Abbildung 40).



ERGEBNISSE

C



D

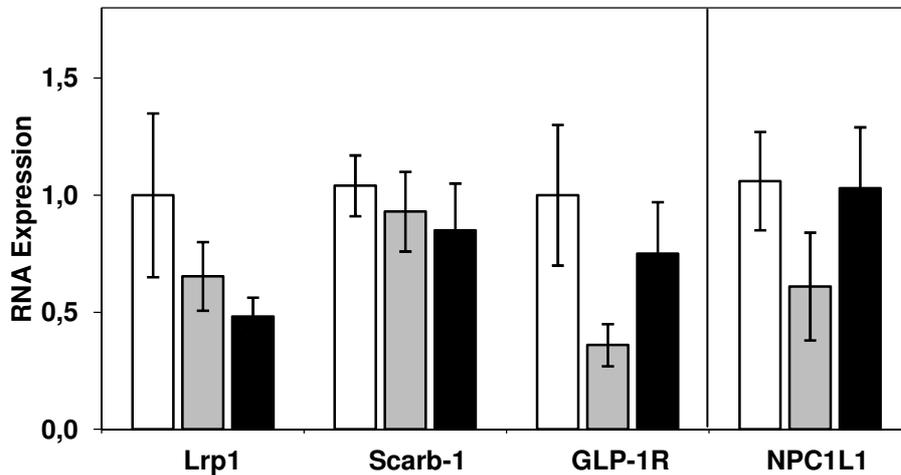


Abbildung 40: hepatisches Expressionsprofil der LDL-Rezeptor^{-/-} Mäuse; (A) mRNA Expression der HMG-CoA-Reduktase (Hmgcr), Lanosterol Synthase (Lss), Squalen Epoxidase (Sqle) und der Fettsäure-Synthase (Fasn), (B) mRNA Expression des Abca-1, Abcg-1, Abcg-5 und der Acyl-CoA-Cholesterin-Acyltransferase-2 (Acat-2), (C) mRNA Expression des CD36, der Cholesterol 7 α -Hydroxylase (Cyp7A1), des Sterol Regulatory Element Binding Factor (Srebf-2) und des Liver X Receptor- α (LXR- α), (D) mRNA Expression des LDL-Rezeptor-related Protein (Lrp1), des Scavenger Rezeptor Class B Member 1 (Scarb-1) und des GLP-1 Rezeptor (GLP-1R) sowie intestinale mRNA Expression des Niemann-Pick C1 Like 1 Protein (NPC1L1) (n=4-9/Gruppe); MW \pm SEM; * p <0,05 versus LacZ; # p <0,05; ## p <0,01; ### p <0,001 versus GLP-1 (9-37)

6.5 Bestimmung der Effekte des GLP-1 (7-37) und (9-37) auf Inflammationsparameter in LDL-Rezeptor^{-/-} Mäusen

In der Leber und der A. carotis wurden die Inflammationsmarker MCP-1 und TNF- α quantifiziert. Die hepatische mRNA Expressionsrate des MCP-1 wurde signifikant (GLP-1 (7-37): $0,18 \pm 0,04$; GLP-1 (9-37): $0,26 \pm 0,06$; LacZ: $1,00 \pm 0,32$) und die des TNF- α nichtsignifikant durch beide Transgene reduziert (Abbildung 41 a und b). In der A. carotis zeigte sich im Vergleich zur Kontrollgruppe unter GLP-1 (7-37) eine signifikant um 74 % verminderte mRNA Expression des MCP-1 ($0,26 \pm 0,08$ versus LacZ: $1,00 \pm 0,31$) und unter beiden Transgenen eine signifikante Reduktion der Expression des TNF- α (GLP-1 (7-37): $0,32 \pm 0,07$; GLP-1 (9-37): $0,31 \pm 0,10$; LacZ: $1,00 \pm 0,30$) (Abbildung 41 c und d).

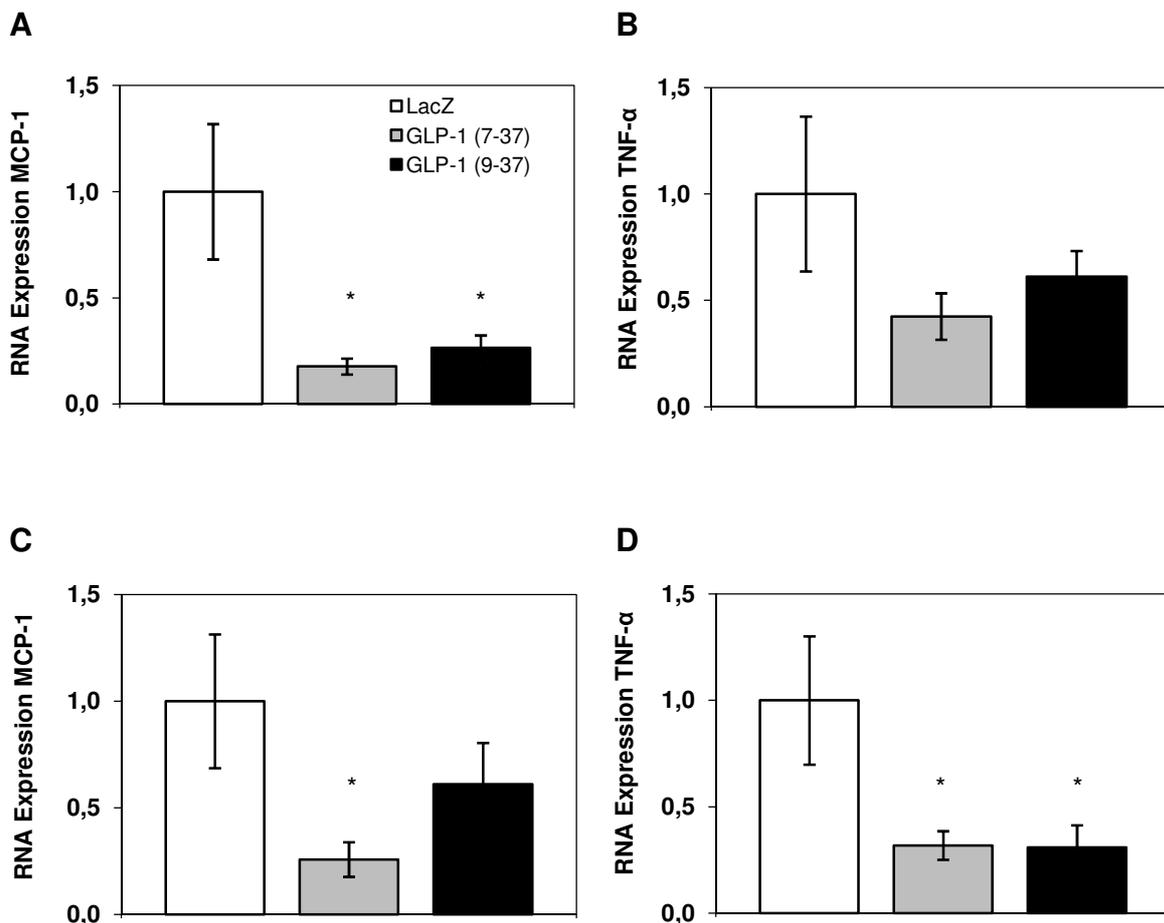


Abbildung 41: mRNA Expression des Monocyte Chemotactic Protein-1 (MCP-1) (A) und des Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α) (B) in der Leber sowie mRNA Expression des MCP-1 (C) und des TNF- α (D) in der A. carotis der LDL-Rezeptor^{-/-} Mäuse (n=8/Gruppe); MW \pm SEM; * p <0,05 versus LacZ

ERGEBNISSE

6.6 Analyse der Entstehung der Atherosklerose in LDL-Rezeptor^{-/-} Mäusen unter GLP-1 (7-37) und (9-37)

Nach 16 Wochen HFD wurden die LDL-Rezeptor^{-/-} Mäuse getötet und atherosklerotische Läsionen quantifiziert. Unter GLP-1 (9-37) wurde ein signifikant erhöhter Anteil Lipid-haltiger Plaques in der Gesamtaorta (GLP-1 (9-37): $7,3 \pm 0,9$ %; GLP-1 (7-37): $3,1 \pm 0,9$ %; LacZ: $3,4 \pm 0,7$ %) und auf Herzklappenebene (GLP-1 (9-37): $24 \pm 1,8$ %; GLP-1 (7-37): $14,1 \pm 2,7$ %; LacZ: $16,1 \pm 2,0$ %) konstatiert. Für das aktive GLP-1 konnte keine Veränderung im Ausmaß der Atherosklerose im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt werden (Abbildung 42, Abbildung 43 und Abbildung 44).

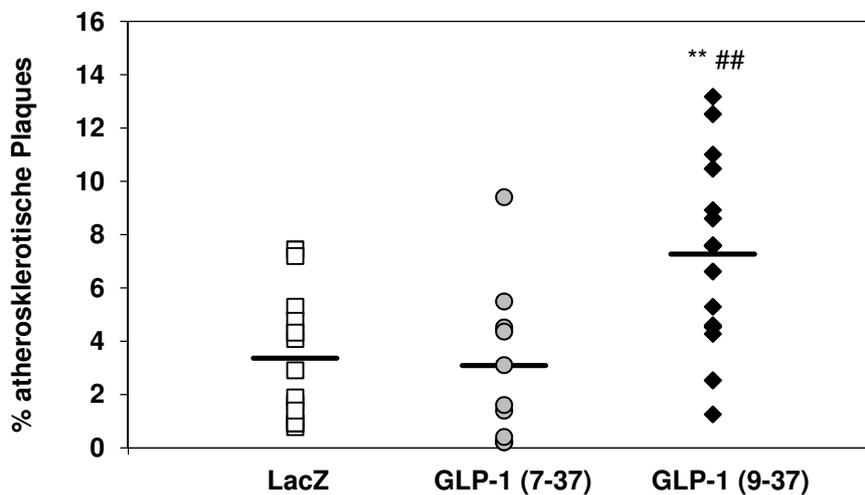


Abbildung 42: Quantifizierung der Artherosklerose in der Gesamtaorta der LDL-Rezeptor^{-/-} Mäuse; Prozentualer Anteil der Plaquefläche an der Gesamtaortafläche (LacZ n=13, GLP-1 (7-37) n=10, GLP-1 (9-37) n=15); ** $p < 0,01$ versus LacZ; ## $p < 0,01$ versus GLP-1 (7-37)

ERGEBNISSE

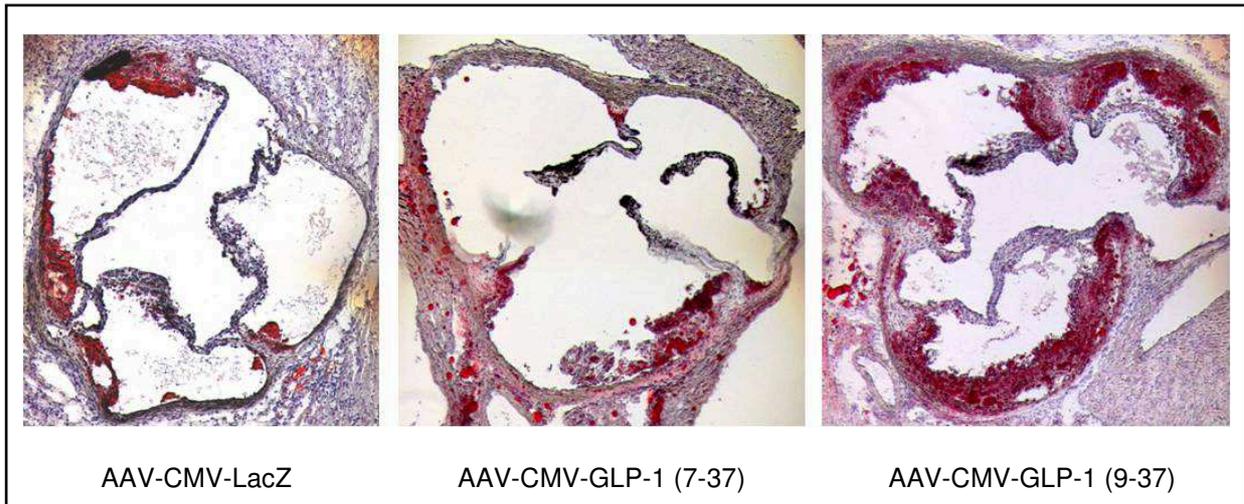


Abbildung 43: Oil-Red-O gefärbte Herzklappenpräparationen der LDL-Rezeptor^{-/-} Mäuse

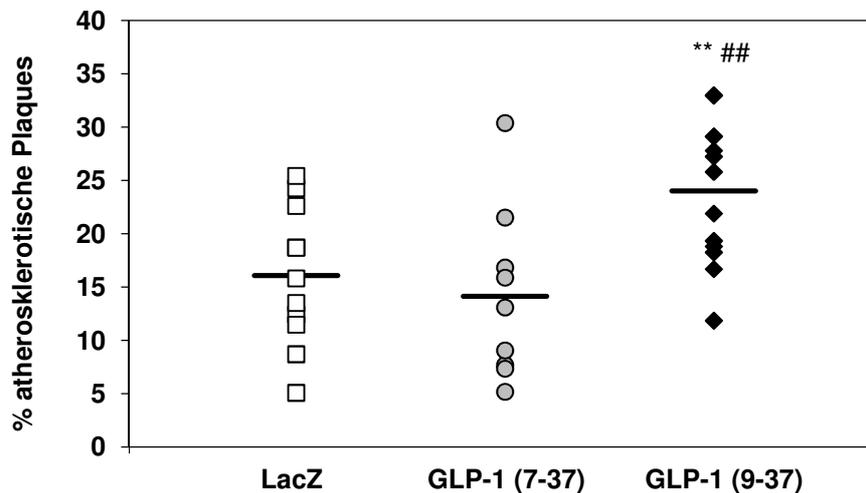


Abbildung 44: Quantifizierung der Atherosklerose auf Herzklappenebene der LDL-Rezeptor^{-/-} Mäuse; Anteil Lipid-haltiger Plaques am Herzvolumen auf Herklappenebene (LacZ n=11, GLP-1 (7-37) n=9, GLP-1 (9-37) n=13); **p<0,01 versus LacZ; ##p<0,01 versus GLP-1 (7-37)

In der Arteria carotis communis dextra wurden die mRNA Expressionsraten für Abca-1 und CD36 ermittelt. In der Gruppe mit Überexpression des GLP-1 (9-37) konnte eine 2,2fach höhere Expression des CD36 im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt werden ($2,20 \pm 0,49$ versus LacZ: $1,00 \pm 0,19$). Die Expression des Abca-1 in der A. carotis blieb unter beiden Transgenen unverändert (Abbildung 45).

ERGEBNISSE

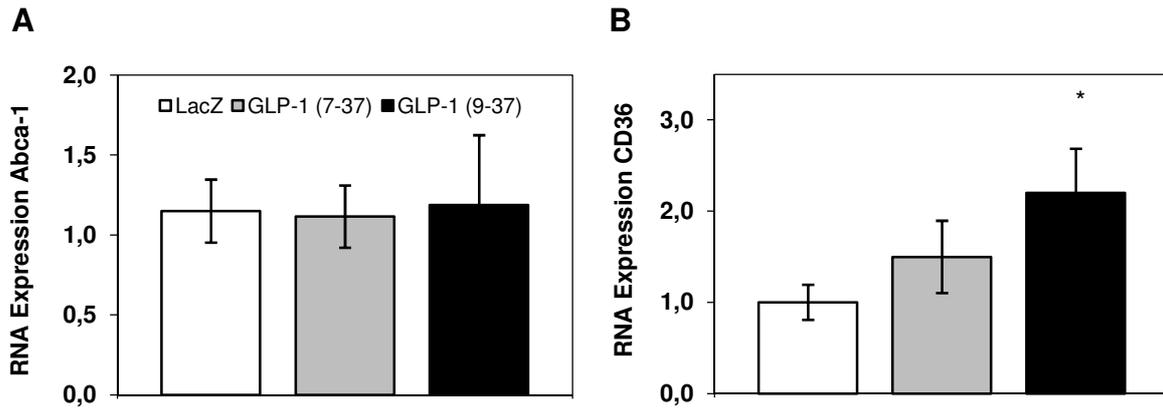


Abbildung 45: (A) mRNA Expression des Abca-1 und (B) CD36 in der A. carotis der LDL-Rezeptor^{-/-} Mäuse (n=8/Gruppe); MW ± SEM<; *p<0,05 versus LacZ

IV DISKUSSION

Zur Charakterisierung der extrapankreatischen Effekte des GLP-1 Systems *in vivo* und damit zur Prüfung der aufgestellten Hypothesen wurden in dieser Arbeit verschiedene Versuchsansätze durchgeführt.

Die Hypothese, dass aktives GLP-1 anti-inflammatorisch wirksam ist, konnte sowohl im NASH- als auch im LDL-Rezeptor^{-/-} Mausmodell nach AAV-vermittelter Überexpression des Inkretins nachgewiesen werden. Überraschenderweise zeigte das metabolisierte GLP-1 ebenfalls unabhängig vom Mausmodell deutliche anti-inflammatorische Effekte. Trotz erzielter Suppression von Entzündungsparametern ließ sich im NASH-Mausmodell keine Prävention der Fibrose durch die GLP-1 Varianten nachweisen.

Die Annahme, dass aktives GLP-1 das Lipidprofil verbessert und die Ausprägung atherosklerotischer Plaques vermindert, kann nur teilweise bestätigt werden. Die Behandlung von LDL-Rezeptor^{-/-} Mäusen mit dem DPP4-Inhibitor PKF275-055, dessen Wirksamkeit anhand der supprimierten DPP4-Aktivität nachgewiesen wurde, resultierte wie erwartet in einer Verbesserung der Nüchtern glukose und Glukosetoleranz, aber ging mit keiner Veränderung der Serumlipidspiegel und Atherosklerose einher. Hingegen ließ sich mittels AAV-vermittelter Überexpression des aktiven als auch metabolisierten GLP-1 eine Diät-abhängige Modulation des Lipidprofils im LDL-Rezeptor^{-/-} Mausmodell nachweisen. Während unter Normaldiät beide GLP-1 Varianten eine Reduktion des GC und der TG sowie eine Erhöhung des HLD-C herbeiführten, zeigte sich unter HFD eine divergente Modulation der Serumlipide. Das metabolisierte GLP-1 führte nach Diätumstellung zur Induktion einer Hypercholesterinämie und ging mit einer verstärkten Ausprägung der Atherosklerose einher. Ebenfalls verlor sich gänzlich mit Beginn der HFD die atheroprotektive Modulation des Lipidprofils unter aktivem GLP-1. Das überexprimierte aktive GLP-1 bewirkte zudem keine verminderte Ausbildung atherosklerotischer Plaques in den LDL-Rezeptor^{-/-} Mäusen.

In den zwei eingesetzten Mausmodellen mit Überexpression des GLP-1 (9-37) wird dessen eigenständige metabolische Wirkung belegt. Die aufgestellte Hypothese, dass sich diese Wirkung komplementär zu den Effekten des aktiven GLP-1 verhält, kann nur zum Teil gestützt werden. Für GLP-1 (9-37) wurden in der vorliegenden Arbeit eine relativ neutrale Rolle im Glukosemetabolismus, eindeutige dem GLP-1 (7-37) analoge anti-inflammatorische Effekte sowie eine komplementäre Wirkung in Bezug auf die Diät-

DISKUSSION

abhängige divergente Modulation des GC mit einhergehender Forcierung der Atherosklerose aufgezeigt.

Diese beschriebenen extrapancreatischen Effekte des GLP-1 Systems werden nachfolgend ausführlich diskutiert.

1 ADENO-ASSOZIIERTE-VIRALE VEKTOREN FÜR DIE GENEXPRESSION

Eine Untersuchung der Langzeiteffekte pharmakologischer GLP-1 Serumspiegel *in vivo* bedarf infolge der kurzen Halbwertszeit des aktiven GLP-1 eine mehrfache tägliche Administration. Die Gentherapie bildet in diesem Zusammenhang eine nützliche Alternative zur Erzielung einer kontinuierlichen Genexpression [204, 343, 360-364]. In der vorliegenden Arbeit wurde die Überexpression des GLP-1 (7-37) und (9-37) *in vivo* mit rAAV Vektoren realisiert. Ziel war es, eine hepatische Expression des jeweiligen Transgens über einen Zeitraum von bis zu fünf Monaten bei minimaler Aktivierung entzündlicher Prozesse zu erzielen. Auf AAV basierende Vektoren behaupten sich unter den etablierten viralen Vektoren (Adenovirus, Lentivirus HSV-1, Retrovirus) durch eine Infektion nicht-proliferierender Gewebe bei gleichzeitig stabiler Langzeit-Transgenexpression und geringer Immunogenität. Das Fehlen viraler ORF's in den rAAV Vektoren bedeutet, dass lediglich mit dem Kapsid virale Proteine übertragen werden und dadurch die Immunantwort weitestgehend minimiert wird. [327-328, 365-366]. Retrovirale Vektoren gehen infolge ihrer DNA-Integration in das Wirtszellgenom mit einem erhöhten Oncogenese-Risiko einher [367-368] und können nur sich in Teilung befindliche Zellen infizieren [366]. Im Gegensatz zum AAV-Wildtyp-Genom, welches bei latenter Infektion vollständig in das Wirtszellgenom integriert wird, liegt die DNA rAAV Vektoren zu schätzungsweise 90 % episomal vor. Die minimal ausgeprägte Integration der rAAV ist nicht ortsspezifisch und stellt demnach ein genotoxisches, wenn auch geringes Risiko dar [366, 369]. Die zur Überexpression des GLP-1 vielfach eingesetzten rekombinanten Adenoviren [204, 343, 360-361] gewährleisteten eine kurze bis mittelfristige Transgenexpression [366]. Adenovirale Vektoren aktivieren jedoch bedeutend stärker die humorale und zelluläre Immunantwort als rAAV und induzieren infolge dessen verstärkt die Produktion inflammatorischer Zytokine [327, 365, 370]. Mit dem Ziel, die Ausbildung von Atherosklerose zu untersuchen, welche im verwendeten LDL-Rezeptor^{-/-} Mausmodell eine Versuchsdauer von 12-20 Wochen benötigt [371-374], wurde das AAV-Vektor-

DISKUSSION

system dem der adenoviralen Vektoren vorgezogen. Um eine optimale Verpackung der DNA und eine effiziente Virusproduktion zu gewährleisten, darf die Größe der rAAV-Vektoren das Wildtypgenom um maximal 10-19 % überschreiten [319-320]. Diese im Vergleich zu anderen Vektorsystemen nachteilige Limitation der rAAV Vektoren stellte bei den in dieser Arbeit vorliegenden geringen Transgengrößen (248 bp und 254 bp) kein Problem dar (II2.4.2).

Die eingesetzten replikationsdefizienten AAV-2/8 Hybridvektoren wurden durch „Cross-Packaging“, der Verpackung des rekombinanten AAV-2 Genom in das Kapsid des Serotyp AAV-8, erzeugt. AAV-8 zeichnet sich im Vergleich zu anderen Serotypen durch einen starken Lebertropismus aus [316-317, 375]. Die Vorteile einer hepatischen Überexpression therapeutischer Gene bestehen in deren effizienter Freisetzung in die Zirkulation, ermöglicht durch die gute Vaskularisierung und geringe Zellturnover-Rate der Leber [376]. Ein weiterer positiver Aspekt der angewendeten Pseudotypisierung ist verglichen zu rAAV-2 die geringere Immunogenität [377] und verminderte Antikörper-Neutralisation [378]. Virale Cap-Proteine (Kapsid) führen über die Aktivierung von B-Lymphozyten zur Bildung neutralisierender Antikörper. Für rAAV-2 wird eine verminderte Effizienz der Transgenexpression bei wiederholter Applikation der viralen Vektoren infolge der humoralen Immunisierung beschrieben [326, 379]. Beim Menschen finden sich nur wenige neutralisierende Antikörper gegen AAV-8 im Serum und es besteht keine Kreuzreaktion mit Antikörpern anderer Serotypen [316, 378]. Anhand dessen ergibt sich die Bedeutsamkeit des AAV-8 Kapsid für den hepatischen Gentransfer und die Langzeitgenexpression.

Zur Produktion der rAAV wurden der Transgen-tragende Vektor und die Helferplasmide mittels linearem PEI (25 kDa) in einer „Triple-Transfektion“ in HEK-293-Zellen kotransfiziert. Anhand der mitgeführten GFP-Kontrolle wurde bereits bei der Transfektion die Qualität der Produktion geprüft und sichergestellt. Eine Transfektionseffizienz von mindestens 60 % wurde dabei konstant erzielt (Abbildung 16). Das lineare PEI (25 kDa) wurde als Reagenz ausgewählt, weil es sich neben einer guten Transfektionseffizienz durch eine geringe Zytotoxizität und gute Stabilität auszeichnet. Reed *et al.* (2006) zeigten in HeLa Zellen eine vergleichbare Effizienz (> 50 % transfizierte Zellen) zwischen Lipofektamin, welches durch seine hohen Kosten für Transfektionen im größeren Rahmen von Nachteil ist, und dem linearen PEI. Zudem erbrachten Sie den Nachweis, dass

DISKUSSION

unter PEI- im Vergleich zur Calciumphosphat-Transfektion 3fach mehr infektiöse AAV-Partikel produziert werden können [380].

Der realisierte Gentransfer mit einer Viruslast von $1 \cdot 10^{12}$ Genomkopien/ Tier resultierte in einer sehr guten Expression der Transgene (beta-Galaktosidase, GLP-1 (7-37) und GLP-1 (9-37)) über bis zu 20 Versuchswochen. Es wurde eine hepatische Transduktionsrate von 50-60 % erzielt (Abbildung 19 und Abbildung 32). Eine vergleichbare Transduktionsrate von 66 % beschreiben Nakai *et al.* (2005) unter einer Viruslast von $1,8 \cdot 10^{12}$ Genomkopien mit AAV-8 [375]. Gao *et al.* (2002) zeigen für AAV-2/8 mit $1 \cdot 10^{11}$ verabreichten Genomkopien eine hepatische Transduktionsrate von geschätzten 50 % [316].

2 MAUSMODELLE

Die als Schwerpunkt in dieser Arbeit induzierten Erkrankungen Atherosklerose und NASH stellen komplexe pathologische Veränderungen dar. Zur Untersuchung therapeutischer Maßnahmen auf die Ausprägung beider Erkrankungen ist die Verwendung von Tiermodellen von essentieller Bedeutung. *In vitro* Studien können hierbei jeweils nur Teilaspekte der Pathogenese widerspiegeln und unterliegen nicht den vielschichtigen Regelmechanismen des Organismus. Im Vergleich zu Großtiermodellen zeichnen sich Mausmodelle vor allem durch eine einfache Haltung und Handhabung der Tiere, die kurze Generationszeit und die unkomplizierte Bebrütung größerer Kohorten aus [381]. In den Modellen dieser Arbeit wurden ausschließlich männliche Tiere eingesetzt, weil diese sowohl in Bezug auf die Ausbildung der Diät-induzierten hepatischen Inflammation als auch der Atherosklerose eine höhere Sensitivität aufweisen [371, 382].

Atherosklerosemodell

Wildtypmäuse entwickeln infolge ihres Lipidprofiles, welches durch einen hohen atheroprotektiven HDL- und niedrige VLDL- und LDL-Cholesterinspiegel gekennzeichnet ist, keine Atherosklerose. Für die Untersuchung des Lipidstoffwechsels und der Atheroskleroseentstehung wurden daher genetische Mausmodelle mit zum Teil diätetischer Manipulation entwickelt. Gut etablierte und die am häufigsten verwendeten Atherosklerosemodelle sind Apolipoprotein E-defiziente Mäuse (ApoE^{-/-}) und LDL-Rezeptor^{-/-} Mäuse. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das LDL-Rezeptor^{-/-} Mausmodell für

DISKUSSION

zwei verschiedene Fragestellungen gewählt. Nachfolgend werden beide Atherosklerosemodelle kurz beschrieben und die Präferenz für das LDL-Rezeptor^{-/-} Modells diskutiert.

Apolipoprotein E dient als Ligand für die Rezeptor-vermittelte zelluläre Cholesterinaufnahme [383-384]. Das Fehlen des ApoE resultiert in einer schweren Hypercholesterinämie (GC: 350 mg/dl) [384], gekennzeichnet durch die drastische Erhöhung des VLDL- und eine Reduktion des HDL-Cholesterinspiegels, die wiederum die spontane Ausbildung atherosklerotischer Veränderungen bedingt [385-386]. Ein Defizit des ApoE^{-/-} Mausmodells besteht im VLDL-dominierten Lipoproteinprofil, welches sich vom humanen Lipoproteinprofil, mit überwiegender Präsenz von LDL-Partikeln, unterscheidet [383].

LDL-Rezeptor^{-/-} Mäuse stellen ein Modell der familiären Hypercholesterinämie dar und weisen infolge des Rezeptor-Mangels moderat erhöhte Cholesterinwerte (250 mg/dl) auf. Das Lipoproteinprofil dieses Mausmodells ist ähnlich dem humanen Lipoprotein-Verteilungsmuster [384, 387]. Die Gabe einer fett- und cholesterinreichen Diät führt in Abhängigkeit vom Cholesteringehalt (0,15-1,25 %) und Fütterungszeitraum zu einem drastischen Anstieg des Cholesterinspiegels (700-1500 mg/dl) und forciert die Atheroskleroseentstehung [374, 388]. In den Versuchen der vorliegenden Arbeit wurde ein GC von 250-300 mg/dl basal und von 780-1370 mg/dl nach 16 Wochen HFD (0,2 % Cholesterin, 21,2 % Fett) erzielt (Abbildung 28 und Abbildung 39), was mit den Angaben in der Literatur vergleichbar ist. LDL-Rezeptor^{-/-} Mäuse entwickeln morphologisch dem Menschen ähnliche Plaques, die sich in ihrer Verteilung zeitabhängig von proximal (Aortenklappe, Aortenbogen) nach distal über die gesamte Aortenlänge erstrecken [371, 383, 388-390]. Das Ausmaß der Atherosklerose liegt nach drei Monaten HFD (0,5-1 % Cholesterin) ungefähr bei 7-8,5 % [371-372]. Die Quantifizierungen der hier durchgeführten Atheroskleroseversuche erbrachten ein Ausmaß der Atherosklerose von 3-7 % (Abbildung 29 und Abbildung 42). Als Ursache dieser im Vergleich zur Literatur verminderten Plaquebildung könnte der geringere Cholesteringehalt der eingesetzten HFD (0,2 % Cholesterin) in Frage kommen. Auf einen höheren Cholesteringehalt der Diät wurde jedoch wegen der Vermeidung unerwünschter hepatotoxischer Effekte verzichtet [372].

Das LDL-Rezeptor^{-/-} Mausmodell wurde für diese Arbeit ausgewählt, weil es neben der Prüfung der aufgestellten Hypothesen auch die Untersuchung von Effekten auf die Diät-

DISKUSSION

induzierte Adipositas und Insulinresistenz gewährleistet. Die Gabe einer Diät mit einem Fettgehalt > 20 % führt bei LDL-Rezeptor^{-/-} Mäusen zur Ausbildung von Adipositas, Hypertriglyzerid-, Hyperinsulin- und Hyperglykämie [374, 390-391]. ApoE^{-/-} Mäuse entwickeln hingegen unter Gabe einer HFD weder eine Adipositas noch eine Insulinresistenz [391-393]. In Hinblick auf die noch unzureichend geklärte Wirkung des GLP-1 (9-37) auf das Körpergewicht und dessen Effekte im Glukosemetabolismus wurde das LDL-Rezeptor^{-/-} Mausmodell zur Charakterisierung verschiedener Komponenten des MetS dem ApoE^{-/-} Modell vorgezogen.

Trotz etablierter Stellung beider Mausmodelle in der Atherosklerosforschung ist eine uneingeschränkte Übertragung der erzielten Ergebnisse auf den Menschen nicht möglich. Es bestehen Unterschiede im Schweregrad der Hypercholesterinämie, vor allem unter Gabe einer HFD, und in der Lokalisation atherosklerotischer Plaques, welche beim Menschen überwiegend in den Koronargefäßen und bei der Maus vordergründig in der Aorta vorzufinden sind. Ferner ist die murine Atherosklerose nicht mit peripherer arterieller Verschlusskrankheit, kardialer Dysfunktion und Myokardinfarkt assoziiert. Das finale Stadium der Atherosklerose, die Plaque-Ruptur, wird im Mausmodell nur sehr selten beobachtet [383]. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit war jedoch das Ausmaß der Atherosklerose der Endpunkt der Studie, so dass diese Aspekte vernachlässigbar waren.

chronisches Inflammationsmodell

Zentrale Adipositas, Dyslipidämie, Hypertonie als auch Insulinresistenz und T2D gelten als Risikofaktoren für die Ausbildung einer NASH, deren Krankheitsbild durch Steatose, lobuläre Inflammation und progressive perizelluläre Fibrose gekennzeichnet ist [76-77, 394]. Bis zum heutigen Zeitpunkt gibt es kein Tiermodell, weder genetisch noch Diätvermittelt, dass die exakte Abbildung der humanen NASH und damit die gleichzeitige Induktion von Insulinresistenz und Steatohepatitis gewährleistet. Die Mehrheit der Tiermodelle, die eine Insulinresistenz infolge von Defekten in der Leptin- oder Adiponectin-Signalkaskade aufweist, entwickelt weder eine Steatohepatitis noch fibrotische Veränderungen [351]. Demnach wurde zur gezielten Untersuchung der anti-inflammatorischen Effekte des GLP-1 Systems in der vorliegenden Arbeit ein Diät-induziertes NASH-Modell mit lipotoxisch induzierter Inflammation und Fibrose gewählt. Der Einsatz eines Knockout-Modells mit Ausbildung einer Steatohepatitis, wie Acyl-Coenzym A Oxidase-defiziente Mäuse (AOX) oder Methionin Adenosyltransferase 1A-defiziente

DISKUSSION

Mäuse (MAT1A), kam aufgrund der hohen Kosten für Anschaffung und Haltung für diesen Pilot-Versuch nicht in Betracht. Zudem fehlt bei diesen Knockout-Modellen die Ausbildung eines Steatose-Stadiums im Vorfeld der Steatohepatitis [351].

Das verwendete klassische Methionin-Cholin-defiziente Diätmodell führt zur Störung der hepatischen β -Oxidation und VLDL-Synthese sowie zu einer Verminderung der antioxidativen Kapazität der Leber. Eine Akkumulation von TG in der Leber und oxidativer Stress sind die Folge [74, 351]. Erwiesenermaßen resultiert die Fütterung der MCD-Diät bei Nagern in einem Gewichtsverlust von bis zu 40 % sowie einem Abfall der Cholesterin- und Triglyzeridspiegel im Serum [351, 395]. Die Daten der vorliegenden Arbeit zeigen im Mittel einen Gewichtsverlust der Wildtypmäuse von 29 % sowie einen Abfall der Spiegel an GC um 51 % und der TG um 32 % nach vier Wochen Diätintervention (Abbildung 20, Tabelle 30 und Abbildung 21). Als Nachteil des MCD-Modells ist die im Vergleich zur humanen NASH nicht induzierte periphere Insulinresistenz zu nennen. Trotz dieser Limitation ist das MCD-Diätmodell ein etabliertes NASH-Modell, das eine Untersuchung therapeutischer Interventionen auf hepatische Inflammation und Fibrose erlaubt [351].

3 EFFEKTE DER DPP4-INHIBITION

Die Effekte einer chronischen Behandlung mit dem Vildagliptin-Analog PKF275-055 wurden in LDL-Rezeptor^{-/-} Mäusen auf HFD untersucht. Den Erwartungen entsprechend führte die Hemmung der DPP4-Aktivität zu einer Verbesserung des Glukosemetabolismus, bei jedoch unverändertem Körpergewicht, Leberfettgehalt und Serumlipidspiegeln. Darüber hinausgehend ließ sich über die Intervention weder eine inflammationsmodulierende Wirkung noch eine Veränderung im Ausmaß atherosklerotischer Plaques nachweisen.

Der DPP4-Inhibitor PKF275-055 weist eine dem Vildagliptin vergleichbare Selektivität und Pharmakodynamik auf [274]. Demzufolge wurde die Dosierung des PKF275-055 in Anlehnung an die von Ahren *et al.* (2005 und 2007) im Mausmodell eingesetzte und funktionell wirksame Dosis des Vildagliptin von 0,3 mg/ml Trinkwasser übernommen [285, 287]. Die Wirksamkeit der Interventionsdosis wurde anhand einer DPP4-Aktivitätsmessung belegt. Während für die Kontrollgruppe ein Anstieg der DPP4-Aktivität nach 10 Wochen mit gleichbleibend hohem Level bis zum Studienende zu verzeichnen war,

DISKUSSION

wies die Interventionsgruppe eine effektive Inhibition der DPP4-Aktivität auf (Abbildung 26). Die Zunahme der DPP4-Aktivität in der Kontrollgruppe lässt sich über den Anstieg des Körpergewichts und oder die steigende Hyperglykämie erklären [242-243].

3.1 PKF275-055 verbessert den Glukosemetabolismus

Klinische Studien beschreiben für DPP4-Inhibitoren gewichtsneutrale Effekte [296], die sich anhand von *in vivo* Studien mit Modellen für Diät-induzierte Adipositas und den hier vorliegenden Daten bestätigen lassen [286, 396-398]. Es ist umfassend belegt, dass die anti-diabetische Wirkung der DPP4-Inhibitoren über eine Stabilisierung der aktiven GLP-1 und GIP Serumspiegel und die darüber vermittelte verstärkte Glukose-abhängige Insulinsekretion realisiert wird. In DIRKO-Mäusen (double incretin receptor knock-out), die einen Knockout für beide Inkretin Rezeptoren aufweisen, lassen sich keine glukoregulatorischen Effekte durch DPP4-Inhibition nachweisen [272, 396]. In Übereinstimmung mit anderen Tiermodell-Studien konnte in dieser Arbeit über die Hemmung der DPP4-Aktivität ein Diät-vermittelter Anstieg der Nüchternglukose [286, 399] verhindert und gleichzeitig eine Verbesserung der Glukosetoleranz erzielt werden [286, 396, 398-401]. Jedoch wurde in diesem Zusammenhang keine veränderte hepatische Expression der Schlüsselenzyme der Glukoneogenese (PEPCK und G6P) festgestellt (Abbildung 26). Ebenso zeigt sich bei DPP4-defizienten Ratten eine basal erniedrigte hepatische Glukoseproduktion bei unveränderter Expression von PEPCK und G6P [402]. Es ist bekannt, dass eine vorliegende Insulinresistenz mit einer erhöhten endogenen Glukoseproduktion resultierend aus gesteigerter Glukoneogenese und Glykogenolyse einhergeht [22, 28]. Samuel *et al.* (2009) zeigten jedoch in zwei Tiermodellen als auch bei Typ 2 Diabetikern, dass erhöhte Nüchtenglukosespiegel und eine gesteigerte endogene Glukoseproduktion nicht mit einer Modifikation der hepatischen mRNA-Expression von PEPCK und G6P assoziiert sind [403]. Eventuell ist die Analyse der Expressionsraten beider Enzyme als Beleg für eine veränderte Glukoseproduktion demnach ungeeignet. Trotz tendenziell verbessertem HOMA-IR führte die PKF275-055-Intervention weder zu einer Modifikation der hepatischen noch der peripheren Insulinsensitivität, die anhand der Phosphorylierung der Proteinkinase B ermittelt wurden (Abbildung 26 und Abbildung 27). Andere Studien konnten ebenfalls keine Verbesserung der Insulinsensitivität unter DPP4-Inhibition in Mäusen auf HFD feststellen [396,

DISKUSSION

399-400]. Eine mögliche Verbesserung der Insulinsensitivität, die zum Teil unter GLP-1 Rezeptor-Agonisten beobachtet wird [404-405], könnte unter DPP4-Inhibition durch die gleichzeitige Erhöhung der endogenen GIP Spiegel maskiert werden. Diese Hypothese stützt sich auf die widerstreitenden Eigenschaften des GIP im Glukosemetabolismus. Während GIP einerseits die Insulinsekretion stimuliert, induziert es andererseits eine Insulinresistenz. Entsprechend weisen GIP-Rezeptor Knockout-Mäuse eine erhöhte Insulinsensitivität auf, die auch über eine pharmakologische Antagonisierung am Rezeptor erreicht wird [405-408], während die Gabe eines GIP Rezeptor-Agonisten eine Insulinresistenz bewirkt [400]. Es besteht nun die begründete Annahme, dass die Normalisierung der Nüchternglukose als auch die Verbesserung der Glukosetoleranz unter PKF275-055-Behandlung in erster Linie auf eine verbesserte Insulinsekretion der β -Zelle und nicht auf eine Veränderung der Insulinwirkung zurückzuführen ist. Um dies jedoch abschließend und gesichert beurteilen zu können, wäre die Durchführung eines hyperinsulinämisch-euglykämischen Clamps, als Goldstandard zur Bestimmung der Insulinwirkung, in einem vergleichbaren Versuch notwendig.

3.2 PKF275-055 bewirkt keinen Unterschied im Lipidprofil

Die 18wöchige Intervention der LDL-Rezeptor^{-/-} Mäuse mit PKF275-055 bewirkte weder eine Modifikation der TG-, GC- und HDL-Cholesterin-Spiegel noch der Lipoproteinverteilung. Im Kontrast dazu stehen Daten aus diabetischen Tiermodellen und solchen mit genetisch bedingter als auch Diät-induzierter Adipositas in denen eine DPP4-Inhibition mit einer Triglyzeridsenkung [286, 291, 396, 409-412] und zum Teil eine Reduktion des GC einherging [396, 410-411]. Klinisch werden unter DPP4-Inhibition eine Absenkung des Gesamtcholesterins [293] und insbesondere eine Verbesserung des postprandialen Triglyzeridmetabolismus beschrieben [292, 413]. Erklärt wird der Effekt auf die postprandialen TG über eine GLP-1 vermittelte Reduktion des intestinalen Lymphflusses, der TG-Absorption sowie der ApoB Sekretion [414-415]. GIP hingegen führt zu einer Verschlechterung des postprandialen Triglyzeridmetabolismus [415].

Im Rahmen der viszeralen Adipositas und peripherer Insulinresistenz sind erhöhte Spiegel an freien Fettsäuren zu verzeichnen, die ihrerseits eine erhöhte VLDL-Produktion und Leberverfettung hervorrufen, toxisch auf die β -Zelle wirken (Lipotoxizität) und die Insulinresistenz verstärken [14, 33]. Es konnten im dargestellten Ver-

DISKUSSION

sich durch die PKF275-055-Gabe keine Effekte auf die freien Fettsäuren und den hepatischen Triglyzeridgehalt festgestellt werden (Tabelle 32). Dieses Ergebnis liegt in Übereinstimmung mit den in beiden Gruppen vergleichbaren Triglyzeridspiegeln und der identischen Insulinsensitivität. In anderen Tiermodellen ließen sich positive Effekte der DPP4-Inhibition auf die freien Fettsäurespiegel [286, 409-411] und den hepatischen Triglyzeridgehalt nachweisen [286, 401, 416]. Die Diskrepanzen zwischen den hier vorliegenden Ergebnissen und weiteren Studien hinsichtlich Lipidprofil lassen sich vermutlich auf Spezies- sowie Tiermodellunterschiede (ZDF-Ratte, *ob/ob*-Maus, HFD-Streptozotocin-Maus, Streptozotocin-Maus oder -Ratte, HFD-Maus) als auch auf die Dosis des jeweils eingesetzten DPP4-Inhibitors zurückführen. Ferner verweisen aktuelle Daten auf eine durch den Knockout der DPP4 erhöhte Anfälligkeit zur Ausbildung einer Dyslipoproteinämie [417-418]. Es wird dabei gezeigt, dass die DPP4 über die Regulation von CYP51 (Cytochrom P450, Familie 51), SC4MOL (Sterol-C4-methyl Oxidase-like) und HSD17B2 (Hydroxysteroid-17beta-Dehydrogenase 2) in die Cholesterin- und Steroidbiosynthese involviert ist. Die unter DPP4-Inhibition stabilisierten Spiegel des aktiven GIP könnten ebenfalls eine Erklärung liefern. McClean *et al.* (2007) erzielten über die Antagonisierung des GIP-Rezeptors eine Reduktion der GC- und TG-Spiegel sowie eine verminderte Akkumulation von TG in Leber und Muskulatur [419]. Infolge der geringen Substratspezifität der DPP4 ist es ebenso möglich, dass positive als auch negative Einzeleffekte der stabilisierten Hormone in Summe als neutrale Wirkung der DPP4-Inhibition zu beobachten sind.

3.3 PKF275-055 hat keinen Effekt auf Inflammation und Atherosklerose

Im Rahmen des MetS ist die Expression des Adipokin Adiponectin, welches anti-diabetische, anti-inflammatorische sowie anti-atherogene Eigenschaften aufweist, vermindert [420]. Die vorliegende Studie belegt einen fehlenden Einfluss der PKF275-055 Intervention auf die Adiponectinspiegel der LDL-Rezeptor^{-/-} Mäuse (Tabelle 32). Daten anderer Studien zeigen widersprüchliche Ergebnisse zum Effekt einer DPP4-Inhibition auf die Serumspiegel des Adiponectin [401, 412]. Als weitere Adipokine wurden TNF- α und MCP-1 untersucht. So induziert die Gabe einer fett- und cholesterinreichen Diät neben einer hepatischen Steatose inflammatorische Prozesse mit erhöhter hepatischer und systemischer Expression beider Entzündungsmarker, die ihrerseits zur Entwicklung

DISKUSSION

einer Insulinresistenz beitragen [351, 421]. Ferner weisen TNF- α und MCP-1 ein hohes atherogenes Profil auf. Es wurde gezeigt, dass TNF- α - als auch MCP-1-defiziente Mäuse weniger Atherosklerose entwickeln, wohingegen deren verstärkte Expression die Ausbildung atherosklerotischer Läsionen forciert [422-425]. Im dargestellten Tiermodell konnte unter der Behandlung mit PKF275-055 für beide Inflamationsparameter weder eine Veränderung der mRNA Expressionsrate in der Leber noch in der A. carotis festgestellt werden (Abbildung 30 und Abbildung 31). Für den DPP4-Inhibitor Sitagliptin werden hingegen in der Literatur anti-inflammatorische Effekte im Tiermodell beschrieben. Unter Sitagliptinbehandlung wurde eine Reduktion des TNF- α Serumspiegels [401] als auch eine verminderte Expression von TNF- α und IL-6 im Fettgewebe bei Wildtypmäusen mit Diät-induzierter Adipositas ermittelt [399]. Zudem belegen Matsubara *et al.* (2012) für Sitagliptin eine Suppression der Expression von IL-6, IL-1 β , TNF- α und MCP-1 in der Aorta von ApoE^{-/-} Mäusen [426]. Die Diskrepanz zwischen den in der Literatur aufgezeigten anti-inflammatorischen Effekten des Sitagliptin und der fehlenden Wirkung des PKF275-055 könnten auf die unterschiedlichen Substanzklassen als auch Tiermodelle zurückzuführen sein. Die unter GLP-1 Rezeptor-Agonisten *in vitro* beschriebenen anti-inflammatorischen Effekte [264-266, 427-428] müssen nicht zwingend beim Einsatz der Gliptine, begründet in deren Vielzahl an Substraten, zum Tragen kommen. So werden Chemokine, wie SDF-1 (stromal cell-derived factor-1) und RANTES durch die DPP4 inaktiviert beziehungsweise in antagonistische Metabolite konvertiert [136]. Eine Modulation inflammatorischer und immunologischer Prozesse unter Hemmung der DPP4-Aktivität geht demnach mit hoher Wahrscheinlichkeit über die Effekte des GLP-1 hinaus. Zum jetzigen Zeitpunkt fehlt eine ausreichende Datenlage, um die Effekte der DPP4-Inhibitoren auf Inflamationsparameter abschließend beurteilen zu können.

Die unter der Therapie des Vildagliptin-Analog PKF275-055 erzielte Verbesserung des Glukosemetabolismus war mit keiner signifikanten Reduktion in der Ausbildung atherosklerotischer Läsionen verbunden (Abbildung 29). Dieses Ergebnis steht in Kontrast zu den zwei kürzlich veröffentlichten Studien von Ta *et al.* (2011) und Matsubara *et al.* (2012), die eine Verminderung der Atherosklerose unter Gliptinbehandlung in ApoE^{-/-} Mäusen feststellten. Während Ta *et al.* (2011) nur unter gleichzeitiger Induktion eines Diabetes (Streptozotocin) diesen anti-atherogenen Effekt des Alogliptin nachweisen konnten, ermittelten Matsubara *et al.* (2012) unabhängig von einer diabetischen Stoffwechsellage eine Suppression atherosklerotischer Läsionen unter Sitagliptinbehandlung

DISKUSSION

[426, 429]. Auch an diesem Zusammenhang könnten die divergenten Ergebnisse auf die verschiedenen Gliptine und Mausmodelle zurückzuführen sein. In wieweit das LDL-Rezeptor^{-/-} Mäusmodell in diesem Zusammenhang einen wichtigen Einfluss haben könnte, wird nachfolgend näher erörtert.

Als Komponente des MetS stellt der Diabetes mellitus einen bedeutsamen kardiovaskulären Risikofaktor dar. Eine chronische Hyperglykämie geht mit der Bildung von AGEs einher, die über die Bindung an ihren Rezeptor RAGE (receptor of advanced glycosylation endproducts) entzündliche Prozesse der Gefäßwand induzieren und damit die Entstehung der Atherosklerose forcieren [88]. Die vorgestellte Studie lässt jedoch darauf schließen, dass die Diät-induzierte Hyperglykämie in LDL-Rezeptor^{-/-} Mäusen ein geringeres atherogenes Risikopotential birgt als die bestehende Hyperlipidämie. Diese Beobachtung wird durch andere Daten gestützt, die darauf verweisen, dass die Progression der Atherosklerose in diesem Mausmodell wesentlich durch die Serum-Cholesterinspiegel determiniert ist, ohne dass dieser Prozess durch Insulinresistenz und Hyperglykämie beeinflussbar erscheint [374, 390, 430-432]. Ebenso wurde klinisch gezeigt, dass eine intensivierete Therapie des T2D im Vergleich zur Standardtherapie über kurze bis mittelfristige Therapiezeiträume mit keiner Reduktion kardiovaskulärer Ereignisse assoziiert ist und demnach keinen oder lediglich einen geringen präventiven Effekt auf die Entstehung atherosklerotischer Läsionen zu haben scheint [433-434]. Dagegen vermindert eine langfristige intensivierete Therapie mit guter Blutzuckereinstellung das Myokardinfarktrisiko [435]. Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, dass die Langzeittherapie mit DPP4-Inhibitoren über eine Verbesserung des Glukosemetabolismus oder darüber hinaus vasoprotektiv wirksam ist. In einer Metaanalyse klinischer Studien zeichnete sich bereits ein vermindertes Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse unter der Therapie mit Gliptinen ab, jedoch mit fehlender statistischer Sicherheit [296]. Zur finalen Beurteilung der kardiovaskulären Wirkung und Sicherheit der DPP4-Inhibitoren bleiben die Ergebnisse prospektiver klinischer Studien mit Langzeit-Follow-up abzuwarten.

3.4 Limitationen der Studie

Die Limitationen des Versuches zur Untersuchung der Effekte einer DPP4-Inhibitor Behandlung auf die Risikofaktoren und das Ausmaß der Atherosklerose liegen in den

DISKUSSION

nachfolgenden Punkten. Es wurden keine Serumspiegel des aktiven GLP-1 und GIP erfasst. Von einer Messung der Inkretine wurde abgesehen, weil die Wirksamkeit des PKF275-055 direkt über die DPP4-Aktivität als auch indirekt über die Bestimmung der Nüchtern glukose sowie Glukostoleranz erfasst werden konnte. In der Literatur werden die Unterschiede in der Wirksamkeit der GLP-1 Rezeptor-Agonisten und der DPP4-Inhibitoren vielfach über den Unterschied in den erzielten Serumspiegeln und der sich daraus ergebenden Rezeptoraktivierung begründet [123]. Die im Vergleich zu den GLP-1 Rezeptor-Agonisten ausbleibenden Effekte auf den Lipidstoffwechsel und Inflammationsparameter könnte ebenso auf die Divergenz zwischen pharmakologischer und physiologischer Regulation zurückzuführen sein. Zudem wurde in der Studie lediglich einmalig das Nüchterninsulin für die Berechnung des HOMA-IR in den LDL-Rezeptor^{-/-} Mäusen erfasst. Die Bestimmung von basalen und postprandialen Insulin- sowie Glukagonspiegeln wurde nicht durchgeführt, da die Effekte der DPP4-Inhibitoren und der Inkretine auf die Gukosehomöostase bereits umfangreich untersucht und beschrieben wurden. Der Schwerpunkt der Studie lag in der Erfassung der Effekte des PKF275-055 auf Lipidmetabolismus, Inflammation und Atherosklerose, bei gleichzeitiger Testung der Glukosetoleranz zur Prüfung der anti-diabetischen Wirksamkeit des Gliptins.

4 EFFEKTE DES GLP-1 SYSTEMS

4.1 Klonierung und Expressionslevel

Zur AAV-vermittelten Überexpression des aktiven und metabolisierten GLP-1 erfolgte die Modifikation der Transgene in Anlehnung an die Klonierungsstrategie von Parsons *et al.* (2007) [343]. Die Sequenzen des GLP-1, kodierend für die Aminosäuren 7-37 und 9-37, wurden aus humaner Glukagon cDNA mittels PCR generiert. Gemäß anderen Studien mit Fragestellungen zu GLP-1 als Gentherapie im Tiermodell [343, 360-361, 436-438], wurde die zweite aktive Form des GLP-1 (7-37), welche die gleiche biologische Aktivität wie GLP-1 (7-36amid) aufweist [118, 147], ausgewählt. Zur Erzielung einer effizienten Sekretion wurden die Sequenzen des GLP-1 (7-37) und (9-37) mit der Signalsequenz der sekretierten alkalischen Phosphatase, welche die Einschleusung in den sekretorischen Pathway gewährleistet, fusioniert [343]. Posttranslational erfolgt die Abtrennung des Signalpeptid über ubiquitär vorkommende Signalpeptidasen, so dass die ersten beiden Aminosäuren des aktiven GLP-1 (7-37), die die essentielle GLP-1

DISKUSSION

Rezeptor-Bindungsdomäne darstellen [438], N-terminal freiliegend sind. *In vitro* wurde die Funktionalität der Klonierung und die Sekretion des GLP-1 durch eine Transfektion in HEK-293-Zellen geprüft und anhand guter Expressionslevel von 800 pM (Abbildung 17) im Medium bestätigt. Die Bedeutsamkeit des Signalpeptids verdeutlicht sich anhand der Studien von Lee *et al.* (2006 und 2008). Diese zeigen, dass eine Transfektion von HEK-293-Zellen mit aktiven GLP-1 Konstrukten ohne Signalsequenz in einem Expressionsniveau von 5-50 pM resultiert, während die Fusionierung mit einer Signalsequenz dieses auf 350 pM steigert [361, 438].

Die *in vivo* im Serum nachweisbaren Transgenspiegel sind das Ergebnis aus viraler Überexpression und der Signalpeptid-vermittelten Sekretion. Es wurden zum Teil Serumspiegel (Gesamt-GLP-1) erreicht, die die beim Menschen physiologisch vorkommenden übersteigen, aber dennoch unter den pharmakologisch erzielten Spiegeln von GLP-1 Rezeptor-Agonisten liegen [252, 439]. So wurden nach 20wöchiger AAV-vermittelter Transgen-Überexpression in den LDL-Rezeptor^{-/-} Mäusen signifikant erhöhte GLP-1 Serumspiegel von durchschnittlich 244 pM (7-37) und 409 pM (9-37) bis maximal 700 pM erzielt (Abbildung 32). Parsons *et al.* (2007) erlangten mittels adenoviralem Gentransfer nach sechs Wochen in verschiedenen Mausstämmen eine mittlere Überexpression des aktiven GLP-1 von 300 pM bis > 1000 pM [343]. Im Vergleich hierzu führt eine Therapie mit dem GLP-1 Rezeptor-Agonisten Liraglutide beim Menschen zu Serumspiegeln von 4000 pM bis 8000 pM [252, 439]. Entsprechend bewegt sich die hier erzielte Transgen-Überexpression in einem moderaten pharmakologischen Bereich. In den Wildtypmäusen (NASH-Tiermodell) wurden nach vier Wochen post-Vektorinjektion im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöhte GLP-1 Serumspiegel von durchschnittlich 27 pM (7-37) und 15 pM (9-37) ermittelt (Abbildung 19). Studien von Oh *et al.* (2003) und Lee *et al.* (2008) zeigen, dass bereits Serumkonzentrationen von 10-25 pM des aktiven GLP-1 im Tiermodell funktionell wirksam sind [361, 436]. Der deutliche Abfall der GLP-1 Serumspiegel nach Umstellung der Tiere auf MCD-Diät könnte auf einen hepatischen Sekretionsdefekt bei fortschreitender Steatohepatitis zurückzuführen sein. Für das Inflammationsmodell wurde der TBG-Promotor dem CMV-Promotor vorgezogen, um die lokale hepatische Dichte des GLP-1 (7-37) und (9-37) zu erhöhen. Die bestehenden Unterschiede im Expressionslevel zwischen beiden Tiermodellen sind erstens auf die unterschiedliche Stärke der verwendeten Promotoren, zweitens auf eine abweichende zeitliche Erfassung des Expressionslevels und drittens ver-

DISKUSSION

mutlich auf unterschiedliche Transduktionseffizienzen in Abhängigkeit vom Tierstamm zurückzuführen.

In beiden Tiermodellen wurden die Blutproben der GLP-1 (7-37)-Gruppe bei der Gewinnung mit dem DPP4-Inhibitor Diprotin A versetzt. Demnach kann davon ausgegangen werden, dass die ermittelten Gesamt-GLP-1 Spiegel in diesen Gruppen das aktive GLP-1 repräsentieren.

4.2 Expression des GLP-1 Rezeptors

In den LDL-Rezeptor^{-/-} Mäusen wurde die hepatische Expression des GLP-1 Rezeptors, die von anderen Autoren kontrovers diskutiert wird [440-441], nachgewiesen (Abbildung 40). Eine tendenzielle Runterregulation des Rezeptors unter Überexpression des aktiven GLP-1 war dabei zu verzeichnen. *In vitro* Studien haben gezeigt, dass infolge chronischer Exposition mit GLP-1 Rezeptor-Agonisten eine Desensitivierung des Rezeptors zu verzeichnen ist, die jedoch *in vivo* zu keiner Beeinträchtigung der glukoregulatorischen Funktion führt [442-443]. Zudem fanden Fehmann *et al.* (1996) in den β -Zellen eine GLP-1 induzierte konzentrations- und zeitabhängige Runterregulation der GLP-1 Rezeptor mRNA Spiegel [444]. Die Tatsache, dass der bekannte (pankreatische) GLP-1 Rezeptor eine 100fach geringere Affinität für das metabolisierte GLP-1 im Vergleich zum aktiven GLP-1 aufweist [142], lässt Vermutungen über das Bestehen eines weiteren bisher noch nicht identifizierten Rezeptors aufkommen [216, 219, 441]. Im weiteren Verlauf der Arbeit wird die Thematik der Rezeptorhypothese noch genauer im gesamten Zusammenhang der Ergebnisse diskutiert.

4.3 GLP-1 (7-37) hat keinen Effekt auf das Körpergewicht, während GLP-1 (9-37) eine Gewichtszunahme in Wildtypmäusen bewirkt

Die Überexpression des aktiven GLP-1 führte weder während einer 4wöchigen Normaldiät in den Wildtyp- als auch LDL-Rezeptor^{-/-} Mäusen noch unter der HFD induzierten Gewichtszunahme des LDL-Rezeptor-defizienten Stammes zu einer Modifikation des Körpergewichtes. Stattdessen wurde eine Gewichtszunahme durch die Überexpression des GLP-1 (9-37) in den Wildtypmäusen beobachtet, die sich jedoch im LDL-Rezeptor^{-/-} Modell unabhängig von der Diät nicht bestätigen ließ (Abbildung 20, Abbildung 33). Kli-

DISKUSSION

nische Studien zeigen eine Körpergewichtsreduktion bei Patienten mit T2D unter einer Behandlung mit GLP-1 Rezeptor-Agonisten, die aus einer verminderten Nahrungsaufnahme resultiert [268, 445]. In diabetischen Tiermodellen und solchen mit genetisch bedingter als auch Diät-induzierter Adipositas wird eine verminderte Gewichtszunahme infolge der Administration als auch Überexpression von GLP-1 Rezeptor-Agonisten bestätigt [204-205, 361, 446-447]. Einige wenige Studien können den Effekt der GLP-1 Rezeptor-Agonisten auf das Körpergewicht nicht reproduzieren [264, 405]. Der Speziesunterschied zwischen den zitierten diabetischen Tiermodellen und dem hier eingesetzten LDL-Rezeptor^{-/-} Modell mit Diät-induzierter Adipositas könnte das Fehlen einer Gewichtsreduktion unter GLP-1 (7-37) erklären. Daten zur Diskussion des Körpergewichtes unter dem Einfluss des metabolisierten GLP-1 liegen bisher nicht vor.

4.4 GLP-1 (7-37) verbessert die Glukosetoleranz in LDL-Rezeptor^{-/-} Mäusen

GLP-1 Rezeptor-Agonisten zeichnen sich in der Therapie des T2D durch eine Absenkung der Nüchtern- und postprandialen Blutglukosespiegel aus [192, 249]. In den LDL-Rezeptor^{-/-} Mäusen konnte mittels Überexpression des aktiven GLP-1 sowohl eine milde nicht statistisch gesicherte Reduktion der Nüchternglukose als auch eine signifikante Verbesserung der Glukosetoleranz gegenüber den Kontrolltieren erzielt werden. Die Gruppe mit überexprimiertem GLP-1 (9-37) wies im Vergleich zur GLP-1 (7-37)-Gruppe eine schlechtere Nüchternglukose und Glukosetoleranz auf. Jedoch sind beide Parameter zwischen der GLP-1 (9-37)-Gruppe und der Kontrollgruppe ohne statistisch gesicherten Unterschied (Abbildung 34, Abbildung 35 und Abbildung 37). Es ergab sich kein Anhalt für eine erhöhte Hypoglykämie-Gefahr infolge der kontinuierlichen GLP-1 (7-37) Produktion. Dies ist in Übereinstimmung mit dem geringen Hypoglykämie-Risiko der GLP-1 Rezeptor-Agonisten und gründet sich auf die Glukose-abhängige Wirkung des Inkretins. Eine langfristige Gabe von GLP-1 Rezeptor-Agonisten ist im Tiermodell als auch in klinischen Studien mit einer Verbesserung der Insulinsensitivität assoziiert [246, 404, 448]. Damit übereinstimmend konnte in der vorliegenden Arbeit im Muskelgewebe der GLP-1 (7-37) transfizierten Tiere eine verstärkte Aktivierung der Proteinkinase B nachgewiesen werden (Abbildung A 4). Diese lässt sich jedoch nicht in Leber und Fettgewebe bestätigen (Abbildung 38 und Abbildung A 4) und war mit keiner Verbesserung der Gesamtkörper-Insulinsensitivität, die anhand eines ITT erfasst wurde, assoziiert

DISKUSSION

(Abbildung 36). Entsprechend ist von einer überwiegend β -zellspezifischen Verbesserung des Glukosemetabolismus durch das aktive GLP-1 auszugehen. Die Überexpression des GLP-1 (9-37) führte zu einer moderaten, nicht signifikanten Verminderung der Insulinsensitivität im ITT (Abbildung 36). Es ließ sich zudem eine nicht signifikante Reduktion der Insulin-stimulierten Phosphorylierung der Proteinkinase B in der Leber der GLP-1 (9-37) transfizierten Tiere nachweisen (Abbildung 38). Eine Modifikation der Phosphorylierung der Proteinkinase B im Fettgewebe und in der Muskulatur konnte für diese Gruppe nicht festgestellt werden (Abbildung A 4). Die beim T2D vorliegende Insulinresistenz ist maßgeblich durch die Störung des Insulin-vermittelten zellulären Glukosetransportes gekennzeichnet. Als essentieller Bestandteil der Insulin-Signalkaskade ist die Aktivierung der Proteinkinase B in Muskulatur und Fettgewebe für den Glukosetransport notwendig [449-450]. Darüber hinausgehend ist deren Insulin-abhängige Aktivierung für die hepatische Glykogensynthese sowie die Hemmung der Glukoneogenese von Bedeutung [451-453].

Eine Induktion der Insulinresistenz durch das metabolisierte GLP-1 (9-37) deutet sich in dieser Arbeit an, ohne dass eine statistische Signifikanz erreicht wurde. In der Literatur wurde zunächst für das GLP-1 (9-36amid) eine schwache antagonistische Wirkung am GLP-1 Rezeptor beschrieben [142, 454]. Inwieweit die beobachtete tendenzielle Verschlechterung des Glukosemetabolismus durch das überexprimierte GLP-1 (9-37) über diesen Mechanismus vermittelt wird, bleibt an dieser Stelle unbeantwortet. Zunehmend häufen sich Daten, die dem metabolisierten GLP-1 eigenständige oder dem aktiven GLP-1 (7-37amid) vergleichbare Wirkungen zuschreiben, welche unabhängig vom bekannten GLP-1 Rezeptor über einen bisher nicht identifizierten Rezeptor vermittelt werden [183, 215-216, 219, 227, 230]. Zu den glukoregulatorischen Eigenschaften des metabolisierten GLP-1 wurden bisher widersprüchliche Ergebnisse publiziert. Verschiedene Autoren stellten durch die Gabe von GLP-1 (9-37amid) eine Insulin-unabhängige Senkung postprandialer Glukosespiegel sowie eine Inhibition der hepatischen Glukoneogenese bei Mensch und Schwein fest [183, 215-216]. In anderen Studien konnten diese Effekte beim Menschen trotz vergleichbar supraphysiologischer Spiegel (> 100 pM) an GLP-1 (9-36amid) nicht bestätigt werden [143-144]. Ebenso fehlt der Nachweis einer glukoregulatorischen Wirkung des metabolisierten Inkretin in Wildtyp-, GLP-1 Rezeptor-Knockout- und *ob/ob* Mäusen [217, 455].

DISKUSSION

Zum jetzigen Zeitpunkt steht die vollständige Charakterisierung der Funktion des GLP-1 (9-36amid und 9-37) auf den Glukosestoffwechsel im gesunden Organismus als auch unter einer diabetischen Stoffwechsellage noch aus. Zur Beantwortung der Frage, ob metabolisiertes GLP-1 eine Insulinresistenz induziert, könnte der Versuch mit gleicher Methodik (AAV) in db/db Mäusen wiederholt werden.

4.5 Aktives und metabolisiertes GLP-1 bewirken eine Diät-abhängige divergente Modulation des Lipidprofils

In Langzeitstudien (sechs Monate bis drei Jahre) erbrachte die Behandlung mit Exenatide eine Verbesserung der diabetischen Dyslipidämie, erfasst über die Erhöhung des HDL-C bei gleichzeitiger Verminderung der TG und des GC [256, 262-263]. Diese Effekte ließen sich in der vorliegenden Arbeit ausnahmslos im LDL-Rezeptor^{-/-} Mausmodell unter Normaldiät durch die AAV-vermittelte Überexpression des aktiven GLP-1 bestätigen. Im gleichen Maße wurde eine Reduktion des GC und der TG sowie eine ebenfalls tendenzielle Erhöhung des HDL-C unter GLP-1 (9-37) erzielt (Abbildung 39). Die Erhöhung der HDL-Cholesterinspiegel bestätigte sich weiterhin durch beide GLP-1 Varianten in den Wildtypmäusen auf Normaldiät (Abbildung 21). Die vergleichbare Wirkung des aktiven und metabolisierten GLP-1 auf das Lipidprofil unter Normaldiät lässt auf eine direkte Modulation, welche unabhängig vom GLP-1 Rezeptor und dem Glukosemetabolismus erfolgt, schließen. Während in klinischen Studien die durch GLP-1 Rezeptor-Agonisten induzierte Veränderung des Lipidprofils (Anstieg HDL-C, Reduktion TG) mit einer Körpergewichtsreduktion assoziiert ist [262], konnte die lipidmodulierende Wirkung in den dargestellten Versuchen unabhängig vom Körpergewicht nachgewiesen werden. Ebenso fanden Arakawa *et al.* (2010) und Irwin *et al.* (2009) im Tiermodell eine Gewichts-unabhängige HDL-C Erhöhung nach 1monatiger Gabe von GLP-1 Rezeptor-Agonisten [264, 405]. Erstaunlicherweise verlor sich in den Versuchen dieser Arbeit mit dem Diätwechsel auf MCD-Diät oder HFD die atheroprotektive Modulation des Lipidprofils durch GLP-1. Unter der MCD-Diät trat ein Abfall der Cholesterin- und Triglyzeridspiegel auf, welcher auf eine Störung der VLDL-Synthese zurückzuführen ist. Infolge dieser Extremsituation konnten keine Effekte des GLP-1 und somit keine Unterschiede mehr zwischen den Gruppen festgestellt werden. In ähnlicher Weise ließ sich trotz eines massiven Anstiegs des GC auf HFD kein Unterschied zwischen der

DISKUSSION

GLP-1 (7-37)-Gruppe und der Kontrollgruppe in den LDL-Rezeptor^{-/-} Mäusen mehr nachweisen. Stattdessen führte das metabolisierte GLP-1 in der HFD-Phase der LDL-Rezeptor^{-/-} Mäuse zu einem signifikanten und kontinuierlichen Anstieg des GC und damit der HDL-Spiegel. Die Ursache für diese paradoxe atherogene Wirkung des GLP-1 (9-37) ist zu diesem Zeitpunkt noch nicht geklärt, wird jedoch im Weiteren versucht herauszuarbeiten.

Der GLP-1 Rezeptor-Agonist Exendin-4 verhindert im Tiermodell mit genetisch bedingter oder Diät-induzierter Adipositas als auch im diabetischen Tiermodell die Entstehung einer hepatischen Steatose [159, 205, 446]. Diese Beobachtungen stehen im Gegensatz zu den erzielten Ergebnissen dieser Arbeit, bei der sich im LDL-Rezeptor^{-/-} Modell kein Unterschied im hepatischen Triglyzeridgehalt infolge der Überexpression der GLP-1 Varianten zeigen ließ. Hingegen wurde bei den Tieren mit Diät-induzierter NASH ein erhöhter Triglyzeridgehalt in der Leber unter GLP-1 (9-37) und mit fehlender statistischer Sicherheit auch unter GLP-1 (7-37) konstatiert. Der Gehalt an hepatischem Cholesterin wurde in beiden Modellen durch GLP-1 (7-37) tendenziell im Vergleich zur Kontrollgruppe und in den LDL-Rezeptor^{-/-} Mäusen signifikant im Vergleich zur GLP-1 (9-37)-Gruppe vermindert (Tabelle 31 und Tabelle 33). Aktuell liegen keine Vergleichsdaten zu den Effekten des GLP-1 Systems im Rahmen einer MCD-Diät-induzierten NASH vor. Lediglich Trevaskis *et al.* (2012) beschreiben die Wirkungen eines GLP-1 Rezeptor-Agonisten auf die Entstehung einer NASH in ob/ob-Mäusen auf HFD [456]. Jedoch ist ein Vergleich der Daten hinsichtlich Lipidstoffwechsel infolge der Diätbedingten Unterschiede (MCD versus HFD) in der Pathogenese der NASH nicht möglich.

Zur näheren Charakterisierung der Effekte beider GLP-1 Varianten im Lipidmetabolismus wurden die hepatischen mRNA Expressionsraten von im Folgenden diskutierten Genen untersucht.

In beiden Tiermodellen konnte keine Modifikation in der mRNA Expression der Fasn infolge der Transgenexpressionen festgestellt werden (Abbildung 22 und Abbildung 40). Ebenso zeigte in den Wildtypmäusen die Quantifizierung des Srebf-1, welcher als Transkriptionsfaktor maßgeblich die Fettsäuresynthese stimuliert [457], keine signifikanten Unterschiede (Abbildung 22). Das CD36, welches in Makrophagen die Aufnahme von oxLDL vermittelt [458], dient in der Leber sowohl der Aufnahme als auch dem Transport von langkettigen Fettsäuren [459]. Bei der Ausbildung einer hepatischen

DISKUSSION

Steatose übernimmt CD36, als LXR Zielgen, eine bedeutende Rolle [460-461]. In den LDL-Rezeptor^{-/-} Mäusen erzielte die Überexpression des aktiven GLP-1 eine signifikante Suppression des Fettsäuretransporters, die jedoch mit keiner Modifikation des Lebertriglyzeridgehaltes assoziiert war (Abbildung 40). Die beobachtete Erhöhung des hepatischen Triglyzeridgehaltes in den Wildtypmäusen lässt sich nicht über Modifikationen der Fasn oder CD36 noch LXR oder Srebf-1 erklären.

Bei den ausgewählten Genen der Cholesterinbiosynthese (Hmgcr, Lss, Sqle) wurde eine signifikante Erhöhung der HMG-CoA-Reduktase Expression durch aktives GLP-1 im Vergleich zu GLP-1 (9-37) konstatiert. Die Transgene führten zu keiner signifikanten Modifikation von Genen der hepatischen Cholesterinaufnahme und -speicherung, welche anhand der Expression der Lipoprotein-Rezeptoren Scarb-1 und Lrp1 sowie der Acat-2 ermittelt wurden. Das Lrp1 bindet ApoE-reiche Lipoprotein-Remnants. Darüber hinaus führt der Knockout des Proteins unabhängig vom Einfluss auf den Cholesterinspiegel zur Progression einer Atherosklerose [462]. Ein nicht signifikanter Abfall der mRNA Expressionsrate des Lrp1 zeigt sich unter beiden GLP-1 Varianten und könnte auf eine gestörte hepatische Aufnahme von Lipoprotein-Remnants deuten. Die ABC Transporter Abca-1 [463], Abcg-1 [464] und Abcg-5 [465] vermitteln die zelluläre Cholesterinexkretion. In der GLP-1 (7-37)-Gruppe wurde eine für das Abcg-1 nicht statistisch gesicherte und für das Abcg-5 eine signifikante Reduktion der mRNA Expressionsrate im Vergleich zur Kontrollgruppe quantifiziert (Abbildung 40).

Eine divergente Regulation der mRNA Expression im Sinne einer signifikanten Steigerung durch GLP-1 (7-37) und einer signifikanten Absenkung durch GLP-1 (9-37) wurde für Cyp7A1 beobachtet (Abbildung 40). Dieses Cytochrom P450 Enzym initiiert den ersten Schritt der Gallensäuresynthese und ist damit maßgeblich an der Cholesterinelimination beteiligt [466]. In Tiermodellen wurde belegt, dass eine Überexpression des Cyp7A1 sowohl in Wildtyp- als auch LDL-Rezeptor^{-/-} Mäusen vor einer Diät-induzierten Hypercholesterinämie sowie einer hepatischen Cholesterinakkumulation schützt [467-469] und vica versa der Knockout des Gens mit einer Hypercholesterinämie assoziiert ist [470]. In diesem Zusammenhang wurde im vorliegenden LDL-Rezeptor^{-/-} Modell weiterhin die mRNA Expressionrate des LXR, als bekannten positiven Regulator des Cyp7A1, und des Transkriptionsfaktors Srebf-2 quantifiziert und eine fehlende Regulation beider Gene unter den GLP-1 Varianten ermittelt. Ratliff *et al.* (2006) [469] beschreiben infolge der Cyp7A1 Überexpression in LDL-Rezeptor^{-/-} Mäusen ein ähnliches hepa-

DISKUSSION

tisches Expressionsprofil, wie es sich in der GLP-1 (7-37)-Gruppe mit Induktion der Cyp7A1 zeigt. Anhand der unveränderten oder signifikant erniedrigten mRNA Expression der Lipoprotein-Rezeptoren (Lrp, Scarb-1) und Cholesterintransporter (Abca-1, Abcg-1, Abcg-5) kann geschlossen werden, dass keine Erhöhung des hepatischen Cholesterin-Uptake noch der Cholesterinexkretion vorliegt. Jedoch lässt sich anhand der Induktion der Cyp7A1 eine vermehrte Gallensäuresynthese vermuten, die eine Erklärung für den tendenziell erniedrigten Cholesteringehalt der Leber in der GLP-1 (7-37)-Gruppe bieten könnte. Eine Regulation der Cyp7A1 durch die Transgene wurde in den Wildtypmäusen nicht konstatiert und ist demnach vermutlich an das Auftreten hoher Cholesterinspiegel oder ein erhöhtes Angebot an Nahrungscholesterin gebunden (Abbildung A 1). Das NPC1L1 ist maßgeblich an der Absorption des nutritiven als auch biliären Cholesterins beteiligt und zeigt eine hohe Expression im Jejunum [336, 471]. Eine statistisch gesicherte Modifikation der intestinalen Expression des NPC1L1 infolge der Transgenexpressionen wurde nicht nachgewiesen (Abbildung 40). Es besteht die Vermutung, dass die schwache Regulation der HMG-CoA-Reduktase im Zusammenhang zur Cyp7A1 steht. Als Schlüsselenzym der Cholesterinbiosynthese erfolgt eine kompensatorische Hochregulation der HMG-CoA-Reduktase bei reduziertem hepatischem Cholesteringehalt [467-468, 472]. Die erniedrigte Cyp7A1 mRNA Expression unter GLP-1 (9-37) geht gemäß den Literaturangaben mit einer Hypercholesterinämie einher, wohingegen die Induktion des Gens infolge der Überexpression des aktiven GLP-1 keine Hypocholesterinämie im Vergleich zur Kontrollgruppe aufweist.

An dieser Stelle sind weitere Untersuchungen erforderlich um die beobachteten kontroversen Effekte zu klären und in Zusammenhang zu bringen. Zudem liegen zum aktuellen Zeitpunkt keine Vergleichsdaten zur Wirkung des GLP-1 (9-37) auf den Lipidstoffwechsel vor. Folgende Fragen bleiben offen: Welche Mechanismen liegen dem auf Normaldiät erzielten günstigen Lipidmodifikationen zu Grunde? Worin liegen die Ursachen für den Shift im Lipidprofil nach Diätumstellung beziehungsweise welche Diätbestandteile sind hierfür im Sinne einer Umwelt-Gen-Interaktion verantwortlich? Gibt es dabei weitere divergente Regulationen zwischen GLP-1 (7-37) und (9-37), die eine Erklärung für die GLP-1 (9-37) induzierte Hypercholesterinämie auf HFD erklären? Zur Beantwortung der ersten Fragestellung bietet sich eine Wiederholung des Modells ohne Diätwechsel oder der Wechsel in das ApoE^{-/-} Mausmodell mit Gabe einer Normaldiät an. Es wäre dabei unter anderem zu prüfen, ob die Gewichts-unabhängige Induktion

DISKUSSION

des HDL-C auf eine erhöhte periphere Expression des Abca-1 zurückzuführen ist. Das Abca-1 vermittelt den Cholesterin-Efflux von Makrophagen auf ApoA-1 oder pre- β -HDL (naszierendes HDL) und wirkt damit als essentieller Bestandteil des rCT atheroprotektiv [473]. Nachfolgende Untersuchungen zur Klärung der zwei weiteren Fragen sollten die Bestimmung der Cholesterinsyntheserate und -exkretion sowie die Erfassung der Cholesterinfreisetzung und -Clearance beinhalten (*Lipid-Turnover*-Versuche).

4.6 Anti-inflammatorische Effekte des Exendin-4, GLP-1 (7-37) und GLP-1 (9-37)

Die Effekte des GLP-1 Systems auf Entzündungsparameter wurden in drei verschiedenen Modellen untersucht. In einem Vorversuch wurden BALB/c Mäuse über sieben Tage mit Exendin-4 behandelt. Die dabei eingesetzte tägliche Dosis von 12 nmol/kg ist vergleichbar mit den Studien von Park *et al.* (2007) und Arakawa *et al.* (2010), die eine Wirksamkeit auf Entzündungs- oder Adhäsionsmarker bei der täglichen Administration von 1 nmol/kg beziehungsweise 24 nmol/kg nachweisen konnten [264, 446]. Unabhängig von einer Modulation des Körpergewichtes zeigte sich nach Induktion eines akuten Inflammationsreizes eine durch Exendin-4 um 69 % verminderte mRNA Expression des TNF- α in den Leukozyten (Tabelle 29 und Abbildung 18). Hinsichtlich der mRNA Expression des IL-1 β und der Serumkonzentration des IL-6 konnte keine Verminderung nach Exendin-4 Administration konstatiert werden.

Anhand der im Vorversuch angedeuteten anti-inflammatorischen Wirkung des GLP-1 Rezeptor-Agonisten wurde die Hypothese, dass aktives GLP-1 das Ausmaß einer NASH über die Suppression entzündlicher Prozesse vermindert, aufgestellt und mittels AAV-vermittelter Transgenexpression geprüft. Parallel dazu wurde im gleichen Versuch das metabolisierte GLP-1 untersucht. Die Gabe der MCD-Diät geht mit einer verstärkten hepatischen Makrophagen-Infiltration und damit der erhöhten Expression an Zytokinen (IL-6, TGF-1 β , TNF- α) und Adhäsionsmolekülen (VCAM-1, ICAM-1, MCP-1) einher [351]. Die Überexpression des GLP-1 (7-37) als auch GLP-1 (9-37) zeigten bei unverändertem Lebergewicht und Transaminasespiegeln eine deutliche anti-inflammatorische Wirkung in der Leber (Tabelle 30, Tabelle 31 und Abbildung 23). Trotz des nachgewiesenen geringeren Entzündungszustandes in der Leber zeigte sich in beiden GLP-1-Gruppen keine anti-fibrotische Wirkung (Abbildung 24). Auch die mRNA Expression des

DISKUSSION

TGF-1 β in der Leber wurde lediglich tendenziell durch GLP-1 (9-37) vermindert (Abbildung 23). Als bedeutender Induktor der hepatischen Fibrose fördert TGF-1 β die Differenzierung von Kupfferschen Sternzellen in Myofibroblasten sowie die Expression von Inhibitoren der Matrix Metalloproteinasen (TIMPs) und fördert die Kollagensynthese [474]. Der beschriebene Versuch musste nach einer Dauer von vier Wochen (vier Wochen MCD-Diät) wegen des rapiden Gewichtsverlustes und der Verschlechterung des Allgemeinzustandes der Tiere beendet werden. Zur Ausbildung einer quantifizierbaren Fibrose ist eine MCD-Diätintervention von mindestens acht Wochen notwendig [475-476]. Daher vermutet die Verfasserin, dass eine längere Dauer des Versuches mit stärker induzierter Fibrogenese mit einer Modifikation dieser durch das GLP-1 System assoziiert sein könnte. Eine Wiederholung des gleichen Modells in Wildtypmäusen mit einem höheren Ausgangsgewicht würde sich zur Bestätigung der anti-inflammatorischen Wirkung und zur weiteren Untersuchung möglicher Effekte auf die Entstehung oder das Ausmaß einer Fibrose empfehlen.

Im Rahmen des Atherosklerosemodells wurden ebenfalls Inflammationsparameter unter dem Einfluss der AAV-vermittelten Überexpression von GLP-1 (7-37) und (9-37) untersucht. Die Gabe einer HFD diente dabei zur Provokation einer Adipositas, welche erwiesenermaßen mit einer systemischen Entzündung, die ihren Ursprung sowohl im Fettgewebe als auch in der Leber findet, assoziiert ist [477]. Infolge der Überexpression des aktiven GLP-1 zeigte sich sowohl in der Leber als auch in der A. carotis eine um mehr als 70 % signifikant gesenkte Expression des MCP-1. Für das metabolisierte GLP-1 ließ sich eine vergleichbare Verminderung der MCP-1 mRNA Expressionsrate in der Leber nachweisen. In der A. carotis wurde durch beide GLP-1 Varianten die Expression des TNF- α gleichermaßen um 68 % sowie 69 % gesenkt (Abbildung 41). Bereits in verschiedenen *in vitro* Studien konnten anti-inflammatorische Effekte des aktiven GLP-1 und der GLP-1 Rezeptor-Agonisten nachgewiesen werden [264-266, 427-428]. In primären Mausmakrophagen und einer humanen endothelialen Zelllinie erbrachten Arakawa *et al.* (2010) und Hattori *et al.* (2010) den Nachweis, dass GLP-1 Rezeptor-Agonisten die Aktivierung des NF- κ B-Signalweges supprimieren [264-265]. Weiterhin können vermutlich zellprotektive Wirkungen des GLP-1 Systems, die vor allem in pankreatischen Zellsystemen zu beobachten sind, auf entzündungshemmende Mechanismen zurückgeführt werden [478]. In wieweit die Vermittlung der anti-inflammatorischen Effekte in den verschiedenen Zellsystemen über den bekannten GLP-1 Re-

DISKUSSION

zeptor und den cAMP-abhängigen Signalweg vermittelt wird, ist noch Gegenstand aktueller Diskussionen [264-266]. Eine Modulation von Entzündungsprozessen durch das metabolisierte GLP-1 wurde bis heute noch nicht untersucht. Die hier nachgewiesene entzündungshemmende Wirkung des GLP-1 (9-37) lässt auf eine GLP-Rezeptor unabhängige Vermittlung schließen. Das Ziel nachfolgender Analysen sollte es sein, die zu Grunde liegenden Mechanismen und Signalwege aufzuklären.

4.7 GLP-1 (9-37) induziert Atherosklerose in LDL-Rezeptor^{-/-} Mäusen

Die Entstehung der Atherosklerose, die mit einem chronisch entzündlichen Zustand des Gefäßsystems einhergeht, wird maßgeblich durch die Komponenten des MetS (Adipositas, Diabetes und Dyslipidämie) begünstigt [82]. In der vorliegenden Arbeit wurde eine signifikant erhöhte Ausbildung atherosklerotischer Plaques sowohl in der Gesamtaorta als auch auf Herzklappenebene in den LDL-Rezeptor^{-/-} Mäusen infolge der Überexpression des GLP-1 (9-37) festgestellt. Es zeigte sich keine Modifikation im Ausmaß der Atherosklerose in der GLP-1 (7-37)-Gruppe (Abbildung 42, Abbildung 43 und Abbildung 44). Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu den Daten von Arakawa *et al.* (2010) und Nagashima *et al.* (2011), die eine atheroprotektive Wirkung des Exendin-4 sowie des GLP-1 (7-36amid) in ApoE^{-/-} Mäusen nachweisen konnten. Nagashima *et al.* (2011) untersuchten zudem im selben Mausmodell das GLP-1 (9-36amid), konnten jedoch keine Effekte des Peptides auf das Ausmaß der Atherosklerose feststellen. Mechanistisch erklären die Autoren beider Gruppen den atheroprotektiven Effekt des aktiven GLP-1 und Exendin-4 über eine verminderte endotheliale Monozytenadhäsion einhergehend mit einer reduzierten aortalen Expression von VCAM-1 und ICAM-1 sowie über eine Inhibition der Schaumzellenbildung [264, 479]. Eine Reduktion endothelialer Adhäsionsmoleküle wurde ebenfalls *in vitro* unter Behandlung mit Liraglutide und aktivem GLP-1 beschrieben [265, 480]. Die verminderte endotheliale Entzündungsreaktion könnte sowohl über eine direkte anti-inflammatorische Wirkung des GLP-1 als auch indirekt über einen verbesserten Glukosemetabolismus mit reduzierter Ausbildung an AGEs vermittelt worden sein.

Obgleich im erläuterten LDL-Rezeptor^{-/-} Modell ebenfalls eine verminderte vaskuläre Inflammation mit supprimierter TNF- α und MCP-1 Expression in den Carotiden und eine Verbesserung der Glukosetoleranz GLP-1 (7-37) transfizierter Tieren nachweisbar war,

DISKUSSION

erwies sich dies als nicht ausreichend effektiv um den Atheroskleroseprozess zu vermindern. Die im Gegensatz dazu nachweisbare vermehrte Atherosklerose unter metabolisiertem GLP-1 ist mit hoher Wahrscheinlichkeit auf das erhöhte GC in dieser Gruppe zurückzuführen, dass als wesentlicher Faktor die Plaquebildung in LDL-Rezeptor^{-/-} Mäusen determiniert (siehe auch Abschnitt IV3.3) [374, 390, 430-432]. Mechanistisch ließ sich desweiteren eine vermehrte mRNA Expression des Scavenger Rezeptors CD36 in der A. carotis der GLP-1 (9-37) transfizierten Tiere nachweisen (Abbildung 45). Das CD36 ist ein multifunktionelles Membranprotein welches auf mononukleären Phagozyten, Thrombozyten, Adipozyten, Myozyten, Endothelial- und Epithelzellen exprimiert wird. Als Scavenger Rezeptor ist das CD36 an der Aufnahme modifizierter Lipoproteine (oxLDL) beteiligt [481]. Entsprechend wurde *ex vivo* eine verminderte Schaumzellenbildung in Makrophagen von CD36^{-/-} Mäusen und zudem eine verminderte Ausbildung atherosklerotischer Plaques in CD36-ApoE-Doppelknock-out-Mäusen festgestellt [482]. Die Expression von CD36 wird durch die Exposition mit oxLDL über den Transkriptionsfaktor PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor gamma) gesteigert, was wiederum als sich-selbst-verstärkender Zyklus die Aufnahme von oxLDL begünstigt und die Schaumzellenbildung forciert [458, 481]. Die erhöhten Cholesterinspiegel in der GLP-1 (9-37)-Gruppe lassen auf einen hohen oxLDL Spiegel schließen, der über die nachgewiesene Induktion von CD36 die Schaumzellenbildung forciert und zu einer verstärkten Atherogenese beigetragen haben könnte. Erstaunlicherweise war trotz verstärkter Ausbildung atherosklerotischer Plaques eine moderate anti-inflammatorische Wirkung des GLP-1 (9-37) in der Gefäßwand nachweisbar, die jedoch in diesem Zusammenhang zu keiner Prävention der Atherosklerose geführt hat.

In wieweit sich diese Untersuchungen auf den Menschen übertragen lassen, ist zu diesem Zeitpunkt unklar. Es bleibt als Fragestellung offen, ob und in welchem Ausmaß eine Langzeittherapie mit aktivem GLP-1 oder GLP-1 Analoga über die anti-diabetischen und anti-inflammatorischen Wirkungen kombiniert mit oder isoliert von Modifikationen im Lipidmetabolismus zur Prävention atherosklerotischer Veränderungen beim Menschen beitragen kann.

4.8 GLP-1 (9-37) ist ein aktiver Metabolit des GLP-1 (7-37)

Anhand der vorgestellten Daten kann geschlussfolgert werden, dass das GLP-1 (9-37) dem GLP-1 (7-37) analoge und divergente Wirkungen besitzt und damit als aktiver Metabolit definiert werden kann. Bereits in anderen Studien wurde ein Nachweis von eigenständigen Funktionen des metabolisierten GLP-1 erbracht und auf das Bestehen weiterer Rezeptoren verwiesen [183, 216, 219, 227, 230, 483]. Dabei wurde unter anderem gezeigt, dass die protektiven kardiovaskulären Effekte des metabolisierten GLP-1 sich nur begrenzt durch Exendin (9-39) antagonisieren lassen [230] und auch in Abwesenheit des GLP-1 Rezeptors nachweisbar sind [219, 483]. Elahi *et al.* (2008) konnten eine durch GLP-1 (9-37amid) induzierte Hemmung der hepatischen Glukoneogenese ermitteln und gehen daher ebenfalls von einem unbekanntem GLP-1 Rezeptor in der Leber aus [216]. Für das Peptid YY (PYY), ebenfalls ein DPP4-Substrat, ist ein ähnlicher Mechanismus bekannt. Die biologischen Funktionen des PYY (1-36) und die des aktiven PYY-Metaboliten (PYY 3-36) werden über verschiedene Rezeptoren transduziert [216, 484].

Zur Diskussion der vorgestellten Daten wird eine Rezeptorhypothese in Anlehnung an die Ansätze von Elahi *et al.* (2008) aufgestellt. Elahi *et al.* (2008) vermuten, dass nach Induktion der pankreatischen Effekte durch das aktive GLP-1 infolge der rapiden DPP4-Spaltung alle extrapancreatischen Wirkungen über das metabolisierte GLP-1 an einem zweiten Rezeptor vermittelt werden [216]. Die Annahme eines weiteren Rezeptors wird in diesem Zusammenhang durch die geringe Affinität des GLP-1 Metaboliten am bekannten GLP-1 Rezeptor [142] sowie die dem GLP-1 Rezeptor verschiedenen Signaltransduktionswege in Fett-, Muskel- und Leberzellen gestützt [207, 209-214]. Weiterhin wird die Vermutung aufgestellt, dass Adipositas und Insulinresistenz die Expression oder über RAMP's (receptor activity modifying proteins) die Ligandenbindung des bekannten als auch unbekanntem GLP-1 Rezeptors beeinflussen könnten [216]. Eine Modifikation der Rezeptoraffinität für verschiedene Liganden durch RAMP's wird für den Calcitonin gene-related Peptide Rezeptor, welcher ebenfalls zur Familie der G-Proteingekoppelten Rezeptoren gehört, beschrieben [485]. Die Verfasserin der vorliegenden Arbeit stellt auf Grundlage der eigenen präsentierten Daten die Hypothese auf, dass die extrapancreatischen Effekte beider GLP-1 Varianten (Lipidmetabolismus, Inflammation) in den eingesetzten Tiermodellen über mindestens zwei Rezeptoren vermittelt werden. Über einen der angenommenen Rezeptoren, der sowohl in in der Leber als auch in der

DISKUSSION

A. carotis exprimiert wird und eine gleiche Bindungsaffinität für aktives und metabolisiertes GLP-1-unabhängig vom metabolischen Zustand aufweist, erfolgt die Transduktion der entzündungshemmenden Wirkung und die Verbesserung des Lipidprofils unter Normaldiät. Hsieh *et al.* (2010) zeigen, dass die Exendin-4 induzierte Reduktion postprandialer Triglyzerid-reicher Lipoproteine GLP-1 Rezeptor-abhängig vermittelt wird [415]. Die hier beobachtete identische Effektstärke beider GLP-1 Varianten auf die Serumlipide unter Normaldiät steht in Kontrast zur geringen Bindungsaffinität des Rezeptors für den GLP-1 Metaboliten, so dass von einer Beteiligung des bekannten GLP-1 Rezeptor in diesem Zusammenhang nicht ausgegangen wird. Es besteht nun die Annahme, dass mit der Gabe der Cholesterin- und Triglyzerid-reichen Diät oder aber mit der damit induzierten Adipositas sowie Insulinresistenz die Hochregulation eines zweiten Hormonrezeptors oder aber eine Modifikation dessen Ligandenbindung induziert wird. Würde dieser metabolisch regulierte hepatische Rezeptor eine Hypercholesterinämie vermitteln sowie eine alleinige Affinität zum metabolisierten GLP-1 aufweisen und dieses in der Gesamtheit binden, so könnte der divergente Lipidphänotyp nach Diätumstellung erklärt werden.

Die Annahme, dass alle extrapancreatischen Effekte des GLP-1 über dessen Metaboliten zum Tragen kommen, kann nicht uneingeschränkt gestützt werden. Lediglich die anti-inflammatorischen Wirkungen (TNF- α , MCP-1) könnten ausschließlich auf das kontinuierlich generierte GLP-1 (9-37) zurückzuführen sein. Im Lipidmetabolismus spricht die divergente Regulation hinsichtlich GC-Spiegel und hepatischer Cyp7A1 mRNA Expression gegen diese Annahme.

Die aufgestellte Hypothese ist ein Versuch die beobachteten extrapancreatischen Wirkungen des GLP-1 Systems zu erklären und soll nur einen Hinweis auf mögliche Ansätze für nachfolgende Untersuchungen in dieser komplexen Thematik geben.

4.9 Limitationen der Studie

Die Limitationen der Versuche zur Untersuchung der Effekte des aktiven und metabolisierten GLP-1 auf die Risikofaktoren und das Ausmaß der Atherosklerose liegen in den nachfolgenden Punkten. Es wurden ausschließlich die Spiegel des Gesamt-GLP-1 nach Überexpression beider Transgene erfasst und keine differenzierte Quantifizierung des aktiven und metabolisierten GLP-1 durchgeführt. Die glukoregulatorische

DISKUSSION

Wirksamkeit des GLP-1, erfasst über die verbesserte Glukosetoleranz im LDL-Rezeptor^{-/-} Mausmodell, wurde als hinreichend nachgewiesene Funktionalität erachtet. Weiterhin wurden im Atherosklerosemodell nach 20 Wochen konstant hohe Spiegel an GLP-1 erzielt, welche sowohl basale als auch postprandiale Konzentrationen beim gesunden Menschen übersteigen. Im Vergleich zu einmaligen therapeutischen Dosen des Liraglutide sind diese jedoch als moderate Erhöhung einzuschätzen.

V ZUSAMMENFASSUNG

Hintergrund: Das „metabolische Syndrom“ stellt einen Komplex aus den Risikofaktoren Adipositas, Dyslipoproteinämie, Hypertonie und gestörter Nüchtern glukose dar und ist mit einem zweifach erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen, der führenden Todesursache der industrialisierten Länder, assoziiert. Die durch die Risikofaktoren forcierte Atherosklerose und die nicht-alkoholische Steatohepatitis (NASH), die hepatische Manifestation des metabolischen Syndroms, verbindet ein progressiver chronisch-entzündlicher Krankheitsverlauf. In der vorliegenden Arbeit galt es, die Wirkungen des GLP-1 Systems auf den Lipidmetabolismus, die Atherosklerose und die Inflammation *in vivo* zu charakterisieren.

Methodik: Es wurden zwei komplementäre Atherosklerosemodelle mit LDL-Rezeptor^{-/-} Mäusen auf Hochfettdiät durchgeführt. Im ersten Modell erfolgte die Behandlung mit dem DPP4-Inhibitor PKF275-055 zur Stabilisierung der endogenen Inkretinspiegel. In einem zweiten Modell wurde aktives GLP-1 (7-37) und metabolisiertes GLP-1 (9-37) mittels Adeno-assoziiierter Viren (AAV) systemisch überexprimiert. Die Prüfung auf entzündungsmodulierende Effekte des GLP-1 Systems erfolgte in einem Diät-vermittelten Inflammationsmodell. Dabei wurde in Wildtypmäusen mit AAV-vermittelter hepatischer Überexpression des GLP-1 (7-37) und GLP-1 (9-37) über eine Methionin-Cholin-defiziente-Diät eine NASH induziert.

Ergebnisse: Die Intervention mit dem DPP4-Inhibitor PKF275-055 resultierte in einer Absenkung der Nüchtern glukose und Verbesserung der Glukosetoleranz, bei neutraler Wirkung auf Serumlipidspiegel, inflammatorische Parameter und Atherosklerose. Hingegen führte die Überexpression des GLP-1 (7-37) als auch des GLP-1 (9-37) unter Normaldiät zu einer Reduktion des Gesamtcholesterins und der Triglyzeride sowie der Erhöhung des HDL-Cholesterins im LDL-Rezeptor^{-/-} Mausmodell. Mit der Umstellung der Tiere auf eine Hochfettdiät ging diese atheroprotektive Modifikation des Lipidprofils verloren und das GLP-1 (9-37) führte zur Induktion einer Hypercholesterinämie. Während das aktive GLP-1 (7-37), einhergehend mit der Verbesserung der Glukosetoleranz, keinen Effekt auf die Atherosklerose hatte, wurde unter GLP-1 (9-37) eine verstärkte Ausbildung atherosklerotischer Plaques konstatiert. Trotz fehlender Prävention der Fibrose durch GLP-1 (7-37) oder GLP-1 (9-37) im NASH-Modell, ließen sich für beide

ZUSAMMENFASSUNG

Inkretinvarianten unabhängig vom Mausmodell anti-inflammatorische Wirkungen (hepatisch und endothelial) nachweisen.

Schlussfolgerung: Sowohl das aktive GLP-1 (7-37) als auch das metabolisierte GLP-1 (9-37) hat direkte Effekte auf die Inflammation und den Lipidstoffwechsel, die unabhängig von Körpergewicht und Glukosemetabolismus vermittelt werden. Beide Inkretinvarianten bewirken eine Diät-abhängige Modulation des Lipidprofils und sind in der Lage Entzündungsprozesse zu supprimieren. Eine Prävention der Atherosklerose durch das GLP-1 wurde nicht nachgewiesen. Die Ursachen für die fehlende atheroprotektive Lipidmodifikation des GLP-1 (7-37) unter Hochfettdiät und die gleichzeitig unter GLP-1 (9-37) induzierte Hypercholesterinämie und dadurch forcierte Atherosklerose gilt es in weiteren Studien herauszuarbeiten. Dabei wird die Abklärung über das Bestehen weiterer Inkretinrezeptoren zwingend notwendig sein. Inwieweit die erhobenen Daten bezüglich des metabolisierten GLP-1 auf den Menschen übertragbar sind und welche Relevanz dies bei der Weiterentwicklung der Inkretin-basierenden Therapien hat, gilt es zu prüfen.

VI LITERATURVERZEICHNIS

1. WHO. Obesity and Overweight. Fact sheet N311 2011; Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/index.html>.
2. Rocchini, A.P., Childhood Obesity and a Diabetes Epidemic. *New England Journal of Medicine*, 2002. 346(11): p. 854-855.
3. Hossain, P., B. Kavar, and M. El Nahas, Obesity and Diabetes in the Developing World -- A Growing Challenge. *N Engl J Med*, 2007. 356(3): p. 213-215.
4. WHO. Global Database on Body Mass Index. 2003; Available from: <http://apps.who.int/bmi/index.jsp>.
5. Hauner, H., Adipositas. *Medizinische Klinik*, 2009. 104(11): p. 851-866.
6. Hotamisligil, G.S., Inflammation and metabolic disorders. *Nature*, 2006. 444(7121): p. 860-867.
7. Tilg, H. and A.R. Moschen, Inflammatory mechanisms in the regulation of insulin resistance. *Mol Med*, 2008. 14(3-4): p. 222-31.
8. Reaven, G.M., Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes*, 1988. 37(12): p. 1595-1607.
9. Alberti, K.G.M.M., et al., Harmonizing the Metabolic Syndrome: A Joint Interim Statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation*, 2009. 120(16): p. 1640-1645.
10. Despres, J.-P. and I. Lemieux, Abdominal obesity and metabolic syndrome. *Nature*, 2006. 444(7121): p. 881-887.
11. Phillips, L. and J. Prins, The link between abdominal obesity and the metabolic syndrome. *Current Hypertension Reports*, 2008. 10(2): p. 156-164.
12. Ford, E.S., C. Li, and N. Sattar, Metabolic Syndrome and Incident Diabetes. *Diabetes Care*, 2008. 31(9): p. 1898-1904.
13. Mottillo, S., et al., The Metabolic Syndrome and Cardiovascular Risk: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Journal of the American College of Cardiology*, 2010. 56(14): p. 1113-1132.
14. Wajchenberg, B.L., Subcutaneous and Visceral Adipose Tissue: Their Relation to the Metabolic Syndrome. *Endocr Rev*, 2000. 21(6): p. 697-738.
15. Weisberg, S.P., et al., Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *The Journal of Clinical Investigation*, 2003. 112(12): p. 1796-1808.

LITERATURVERZEICHNIS

16. Xu, H., et al., Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *The Journal of Clinical Investigation*, 2003. 112(12): p. 1821-1830.
17. Wang, Z. and T. Nakayama, Inflammation, a link between obesity and cardiovascular disease. *Mediators Inflamm*, 2010. 2010: p. 535918.
18. Lemieux, I., et al., Elevated C-Reactive Protein : Another Component of the Atherothrombotic Profile of Abdominal Obesity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2001. 21(6): p. 961-967.
19. Kerner, W. and J. Brückel, Definition, Klassifikation und Diagnostik des Diabetes mellitus, in *Praxisempfehlungen der Deutschen Diabetes-Gesellschaft, Diabetologie und Stoffwechsel*. 2011.
20. IDF. *Diabetes Atlas*. 2011; Available from: <http://www.idf.org/diabetesatlas/5e/the-global-burden>.
21. Alberti, K.G. and P.Z. Zimmet, Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med*, 1998. 15(7): p. 539-53.
22. Gerich, J.E., Contributions of Insulin-Resistance and Insulin-Secretory Defects to the Pathogenesis of Type 2 Diabetes Mellitus. *Mayo Clinic Proceedings*, 2003. 78(4): p. 447-456.
23. Barnett, A.H., et al., Diabetes in identical twins. *Diabetologia*, 1981. 20(2): p. 87-93.
24. Sladek, R., et al., A genome-wide association study identifies novel risk loci for type 2 diabetes. *Nature*, 2007. 445(7130): p. 881-885.
25. Zeggini, E., et al., Replication of Genome-Wide Association Signals in UK Samples Reveals Risk Loci for Type 2 Diabetes. *Science*, 2007. 316(5829): p. 1336-1341.
26. Voight, B.F., et al., Twelve type 2 diabetes susceptibility loci identified through large-scale association analysis. *Nat Genet*, 2010. 42(7): p. 579-589.
27. Kerner, W., J. Brückel, and B. Böhm, Definition, Klassifikation und Diagnostik des Diabetes mellitus, in *Evidenzbasierte Leitlinie der Deutschen Diabetes-Gesellschaft (DDG)*. 2004.
28. DeFronzo, R.A., Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Med Clin North Am*, 2004. 88(4): p. 787-835, ix.
29. Kahn, S.E., The Importance of β -Cell Failure in the Development and Progression of Type 2 Diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*, 2001. 86(9): p. 4047-4058.

LITERATURVERZEICHNIS

30. Campbell, P.J., M.G. Carlson, and N. Nurjhan, Fat metabolism in human obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 1994. 266(4): p. E600-605.
31. Boden, G., Role of fatty acids in the pathogenesis of insulin resistance and NIDDM. *Diabetes*, 1997. 46(1): p. 3-10.
32. Roden, M., et al., Mechanism of free fatty acid-induced insulin resistance in humans. *The Journal of Clinical Investigation*, 1996. 97(12): p. 2859-2865.
33. Del Prato, S., Role of glucotoxicity and lipotoxicity in the pathophysiology of Type 2 diabetes mellitus and emerging treatment strategies. *Diabetic Medicine*, 2009. 26(12): p. 1185-1192.
34. Kahn, S.E., R.L. Hull, and K.M. Utzschneider, Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature*, 2006. 444(7121): p. 840-846.
35. Kido, Y., J. Nakae, and D. Accili, The Insulin Receptor and Its Cellular Targets. *J Clin Endocrinol Metab*, 2001. 86(3): p. 972-979.
36. White, M.F., IRS proteins and the common path to diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2002. 283(3): p. E413-422.
37. Hotamisligil, G.S., et al., IRS-1-Mediated Inhibition of Insulin Receptor Tyrosine Kinase Activity in TNF-alpha- and Obesity-Induced Insulin Resistance. *Science*, 1996. 271(5249): p. 665-670.
38. Paz, K., et al., A Molecular Basis for Insulin Resistance. *Journal of Biological Chemistry*, 1997. 272(47): p. 29911-29918.
39. Aguirre, V., et al., The c-Jun NH2-terminal Kinase Promotes Insulin Resistance during Association with Insulin Receptor Substrate-1 and Phosphorylation of Ser307. *Journal of Biological Chemistry*, 2000. 275(12): p. 9047-9054.
40. Giani, G., et al., Epidemiologie und Verlauf des Diabetes mellitus in Deutschland, in Evidenzbasierte Leitlinie der Deutschen Diabetes-Gesellschaft (DDG). 2004.
41. Matthaei, S., et al., Behandlung des Diabetes mellitus Typ 2, in Praxisempfehlungen der Deutschen Diabetes-Gesellschaft, Diabetologie und Stoffwechsel. 2011.
42. Taskinen, M.R., Diabetic dyslipidaemia: from basic research to clinical practice*. *Diabetologia*, 2003. 46(6): p. 733-749.
43. Kontush, A. and M. Chapman, Why is HDL functionally deficient in type 2 diabetes? *Current Diabetes Reports*, 2008. 8(1): p. 51-59.
44. Parhofer, K.G., Pathophysiology of diabetic dyslipidemia: implications for atherogenesis and treatment. *Clinical Lipidology*, 2011. 6(4): p. 401-411.
45. Schwandt, P. and K.G. Parhofer, Handbuch der Fettstoffwechselstörungen. Dyslipoproteinämien und Atherosklerose: Diagnostik, Therapie und Prävention. Vol. 3. 2007, Stuttgart: Schattauer. p.1-65.

LITERATURVERZEICHNIS

46. Gordon, D.A. and H. Jamil, Progress towards understanding the role of microsomal triglyceride transfer protein in apolipoprotein-B lipoprotein assembly. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 2000. 1486(1): p. 72-83.
47. Goldstein, J.L. and M.S. Brown, Progress in understanding the LDL receptor and HMG-CoA reductase, two membrane proteins that regulate the plasma cholesterol. *Journal of Lipid Research*, 1984. 25(13): p. 1450-1461.
48. Goldstein, J.L., et al., Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1979. 76(1): p. 333-7.
49. Berliner, J.A., et al., Atherosclerosis: Basic Mechanisms : Oxidation, Inflammation, and Genetics. *Circulation*, 1995. 91(9): p. 2488-2496.
50. Fielding, C.J. and P.E. Fielding, Molecular physiology of reverse cholesterol transport. *Journal of Lipid Research*, 1995. 36(2): p. 211-228.
51. Ohashi, R., et al., Reverse cholesterol transport and cholesterol efflux in atherosclerosis. *QJM*, 2005. 98(12): p. 845-856.
52. Sattler, W., J. Christison, and R. Stocker, Cholesterylester hydroperoxide reducing activity associated with isolated high- and low-density lipoproteins. *Free Radical Biology and Medicine*, 1995. 18(3): p. 421-429.
53. Garner, B., et al., Oxidation of High Density Lipoproteins. *Journal of Biological Chemistry*, 1998. 273(11): p. 6088-6095.
54. Nofer, J.-R., et al., Suppression of Endothelial Cell Apoptosis by High Density Lipoproteins (HDL) and HDL-associated Lysosphingolipids. *Journal of Biological Chemistry*, 2001. 276(37): p. 34480-34485.
55. Wadham, C., et al., High-Density Lipoproteins Neutralize C-Reactive Protein Proinflammatory Activity. *Circulation*, 2004: p. 01.CIR.0000127419.45975.26.
56. Ginsberg, H.N., Insulin resistance and cardiovascular disease. *The Journal of Clinical Investigation*, 2000. 106(4): p. 453-458.
57. Lewis, G.F., Fatty acid regulation of very low density lipoprotein production. *Curr Opin Lipidol*, 1997. 8(3): p. 146-53.
58. Taghibiglou, C., et al., Mechanisms of Hepatic Very Low Density Lipoprotein Overproduction in Insulin Resistance. *Journal of Biological Chemistry*, 2000. 275(12): p. 8416-8425.
59. Duez, H., et al., Both Intestinal and Hepatic Lipoprotein Production Are Stimulated by an Acute Elevation of Plasma Free Fatty Acids in Humans. *Circulation*, 2008. 117(18): p. 2369-2376.
60. Kuriyama, H., et al., Enhanced expression of hepatic acyl-coenzyme A synthetase and microsomal triglyceride transfer protein messenger RNAs in the

LITERATURVERZEICHNIS

- obese and hypertriglyceridemic rat with visceral fat accumulation. *Hepatology*, 1998. 27(2): p. 557-562.
61. Bartels, E.D., M. Lauritsen, and L.B. Nielsen, Hepatic Expression of Microsomal Triglyceride Transfer Protein and In Vivo Secretion of Triglyceride-Rich Lipoproteins Are Increased in Obese Diabetic Mice. *Diabetes*, 2002. 51(4): p. 1233-1239.
 62. Lin, M.C., D. Gordon, and J.R. Wetterau, Microsomal triglyceride transfer protein (MTP) regulation in HepG2 cells: insulin negatively regulates MTP gene expression. *Journal of Lipid Research*, 1995. 36(5): p. 1073-1081.
 63. Chirieac, D.V., et al., Glucose-stimulated insulin secretion suppresses hepatic triglyceride-rich lipoprotein and apoB production. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2000. 279(5): p. E1003-1011.
 64. Pietzsch, J., et al., In vivo evidence for increased apolipoprotein A-I catabolism in subjects with impaired glucose tolerance. *Diabetes*, 1998. 47(12): p. 1928-1934.
 65. Lamarche, B., et al., Triglyceride enrichment of HDL enhances in vivo metabolic clearance of HDL apo A-I in healthy men. *The Journal of Clinical Investigation*, 1999. 103(8): p. 1191-1199.
 66. Rashid, S., et al., Lipolytically Modified Triglyceride-Enriched HDLs Are Rapidly Cleared From the Circulation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2002. 22(3): p. 483-487.
 67. Syvanne, M., et al., Cholesterol efflux from Fu5AH hepatoma cells induced by plasma of subjects with or without coronary artery disease and non-insulin-dependent diabetes: importance of LpA-I:A-II particles and phospholipid transfer protein. *Atherosclerosis*, 1996. 127(2): p. 245-53.
 68. Brites, F.D., et al., Abnormal capacity to induce cholesterol efflux and a new LpA-I pre-[beta] particle in type 2 diabetic patients. *Clinica Chimica Acta*, 1999. 279(1-2): p. 1-14.
 69. Nobecourt, E., et al., Defective antioxidative activity of small dense HDL3 particles in type 2 diabetes: relationship to elevated oxidative stress and hyperglycaemia. *Diabetologia*, 2005. 48(3): p. 529-38.
 70. de Graaf, J., et al., Enhanced susceptibility to in vitro oxidation of the dense low density lipoprotein subfraction in healthy subjects. *Arterioscler Thromb*, 1991. 11(2): p. 298-306.
 71. Tribble, D.L., et al., Variations in oxidative susceptibility among six low density lipoprotein subfractions of differing density and particle size. *Atherosclerosis*, 1992. 93(3): p. 189-99.
 72. Chapman, M.J., M. Guerin, and E. Bruckert, Atherogenic, dense low-density lipoproteins. Pathophysiology and new therapeutic approaches. *Eur Heart J*, 1998. 19 Suppl A: p. A24-30.

LITERATURVERZEICHNIS

73. Sanyal, A.J., AGA technical review on nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology*, 2002. 123(5): p. 1705-1725.
74. Anstee, Q.M. and R.D. Goldin, Mouse models in non-alcoholic fatty liver disease and steatohepatitis research. *International Journal of Experimental Pathology*, 2006. 87(1): p. 1-16.
75. Varela-Rey, M., et al., Non-alcoholic steatohepatitis and animal models: Understanding the human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2009. 41(5): p. 969-976.
76. Fan, J.G. and L. Qiao, Commonly used animal models of non-alcoholic steatohepatitis. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2009. 8(3): p. 233-40.
77. Ismail, M.H., Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Type 2 Diabetes Mellitus: The Hidden Epidemic. *The American Journal of the Medical Sciences*, 2011. 341(6): p. 485-492 10.1097/MAJ.0b013e3182018598.
78. Day, C.P. and O.F.W. James, Steatohepatitis: A tale of two "hits"? *Gastroenterology*, 1998. 114(4): p. 842-845.
79. Crespo, J., et al., Gene expression of tumor necrosis factor α and TNF-receptors, p55 and p75, in nonalcoholic steatohepatitis patients. *Hepatology*, 2001. 34(6): p. 1158-1163.
80. Ross, R., Atherosclerosis — An Inflammatory Disease. *New England Journal of Medicine*, 1999. 340(2): p. 115-126.
81. Braunwald, E., Cardiovascular Medicine at the Turn of the Millennium: Triumphs, Concerns, and Opportunities. *New England Journal of Medicine*, 1997. 337(19): p. 1360-1369.
82. Lusis, A.J., Atherosclerosis. *Nature*, 2000. 407(6801): p. 233-241.
83. WHO. Cardiovascular diseases (CVDs). Fact Sheet N317 2011; Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/index.html>.
84. Miller, Y.I., et al., Oxidized low density lipoprotein and innate immune receptors. *Current Opinion in Lipidology*, 2003. 14(5): p. 437-445.
85. Cushing, S.D., et al., Minimally modified low density lipoprotein induces monocyte chemotactic protein 1 in human endothelial cells and smooth muscle cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1990. 87(13): p. 5134-5138.
86. Rajavashisth, T.B., et al., Induction of endothelial cell expression of granulocyte and macrophage colony-stimulating factors by modified low-density lipoproteins. *Nature*, 1990. 344(6263): p. 254-7.
87. Hofmann, M.A., et al., RAGE mediates a novel proinflammatory axis: a central cell surface receptor for S100/calgranulin polypeptides. *Cell*, 1999. 97(7): p. 889-901.

LITERATURVERZEICHNIS

88. Yan, S.-F., et al., RAGE and its ligands: a lasting memory in diabetic complications? *Diabetes and Vascular Disease Research*, 2004. 1(1): p. 10-20.
89. Collins, R.G., et al., P-Selectin or Intercellular Adhesion Molecule (Icam)-1 Deficiency Substantially Protects against Atherosclerosis in Apolipoprotein E-Deficient Mice. *The Journal of Experimental Medicine*, 2000. 191(1): p. 189-194.
90. Suzuki, H., et al., A role for macrophage scavenger receptors in atherosclerosis and susceptibility to infection. *Nature*, 1997. 386(6622): p. 292-296.
91. Hansson, G.K., Inflammation, Atherosclerosis, and Coronary Artery Disease. *New England Journal of Medicine*, 2005. 352(16): p. 1685-1695.
92. Libby, P., Inflammation and cardiovascular disease mechanisms. *Am J Clin Nutr*, 2006. 83(2): p. 456S-460.
93. Packard, R.R.S. and P. Libby, Inflammation in Atherosclerosis: From Vascular Biology to Biomarker Discovery and Risk Prediction. *Clin Chem*, 2008. 54(1): p. 24-38.
94. Creutzfeldt, W., The incretin concept today. *Diabetologia*, 1979. 16(2): p. 75-85.
95. Bayliss, W.M. and E.H. Starling, The mechanism of pancreatic secretion. *The Journal of physiology*, 1902. 28(5): p. 325-53.
96. Moore, B., On the treatment of Diabetes mellitus by acid extract of Duodenal Mucous Membrane. *Biochem J*, 1906. 1(1): p. 28-38.
97. Unger, R.H. and A.M. Eisentraut, Entero-Insular Axis. *Arch Intern Med*, 1969. 123(3): p. 261-266.
98. Perley, M.J. and D.M. Kipnis, Plasma Insulin Responses to Oral and Intravenous Glucose: Studies in Normal and Diabetic Subjects*. *The Journal of Clinical Investigation*, 1967. 46(12): p. 1954-1962.
99. Nauck, M., et al., Reduced incretin effect in Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes. *Diabetologia*, 1986. 29(1): p. 46-52.
100. Creutzfeldt, W. and R. Ebert, New developments in the incretin concept. *Diabetologia*, 1985. 28(8): p. 565-573.
101. Nauck, M.A., et al., Incretin Effects of Increasing Glucose Loads in Man Calculated from Venous Insulin and C-Peptide Responses. *J Clin Endocrinol Metab*, 1986. 63(2): p. 492-498.
102. Baggio, L.L. and D.J. Drucker, Biology of Incretins: GLP-1 and GIP. *Gastroenterology*, 2007. 132(6): p. 2131-2157.
103. Kreymann, B., et al., Glucagon-like peptide-1 7-36: a physiological incretin in man. *Lancet*, 1987. 2(8571): p. 1300-4.

LITERATURVERZEICHNIS

104. Nauck, M., et al., Insulinotropic Properties of Synthetic Human Gastric Inhibitory Polypeptide in Man: Interactions with Glucose, Phenylalanine, and Cholecystokinin-8. *J Clin Endocrinol Metab*, 1989. 69(3): p. 654-662.
105. Neumiller, J.J., Differential chemistry (structure), mechanism of action, and pharmacology of GLP-1 receptor agonists and DPP-4 inhibitors. *J Am Pharm Assoc (2003)*, 2009. 49 Suppl 1: p. S16-29.
106. Bell, G.I., R.F. Santerre, and G.T. Mullenbach, Hamster proglucagon contains the sequence of glucagon and two related peptides. *Nature*, 1983. 302(5910): p. 716-718.
107. Bell, G.I., et al., Exon duplication and divergence in the human proglucagon gene. *Nature*, 1983. 304(5924): p. 368-371.
108. Bell, G.I., The glucagon superfamily: precursor structure and gene organization. *Peptides*, 1986. 7 Suppl 1: p. 27-36.
109. Mojsov, S., et al., Proglucagon gene expression in pancreas and intestine diversifies at the level of post-translational processing. *Journal of Biological Chemistry*, 1986. 261(25): p. 11880-11889.
110. Orskov, C., et al., Glucagon-Like Peptides GLP-1 and GLP-2, Predicted Products of the Glucagon Gene, Are Secreted Separately from Pig Small Intestine but Not Pancreas. *Endocrinology*, 1986. 119(4): p. 1467-1475.
111. Larsen, P.J., et al., Distribution of glucagon-like peptide-1 and other proglucagon-derived peptides in the rat hypothalamus and brainstem. *Neuroscience*, 1997. 77(1): p. 257-270.
112. Holst, J.J., The Physiology of Glucagon-like Peptide 1. *Physiol. Rev.*, 2007. 87(4): p. 1409-1439.
113. Furuta, M., et al., Defective prohormone processing and altered pancreatic islet morphology in mice lacking active SPC2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. 94(13): p. 6646-51.
114. Rouille, Y., et al., Role of the prohormone convertase PC2 in the processing of proglucagon to glucagon. *FEBS Letters*, 1997. 413(1): p. 119-123.
115. Drucker, D.J., Biologic actions and therapeutic potential of the proglucagon-derived peptides. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*, 2005. 1(1): p. 22-31.
116. Ugleholdt, R., et al., Impaired Intestinal Proglucagon Processing in Mice Lacking Prohormone Convertase 1. *Endocrinology*, 2004. 145(3): p. 1349-1355.
117. Orskov, C., et al., Complete sequences of glucagon-like peptide-1 from human and pig small intestine. *Journal of Biological Chemistry*, 1989. 264(22): p. 12826-12829.

LITERATURVERZEICHNIS

118. Orskov, C., A. Wettergren, and J.J. Holst, Biological effects and metabolic rates of glucagonlike peptide-1 7-36 amide and glucagonlike peptide-1 7-37 in healthy subjects are indistinguishable. *Diabetes*, 1993. 42(5): p. 658-661.
119. Orskov, C., et al., Tissue and plasma concentrations of amidated and glycine-extended glucagon-like peptide I in humans. *Diabetes*, 1994. 43(4): p. 535-539.
120. Kieffer, T.J. and J. Francis Habener, The Glucagon-Like Peptides. *Endocr Rev*, 1999. 20(6): p. 876-913.
121. Göke, B., et al., Das Inkretinhormon GLP-1: Eine therapeutische Option bei Typ-2-Diabetes? *Pharmazie in unserer Zeit*, 2002. 31(3): p. 294-299.
122. Wideman, R.D. and T.J. Kieffer, Mining incretin hormone pathways for novel therapies. *Trends Endocrinol Metab*, 2009. 20(6): p. 280-6.
123. Drucker, D.J. and M.A. Nauck, The incretin system: glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes. *The Lancet*, 2006. 368(9548): p. 1696-1705.
124. Elliott, R.M., et al., Glucagon-like peptide-1(7-36)amide and glucose-dependent insulinotropic polypeptide secretion in response to nutrient ingestion in man: acute post-prandial and 24-h secretion patterns. *J Endocrinol*, 1993. 138(1): p. 159-166.
125. Herrmann, C., et al., Glucagon-like peptide-1 and glucose-dependent insulin-releasing polypeptide plasma levels in response to nutrients. *Digestion*, 1995. 56(2): p. 117-26.
126. Rocca, A.S. and P.L. Brubaker, Role of the Vagus Nerve in Mediating Proximal Nutrient-Induced Glucagon-Like Peptide-1 Secretion. *Endocrinology*, 1999. 140(4): p. 1687-1694.
127. Hansen, L., et al., Neural regulation of glucagon-like peptide-1 secretion in pigs. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2004. 287(5): p. E939-947.
128. Eissele, R., et al., Glucagon-like peptide-1 cells in the gastrointestinal tract and pancreas of rat, pig and man. *Eur J Clin Invest*, 1992. 22(4): p. 283-91.
129. Brubaker, P.L., Regulation of Intestinal Proglucagon- Derived Peptide Secretion by Intestinal Regulatory Peptides. *Endocrinology*, 1991. 128(6): p. 3175-3182.
130. Damholt, A.B., A.M.J. Buchan, and H. Kofod, Glucagon-Like-Peptide-1 Secretion from Canine L-Cells Is Increased by Glucose-Dependent-Insulinotropic Peptide but Unaffected by Glucose. *Endocrinology*, 1998. 139(4): p. 2085-2091.
131. Roberge, J. and P. Brubaker, Regulation of intestinal proglucagon-derived peptide secretion by glucose-dependent insulinotropic peptide in a novel enteroendocrine loop. *Endocrinology*, 1993. 133(1): p. 233-240.
132. Nauck, M.A., et al., Additive insulinotropic effects of exogenous synthetic human gastric inhibitory polypeptide and glucagon-like peptide-1-(7-36) amide infused at

LITERATURVERZEICHNIS

- near-physiological insulinotropic hormone and glucose concentrations. *J Clin Endocrinol Metab*, 1993. 76(4): p. 912-7.
133. Fieseler, P., et al., Physiological augmentation of amino acid-induced insulin secretion by GIP and GLP-I but not by CCK-8. *American Journal of Physiology - Endocrinology And Metabolism*, 1995. 268(5): p. E949-E955.
 134. Deacon, C.F., et al., Glucagon-like peptide 1 undergoes differential tissue-specific metabolism in the anesthetized pig. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 1996. 271(3): p. E458-464.
 135. Vilsboll, T., et al., Similar Elimination Rates of Glucagon-Like Peptide-1 in Obese Type 2 Diabetic Patients and Healthy Subjects. *J Clin Endocrinol Metab*, 2003. 88(1): p. 220-224.
 136. Mentlein, R., Dipeptidyl-peptidase IV (CD26)-role in the inactivation of regulatory peptides. *Regulatory Peptides*, 1999. 85(1): p. 9-24.
 137. Mentlein, R., B. Gallwitz, and W.E. Schmidt, Dipeptidyl-peptidase IV hydrolyses gastric inhibitory polypeptide, glucagon-like peptide-1(7-36)amide, peptide histidine methionine and is responsible for their degradation in human serum. *European Journal of Biochemistry*, 1993. 214(3): p. 829-835.
 138. Deacon, C.F., et al., Both subcutaneously and intravenously administered glucagon-like peptide I are rapidly degraded from the NH₂-terminus in type II diabetic patients and in healthy subjects. *Diabetes*, 1995. 44(9): p. 1126-1131.
 139. Deacon, C., A. Johnsen, and J. Holst, Degradation of glucagon-like peptide-1 by human plasma in vitro yields an N-terminally truncated peptide that is a major endogenous metabolite in vivo. *J Clin Endocrinol Metab*, 1995. 80(3): p. 952-957.
 140. Hansen, L., et al., Glucagon-Like Peptide-1-(7-36)Amide Is Transformed to Glucagon-Like Peptide-1-(9-36)Amide by Dipeptidyl Peptidase IV in the Capillaries Supplying the L Cells of the Porcine Intestine. *Endocrinology*, 1999. 140(11): p. 5356-5363.
 141. Hupe-Sodmann, K., et al., Endoproteolysis of Glucagon-like Peptide (GLP)-1(7-36) amide by Ectopeptidases in RINm5F Cells. *Peptides*, 1997. 18(5): p. 625-632.
 142. Knudsen, L.B. and L. Pridal, Glucagon-like peptide-1-(9-36) amide is a major metabolite of glucagon-like peptide-1-(7-36) amide after in vivo administration to dogs, and it acts as an antagonist on the pancreatic receptor. *European Journal of Pharmacology*, 1996. 318(2-3): p. 429-435.
 143. Vahl, T.P., et al., Effects of GLP-1-(7-36)NH₂, GLP-1-(7-37), and GLP-1-(9-36)NH₂ on Intravenous Glucose Tolerance and Glucose-Induced Insulin Secretion in Healthy Humans. *J Clin Endocrinol Metab*, 2003. 88(4): p. 1772-1779.

LITERATURVERZEICHNIS

144. Zander, M., et al., The metabolite generated by dipeptidyl-peptidase 4 metabolism of glucagon-like peptide-1 has no influence on plasma glucose levels in patients with type 2 diabetes. *Diabetologia*, 2006. 49(2): p. 369-74.
145. Meier, J.J., et al., Secretion, Degradation, and Elimination of Glucagon-Like Peptide 1 and Gastric Inhibitory Polypeptide in Patients with Chronic Renal Insufficiency and Healthy Control Subjects. *Diabetes*, 2004. 53(3): p. 654-662.
146. Schmidt, W.E., E.G. Siegel, and W. Creutzfeldt, Glucagon-like peptide-1 but not glucagon-like peptide-2 stimulates insulin release from isolated rat pancreatic islets. *Diabetologia*, 1985. 28(9): p. 704-7.
147. Suzuki, S., et al., Comparison of the Effects of Various C-Terminal and N-Terminal Fragment Peptides of Glucagon-Like Peptide-1 on Insulin and Glucagon Release from the Isolated Perfused Rat Pancreas. *Endocrinology*, 1989. 125(6): p. 3109-3114.
148. Clark, S.A., B.L. Burnham, and W.L. Chick, Modulation of Glucose-Induced Insulin Secretion from a Rat Clonal β -Cell Line. *Endocrinology*, 1990. 127(6): p. 2779-2788.
149. Göke, R., et al., Glucose-dependency of the insulin stimulatory effect of glucagon-like peptide-1 (7-36) amide on the rat pancreas. *Res Exp Med (Berl)*, 1993. 193(2): p. 97-103.
150. Thorens, B., Expression cloning of the pancreatic beta cell receptor for the glucagon-like peptide 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1992. 89(18): p. 8641-8645.
151. Göke, R. and J.M. Conlon, Receptors for glucagon-like peptide-1(7-36) amide on rat insulinoma-derived cells. *J Endocrinol*, 1988. 116(3): p. 357-62.
152. Fehmman, H.C. and J.F. Habener, Functional receptors for the insulinotropic hormone glucagon-like peptide-I(7-37) on a somatostatin secreting cell line. *FEBS Letters*, 1991. 279(2): p. 335-340.
153. Heller, R.S., T.J. Kieffer, and J.F. Habener, Insulinotropic glucagon-like peptide I receptor expression in glucagon-producing alpha-cells of the rat endocrine pancreas. *Diabetes*, 1997. 46(5): p. 785-791.
154. Campos, R., Y. Lee, and D. Drucker, Divergent tissue-specific and developmental expression of receptors for glucagon and glucagon-like peptide-1 in the mouse. *Endocrinology*, 1994. 134(5): p. 2156-2164.
155. Wei, Y. and S. Mojsov, Tissue-specific expression of the human receptor for glucagon-like peptide-I: brain, heart and pancreatic forms have the same deduced amino acid sequences. *FEBS Letters*, 1995. 358(3): p. 219-224.
156. Bullock, B.P., R.S. Heller, and J.F. Habener, Tissue distribution of messenger ribonucleic acid encoding the rat glucagon-like peptide-1 receptor. *Endocrinology*, 1996. 137(7): p. 2968-78.

LITERATURVERZEICHNIS

157. Egan, J., et al., Glucagon-like peptide-1(7-36) amide (GLP-1) enhances insulin-stimulated glucose metabolism in 3T3-L1 adipocytes: one of several potential extrapancreatic sites of GLP-1 action. *Endocrinology*, 1994. 135(5): p. 2070-2075.
158. Sandhu, H., et al., Glucagon-like peptide 1 increases insulin sensitivity in depancreatized dogs. *Diabetes*, 1999. 48(5): p. 1045-1053.
159. Ding, X., et al., Exendin-4, a glucagon-like protein-1 (GLP-1) receptor agonist, reverses hepatic steatosis in ob/ob mice. *Hepatology*, 2006. 43(1): p. 173-81.
160. Gupta, N.A., et al., Glucagon-like peptide-1 receptor is present on human hepatocytes and has a direct role in decreasing hepatic steatosis in vitro by modulating elements of the insulin signaling pathway. *Hepatology*, 2010. 51(5): p. 1584-1592.
161. Fehmman, H.C., et al., Ligand-specificity of the rat GLP-I receptor recombinantly expressed in Chinese hamster ovary (CHO-) cells. *Z Gastroenterol*, 1994. 32(4): p. 203-7.
162. Thorens, B., et al., Cloning and functional expression of the human islet GLP-1 receptor. Demonstration that exendin-4 is an agonist and exendin-(9-39) an antagonist of the receptor. *Diabetes*, 1993. 42(11): p. 1678-82.
163. Scrocchi, L.A., et al., Glucose intolerance but normal satiety in mice with a null mutation in the glucagon-like peptide 1 receptor gene. *Nat Med*, 1996. 2(11): p. 1254-8.
164. Göke, R., et al., Exendin-4 is a high potency agonist and truncated exendin-(9-39)-amide an antagonist at the glucagon-like peptide 1-(7-36)-amide receptor of insulin-secreting beta-cells. *J Biol Chem*, 1993. 268(26): p. 19650-5.
165. Montrose-Rafizadeh, C., et al., High Potency Antagonists of the Pancreatic Glucagon-like Peptide-1 Receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 1997. 272(34): p. 21201-21206.
166. Kashima, Y., et al., Critical Role of cAMP-GEFII·Rim2 Complex in Incretin-potentiated Insulin Secretion. *Journal of Biological Chemistry*, 2001. 276(49): p. 46046-46053.
167. Holz, G.G., Epac: A New cAMP-Binding Protein in Support of Glucagon-Like Peptide-1 Receptor-Mediated Signal Transduction in the Pancreatic β -Cell. *Diabetes*, 2004. 53(1): p. 5-13.
168. Drucker, D.J., et al., Glucagon-like peptide I stimulates insulin gene expression and increases cyclic AMP levels in a rat islet cell line. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1987. 84(10): p. 3434-3438.
169. Skoglund, G., M.A. Hussain, and G.G. Holz, Glucagon-like peptide 1 stimulates insulin gene promoter activity by protein kinase A-independent activation of the rat insulin I gene cAMP response element. *Diabetes*, 2000. 49(7): p. 1156-1164.

LITERATURVERZEICHNIS

170. Orskov, C., J.J. Holst, and O.V. Nielsen, Effect of Truncated Glucagon-Like Peptide-1 [Proglucagon-(78-107) amide] on Endocrine Secretion from Pig Pancreas, Antrum, and Nonantral Stomach. *Endocrinology*, 1988. 123(4): p. 2009-2013.
171. de Heer, J., et al., Glucagon-like peptide-1, but not glucose-dependent insulinotropic peptide, inhibits glucagon secretion via somatostatin (receptor subtype 2) in the perfused rat pancreas. *Diabetologia*, 2008. 51(12): p. 2263-70.
172. Nauck, M.A., et al., Effects of Glucagon-Like Peptide 1 on Counterregulatory Hormone Responses, Cognitive Functions, and Insulin Secretion during Hyperinsulinemic, Stepped Hypoglycemic Clamp Experiments in Healthy Volunteers. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002. 87(3): p. 1239-1246.
173. Farilla, L., et al., Glucagon-Like Peptide 1 Inhibits Cell Apoptosis and Improves Glucose Responsiveness of Freshly Isolated Human Islets. *Endocrinology*, 2003. 144(12): p. 5149-5158.
174. Xu, G., et al., Exendin-4 stimulates both beta-cell replication and neogenesis, resulting in increased beta-cell mass and improved glucose tolerance in diabetic rats. *Diabetes*, 1999. 48(12): p. 2270-2276.
175. Farilla, L., et al., Glucagon-Like Peptide-1 Promotes Islet Cell Growth and Inhibits Apoptosis in Zucker Diabetic Rats. *Endocrinology*, 2002. 143(11): p. 4397-4408.
176. Zhou, J., et al., Glucagon-like peptide 1 and exendin-4 convert pancreatic AR42J cells into glucagon- and insulin-producing cells. *Diabetes*, 1999. 48(12): p. 2358-2366.
177. Yue, F., et al., Glucagon-like peptide-1 differentiation of primate embryonic stem cells into insulin-producing cells. *Tissue Eng*, 2006. 12(8): p. 2105-16.
178. Hui, H., et al., Glucagon like peptide-1-directed human embryonic stem cells differentiation into insulin-producing cells via hedgehog, cAMP, and PI3K pathways. *Pancreas*, 2010. 39(3): p. 315-22.
179. Stoffers, D.A., et al., Neonatal Exendin-4 Prevents the Development of Diabetes in the Intrauterine Growth Retarded Rat. *Diabetes*, 2003. 52(3): p. 734-740.
180. Li, Y., et al., β -Cell Pdx1 Expression Is Essential for the Glucoregulatory, Proliferative, and Cytoprotective Actions of Glucagon-Like Peptide-1. *Diabetes*, 2005. 54(2): p. 482-491.
181. Drucker, D.J., The biology of incretin hormones. *Cell Metab*, 2006. 3(3): p. 153-65.
182. Wang, X., et al., Glucagon-Like Peptide-1 Regulates the Beta Cell Transcription Factor, PDX-1, in Insulinoma Cells. *Endocrinology*, 1999. 140(10): p. 4904-4907.
183. Meier, J.J., et al., The glucagon-like peptide-1 metabolite GLP-1-(9-36) amide reduces postprandial glycemia independently of gastric emptying and insulin

LITERATURVERZEICHNIS

- secretion in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2006. 290(6): p. E1118-1123.
184. Wettergren, A., et al., Truncated GLP-1 (proglucagon 78–107-amide) inhibits gastric and pancreatic functions in man. *Digestive Diseases and Sciences*, 1993. 38(4): p. 665-673.
 185. Schirra, J., et al., Effects of glucagon-like peptide-1(7-36)amide on antro-pyloro-duodenal motility in the interdigestive state and with duodenal lipid perfusion in humans. *Gut*, 2000. 46(5): p. 622-631.
 186. Schirra, J., et al., Effects of glucagon-like peptide-1(7–36)amide on motility and sensation of the proximal stomach in humans. *Gut*, 2002. 50(3): p. 341-348.
 187. Imeryuz, N., et al., Glucagon-like peptide-1 inhibits gastric emptying via vagal afferent-mediated central mechanisms. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 1997. 273(4): p. G920-927.
 188. Willms, B., et al., Gastric emptying, glucose responses, and insulin secretion after a liquid test meal: effects of exogenous glucagon-like peptide-1 (GLP-1)- (7-36) amide in type 2 (noninsulin-dependent) diabetic patients. *J Clin Endocrinol Metab*, 1996. 81(1): p. 327-332.
 189. Tang-Christensen, M., et al., Central administration of GLP-1-(7-36) amide inhibits food and water intake in rats. *Am J Physiol*, 1996. 271(4 Pt 2): p. R848-56.
 190. Turton, M.D., et al., A role for glucagon-like peptide-1 in the central regulation of feeding. *Nature*, 1996. 379(6560): p. 69-72.
 191. Meeran, K., et al., Repeated Intracerebroventricular Administration of Glucagon-Like Peptide-1-(7-36) Amide or Exendin-(9-39) Alters Body Weight in the Rat. *Endocrinology*, 1999. 140(1): p. 244-250.
 192. van Genugten, R.E., D.H. van Raalte, and M. Diamant, Does glucagon-like peptide-1 receptor agonist therapy add value in the treatment of type 2 diabetes? Focus on exenatide. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 2009. 86(Supplement 1): p. S26-S34.
 193. Jin, S.L., et al., Distribution of glucagonlike peptide I (GLP-I), glucagon, and glicentin in the rat brain: an immunocytochemical study. *J Comp Neurol*, 1988. 271(4): p. 519-32.
 194. Kreymann, B., et al., Characterization of glucagon-like peptide-1-(7-36)amide in the hypothalamus. *Brain Research*, 1989. 502(2): p. 325-331.
 195. Shughrue, P., M. Lane, and I. Merchenthaler, Glucagon-like peptide-1 receptor (GLP1-R) mRNA in the rat hypothalamus. *Endocrinology*, 1996. 137(11): p. 5159-5162.

LITERATURVERZEICHNIS

196. Larsen, P.J., M. Tang-Christensen, and D.S. Jessop, Central Administration of Glucagon-Like Peptide-1 Activates Hypothalamic Neuroendocrine Neurons in the Rat. *Endocrinology*, 1997. 138(10): p. 4445-4455.
197. Abbott, C.R., et al., The inhibitory effects of peripheral administration of peptide YY3-36 and glucagon-like peptide-1 on food intake are attenuated by ablation of the vagal-brainstem-hypothalamic pathway. *Brain Research*, 2005. 1044(1): p. 127-131.
198. Flint, A., et al., Glucagon-like peptide 1 promotes satiety and suppresses energy intake in humans. *The Journal of Clinical Investigation*, 1998. 101(3): p. 515-520.
199. Naslund, E., et al., Energy intake and appetite are suppressed by glucagon-like peptide-1 (GLP-1) in obese men. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 1999. 23(3): p. 304-11.
200. Valverde, I., et al., Glucagon-like peptide 1: a potent glycogenic hormone. *FEBS Lett*, 1994. 349(2): p. 313-6.
201. Lopez-Delgado, M.I., et al., Effects of Glucagon-Like Peptide 1 on the Kinetics of Glycogen Synthase a in Hepatocytes from Normal and Diabetic Rats. *Endocrinology*, 1998. 139(6): p. 2811-2817.
202. Egan, J.M., et al., Glucagon-Like Peptide-1 Augments Insulin-Mediated Glucose Uptake in the Obese State. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002. 87(8): p. 3768-3773.
203. Dardevet, D., et al., Insulin-independent effects of GLP-1 on canine liver glucose metabolism: duration of infusion and involvement of hepatoporal region. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2004. 287(1): p. E75-81.
204. Lee, Y.-S., et al., Glucagon-Like Peptide-1 Gene Therapy in Obese Diabetic Mice Results in Long-Term Cure of Diabetes by Improving Insulin Sensitivity and Reducing Hepatic Gluconeogenesis. *Diabetes*, 2007. 56(6): p. 1671-1679.
205. Samson, S.L., et al., Gene therapy for diabetes: metabolic effects of helper-dependent adenoviral exendin 4 expression in a diet-induced obesity mouse model. *Mol Ther*, 2008. 16(11): p. 1805-12.
206. Yang, H., et al., GLP-1 action in L6 myotubes is via a receptor different from the pancreatic GLP-1 receptor. *Am J Physiol*, 1998. 275(3 Pt 1): p. C675-83.
207. Luque, M.A., et al., Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) and glucose metabolism in human myocytes. *J Endocrinol*, 2002. 173(3): p. 465-73.
208. Arnes, L., et al., Characteristics of GLP-1 and exendins action upon glucose transport and metabolism in type 2 diabetic rat skeletal muscle. *Int J Mol Med*, 2008. 22(1): p. 127-32.
209. Miki, H., et al., Glucagon-like peptide-1(7-36)amide enhances insulin-stimulated glucose uptake and decreases intracellular cAMP content in isolated rat adipocytes. *Biochim Biophys Acta*, 1996. 1312(2): p. 132-6.

LITERATURVERZEICHNIS

210. Montrose-Rafizadeh, C., et al., Novel signal transduction and peptide specificity of glucagon-like peptide receptor in 3T3-L1 adipocytes. *J Cell Physiol*, 1997. 172(3): p. 275-83.
211. Sancho, V., et al., Effects of glucagon-like peptide-1 and exendins on kinase activity, glucose transport and lipid metabolism in adipocytes from normal and type-2 diabetic rats. *J Mol Endocrinol*, 2005. 35(1): p. 27-38.
212. Delgado, E., et al., Glucagon-like peptide-1 binding to rat skeletal muscle. *Peptides*, 1995. 16(2): p. 225-9.
213. Villanueva-Penacarrillo, M.L., et al., Glucagon-like peptide-1 binding to rat hepatic membranes. *J Endocrinol*, 1995. 146(1): p. 183-189.
214. Gonzalez, N., et al., Effect of GLP-1 on glucose transport and its cell signalling in human myocytes. *Regul Pept*, 2005. 126(3): p. 203-11.
215. Deacon, C.F., et al., GLP-1-(9-36) amide reduces blood glucose in anesthetized pigs by a mechanism that does not involve insulin secretion. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2002. 282(4): p. E873-9.
216. Elahi, D., et al., GLP-1 (9-36) amide, cleavage product of GLP-1 (7-36) amide, is a glucoregulatory peptide. *Obesity (Silver Spring)*, 2008. 16(7): p. 1501-9.
217. Rolin, B., et al., The major glucagon-like peptide-1 metabolite, GLP-1-(9-36)-amide, does not affect glucose or insulin levels in mice. *Eur J Pharmacol*, 2004. 494(2-3): p. 283-8.
218. Yamamoto, H., et al., Glucagon-like peptide-1 receptor stimulation increases blood pressure and heart rate and activates autonomic regulatory neurons. *The Journal of Clinical Investigation*, 2002. 110(1): p. 43-52.
219. Ban, K., et al., Cardioprotective and vasodilatory actions of glucagon-like peptide 1 receptor are mediated through both glucagon-like peptide 1 receptor-dependent and -independent pathways. *Circulation*, 2008. 117(18): p. 2340-50.
220. Gros, R., et al., Cardiac Function in Mice Lacking the Glucagon-Like Peptide-1 Receptor. *Endocrinology*, 2003. 144(6): p. 2242-2252.
221. Gallwitz, B., Inkretine: Gibt es kardiovaskuläre Effekte? *Herz*, 2010. 35(3): p. 130-138.
222. Barragan, J.M., et al., Neural contribution to the effect of glucagon-like peptide-1-(7--36) amide on arterial blood pressure in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 1999. 277(5): p. E784-791.
223. Sulistio, M., et al., GLP-1 agonist-based therapies: an emerging new class of antidiabetic drug with potential cardioprotective effects. *Curr Atheroscler Rep*, 2009. 11(2): p. 93-9.
224. Nikolaidis, L.A., et al., Recombinant Glucagon-Like Peptide-1 Increases Myocardial Glucose Uptake and Improves Left Ventricular Performance in

LITERATURVERZEICHNIS

- Conscious Dogs With Pacing-Induced Dilated Cardiomyopathy. *Circulation*, 2004. 110(8): p. 955-961.
225. Bose, A.K., et al., Glucagon-like Peptide 1 Can Directly Protect the Heart Against Ischemia/Reperfusion Injury. *Diabetes*, 2005. 54(1): p. 146-151.
226. Nikolaidis, L.A., et al., Glucagon-Like Peptide-1 Limits Myocardial Stunning following Brief Coronary Occlusion and Reperfusion in Conscious Canines. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2005. 312(1): p. 303-308.
227. Nikolaidis, L.A., et al., Active metabolite of GLP-1 mediates myocardial glucose uptake and improves left ventricular performance in conscious dogs with dilated cardiomyopathy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2005. 289(6): p. H2401-2408.
228. Nikolaidis, L.A., et al., Effects of glucagon-like peptide-1 in patients with acute myocardial infarction and left ventricular dysfunction after successful reperfusion. *Circulation*, 2004. 109(8): p. 962-5.
229. Zhao, T., et al., Direct Effects of Glucagon-Like Peptide-1 on Myocardial Contractility and Glucose Uptake in Normal and Postischemic Isolated Rat Hearts. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2006. 317(3): p. 1106-1113.
230. Sonne, D.P., T. Engstrom, and M. Treiman, Protective effects of GLP-1 analogues exendin-4 and GLP-1(9-36) amide against ischemia-reperfusion injury in rat heart. *Regul Pept*, 2008. 146(1-3): p. 243-9.
231. Nauck, M.A., et al., Preserved incretin activity of glucagon-like peptide 1 [7-36 amide] but not of synthetic human gastric inhibitory polypeptide in patients with type-2 diabetes mellitus. *The Journal of Clinical Investigation*, 1993. 91(1): p. 301-307.
232. Nauck, M.A., B. Baller, and J.J. Meier, Gastric Inhibitory Polypeptide and Glucagon-Like Peptide-1 in the Pathogenesis of Type 2 Diabetes. *Diabetes*, 2004. 53(suppl 3): p. S190-S196.
233. Lynn, F.C., et al., A novel pathway for regulation of glucose-dependent insulinotropic polypeptide receptor expression in b-cells. *FASEB J.*, 2002: p. 02-0243fje.
234. Vilsboll, T., et al., The elimination rates of intact GIP as well as its primary metabolite, GIP 3-42, are similar in type 2 diabetic patients and healthy subjects. *Regulatory Peptides*, 2006. 137(3): p. 168-172.
235. Toft-Nielsen, M.-B., et al., Determinants of the Impaired Secretion of Glucagon-Like Peptide-1 in Type 2 Diabetic Patients. *J Clin Endocrinol Metab*, 2001. 86(8): p. 3717-3723.
236. Vilsboll, T., et al., Reduced Postprandial Concentrations of Intact Biologically Active Glucagon-Like Peptide 1 in Type 2 Diabetic Patients. *Diabetes*, 2001. 50(3): p. 609-613.

LITERATURVERZEICHNIS

237. Grant, S.F.A., et al., Variant of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene confers risk of type 2 diabetes. *Nat Genet*, 2006. 38(3): p. 320-323.
238. Tong, Y., et al., Association between TCF7L2 gene polymorphisms and susceptibility to Type 2 Diabetes Mellitus: a large Human Genome Epidemiology (HuGE) review and meta-analysis. *BMC Medical Genetics*, 2009. 10(1): p. 15.
239. Schäfer, S., et al., Impaired glucagon-like peptide-1-induced insulin secretion in carriers of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene polymorphisms. *Diabetologia*, 2007. 50(12): p. 2443-2450.
240. Villareal, D.T., et al., TCF7L2 Variant rs7903146 Affects the Risk of Type 2 Diabetes by Modulating Incretin Action. *Diabetes*, 2010. 59(2): p. 479-485.
241. Shu, L., et al., Decreased TCF7L2 protein levels in type 2 diabetes mellitus correlate with downregulation of GIP- and GLP-1 receptors and impaired beta-cell function. *Human Molecular Genetics*, 2009. 18(13): p. 2388-2399.
242. Mannucci, E., et al., Hyperglycaemia increases dipeptidyl peptidase IV activity in diabetes mellitus. *Diabetologia*, 2005. 48(6): p. 1168-1172.
243. Carr, R.D., et al., Secretion and Dipeptidyl Peptidase-4-Mediated Metabolism of Incretin Hormones after a Mixed Meal or Glucose Ingestion in Obese Compared to Lean, Nondiabetic Men. *J Clin Endocrinol Metab*, 2010. 95(2): p. 872-878.
244. Vilsboll, et al., Defective amplification of the late phase insulin response to glucose by GIP in obese Type II diabetic patients. *Diabetologia*, 2002. 45(8): p. 1111-1119.
245. Rachman, J., et al., Near-normalisation of diurnal glucose concentrations by continuous administration of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) in subjects with NIDDM. *Diabetologia*, 1997. 40(2): p. 205-211.
246. Zander, M., et al., Effect of 6-week course of glucagon-like peptide 1 on glycaemic control, insulin sensitivity, and [beta]-cell function in type 2 diabetes: a parallel-group study. *The Lancet*, 2002. 359(9309): p. 824-830.
247. Eng, J., et al., Isolation and characterization of exendin-4, an exendin-3 analogue, from *Heloderma suspectum* venom. Further evidence for an exendin receptor on dispersed acini from guinea pig pancreas. *Journal of Biological Chemistry*, 1992. 267(11): p. 7402-7405.
248. Kolterman, O.G., et al., Pharmacokinetics, pharmacodynamics, and safety of exenatide in patients with type 2 diabetes mellitus. *Am J Health Syst Pharm*, 2005. 62(2): p. 173-181.
249. Lovshin, J.A. and D.J. Drucker, Incretin-based therapies for type 2 diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol*, 2009. 5(5): p. 262-269.
250. Knudsen, L.B., et al., Potent Derivatives of Glucagon-like Peptide-1 with Pharmacokinetic Properties Suitable for Once Daily Administration. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2000. 43(9): p. 1664-1669.

LITERATURVERZEICHNIS

251. Russell-Jones, D., Molecular, pharmacological and clinical aspects of liraglutide, a once-daily human GLP-1 analogue. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2009. 297(1-2): p. 137-140.
252. Agero, H., et al., The pharmacokinetics, pharmacodynamics, safety and tolerability of NN2211, a new long-acting GLP-1 derivative, in healthy men. *Diabetologia*, 2002. 45(2): p. 195-202.
253. Juhl, C.B., et al., Bedtime Administration of NN2211, a Long-Acting GLP-1 Derivative, Substantially Reduces Fasting and Postprandial Glycemia in Type 2 Diabetes. *Diabetes*, 2002. 51(2): p. 424-429.
254. Holst, J.J., T. Vilsbøll, and C.F. Deacon, The incretin system and its role in type 2 diabetes mellitus. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2009. 297(1-2): p. 127-136.
255. Kendall, D.M., et al., Effects of Exenatide (Exendin-4) on Glycemic Control Over 30 Weeks in Patients With Type 2 Diabetes Treated With Metformin and a Sulfonylurea. *Diabetes Care*, 2005. 28(5): p. 1083-1091.
256. Klonoff, D.C., et al., Exenatide effects on diabetes, obesity, cardiovascular risk factors and hepatic biomarkers in patients with type 2 diabetes treated for at least 3 years*. *Current Medical Research and Opinion*, 2008. 24(1): p. 275-286.
257. Zinman, B., et al., Efficacy and Safety of the Human Glucagon-Like Peptide-1 Analog Liraglutide in Combination With Metformin and Thiazolidinedione in Patients With Type 2 Diabetes (LEAD-4 Met+TZD). *Diabetes Care*, 2009. 32(7): p. 1224-1230.
258. Buse, J.B., et al., Liraglutide once a day versus exenatide twice a day for type 2 diabetes: a 26-week randomised, parallel-group, multinational, open-label trial (LEAD-6). *The Lancet*, 2009. 374(9683): p. 39-47.
259. Vilsboll, T., et al., Liraglutide, a once-daily human GLP-1 analogue, improves pancreatic B-cell function and arginine-stimulated insulin secretion during hyperglycaemia in patients with Type 2 diabetes mellitus. *Diabetic Medicine*, 2008. 25(2): p. 152-156.
260. Bunck, M.C., et al., One-Year Treatment With Exenatide Improves β -Cell Function, Compared With Insulin Glargine, in Metformin-Treated Type 2 Diabetic Patients. *Diabetes Care*, 2009. 32(5): p. 762-768.
261. Varanasi, A., et al., Clinical Use of Liraglutide in Type 2 Diabetes, and Its Effects on Cardiovascular Risk Factors. *Endocr Pract*, 2011: p. 1-13.
262. Blonde, L., et al., Interim analysis of the effects of exenatide treatment on A1C, weight and cardiovascular risk factors over 82 weeks in 314 overweight patients with type 2 diabetes. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 2006. 8(4): p. 436-447.
263. Brixner, D.I., et al., Six-month outcomes on A1C and cardiovascular risk factors in patients with type 2 diabetes treated with exenatide in an ambulatory care setting. *Diabetes Obes Metab*, 2009. 11(12): p. 1122-30.

LITERATURVERZEICHNIS

264. Arakawa, M., et al., Inhibition of monocyte adhesion to endothelial cells and attenuation of atherosclerotic lesion by a glucagon-like peptide-1 receptor agonist, exendin-4. *Diabetes*, 2010. 59(4): p. 1030-7.
265. Hattori, Y., et al., A glucagon-like peptide-1 (GLP-1) analogue, liraglutide, upregulates nitric oxide production and exerts anti-inflammatory action in endothelial cells. *Diabetologia*, 2010. 53(10): p. 2256-2263.
266. Pugazhenthii, U., et al., Anti-inflammatory action of exendin-4 in human islets is enhanced by phosphodiesterase inhibitors: potential therapeutic benefits in diabetic patients. *Diabetologia*, 2010. 53(11): p. 2357-2368.
267. Green, B.D. and P.R. Flatt, Incretin hormone mimetics and analogues in diabetes therapeutics. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2007. 21(4): p. 497-516.
268. Monami, M., N. Marchionni, and E. Mannucci, Glucagon-like peptide-1 receptor agonists in type 2 diabetes: a meta-analysis of randomized clinical trials. *Eur J Endocrinol*, 2009. 160(6): p. 909-917.
269. Garber, A.J., Novel GLP-1 receptor agonists for diabetes. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 2012. 21(1): p. 45-57.
270. Gallwitz, B., Glucagon-like Peptide–1 Analogues for Type 2 Diabetes Mellitus: Current and Emerging Agents. *Drugs*, 2011. 71(13): p. 1675-1688
10.2165/11592810-000000000-00000.
271. Ahren, B., The future of incretin-based therapy: novel avenues—novel targets. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 2011. 13: p. 158-166.
272. Hansotia, T., et al., Double Incretin Receptor Knockout (DIRKO) Mice Reveal an Essential Role for the Enteroinsular Axis in Transducing the Glucoregulatory Actions of DPP-IV Inhibitors. *Diabetes*, 2004. 53(5): p. 1326-1335.
273. Marguet, D., et al., Enhanced insulin secretion and improved glucose tolerance in mice lacking CD26. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. 97(12): p. 6874-9.
274. Villhauer, E.B., et al., 1-[[[3-Hydroxy-1-adamantyl)amino]acetyl]-2-cyano-(S)-pyrrolidine: A Potent, Selective, and Orally Bioavailable Dipeptidyl Peptidase IV Inhibitor with Antihyperglycemic Properties. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2003. 46(13): p. 2774-2789.
275. Augeri, D.J., et al., Discovery and Preclinical Profile of Saxagliptin (BMS-477118): A Highly Potent, Long-Acting, Orally Active Dipeptidyl Peptidase IV Inhibitor for the Treatment of Type 2 Diabetes. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2005. 48(15): p. 5025-5037.
276. Kim, D., et al., (2R)-4-Oxo-4-[3-(Trifluoromethyl)-5,6-dihydro[1,2,4]triazolo[4,3-a]pyrazin-7(8H)-yl]-1-(2,4,5-trifluorophenyl)butan-2-amine: A Potent, Orally Active Dipeptidyl Peptidase IV Inhibitor for the Treatment of Type 2 Diabetes. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2005. 48(1): p. 141-151.

LITERATURVERZEICHNIS

277. Ahren, B., Clinical results of treating type 2 diabetic patients with sitagliptin, vildagliptin or saxagliptin - diabetes control and potential adverse events. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2009. 23(4): p. 487-498.
278. Aletti, R. and A. Cheng-Lai, Linagliptin: The Newest Dipeptidyl Peptidase-4 Inhibitor for Type 2 Diabetes Mellitus. *Cardiology in Review*, 2012. 20(01): p. 045-051 10.1097/CRD.0b013e31823a3afc.
279. Schernthaner, G., et al., Safety and tolerability of linagliptin: a pooled analysis of data from randomized controlled trials in 3572 patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 2012: p. no-no.
280. Ahren, B., et al., Inhibition of Dipeptidyl Peptidase-4 Reduces Glycemia, Sustains Insulin Levels, and Reduces Glucagon Levels in Type 2 Diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*, 2004. 89(5): p. 2078-2084.
281. Burkey, B.F., et al., Acute and chronic effects of the incretin enhancer vildagliptin in insulin-resistant rats. *J Pharmacol Exp Ther*, 2005. 315(2): p. 688-95.
282. Bergman, A.J., et al., Pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of multiple oral doses of sitagliptin, a dipeptidyl peptidase-IV inhibitor: A double-blind, randomized, placebo-controlled study in healthy male volunteers. *Clinical Therapeutics*, 2006. 28(1): p. 55-72.
283. Mari, A., et al., Vildagliptin, a Dipeptidyl Peptidase-IV Inhibitor, Improves Model-Assessed {beta}-Cell Function in Patients with Type 2 Diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*, 2005. 90(8): p. 4888-4894.
284. Ahren, B., et al., Improved Meal-Related β -Cell Function and Insulin Sensitivity by the Dipeptidyl Peptidase-IV Inhibitor Vildagliptin in Metformin-Treated Patients With Type 2 Diabetes Over 1 Year. *Diabetes Care*, 2005. 28(8): p. 1936-1940.
285. Ahren, B., et al., Beta-cell expression of a dominant-negative HNF-1alpha compromises the ability of inhibition of dipeptidyl peptidase-4 to elicit a long-term augmentation of insulin secretion in mice. *Eur J Pharmacol*, 2005. 521(1-3): p. 164-8.
286. Mu, J., et al., Chronic inhibition of dipeptidyl peptidase-4 with a sitagliptin analog preserves pancreatic beta-cell mass and function in a rodent model of type 2 diabetes. *Diabetes*, 2006. 55(6): p. 1695-704.
287. Ahren, B., et al., DPP-4 inhibition improves glucose tolerance and increases insulin and GLP-1 responses to gastric glucose in association with normalized islet topography in mice with beta-cell-specific overexpression of human islet amyloid polypeptide. *Regul Pept*, 2007. 143(1-3): p. 97-103.
288. Balas, B., et al., The Dipeptidyl Peptidase IV Inhibitor Vildagliptin Suppresses Endogenous Glucose Production and Enhances Islet Function after Single-Dose Administration in Type 2 Diabetic Patients. *J Clin Endocrinol Metab*, 2007. 92(4): p. 1249-1255.

LITERATURVERZEICHNIS

289. Ahren, B., DPP-4 inhibitors. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2007. 21(4): p. 517-533.
290. Rosenstock, J., S. Sankoh, and J.F. List, Glucose-lowering activity of the dipeptidyl peptidase-4 inhibitor saxagliptin in drug-naive patients with type 2 diabetes*. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 2008. 10(5): p. 376-386.
291. Moritoh, Y., et al., Chronic administration of alogliptin, a novel, potent, and highly selective dipeptidyl peptidase-4 inhibitor, improves glycemic control and beta-cell function in obese diabetic ob/ob mice. *Eur J Pharmacol*, 2008. 588(2-3): p. 325-32.
292. Matikainen, N., et al., Vildagliptin therapy reduces postprandial intestinal triglyceride-rich lipoprotein particles in patients with type 2 diabetes. *Diabetologia*, 2006. 49(9): p. 2049-57.
293. Monami, M., et al., DPP-4 Inhibitors and Lipids: Systematic Review and Meta-Analysis. *Advances in Therapy*, 2012. 29(1): p. 14-25.
294. Ye, Y., et al., The myocardial infarct size-limiting effect of sitagliptin is PKA-dependent, whereas the protective effect of pioglitazone is partially dependent on PKA. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2010. 298(5): p. H1454-1465.
295. Read, P.A., et al., DPP-4 inhibition by sitagliptin improves the myocardial response to dobutamine stress and mitigates stunning in a pilot study of patients with coronary artery disease. *Circ Cardiovasc Imaging*, 2010. 3(2): p. 195-201.
296. Monami, M., et al., Dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes: a meta-analysis of randomized clinical trials. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 2010. 20(4): p. 224-35.
297. Yazbeck, R., G.S. Howarth, and C.A. Abbott, Dipeptidyl peptidase inhibitors, an emerging drug class for inflammatory disease? *Trends in Pharmacological Sciences*, 2009. 30(11): p. 600-607.
298. Atchison, R.W., B.C. Casto, and W.M. Hammon, Adenovirus-Associated Defective Virus Particles. *Science*, 1965. 149(3685): p. 754-755.
299. McPherson, R.A., L.J. Rosenthal, and J.A. Rose, Human cytomegalovirus completely helps adeno-associated virus replication. *Virology*, 1985. 147(1): p. 217-22.
300. Thomson, B.J., et al., Human herpesvirus 6 (HHV-6) is a helper virus for adeno-associated virus type 2 (AAV-2) and the AAV-2 rep gene homologue in HHV-6 can mediate AAV-2 DNA replication and regulate gene expression. *Virology*, 1994. 204(1): p. 304-11.
301. Wu, Z., A. Asokan, and R.J. Samulski, Adeno-associated virus serotypes: vector toolkit for human gene therapy. *Mol Ther*, 2006. 14(3): p. 316-27.
302. Büning, H., et al., Recent developments in adeno-associated virus vector technology. *The Journal of Gene Medicine*, 2008. 10(7): p. 717-733.

LITERATURVERZEICHNIS

303. Yakobson, B., T. Koch, and E. Winocour, Replication of adeno-associated virus in synchronized cells without the addition of a helper virus. *J Virol*, 1987. 61(4): p. 972-81.
304. Yalkinoglu, A.O., et al., DNA Amplification of Adeno-associated Virus as a Response to Cellular Genotoxic Stress. *Cancer Res*, 1988. 48(11): p. 3123-3129.
305. Moskalenko, M., et al., Epitope mapping of human anti-adeno-associated virus type 2 neutralizing antibodies: implications for gene therapy and virus structure. *J Virol*, 2000. 74(4): p. 1761-6.
306. Goncalves, M.A., Adeno-associated virus: from defective virus to effective vector. *Virology*, 2005. 332(2): p. 43.
307. Balague, C., M. Kalla, and W.W. Zhang, Adeno-associated virus Rep78 protein and terminal repeats enhance integration of DNA sequences into the cellular genome. *J Virol*, 1997. 71(4): p. 3299-306.
308. Grimm, D., Production methods for gene transfer vectors based on adeno-associated virus serotypes. *Methods*, 2002. 28(2): p. 146-157.
309. Bueler, H., Adeno-associated viral vectors for gene transfer and gene therapy. *Biol Chem*, 1999. 380(6): p. 613-22.
310. Koczot, F.J., et al., Self-complementarity of terminal sequences within plus or minus strands of adenovirus-associated virus DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1973. 70(1): p. 215-9.
311. Summerford, C. and R.J. Samulski, Membrane-associated heparan sulfate proteoglycan is a receptor for adeno-associated virus type 2 virions. *J Virol*, 1998. 72(2): p. 1438-45.
312. Bartlett, J.S., R. Wilcher, and R.J. Samulski, Infectious entry pathway of adeno-associated virus and adeno-associated virus vectors. *J Virol*, 2000. 74(6): p. 2777-85.
313. Sanlioglu, S., et al., Endocytosis and nuclear trafficking of adeno-associated virus type 2 are controlled by rac1 and phosphatidylinositol-3 kinase activation. *J Virol*, 2000. 74(19): p. 9184-96.
314. Douar, A.M., et al., Intracellular trafficking of adeno-associated virus vectors: routing to the late endosomal compartment and proteasome degradation. *J Virol*, 2001. 75(4): p. 1824-33.
315. Asokan, A., et al., Adeno-associated virus type 2 contains an integrin alpha5beta1 binding domain essential for viral cell entry. *J Virol*, 2006. 80(18): p. 8961-9.
316. Gao, G.P., et al., Novel adeno-associated viruses from rhesus monkeys as vectors for human gene therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. 99(18): p. 11854-9.

LITERATURVERZEICHNIS

317. Gao, G., L.H. Vandenberghe, and J.M. Wilson, New recombinant serotypes of AAV vectors. *Curr Gene Ther*, 2005. 5(3): p. 285-97.
318. Samulski, R.J., et al., Cloning of adeno-associated virus into pBR322: rescue of intact virus from the recombinant plasmid in human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1982. 79(6): p. 2077-81.
319. Dong, J.Y., P.D. Fan, and R.A. Frizzell, Quantitative analysis of the packaging capacity of recombinant adeno-associated virus. *Hum Gene Ther*, 1996. 7(17): p. 2101-12.
320. Hermonat, P.L., et al., The packaging capacity of adeno-associated virus (AAV) and the potential for wild-type-plus AAV gene therapy vectors. *FEBS Letters*, 1997. 407(1): p. 78-84.
321. Xiao, X., J. Li, and R.J. Samulski, Production of high-titer recombinant adeno-associated virus vectors in the absence of helper adenovirus. *J Virol*, 1998. 72(3): p. 2224-32.
322. Matsushita, T., et al., Adeno-associated virus vectors can be efficiently produced without helper virus. *Gene Ther*, 1998. 5(7): p. 938-45.
323. Broedl, U.C. and D.J. Rader, Gene therapy for lipoprotein disorders. *Expert Opin Biol Ther*, 2005. 5(8): p. 1029-38.
324. Xiao, X., J. Li, and R.J. Samulski, Efficient long-term gene transfer into muscle tissue of immunocompetent mice by adeno-associated virus vector. *J Virol*, 1996. 70(11): p. 8098-108.
325. Jooss, K., et al., Transduction of Dendritic Cells by DNA Viral Vectors Directs the Immune Response to Transgene Products in Muscle Fibers. *J. Virol.*, 1998. 72(5): p. 4212-4223.
326. Halbert, C.L., et al., Repeat transduction in the mouse lung by using adeno-associated virus vectors with different serotypes. *J Virol*, 2000. 74(3): p. 1524-32.
327. Jooss, K. and N. Chirmule, Immunity to adenovirus and adeno-associated viral vectors: implications for gene therapy. *Gene Ther*, 2003. 10(11): p. 955-963.
328. Miao, C.H., et al., Nonrandom Transduction of Recombinant Adeno-Associated Virus Vectors in Mouse Hepatocytes In Vivo: Cell Cycling Does Not Influence Hepatocyte Transduction. *J. Virol.*, 2000. 74(8): p. 3793-3803.
329. Choi, V.W., et al., Production of recombinant adeno-associated viral vectors for in vitro and in vivo use. *Curr Protoc Mol Biol*, 2007. Chapter 16: p. Unit 16 25.
330. Li, J., et al., Efficient and long-term intracardiac gene transfer in [delta]-sarcoglycan-deficiency hamster by adeno-associated virus-2 vectors. *Gene Ther*, 2003. 10(21): p. 1807-1813.

LITERATURVERZEICHNIS

331. Rivera, V.M., et al., Long-term pharmacologically regulated expression of erythropoietin in primates following AAV-mediated gene transfer. *Blood*, 2005. 105(4): p. 1424-30.
332. Schnepf, B.C., et al., Genetic fate of recombinant adeno-associated virus vector genomes in muscle. *J Virol*, 2003. 77(6): p. 3495-504.
333. Hildinger, M. and A. Auricchio, Advances in AAV-mediated gene transfer for the treatment of inherited disorders. *Eur J Hum Genet*, 2004. 12(4): p. 263-71.
334. Lehrke, M., et al., Diet-dependent cardiovascular lipid metabolism controlled by hepatic LXR \pm . *Cell metabolism*, 2005. 1(5): p. 297-308.
335. Giulietti, A., et al., An Overview of Real-Time Quantitative PCR: Applications to Quantify Cytokine Gene Expression. *Methods*, 2001. 25(4): p. 386-401.
336. Davis, H.R., et al., Niemann-Pick C1 Like 1 (NPC1L1) Is the Intestinal Phytosterol and Cholesterol Transporter and a Key Modulator of Whole-body Cholesterol Homeostasis. *Journal of Biological Chemistry*, 2004. 279(32): p. 33586-33592.
337. Alberts, B., et al., Lehrbuch der Molekularen Zellbiologie. Vol. 2. 2001, Weinheim, New York, Chichester, Singapore, Toronto: WILEY-VCH. p.701.
338. Wilfinger, W.W., K. Mackey, and P. Chomczynski, Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *Biotechniques*, 1997. 22(3): p. 474-6, 478-81.
339. Manchester, K.L., Value of A260/A280 ratios for measurement of purity of nucleic acids. *Biotechniques*, 1995. 19(2): p. 208-10.
340. Holland, P.M., et al., Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991. 88(16): p. 7276-80.
341. Heid, C.A., et al., Real time quantitative PCR. *Genome Res*, 1996. 6(10): p. 986-94.
342. Bi, X. and L.F. Liu, DNA rearrangement mediated by inverted repeats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1996. 93(2): p. 819-823.
343. Parsons, G.B., et al., Ectopic expression of glucagon-like peptide 1 for gene therapy of type II diabetes. *Gene Ther*, 2007. 14(1): p. 38-48.
344. Durocher, Y., et al., Scalable serum-free production of recombinant adeno-associated virus type 2 by transfection of 293 suspension cells. *Journal of Virological Methods*, 2007. 144(1-2): p. 32-40.
345. Florea, B.I., et al., Transfection efficiency and toxicity of polyethylenimine in differentiated Calu-3 and nondifferentiated COS-1 cell cultures. *AAPS PharmSci*, 2002. 4(3): p. E12.

LITERATURVERZEICHNIS

346. Boussif, O., et al., A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. 92(16): p. 7297-301.
347. Moret, I., et al., Stability of PEI-DNA and DOTAP-DNA complexes: effect of alkaline pH, heparin and serum. *Journal of Controlled Release*, 2001. 76(1-2): p. 169-181.
348. Grieger, J.C., V.W. Choi, and R.J. Samulski, Production and characterization of adeno-associated viral vectors. *Nat Protoc*, 2006. 1(3): p. 1412-28.
349. Bradford, M.M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 1976. 72(1-2): p. 248-254.
350. Laemmli, U.K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970. 227(5259): p. 680-5.
351. London, R.M. and J. George, Pathogenesis of NASH: Animal Models. *Clinics in Liver Disease*, 2007. 11(1): p. 55-74.
352. Oz, H., T. Chen, and M. Neuman, Methionine Deficiency and Hepatic Injury in a Dietary Steatohepatitis Model. *Digestive Diseases and Sciences*, 2008. 53(3): p. 767-776.
353. Deacon, C.F., et al., Dipeptidyl peptidase IV resistant analogues of glucagon-like peptide-1 which have extended metabolic stability and improved biological activity. *Diabetologia*, 1998. 41(3): p. 271-278.
354. Yamauchi, T., et al., Targeted disruption of AdipoR1 and AdipoR2 causes abrogation of adiponectin binding and metabolic actions. *Nat Med*, 2007. 13(3): p. 332-339.
355. Underwood, R., et al., Sequence, Purification, and Cloning of an Intracellular Serine Protease, Quiescent Cell Proline Dipeptidase. *Journal of Biological Chemistry*, 1999. 274(48): p. 34053-34058.
356. Durinx, C., et al., Molecular characterization of dipeptidyl peptidase activity in serum. *European Journal of Biochemistry*, 2000. 267(17): p. 5608-5613.
357. Nagakura, T., et al., Enteroinsular axis of db/db mice and efficacy of dipeptidyl peptidase IV inhibition. *Metabolism: clinical and experimental*, 2003. 52(1): p. 81-86.
358. Karlmark, K.R., et al., Hepatic recruitment of the inflammatory Gr1+ monocyte subset upon liver injury promotes hepatic fibrosis. *Hepatology*, 2009. 50(1): p. 261-274.
359. Arthur, M.J.P., Fibrogenesis II. Metalloproteinases and their inhibitors in liver fibrosis. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 2000. 279(2): p. G245-G249.

LITERATURVERZEICHNIS

360. Liu, M.-J., et al., Prolonged Remission of Diabetes by Regeneration of [beta] Cells in Diabetic Mice Treated with Recombinant Adenoviral Vector Expressing Glucagon-like Peptide-1. *Mol Ther*, 2007. 15(1): p. 86-93.
361. Lee, Y., et al., Adenoviral vector-mediated glucagon-like peptide 1 gene therapy improves glucose homeostasis in Zucker diabetic fatty rats. *The Journal of Gene Medicine*, 2008. 10(3): p. 260-268.
362. Riedel, M.J., C.W.K. Lee, and T.J. Kieffer, Engineered glucagon-like peptide-1-producing hepatocytes lower plasma glucose levels in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2009. 296(4): p. E936-944.
363. Choi, S.H. and H.C. Lee, Long-term, antidiabetogenic effects of GLP-1 gene therapy using a double-stranded, adeno-associated viral vector. *Gene Ther*, 2010.
364. Liu, M.-J., et al., Amelioration of hyperglycemia by intestinal overexpression of glucagon-like peptide-1 in mice. *Journal of Molecular Medicine*, 2010. 88(4): p. 351-358.
365. Zaiss, A.-K., et al., Differential Activation of Innate Immune Responses by Adenovirus and Adeno-Associated Virus Vectors. *J. Virol.*, 2002. 76(9): p. 4580-4590.
366. Bouard, D., N. Alazard-Dany, and F.L. Cosset, Viral vectors: from virology to transgene expression. *British Journal of Pharmacology*, 2009. 157(2): p. 153-165.
367. Daniel, R. and J.A. Smith, Integration site selection by retroviral vectors: molecular mechanism and clinical consequences. *Hum Gene Ther*, 2008. 19(6): p. 557-68.
368. Hacein-Bey-Abina, S., et al., Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovirus-mediated gene therapy of SCID-X1. *J Clin Invest*, 2008. 118(9): p. 3132-42.
369. Nakai, H., et al., Extrachromosomal Recombinant Adeno-Associated Virus Vector Genomes Are Primarily Responsible for Stable Liver Transduction In Vivo. *J. Virol.*, 2001. 75(15): p. 6969-6976.
370. Stilwell, J.L. and R.J. Samulski, Role of Viral Vectors and Virion Shells in Cellular Gene Expression. *Mol Ther*, 2004. 9(3): p. 337-346.
371. Tangirala, R.K., E.M. Rubin, and W. Palinski, Quantitation of atherosclerosis in murine models: correlation between lesions in the aortic origin and in the entire aorta, and differences in the extent of lesions between sexes in LDL receptor-deficient and apolipoprotein E-deficient mice. *Journal of Lipid Research*, 1995. 36(11): p. 2320-8.
372. Lichtman, A.H., et al., Hyperlipidemia and Atherosclerotic Lesion Development in LDL Receptor-Deficient Mice Fed Defined Semipurified Diets With and Without Cholate. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1999. 19(8): p. 1938-1944.

LITERATURVERZEICHNIS

373. Merkel, M., et al., Compared with saturated fatty acids, dietary monounsaturated fatty acids and carbohydrates increase atherosclerosis and VLDL cholesterol levels in LDL receptor-deficient, but not apolipoprotein E-deficient, mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2001. 98(23): p. 13294-13299.
374. Wu, L., et al., Addition of dietary fat to cholesterol in the diets of LDL receptor knockout mice: effects on plasma insulin, lipoproteins, and atherosclerosis. *Journal of Lipid Research*, 2006. 47(10): p. 2215-2222.
375. Nakai, H., et al., Unrestricted hepatocyte transduction with adeno-associated virus serotype 8 vectors in mice. *J Virol*, 2005. 79(1): p. 214-24.
376. Nguyen, T.H. and N. Ferry, Liver gene therapy: advances and hurdles. *Gene Ther*, 2004. 11(S1): p. S76-S84.
377. Wang, L., et al., Cross-presentation of adeno-associated virus serotype 2 capsids activates cytotoxic T cells but does not render hepatocytes effective cytolytic targets. *Hum Gene Ther*, 2007. 18(3): p. 185-94.
378. Scallan, C.D., et al., Human immunoglobulin inhibits liver transduction by AAV vectors at low AAV2 neutralizing titers in SCID mice. *Blood*, 2006. 107(5): p. 1810-1817.
379. Chirmule, N., et al., Humoral Immunity to Adeno-Associated Virus Type 2 Vectors following Administration to Murine and Nonhuman Primate Muscle. *J. Virol.*, 2000. 74(5): p. 2420-2425.
380. Reed, S.E., et al., Transfection of mammalian cells using linear polyethylenimine is a simple and effective means of producing recombinant adeno-associated virus vectors. *J Virol Methods*, 2006. 138(1-2): p. 85-98.
381. Jawien, J., P. Nastalek, and R. Korbut, Mouse models of experimental atherosclerosis. *J Physiol Pharmacol*, 2004. 55(3): p. 503-17.
382. Kirsch, R., et al., Rodent nutritional model of non-alcoholic steatohepatitis: Species, strain and sex difference studies. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 2003. 18(11): p. 1272-1282.
383. Zadelaar, S., et al., Mouse Models for Atherosclerosis and Pharmaceutical Modifiers. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007. 27(8): p. 1706-1721.
384. Kennedy, A.J., et al., Mouse models of the metabolic syndrome. *Dis Model Mech*, 2010. 3(3-4): p. 156-66.
385. Plump, A.S., et al., Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. *Cell*, 1992. 71(2): p. 343-353.
386. Zhang, S., et al., Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. *Science*, 1992. 258(5081): p. 468-471.

LITERATURVERZEICHNIS

387. Ishibashi, S., et al., Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery. *The Journal of Clinical Investigation*, 1993. 92(2): p. 883-893.
388. Ishibashi, S., et al., Massive xanthomatosis and atherosclerosis in cholesterol-fed low density lipoprotein receptor-negative mice. *The Journal of Clinical Investigation*, 1994. 93(5): p. 1885-1893.
389. Palinski, W., et al., Increased Autoantibody Titers Against Epitopes of Oxidized LDL in LDL Receptor-Deficient Mice With Increased Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1995. 15(10): p. 1569-1576.
390. Merat, S., et al., Western-Type Diets Induce Insulin Resistance and Hyperinsulinemia in LDL Receptor-Deficient Mice But Do Not Increase Aortic Atherosclerosis Compared With Normoinsulinemic Mice in Which Similar Plasma Cholesterol Levels Are Achieved by a Fructose-Rich Diet. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1999. 19(5): p. 1223-1230.
391. Schreyer, S.A., et al., LDL receptor but not apolipoprotein E deficiency increases diet-induced obesity and diabetes in mice. *American Journal of Physiology - Endocrinology And Metabolism*, 2002. 282(1): p. E207-E214.
392. Gao, J., et al., Involvement of Apolipoprotein E in Excess Fat Accumulation and Insulin Resistance. *Diabetes*, 2007. 56(1): p. 24-33.
393. Hofmann, S.M., et al., Defective Lipid Delivery Modulates Glucose Tolerance and Metabolic Response to Diet in Apolipoprotein E-Deficient Mice. *Diabetes*, 2008. 57(1): p. 5-12.
394. Farrell, G.C. and C.Z. Larter, Nonalcoholic fatty liver disease: From steatosis to cirrhosis. *Hepatology*, 2006. 43(S1): p. S99-S112.
395. Ip, E., et al., Central role of PPAR α -dependent hepatic lipid turnover in dietary steatohepatitis in mice. *Hepatology*, 2003. 38(1): p. 123-132.
396. Flock, G., et al., Incretin receptors for glucagon-like peptide 1 and glucose-dependent insulinotropic polypeptide are essential for the sustained metabolic actions of vildagliptin in mice. *Diabetes*, 2007. 56(12): p. 3006-13.
397. Raun, K., et al., Liraglutide, a long-acting glucagon-like peptide-1 analog, reduces body weight and food intake in obese candy-fed rats, whereas a dipeptidyl peptidase-IV inhibitor, vildagliptin, does not. *Diabetes*, 2007. 56(1): p. 8-15.
398. Liu, X., et al., Effects of long-term dipeptidyl peptidase-IV inhibition on body composition and glucose tolerance in high fat diet-fed mice. *Life Sciences*, 2009. 84(25-26): p. 876-881.
399. Dobrian, A.D., et al., Dipeptidyl peptidase-4 inhibitor sitagliptin reduces local inflammation in adipose tissue and in pancreatic islets of obese mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2010.

LITERATURVERZEICHNIS

400. Lamont, B.J. and D.J. Drucker, Differential Antidiabetic Efficacy of Incretin Agonists Versus DPP-4 Inhibition in High Fat-Fed Mice. *Diabetes*, 2008. 57(1): p. 190-198.
401. Souza-Mello, V., et al., Comparative effects of telmisartan, sitagliptin and metformin alone or in combination on obesity, insulin resistance, and liver and pancreas remodelling in C57BL/6 mice fed on a very high-fat diet. *Clinical Science*, 2010. 119(6): p. 239-50.
402. Ben-Shlomo, S., et al., Glucagon-like peptide-1 reduces hepatic lipogenesis via activation of AMP-activated protein kinase. *Journal of hepatology*, 2011. 54(6): p. 1214-1223.
403. Samuel, V.T., et al., Fasting hyperglycemia is not associated with increased expression of PEPCK or G6Pc in patients with Type 2 Diabetes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2009. 106(29): p. 12121-12126.
404. Gedulin, B.R., et al., Exenatide (exendin-4) improves insulin sensitivity and β -cell mass in insulin-resistant obese fa/fa Zucker rats independent of glycemia and body weight. *Endocrinology*, 2005. 146(4): p. 2069-76.
405. Irwin, et al., Metabolic effects of sustained activation of the GLP-1 receptor alone and in combination with background GIP receptor antagonism in high fattfed mice. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 2009. 11: p. 603-610.
406. Gault, V.A., et al., Chemical Ablation of Gastric Inhibitory Polypeptide Receptor Action by Daily (Pro³)GIP Administration Improves Glucose Tolerance and Ameliorates Insulin Resistance and Abnormalities of Islet Structure in Obesity-Related Diabetes. *Diabetes*, 2005. 54(8): p. 2436-2446.
407. Gault, V., et al., Chemical gastric inhibitory polypeptide receptor antagonism protects against obesity, insulin resistance, glucose intolerance and associated disturbances in mice fed high-fat and cafeteria diets. *Diabetologia*, 2007. 50(8): p. 1752-1762.
408. Irwin, N., et al., Early administration of the glucose-dependent insulinotropic polypeptide receptor antagonist (Pro³)GIP prevents the development of diabetes and related metabolic abnormalities associated with genetically inherited obesity in *ob/ob* mice. *Diabetologia*, 2007. 50(7): p. 1532-1540.
409. Sudre, B., et al., Chronic inhibition of circulating dipeptidyl peptidase IV by FE 999011 delays the occurrence of diabetes in male Zucker diabetic fatty rats. *Diabetes*, 2002. 51(5): p. 1461-9.
410. Pospisilik, J.A., et al., Dipeptidyl peptidase IV inhibitor treatment stimulates β -cell survival and islet neogenesis in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes*, 2003. 52(3): p. 741-50.
411. Matsuyama-Yokono, A., et al., Chronic inhibition of dipeptidyl peptidase-IV with ASP8497 improved the HbA(1c) level, glucose intolerance, and lipid parameter level in streptozotocin-nicotinamide-induced diabetic mice. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2009. 379(2): p. 191-9.

LITERATURVERZEICHNIS

412. Ferreira, L., et al., Effects of sitagliptin treatment on dysmetabolism, inflammation, and oxidative stress in an animal model of type 2 diabetes (ZDF rat). *Mediators Inflamm*, 2010. 2010: p. 592760.
413. Tremblay, A.J., et al., Effect of sitagliptin therapy on postprandial lipoprotein levels in patients with type 2 diabetes. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 2011: p. no-no.
414. Qin, X., et al., GLP-1 reduces intestinal lymph flow, triglyceride absorption, and apolipoprotein production in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2005. 288(5): p. G943-949.
415. Hsieh, J., et al., The glucagon-like peptide 1 receptor is essential for postprandial lipoprotein synthesis and secretion in hamsters and mice. *Diabetologia*, 2010. 53(3): p. 552-561.
416. Maiztegui, B., et al., Sitagliptin prevents the development of metabolic and hormonal disturbances, increased β -cell apoptosis and liver steatosis induced by a fructose-rich diet in normal rats. *Clinical Science*, 2011. 120(2): p. 73-80.
417. Kirino, Y., et al., Interrelationship of dipeptidyl peptidase IV (DPP4) with the development of diabetes, dyslipidaemia and nephropathy: a streptozotocin-induced model using wild-type and DPP4-deficient rats. *J Endocrinol*, 2009. 200(1): p. 53-61.
418. Sato, Y., et al., Role of dipeptidyl peptidase IV (DPP4) in the development of dyslipidemia: DPP4 contributes to the steroid metabolism pathway. *Life Sciences*, 2011. 88(1-2): p. 43-49.
419. McClean, P.L., et al., GIP receptor antagonism reverses obesity, insulin resistance, and associated metabolic disturbances induced in mice by prolonged consumption of high-fat diet. *American Journal of Physiology - Endocrinology And Metabolism*, 2007. 293(6): p. E1746-E1755.
420. Okamoto, Y., et al., Adiponectin: a key adipocytokine in metabolic syndrome. *Clin Sci (Lond)*, 2006. 110(3): p. 267-78.
421. Rull, A., et al., Hepatic monocyte chemoattractant protein-1 is upregulated by dietary cholesterol and contributes to liver steatosis. *Cytokine*, 2009. 48(3): p. 273-279.
422. Gu, L., et al., Absence of Monocyte Chemoattractant Protein-1 Reduces Atherosclerosis in Low Density Lipoprotein Receptor Deficient Mice. *Molecular cell*, 1998. 2(2): p. 275-281.
423. Aiello, R.J., et al., Monocyte Chemoattractant Protein-1 Accelerates Atherosclerosis in Apolipoprotein E-Deficient Mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1999. 19(6): p. 1518-1525.

LITERATURVERZEICHNIS

424. Branen, L., et al., Inhibition of Tumor Necrosis Factor- α Reduces Atherosclerosis in Apolipoprotein E Knockout Mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004. 24(11): p. 2137-2142.
425. Canault, M., et al., Progression of atherosclerosis in ApoE-deficient mice that express distinct molecular forms of TNF- α . *The Journal of Pathology*, 2008. 214(5): p. 574-583.
426. Matsubara, J., et al., A Dipeptidyl Peptidase-4 Inhibitor, Des-Fluoro-Sitagliptin, Improves Endothelial Function and Reduces Atherosclerotic Lesion Formation in Apolipoprotein E-Deficient Mice. *J Am Coll Cardiol*, 2012. 59(3): p. 265-276.
427. Iwai, T., et al., Glucagon-like peptide-1 inhibits LPS-induced IL-1 β production in cultured rat astrocytes. *Neuroscience Research*, 2006. 55(4): p. 352-360.
428. Hahm, E., Y.S. Lee, and H.S. Jun, Suppressive effects of glucagon-like peptide-1 on interferon-gamma-induced nitric oxide production in insulin-producing cells is mediated by inhibition of tumor necrosis factor- α production. *J Endocrinol Invest*, 2008. 31(4): p. 334-40.
429. Ta, N.N., et al., DPP-4 (CD26) Inhibitor Alogliptin Inhibits Atherosclerosis in Diabetic Apolipoprotein E-Deficient Mice. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 2011. 58(2): p. 157-166 10.1097/FJC.0b013e31821e5626.
430. Reaven, P., et al., Effect of Streptozotocin-Induced Hyperglycemia on Lipid Profiles, Formation of Advanced Glycation Endproducts in Lesions, and Extent of Atherosclerosis in LDL Receptor-Deficient Mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1997. 17(10): p. 2250-2256.
431. Goldberg, I.J. and H.M. Dansky, Diabetic Vascular Disease: An Experimental Objective. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006. 26(8): p. 1693-1701.
432. Coenen, K.R. and A.H. Hasty, Obesity potentiates development of fatty liver and insulin resistance, but not atherosclerosis, in high-fat diet-fed agouti LDLR-deficient mice. *American Journal of Physiology - Endocrinology And Metabolism*, 2007. 293(2): p. E492-E499.
433. Gerstein, H.C., et al., Effects of intensive glucose lowering in type 2 diabetes. *N Engl J Med*, 2008. 358(24): p. 2545-59.
434. Patel, A., et al., Intensive Blood Glucose Control and Vascular Outcomes in Patients with Type 2 Diabetes. *New England Journal of Medicine*, 2008. 358(24): p. 2560-2572.
435. Holman, R.R., et al., 10-Year Follow-up of Intensive Glucose Control in Type 2 Diabetes. *New England Journal of Medicine*, 2008. 359(15): p. 1577-1589.
436. Oh, S., et al., GLP-1 Gene Delivery for the Treatment of Type 2 Diabetes. *Mol Ther*, 2003. 7(4): p. 478-483.
437. Choi, S., et al., Glucagon-like Peptide-1 Plasmid Construction and Delivery for the Treatment of Type 2 Diabetes. *Mol Ther*, 2005. 12(5): p. 885-891.

LITERATURVERZEICHNIS

438. Lee, M., et al., An efficient GLP-1 expression system using two-step transcription amplification. *Journal of Controlled Release*, 2006. 115(3): p. 316-321.
439. Flint, A., et al., Influence of hepatic impairment on pharmacokinetics of the human GLP-1 analogue, liraglutide. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 2010. 70(6): p. 807-814.
440. Abu-Hamdah, R., et al., The Extrapancreatic Effects of Glucagon-Like Peptide-1 and Related Peptides. *J Clin Endocrinol Metab*, 2009. 94(6): p. 1843-1852.
441. Tomas, E. and J.F. Habener, Insulin-like actions of glucagon-like peptide-1: a dual receptor hypothesis. *Trends Endocrinol Metab*, 2010. 21(2): p. 59-67.
442. Widmann, C., W. Dolci, and B. Thorens, Desensitization and phosphorylation of the glucagon-like peptide-1 (GLP- 1) receptor by GLP-1 and 4-phorbol 12-myristate 13-acetate. *Mol Endocrinol*, 1996. 10(1): p. 62-75.
443. Baggio, L.L., J.-G. Kim, and D.J. Drucker, Chronic Exposure to GLP-1R Agonists Promotes Homologous GLP-1 Receptor Desensitization In Vitro but Does Not Attenuate GLP-1R-Dependent Glucose Homeostasis In Vivo. *Diabetes*, 2004. 53(suppl 3): p. S205-S214.
444. Fehmann, H.-C., et al., Ligand-Induced Regulation of Glucagon-like Peptide-1 Receptor Function and Expression in Insulin-Secreting [beta] Cells. *Pancreas*, 1996. 13(3): p. 273-282.
445. Edwards, C.M., et al., Exendin-4 reduces fasting and postprandial glucose and decreases energy intake in healthy volunteers. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2001. 281(1): p. E155-61.
446. Park, C.W., et al., Long-term treatment of glucagon-like peptide-1 analog exendin-4 ameliorates diabetic nephropathy through improving metabolic anomalies in db/db mice. *J Am Soc Nephrol*, 2007. 18(4): p. 1227-38.
447. Cummings, B.P., et al., Chronic administration of the glucagon-like peptide-1 analog, liraglutide, delays the onset of diabetes and lowers triglycerides in UCD-T2DM rats. *Diabetes*, 2010. 59(10): p. 2653-61.
448. Young, A.A., et al., Glucose-lowering and insulin-sensitizing actions of exendin-4: studies in obese diabetic (ob/ob, db/db) mice, diabetic fatty Zucker rats, and diabetic rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). *Diabetes*, 1999. 48(5): p. 1026-1034.
449. Kohn, A.D., et al., Expression of a Constitutively Active Akt Ser/Thr Kinase in 3T3-L1 Adipocytes Stimulates Glucose Uptake and Glucose Transporter 4 Translocation. *Journal of Biological Chemistry*, 1996. 271(49): p. 31372-31378.
450. Wang, Q., et al., Protein Kinase B/Akt Participates in GLUT4 Translocation by Insulin in L6 Myoblasts. *Mol. Cell. Biol.*, 1999. 19(6): p. 4008-4018.
451. Cross, D.A.E., et al., Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature*, 1995. 378(6559): p. 785-789.

LITERATURVERZEICHNIS

452. van Weeren, P.C., et al., Essential Role for Protein Kinase B (PKB) in Insulin-induced Glycogen Synthase Kinase 3 Inactivation. *Journal of Biological Chemistry*, 1998. 273(21): p. 13150-13156.
453. Czech, M.P., Insulin's expanding control of forkheads. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2003. 100(20): p. 11198-11200.
454. Wettergren, A., M. Wojdemann, and J.J. Holst, The Inhibitory Effect of Glucagon-Like Peptide-1 (7-36)amide on Antral Motility is Antagonized by Its N-Terminally Truncated Primary Metabolite GLP-1 (9-36)amide. *Peptides*, 1998. 19(5): p. 877-882.
455. Parker, J.C., et al., Effects of sub-chronic exposure to naturally occurring N-terminally truncated metabolites of glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) and glucagon-like peptide-1 (GLP-1), GIP(3-42) and GLP-1(9-36)amide, on insulin secretion and glucose homeostasis in ob/ob mice. *J Endocrinol*, 2006. 191(1): p. 93-100.
456. Trevaskis, J.L., et al., Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) receptor agonism improves metabolic, biochemical and histopathological indices of nonalcoholic steatohepatitis (NASH) in mice. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 2012.
457. Horton, J.D., J.L. Goldstein, and M.S. Brown, SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest*, 2002. 109(9): p. 1125-31.
458. Silverstein, R.L., Inflammation, atherosclerosis, and arterial thrombosis: Role of the scavenger receptor CD36. *Cleveland Clinic Journal of Medicine*, 2009. 76(Suppl 2): p. S27-S30.
459. Miquilena-Colina, M.E., et al., Hepatic fatty acid translocase CD36 upregulation is associated with insulin resistance, hyperinsulinaemia and increased steatosis in non-alcoholic steatohepatitis and chronic hepatitis C. *Gut*.
460. Koonen, D.P.Y., et al., Increased Hepatic CD36 Expression Contributes to Dyslipidemia Associated With Diet-Induced Obesity. *Diabetes*, 2007. 56(12): p. 2863-2871.
461. Zhou, J., et al., Hepatic Fatty Acid Transporter Cd36 Is a Common Target of LXR, PXR, and PPAR γ in Promoting Steatosis. *Gastroenterology*, 2008. 134(2): p. 556-567.e1.
462. Espirito Santo, S.M.S., et al., Hepatic low-density lipoprotein receptor-related protein deficiency in mice increases atherosclerosis independent of plasma cholesterol. *Blood*, 2004. 103(10): p. 3777-3782.
463. Matsuo, M., ATP-binding cassette proteins involved in glucose and lipid homeostasis. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2010. 74(5): p. 899-907.

LITERATURVERZEICHNIS

464. Kennedy, M.A., et al., ABCG1 has a critical role in mediating cholesterol efflux to HDL and preventing cellular lipid accumulation. *Cell metabolism*, 2005. 1(2): p. 121-131.
465. Yu, L., et al., Disruption of Abcg5 and Abcg8 in mice reveals their crucial role in biliary cholesterol secretion. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2002. 99(25): p. 16237-16242.
466. Gilardi, F., et al., The pharmacological exploitation of cholesterol 7[alpha]-hydroxylase, the key enzyme in bile acid synthesis: from binding resins to chromatin remodelling to reduce plasma cholesterol. *Pharmacology & Therapeutics*, 2007. 116(3): p. 449-472.
467. Spady, D.K., et al., Overexpression of Cholesterol 7 α -Hydroxylase (CYP7A) in Mice Lacking the Low Density Lipoprotein (LDL) Receptor Gene. *Journal of Biological Chemistry*, 1998. 273(1): p. 126-132.
468. Miyake, J.H., et al., Transgenic Expression of Cholesterol-7-{alpha}-Hydroxylase Prevents Atherosclerosis in C57BL/6J Mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2002. 22(1): p. 121-126.
469. Ratliff, E.P., A. Gutierrez, and R.A. Davis, Transgenic expression of CYP7A1 in LDL receptor-deficient mice blocks diet-induced hypercholesterolemia. *Journal of Lipid Research*, 2006. 47(7): p. 1513-1520.
470. Erickson, S.K., et al., Hypercholesterolemia and changes in lipid and bile acid metabolism in male and female cyp7A1-deficient mice. *Journal of Lipid Research*, 2003. 44(5): p. 1001-1009.
471. Davis, H.R., Jr, et al., Deficiency of Niemann-Pick C1 Like 1 Prevents Atherosclerosis in ApoE^{-/-} Mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007. 27(4): p. 841-849.
472. Jiao, R., et al., Hypocholesterolemic activity of grape seed proanthocyanidin is mediated by enhancement of bile acid excretion and up-regulation of CYP7A1. *The Journal of nutritional biochemistry*, 2010. 21(11): p. 1134-1139.
473. Tan, K.C.B., Reverse cholesterol transport in type 2 diabetes mellitus. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 2009. 11(6): p. 534-543.
474. Wynn, T.A. and L. Barron, Macrophages: master regulators of inflammation and fibrosis. *Semin Liver Dis*, 2010. 30(3): p. 245-57.
475. Ip, E., et al., Administration of the potent PPAR α agonist, Wy-14,643, reverses nutritional fibrosis and steatohepatitis in mice. *Hepatology*, 2004. 39(5): p. 1286-1296.
476. Sahai, A., et al., Upregulation of osteopontin expression is involved in the development of nonalcoholic steatohepatitis in a dietary murine model. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 2004. 287(1): p. G264-G273.

LITERATURVERZEICHNIS

477. Van Gaal, L.F., I.L. Mertens, and C.E. De Block, Mechanisms linking obesity with cardiovascular disease. *Nature*, 2006. 444(7121): p. 875-880.
478. Li, L., et al., Glucagon-like peptide-1 protects beta cells from cytokine-induced apoptosis and necrosis: role of protein kinase B. *Diabetologia*, 2005. 48(7): p. 1339-1349.
479. Nagashima, M., et al., Native incretins prevent the development of atherosclerotic lesions in apolipoprotein E knockout mice. *Diabetologia*, 2011. 54(10): p. 2649-2659.
480. Ishibashi, Y., et al., Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) inhibits advanced glycation end product (AGE)-induced up-regulation of VCAM-1 mRNA levels in endothelial cells by suppressing AGE receptor (RAGE) expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2010. 391(3): p. 1405-1408.
481. Silverstein, R.L., et al., Mechanisms of cell signaling by the scavenger receptor CD36: implications in atherosclerosis and thrombosis. *Trans Am Clin Climatol Assoc*, 2010. 121: p. 206-20.
482. Febbraio, M., et al., Targeted disruption of the class B scavenger receptor CD36 protects against atherosclerotic lesion development in mice. *The Journal of Clinical Investigation*, 2000. 105(8): p. 1049-1056.
483. Ban, K., et al., Glucagon-like peptide (GLP)-1(9-36)amide-mediated cytoprotection is blocked by exendin(9-39) yet does not require the known GLP-1 receptor. *Endocrinology*, 2010. 151(4): p. 1520-31.
484. Unniappan, S., et al., Effects of dipeptidyl peptidase IV on the satiety actions of peptide YY. *Diabetologia*, 2006. 49(8): p. 1915-1923.
485. Sexton, P.M., et al., Complexing Receptor Pharmacology. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2006. 1070(1): p. 90-104.

ANHANG

VII ANHANG

1 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AAV	Adeno-assoziierte Viren
Abca-1	ATP-binding cassette transporter-1
Acat-2	Acyl-CoA-Cholesterin-Acyltransferase-2
AGEs	advanced glycosylation endproducts
AHA/NHLBI	American Heart Association; National Heart, Lung, and Blood Institute
ALAT	Alanin-Aminotransferase
Apo	Apolipoprotein
ASAT	Aspartat-Aminotransferase
AUC	area under the curve
BE	Blutentnahme
BGH-PolyA	bovine growth hormone polyadenylation signal
BSA	bovine serum albumin
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CETP	Cholesterinester-Transferprotein
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
CGRP	calcitonin gene related peptide
CMV	Cytomegalovirus
CRP	C-reaktives Protein
Cyp7A1	Cholesterol 7 α -Hydroxylase
DIRKO	double incretin receptor knockout
DPP4	Dipeptidylpeptidase-4
DTT	Dithiothreitol

ANHANG

eGFP	enhanced green fluorescent protein
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
Fasn	Fettsäure-Synthase
FBS	fötales bovines Serum
FDA	Food and Drug Administration
fFS	freie Fettsäuren
FGFR-1	Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptor 1
FPLC	fast protein liquid chromatography
G6P	Glukose-6-Phosphatase
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GC	Gesamtcholesterin
GGT	γ -Glutamyl-Transferase
GIP	Glucose-dependent insulintropic Polypeptide
GLP-1	Glucagon-like Peptide-1
GLP-1R	GLP-1 Rezeptor
GLP-2	Glucagon-like Peptide-2
GRP	gastrin releasing peptide
GRPP	glicentin-related pancreatic peptide
GTT	Glukosetoleranztest
H	Stunde
HDL	high density lipoprotein
HDL-C	HDL-Cholesterin
HEK	human embryonic kidney
HFD	Hochfettdiät
HGFR	Hepatozyten-Wachstumsfaktor-Rezeptor

ANHANG

HL	hepatische Lipase
HMG-CoA-Reduktase	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase
HOMA	Homeostasis Model Assessment
HSPG	Heparansulfat-Proteoglykan
ICAM-1	intercellular adhesion molecule-1
IDF	International Diabetes Federation
IDL	intermediate density lipoprotein
IL-1 β	Interleukin-1 β
IL-6	Interleukin-6
ip	intraperitoneal
IP1 / 2	intervening peptide 1 / 2
IR	Insulinresistenz
ITR	inverted terminal repeat
ITT	Insulintoleranztest
LCAT	Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase
LDL	low density lipoprotein
LDL-Rezeptor ^{-/-}	low density lipoprotein receptor knockout
LPL	Lipoproteinlipase
Lrp1	LDL-Receptor-related Protein 1
Lss	Lanosterol Synthase
LXR	Liver X Receptor
MCD	Methionin-Cholin-defizient
MCP-1	Monocyte Chemotactic Protein-1
MCS	multiple cloning site
M-CSF	macrophage colony-stimulating factor

ANHANG

MetS	metabolisches Syndrom
Min	Minute
MPGF	major pancreatic proglucagon fragment
MTP	microsomal triglycerid transfer protein
MW	Mittelwert
NAFL	non-alcoholic fatty liver
NAFLD	non-alcoholic fatty liver disease
NASH	non-alcoholic steatohepatitis
NPC1L1	Niemann-Pick C1 Like 1 Protein
ORF	open reading frame
oxLDL	oxidiertes LDL
PBS	phosphate buffered saline
PC1/3	Prohormonconvertase 1/3
PC2	Prohormonconvertase 2
PCR	polymerase chain reaction
PDX-1	pancreatic and duodenal homeobox gene 1
PEI	Polyethylenimin
PEPCK	Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase
PPAR γ	peroxisome proliferator-activated receptor gamma
PYY	Peptid YY
rAAV	rekombinante Adeno-assoziierte Viren
RAGE	receptor of advanced glycosylation endproducts
RAMP's	receptor activity modifying proteins
rCt	reverser Cholesterintransport
ROS	reactive oxygen species

ANHANG

RT	Raumtemperatur
Scarb-1	Scavenger Receptor Class B Member 1
SDF-1	stromal cell-derived factor-1
SDS	sodium dodecylsulfat
SEAP	sekretierte alkalische Phosphatase
Sec	Sekunde
SEM	standard error of the mean
SNP	single nucleotide polymorphism
Sqle	Squalen Epoxidase
Srebf-1	Sterol Regulatory Element Binding Factor 1
Srebf-2	Sterol Regulatory Element Binding Factor 2
SV-40	simian virus type 40
T2D	Diabetes mellitus Typ 2
TBG	Thyroxin-bindendes Globulin
TCF7L2	Transkriptionsfaktor 7-like-2
TG	Triglyzeride
TGF-1 β	Transforming Growth Factor-1 β
TIMPs	tissue inhibitors of matrix metalloproteases
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor- α
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule-1
VLDL	very low density lipoprotein
WHO	Weltgesundheitsorganisation
ZDF	zucker diabetic fatty

2 ZUSÄTZLICHE DATEN

Tabelle A 1: Restriktionsmuster der Vektor- und Helferplasmide

Plasmid	Enzym	Restriktionsmuster (bp der Fragmente)
pAAV2.1-TBG-MCS I	Sma I	2873, 1087, 770, 11, 11
	EcoR I	3204, 1256, 292
pAAV2.1-TBG-MCS II	Sma I	2873, 1314, 543, 11, 11
	EcoR I	3204, 1256, 292
pAAV2.1-CMV-MCS	Sma I	2873, 2531, 11, 11
	EcoR I	3204, 838, 809, 575
pAAV2.1-TBG-LacZ	Sma I	4517, 2873, 11, 11
	EcoR I	3916, 3204, 292
pAAV2.1-CMV-LacZ	Sma I	4247, 2873, 11, 11
	EcoR I	3646, 3204, 292
pAAV2.1-CMV-eGFP	EcoR I	3204, 2300
pAAV-2/8	BamH I	3434, 2778, 832, 352
	EcoR I	2997, 2497, 1522, 218, 162
pAd-delta-F6	Hind III	5572, 3012, 2937, 2381, 1522
	EcoR V	3808, 2623, 2542, 2531, 2052, 1255, 613

ANHANG

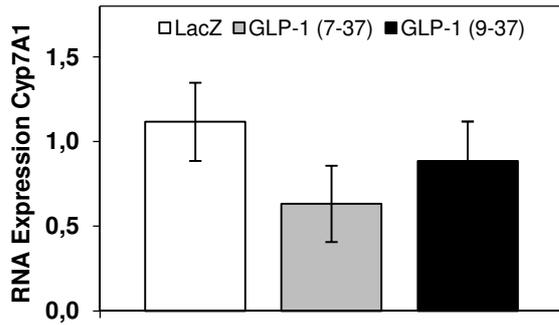


Abbildung A 1: hepatische mRNA Expression der Cholesterol 7 α -Hydroxylase (Cyp7A1) in den C57BL/6 Mäusen auf MCD-Diät (n=5/Gruppe); MW \pm SEM

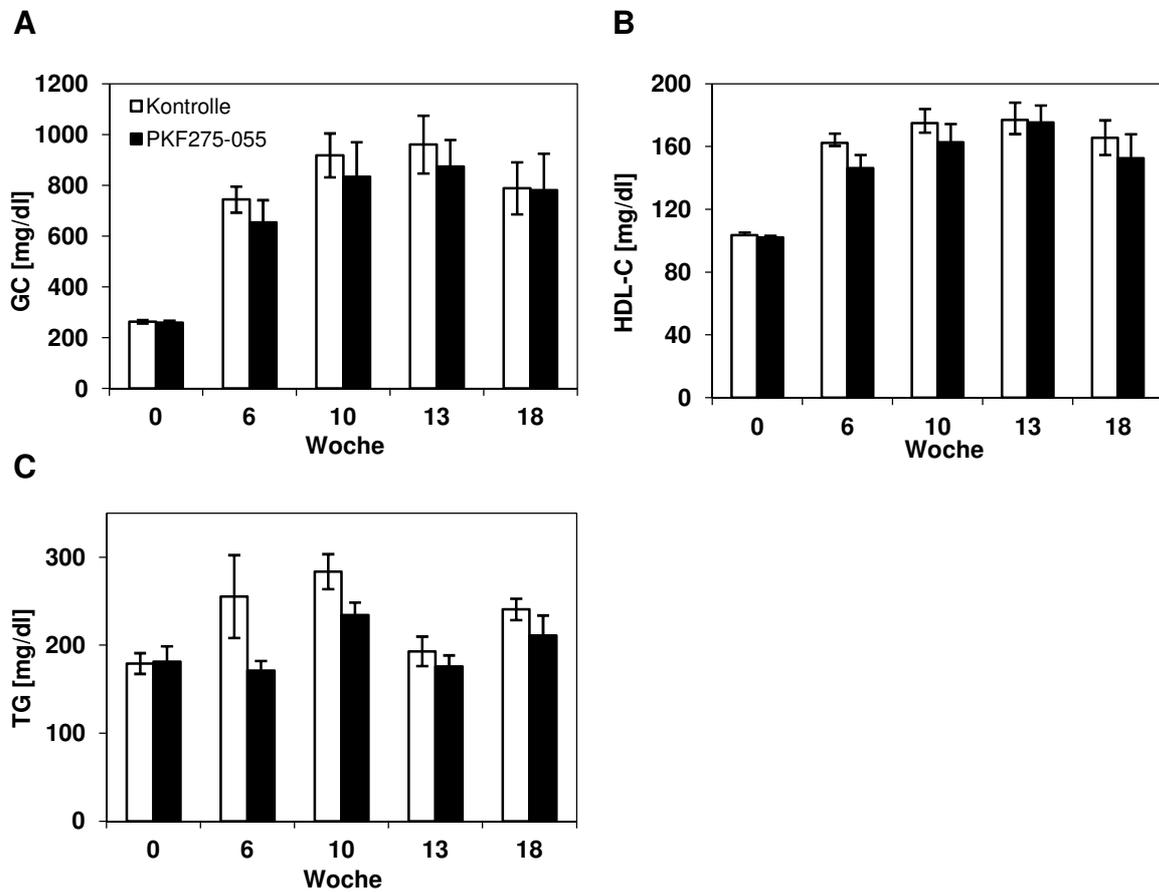


Abbildung A 2: Serumspiegel (A) des Gesamtcholesterin (GC), (B) des HDL-Cholesterin (HDL-C) und (C) der Triglyzeride (TG) über 18 Wochen PKF275-055-Intervention bei LDL-Rezeptor^{-/-} Mäusen (n=15/Gruppe); MW \pm SEM

ANHANG

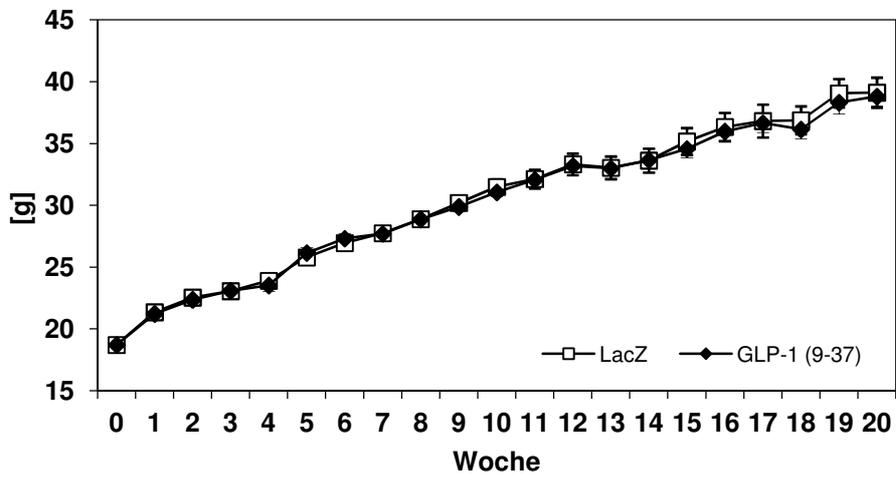
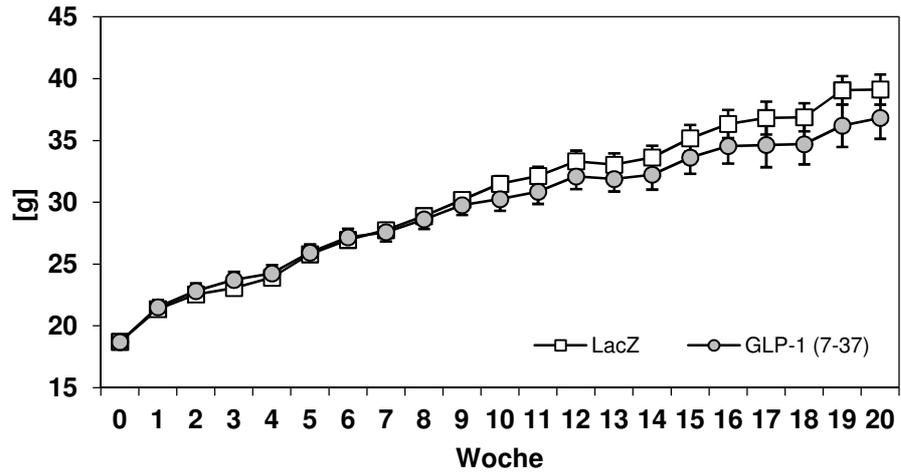
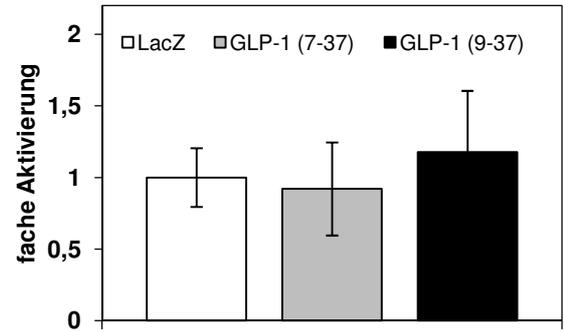
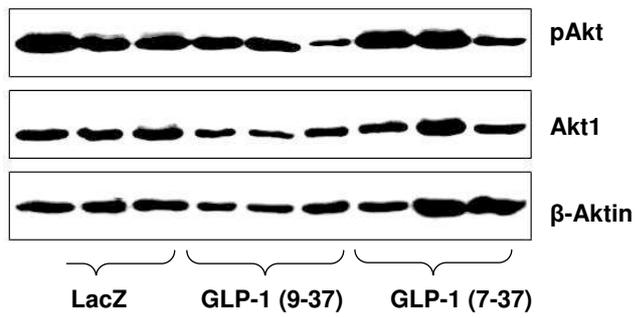


Abbildung A 3: **Gewichtsverlauf der LDL-Rezeptor^{-/-} Mäuse** dargestellt nach Gruppen (n=10-15/Gruppe); MW \pm SEM

A



B

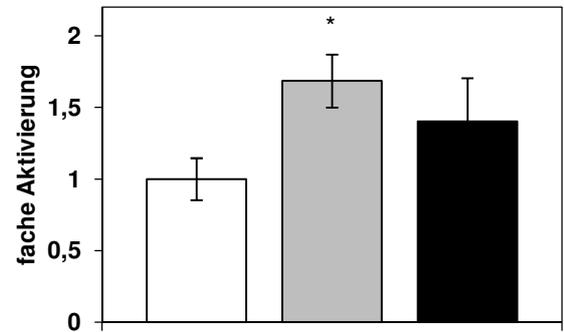
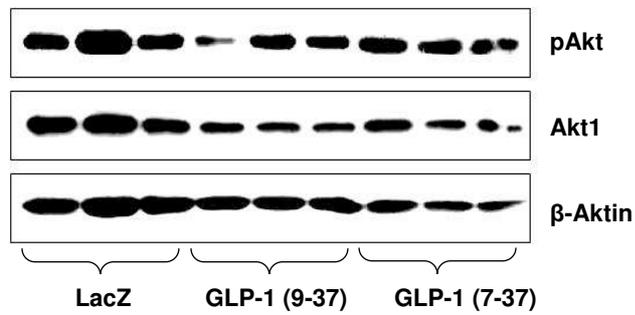


Abbildung A 4: **Aktivierung der Proteinkinase B in (A) Fettgewebe und (B) Muskulatur der LDL-Rezeptor^{-/-} Mäuse**; Western Blot links und densitometrische Auswertung rechts; β -Aktin als Ladekontrolle; MW \pm SEM; * p <0,05 versus LacZ

ANHANG

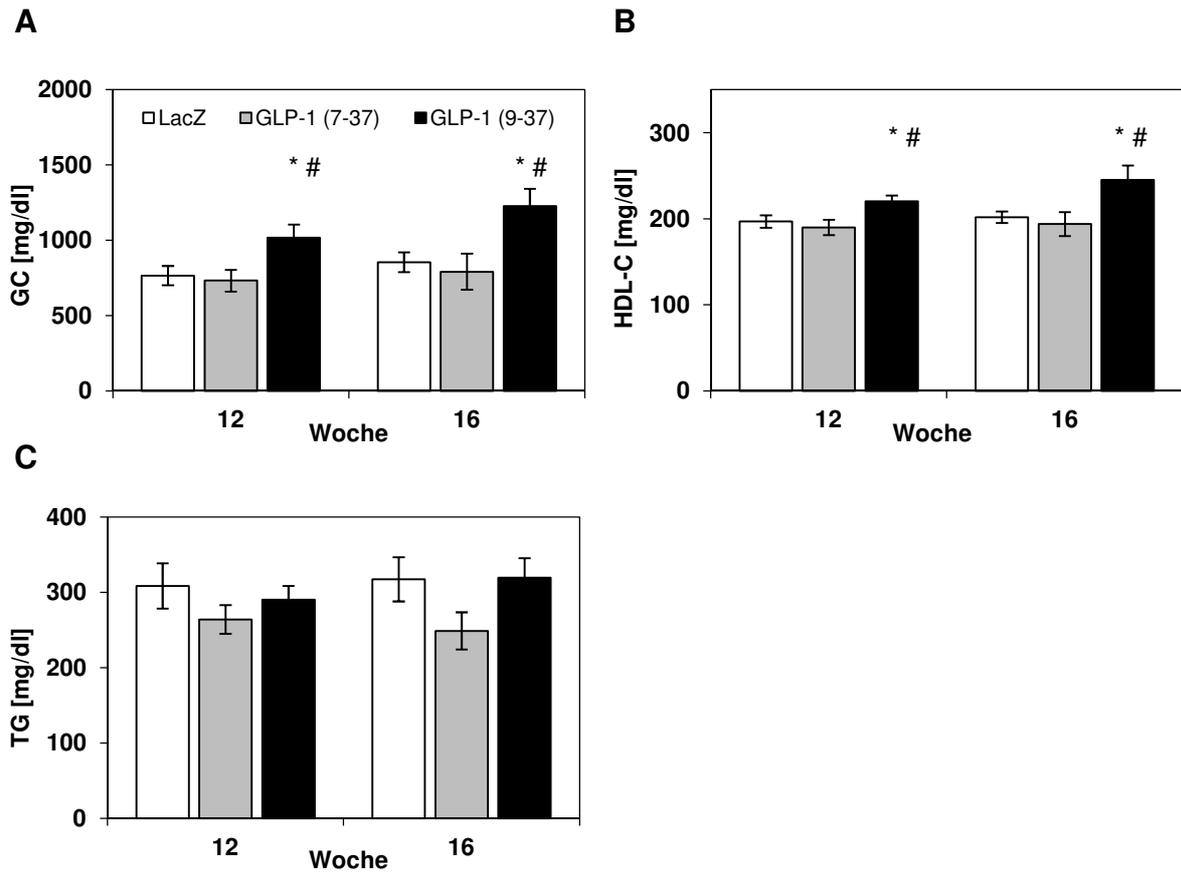


Abbildung A 5: **Lipidprofil der LDL-Rezeptor^{-/-} Mäuse; Serumspiegel (A) des Gesamtcholesterin (GC), (B) des HDL-Cholesterin (HDL-C) und (C) der Triglyzeride (TG)** nach 12 und 16 Wochen post-Vektorinjektion (n=10-15/Gruppe); MW ± SEM; **p*<0,05 versus LacZ; #*p*<0,05 versus GLP-1 (7-37)

3 PUBLIKATIONEN

Piotrowski K, Becker M, Zugwurst J, Biller-Friedmann I, Spöttl G, Möllmann J, Greif M, Leber AW, Becker A, Tailleux A, Laubender RP, Lebherz C, Staels B, Göke B, Marx N, Parhofer KG, Brödl UC, Lehrke M. GLP-1 metabolite (9-37) increases atherosclerotic lesions in mice and is associated with coronary atherosclerosis in humans. *In Revision für Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*

Becker M, **Rabe K**, Lebherz C, Zugwurst J, Göke B, Parhofer KG, Lehrke M, Brödl UC. Expression of human chemerin induces insulin resistance in the skeletal muscle but does not affect weight, lipid levels, and atherosclerosis in LDL receptor knockout mice on high-fat diet. *Diabetes* 2010; 59: 2898-2903

Rabe K, Lehrke M, Parhofer KG, Broedl UC. Adipokines and insulin resistance. *Mol Med* 2008; 14: 741-751

Brödl UC, **Rabe K**, Parhofer KG. Fettstoffwechselstörung bei Metabolischem Syndrom. Interdisziplinäre Falldiskussion. *Diabetes, Stoffwechsel und Herz* 2008; 1: 59-64

Freie Vorträge und Poster:

Piotrowski K, Becker M, Zugwurst J, Biller-Friedmann I, Spöttl G, Möllmann J, Greif M, Leber AW, Becker A, Tailleux A, Laubender RP, Lebherz C, Staels B, Göke B, Marx N, Parhofer KG, Brödl UC, Lehrke M. The GLP-1 metabolite GLP 9-37 increases atherosclerotic lesions in mice and is associated with coronary atherosclerosis in humans. 78. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie, Mannheim, April 2012

Lehrke M, **Piotrowski K**, El-aouni C, Becker M, Helbig S, Parhofer KG, Broedl UC, Boecksteger P, Lebherz C. Overexpression of Fetuin A in LDL receptor deficient mice induces dyslipidemia, impaired glucose tolerance and increased atherosclerosis. 25.

ANHANG

Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Atheroskleroseforschung, Blaubeuren, März 2011

Rabe K, Becker M, Bureik D, Zugwurst J, Göke B, Parhofer KG, Brödl UC, Lehrke M. DPP4-Inhibition verbessert die Glukosehomöostase, reduziert jedoch nicht die Atheroskleroseentstehung in LDL-Rezeptor-defizienten Mäusen. 45. Jahrestagung der Deutschen Diabetes Gesellschaft, Stuttgart, Mai 2010

Auszeichnung:

“Michaela Modan Memorial Award” für den Abstrakt/Vortrag: The GLP-1 Metabolite GLP 9-37 Increases Atherosclerotic Lesions in Mice and is Associated with Coronary Atherosclerosis in Humans. (**Piotrowski K**, Becker M, Zugwurst J, Biller-Friedmann I, Spöttl G, Möllmann J, Greif M, Leber AW, Becker A, Tailleux A, Laubender RP, Lebherz C, Staels B, Göke B, Marx N, Parhofer KG, Brödl UC, Lehrke M), Vergabe durch die American Diabetes Association, 72nd Scientific Sessions, Philadelphia, Juni 2012

4 DANKSAGUNG

An erster Stelle danke ich Herrn Prof. Dr. med. Burkhard Göke für die Möglichkeit, meine Promotion in der Medizinischen Klinik II am Klinikum der Universität München-Großhadern durchzuführen. Bei Herrn Prof. Dr. med. Klaus Parhofer bedanke ich mich für die Unterstützung bei der Fertigstellung der Arbeit und die Übernahme des Gutachtens.

Mein besonderer Dank gilt meinen Betreuern Dr. Michael Lehrke und Dr. Uli Brödl für die Überlassung des interessanten Themas, die umfassende wissenschaftliche Ausbildung und die freundliche Unterstützung bei theoretischen und praktischen Problemen auf dem Weg zu dieser Arbeit.

Frau Dr. Corinna Lebherz möchte ich für Ihren Einsatz bei der Etablierung der Virusproduktion danken.

Weiterhin bedanke ich mich recht herzlich bei meiner Arbeitsgruppe für all die großen und kleinen Hilfen im Laboralltag und die aufmunternde Arbeitsatmosphäre. Liebe Dani, Julia, Melanie, Inge – vielen Dank für den guten Zusammenhalt und euren Einsatz vorallem an den langen „Maustagen“.

Herzlichst Danke ich meinen Eltern, die mich auf meinem Lebensweg immer mit Vertrauen und Motivation unterstützt haben. Ein besonderes Wort des Dankes richte ich an meinen Mann Eric Piotrowski, der mir immer den Rücken frei gehalten hat und mich stets bestärkte, wenn ich an mir gezweifelt habe. Ihm und meinen Eltern widme ich diese Arbeit.