

Gliptin-vermittelte Regeneration nach  
akuter endothelialer Schädigung  
im *Glp1r<sup>-/-</sup>* Mausmodell

von Friederike Charlotte Remm



Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität  
München

Gliptin-vermittelte Regeneration nach akuter endothelialer  
Schädigung  
im *Glp1r*<sup>-/-</sup> Mausmodell

von Friederike Charlotte Remm  
aus Ulm  
München 2018



Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Molekulare Tierzucht und Biotechnologie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von: Univ.-Prof. Dr. Eckhard Wolf

Angefertigt an der Medizinischen Universität Innsbruck,  
Univ.-Klinik für Innere Medizin III – Kardiologie und Angiologie

Mentor: Priv.-Doz. Dr. med. Christoph Brenner



**Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians Universität München**

**Dekan:** Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

**Berichterstatter:** Univ.-Prof. Dr. Eckhard Wolf

**Korreferent/en:** Univ.-Prof. Dr. Ralf S. Müller

Tag der Promotion: 27.07.2018



Meiner Familie



# Inhalt

1	Einleitung.....	1
2	Literaturübersicht.....	5
2.1	Koronare Herzkrankheit (KHK) .....	5
2.1.1	Pathogenese der Atherosklerose .....	5
2.1.2	Therapieansätze .....	7
2.1.3	Re-stenose und Stentthrombose .....	13
2.2	Progenitorzellen .....	14
2.3	Dipeptidyl-Peptidase 4 .....	15
2.4	SDF1-CXCR4-Achse .....	16
2.5	Rolle der Inkretine .....	19
2.6	Wirkungsmechanismus der Gliptine .....	21
2.7	Atherosklerose im Tiermodell .....	24
3	Zielsetzung.....	27
4	Material und Methoden .....	29
4.1	Versuchstiere.....	29
4.1.1	Gesetzliche Grundlage.....	29
4.1.2	Verwendete Tiere.....	29
4.1.3	Haltungsbedingungen .....	30
4.2	Materialien für die Versuche.....	31
4.2.1	Versuchstier-Zubehör .....	31
4.2.2	DPP4 Aktivitätsbestimmung.....	31
4.2.3	Genotypisierung, Polymerase Kettenreaktion (PCR).....	32
4.2.4	„Carotid Injury“ und “Carotid Harvest” .....	33
4.2.5	Scratch-Assay.....	35
4.2.6	Allgemeine Substanzen und Diverses.....	36
4.3	Methoden.....	37
4.3.1	Versuchstiere.....	37

4.3.2	DPP4-Aktivitätsbestimmung.....	43
4.3.3	„Carotid Injury“ und „Carotid harvest“ .....	50
4.3.4	Reendothelialisierungs-Assay.....	55
4.3.5	Durchflusszytometrie (FACS-Analysen).....	57
4.3.6	Histologie.....	61
4.3.7	Scratch-Assay.....	63
4.3.8	Statistische Versuchsauswertung.....	66
5	Ergebnisse.....	67
5.1	Inhibition der DPP4-Serumaktivität unter oraler Gliptin-Therapie – Nachweis mittels fluorometrischer Aktivitätsmessungen.....	67
5.2	Reendothelialisierungs-Assay.....	67
5.2.1	Etablierung des Reendothelialisierungs-Assays im Labor .....	67
5.2.2	Einfluss der Sitagliptin-Therapie auf die Reendothelialisierung im <i>Glp1r<sup>-/-</sup></i> Mausmodell und C57BL/6 Wildtyp.....	69
5.3	Quantifizierung der rekrutierten Progenitorzellen (CXCR4 <sup>+</sup> CD133 <sup>+</sup> und CXCR4 <sup>+</sup> Flk-1 <sup>+</sup> ).....	71
5.4	Histologische Analysen - Einfluss der Sitagliptin-Therapie auf die Neointimaformation (Weigert-Elastica-van Gieson).....	73
5.5	Quantifizierung der intramuralen Makrophagen und ihrer Subtypen in den Carotiden.....	75
5.6	Scratch-Assay.....	77
5.6.1	Einfluss der SDF1 Konzentration auf die Endothelzellproliferation (HUVEC) nach 24 h77	
6	Diskussion.....	79
6.1	Die verbesserte endotheliale Regeneration nach akutem Endothelschaden im <i>Glp1r<sup>-/-</sup></i> Mausmodell.....	79
6.2	Die verstärkte Rekrutierung zirkulierender Progenitorzellen durch Gliptin-Therapie ist verantwortlich für eine verbesserte Endothelregeneration .....	80
6.3	Die Gliptin-vermittelte endotheliale Regeneration ist unabhängig vom GLP1-Rezeptor-Signalweg.....	82
6.4	SDF1 hat eine direkte pro-proliferative Wirkung auf Gefäßendothelzellen .....	83
6.5	Begründung für die Durchführung der Tierexperimente .....	83
6.6	Limitationen der Arbeit .....	85

6.7	Ausblick.....	86
7	Zusammenfassung.....	89
8	Summary.....	91
	Gliptin-mediated regeneration after acute endothelial injury in the <i>Glp1r<sup>-/-</sup></i> mouse model .....	91
9	Anhang.....	93
	Literaturverzeichnis.....	93
	Danksagung .....	103



## Abkürzungsverzeichnis

7-AAD	7-Actinoaminomycin Farbstoff
A., Aa.	Arteria (deutsch: Arterie), Arteriae
AAV	Adeno Associated Virus
AB	Assay Buffer (DPP4 Activity Kit)
Abb.	Abbildung
ACS	akutes Koronarsyndrom
ADA	Adenosin-Deaminase
AGE	Advanced Glycation End Product
AK	Antikörper
AMC	7-Amino-4-Methyl-Coumarin, AMC-Standard (DPP4 Activity Kit)
ApoE	Apolipoprotein E
<i>ApoE<sup>-/-</sup></i>	Apolipoprotein E knock-out
Aq. ad. inj.	Aqua ad injectabile
Aq. dest.	destilliertes Wasser
ASS	Acetylsalicylsäure
B	Background (DPP4 Activity Kit)
BM SMC	bone-marrow derived smooth muscle cells
bp	Basenpaar, base pair
BSA	Bovine Serum Albumin
BVS	Bioresorbable vascular Scaffold
bzw.	Beziehungsweise
ca.	Circa
CBEM	Center of Biomodels and Experimental Medicine
CD	cluster of differentiation
CH	Carotid Harvest
CI	Carotid Injury
ciPC	circulating Progenitor Cell
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CRP	C-reaktives Protein
CXCR4	CXC-Motiv-Receptor 4
DES	Drug eluting Stent
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPP4 Inhibitoren	DPP4i
EKG	Elektrokardiogramm
Em	Emission
EMA	European Medicines Agency
EPC	Endothelial Progenitor Cell
ES	Embryonale Stammzellen
ESC	European Society of Cardiology
ET	Embryotransfer
Ex	Extinktion
FACS	Fluorescence-Activated Cell Sorting

<i>Fbn1</i> <sup>C1039G+/-</sup>	Fibrillin 1-Mutante
FDA	U.S. Food and Drug Administration
FSC	Forwardscatter
GIP	Glucose-dependent Insulinotropic Polypeptide
Gl., Gll.	Glandula (deutsch: Drüse), Glandulae
GLP1	Glucagon-like Peptide 1
GLP1R	Glucagon-like Peptide 1 Receptor
<i>Glpr1</i> <sup>-/-</sup>	Glucagon-like-peptide 1 knock-out
H <sub>2</sub> O	Wasser
HAEC	human aortic endothelial cell
HDL	high-density-lipoprotein
HUVEC	human umbilical vein endothelial cell
i.p.	Intraperitoneal
i.v.	Intravenös
	International Conference on Harmonisation of Technical Requirements
ICH	for Registration of Pharmaceuticals for Human Use
IDL	intermediate-density-lipoprotein
IFN $\gamma$	Interferon $\gamma$
IL-6	Interleukin 6
Inh.	Inhibitor (DPP4 Activity Kit)
KHK	Koronare Herzerkrankung
LDL	low-density-lipoprotein
<i>Ldlr</i> <sup>-/-</sup>	low-density-lipoprotein-receptor knock-out
M.	Musculus (deutsch: Muskel)
M1	inflammatorischer M1 Makrophagensubtyp
M2	regenerativer M2 Makrophagensubtyp
MMP-9	Matrixmetalloproteinase-9
N.	Nervus (deutsch: Nerv)
n.s.	nicht signifikant
NO	Stickstoff-Monoxid
NZW	New Zealand White Kaninchen
OP	Operation
p.o.	per os
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCI	percutaneous coronary intervention
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PCSK9	proprotein convertase subtilisin/kexin type 9
PK	Positivkontrolle (DPP4 Activity Kit)
PTCA	perkutane transluminale koronare Angioplastie
	Rezeptor/Receptor bzw. für die Formeln des DPP4 Activity Kits "relative
R	fluorometric units"
Re-A	Reendothelialisierungs-Assay
RFU	relative fluorometric units
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur

S	Serum (DPP4 Activity Kit)
s.c.	Subkutan
SDF1	Stromal cell-derived factor 1
SMC	glatte Muskelzelle (smooth muscle cell)
SOPF	Specific and opportunistic pathogene free
SPF	Specific pathogene free
SSC	Sidescatter
T2DM	Diabetes mellitus Typ 2
Tab.	Tabelle
TCR	T-cell-receptor/T-Zell-Rezeptor
TG	Triglyzeride
TNF $\alpha$	Tumor Necrosis Factor $\alpha$
TSchG	Tierschutzgesetz
TVersG	Tierversuchsgesetz
u.A.	unter anderem
VEFG	vascular endothelial growth factor
VEGFR-2	vascular endothelial growth factor receptor 2
WEG	Weigert-Elastica-van-Gieson
<i>WHHL</i>	Watanabe Heritable Hyperlipidemic Kaninchen



## 1 Einleitung

Derzeit sind Herz-Kreislauf-Erkrankungen, trotz sinkender Fallzahlen, die häufigste Todesursache in Deutschland. Mit einem Anteil von 21,3 % hat hier die koronare Herzkrankheit den größten Anteil [1, 2]. Auch weltweit lässt sich ebendieser Trend feststellen [3, 4]. So starben 2015 weltweit ungefähr 17,5 Mio. Menschen allein an Herz-Kreislaufferkrankungen, was einen Anteil von 45% der nichtübertragbaren, chronischen Erkrankungen ausmacht [3]. Die Koronare Herzkrankheit (KHK), die Manifestation der Atherosklerose am Herzen, spielt hierbei mit einer Prävalenz von 6,6% (weibliche Bevölkerung) bzw. 9,6% (männliche Bevölkerung) in Deutschland die größte Rolle [2].

Die Tatsache, dass trotz der heute verfügbaren Therapieoptionen Herz-Kreislauf-Erkrankungen immer noch die häufigste Todesursache in der westlichen Welt darstellen, verdeutlicht, dass weiterhin ein enormer Forschungsbedarf vorhanden ist, um die Behandlungsmöglichkeiten der KHK zu verbessern. Neben den etablierten medikamentösen und interventionellen Therapieformen zur Revaskularisation und zur Vermeidung von Restenosen, werden derzeit weitere vielversprechende Therapeutika erforscht [5, 6]. Hierzu zählen auch Inhibitoren der Dipeptidyl-Peptidase-4 (DPP4), die Gliptine. Die Wirkstoffe dieser Gruppe sind derzeit nur für die orale Blutzuckerkontrolle bei Diabetes mellitus Typ 2 (T2DM) zugelassen. Zahlreiche präklinische Arbeiten versprechen jedoch ein vielfältigeres Therapiespektrum, insbesondere in Hinsicht auf schnellere Endothelregeneration, Atheroskleroseprophylaxe, sowie eine verbesserte Endothelfunktion [7-11].

Eine schnelle Reendothelialisierung nach Verletzung des Gefäßendothels ist notwendig, um die Bildung der sogenannten Neointima zu verhindern. Dieses „Narbgewebe“ der Gefäßwand kann zu Restenosen der Gefäße führen und begünstigt somit die Progression der KHK. Es ist bekannt, dass zirkulierende Progenitorzellen (ciPCs) maßgeblich an der Reendothelialisierung beteiligt sind [12, 13]. Zirkulierende Progenitorzellen, welche insbesondere aus dem Knochenmark stammen [14, 15], können über den sogenannten SDF1-CXCR4-Signalweg in die betroffenen Gefäßareale rekrutiert werden.

SDF1, der Stromal cell-derived-factor 1, wird nach Gefäßverletzung von anhaftenden Thrombozyten und glatten Gefäßmuskelzellen sezerniert [16, 17] und bindet an den CXCR4-

Einleitung

Rezeptor auf der Oberfläche der ciPCs. Hierdurch werden die ciPCs rekrutiert und induzieren in den betroffenen Arealen über parakrine Mechanismen die Regeneration des Endothels [12, 18, 19].

Reguliert wird dieser Signalweg physiologischer Weise durch das Enzym Dipeptidyl-Peptidase 4 (DPP4). Bei diesem handelt es sich um eine Prolyl-Oligopeptidase, zu deren Substraten neben den Inkretinen Glucagon-like Peptide 1/Gastric Inhibitory Polypeptide (GLP1/GIP) auch das Zytokin SDF1 gehört. Durch N-terminale Abspaltung eines Dipeptids (x-Pro) wird die Signalfunktion der Substrate aufgehoben [20, 21]. Folglich haben Gliptine als Inhibitoren der DPP4 einen verstärkenden Einfluss auf diesen Signalweg. Durch die Hemmung des DPP4-bedingten SDF1-Abbaus kann der SDF1-CXCR4-Signalweg verstärkt und die Endothelregeneration so maßgeblich durch Gliptin-Gabe unterstützt werden [9].

Neben der verbesserten Endothelregeneration scheinen Gliptine auch protektive Effekte in der Frühatherosklerose zu vermitteln. Diese basieren zwar ebenfalls auf der SDF1-CXCR4-Achse, allerdings wirken diese in der chronischen Erkrankung der Gefäßwand nicht über eine verstärkte Rekrutierung von Progenitorzellen sondern über eine gezielte Differenzierung von residenten Monozyten hin zu reparativen M2-Makrophagen [7, 22, 23].

Daneben scheint auch das Inkretin GLP1, dessen Abbau bei Patienten mit Diabetes mellitus durch eine Gliptin-Therapie verhindert werden soll, vasoprotektive Effekte zu vermitteln [24, 25]. Neben einer verstärkten NO-Synthese, verminderter Synthese von reaktiven Sauerstoffverbindungen (reactive oxygen species, ROS) und der Cyclooxygenase 2 (COX2)-Aktivität [26] werden von Ceriello *et al.* eine antiinflammatorische Wirkung und verbesserte Endothelfunktion durch GLP1 beschrieben [27]. Somit könnte auch die Stabilisierung von GLP1 durch Inhibition der DPP4 eine mögliche Erklärung für die regenerative Wirkung von Gliptinen nach Endothelverletzungen sein.

Zusätzlich zur Wirkung über die SDF1-CXCR4-Achse könnte das Zytokin SDF1 ferner auch eine direkte Wirkung aufs Gefäßendothel haben. In diversen Vorarbeiten wird dem Molekül eine pro-proliferative Wirkung auf CD34<sup>+</sup> Progenitorzellen, epidermale Progenitorzellen und hämatopoetische Stammzellen sowie auf diverse andere Zelltypen (z.B. Astrozyten) zugesprochen [28-30] [31]. Andere Arbeiten beschreiben außerdem eine pro-angiogenetische Wirkung von SDF1 sowie eine verstärkte SDF1-bedingte Endothelzellmigration [32, 33].

## Einleitung

In dieser Arbeit soll daher geklärt werden, ob die SDF1-CXCR4-Achse wirklich der ausschlaggebende Mechanismus für die Gliptin-Wirkung ist und welchen Anteil der GLP1-Signalweg möglicherweise spielt. Ergänzend hierzu soll die mögliche pro-proliferative Wirkung von SDF1 weitergehend untersucht werden.



## 2 Literaturübersicht

### 2.1 Koronare Herzkrankheit (KHK)

Bei der Koronaren Herzerkrankung (KHK) handelt es sich um eine manifeste Atherosklerose der Herzkranzgefäße. Durch Lipideinlagerungen in der Gefäßwand kommt es im Verlauf der Erkrankung zu einer fortschreitenden Verengung der Herzkranzgefäße. Dies kann klinisch in Form einer Angina pectoris oder einem akuten Myokardinfarkt in Erscheinung treten und ischämische Kardiomyopathien oder Herzrhythmusstörungen zur Folge haben. Neben dieser Form der symptomatischen KHK kann die Verengung der Herzkranzgefäße auch in Form einer stummen, asymptomatischen KHK vorliegen [5, 34, 35].

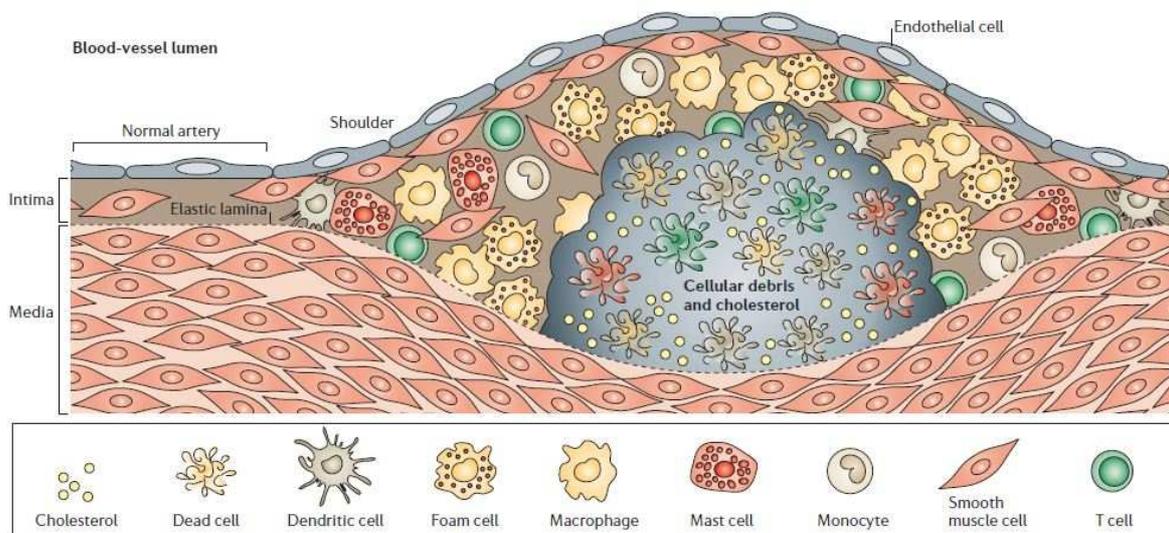
#### 2.1.1 Pathogenese der Atherosklerose

Die Atherosklerose wird als chronisch entzündliche Erkrankung der Gefäße definiert, bei der vor allem mittlere und große Arterien (z.B. Koronararterien und *A. carotis*) betroffen sind. Das Krankheitsgeschehen ist multifaktoriell bedingt, jedoch können einige Hauptrisikofaktoren genannt werden. Hierzu zählen neben alimentär bedingten hohen Plasmacholesterolspiegeln der Bluthochdruck, Diabetes mellitus und Nikotinabusus, wie auch die familiäre Hypercholesterinämie [1, 35-38]. Weiterhin lässt sich Atherosklerose durch das Vorhandensein atherosklerotischer Plaques (siehe Abb. 1) charakterisieren. Bei diesen Plaques handelt es sich um durch Immunreaktionen hervorgerufene asymmetrische Verdickungen der Gefäßwand, welche sich vor allem aus Lipiden, glatten Muskelzellen (smooth muscle cell, SMC), Schaumzellen, Endothelzellen und Leukozyten zusammensetzen [37, 39, 40].

Am Beginn des Krankheitsgeschehens stehen die sogenannten „fatty streaks“, streifige Lipideinlagerungen welche sich zusammen mit Schaumzellen und T-Lymphozyten direkt unter dem Gefäßendothel befinden. Diese „fatty streaks“ können schon im jugendlichen Alter der Patienten entstehen, sind in der Regel symptomlos und können sich auch wieder zurückbilden. Kommt es jedoch zu weiterer Lipidakkumulation in den Gefäßwänden, wird die dort

## Literaturübersicht

ausgelöste Immunreaktion verstärkt und es bilden sich ausgedehnte atherosklerotische Plaques. Durch Veränderungen der physiologischen Hämodynamik und eine geschädigte Barrierefunktion des Gefäßendothels kommt es zur Adhäsion diverser Hämatozyten (z.B. Leukozyten und Thrombozyten) und zur Einwanderung mononukleärer Zellen (v.a. Makrophagen und T-Lymphozyten). Diese Vorgänge führen durch die Expression verschiedener Zytokine (z.B. TNF und IFN $\gamma$ ) und hydrolytischer Enzyme zu einer ausgedehnten, fortschreitenden Immunreaktion, welche zur Formierung eines Plaque Zentrums („Core“) führt. Der „Core“ der Plaques besteht aus Cholesterinestern, -kristallen und Zelldebris. Die zusätzliche Einwanderung von Fibroblasten hat die Formation eines fibrösen Überzugs („fibrosus cap“) zur Folge. In späteren Stadien der Atherosklerose kann es auch zur Kalzifizierung der Plaques kommen, was die Gefäßfunktion durch Versteifung der Arterien weiter einschränkt und somit die Progression der Erkrankung zusätzlich begünstigt [37, 38].



**Abb. 1** Schematische Darstellung eines atherosklerotischen Plaques mit fibrösem Überzug („fibrosus cap“) und nekrotischem Plaque-Zentrum („Core“) in fortgeschrittenem Stadium (nach Hansson et al. [38]).

Über die Jahre hinweg schreitet die Atherosklerose durch die sich selbst erhaltenden Prozesse immer weiter voran, führt nach und nach zu einer Einengung des Gefäßlumens und kann sogar bis hin zu vollständiger Okklusion der betroffenen Gefäße reichen. Geschieht dies in den Koronararterien, zeigen sich bei den betroffenen Patienten die typischen Symptome einer KHK

## Literaturübersicht

wie z.B. beengende Schmerzen im Brustbereich (Angina pectoris) [41]. Des Weiteren kann es zu einer Ruptur atherosklerotischer Plaques („vulnerable Plaques“) kommen. Hierfür ist insbesondere die von Makrophagen sezernierte Matrixmetalloproteinase-9 (MMP-9) verantwortlich. Die Ruptur einer Plaque begünstigt die lokale Formation von Thromben, was einen akuten Gefäßverschluss mit folgendem Myokardinfarkt zur Folge haben kann [41, 42].

Als weiterer Entstehungsmechanismus der Atherosklerose wird der oben beschriebenen Pathogenese aktuell von Haverich ein anderer primärer Stimulus vorangestellt. So soll der Atherosklerose eine Ischämie der Gefäßwand größerer Gefäße durch Obstruktion der *Vasa vasorum* vorangehen, welche in fokalen Gefäßwand-Nekrosen mit folgender endothelialer Dysfunktion resultiert. Diese Obstruktion der *Vasa vasorum* kann ebenfalls durch Nikotinabusus oder Übergewicht bedingt sein. Somit würde es sich bei der Atherosklerose um eine primär mikrovaskuläre Erkrankung handeln, welche sich klinisch in den Versorgungsgebieten der *Vasa vasorum* zeigt und das multifokale Muster ebenfalls erklärt, da meist nur größere Gefäße mit mikrovaskulärer Versorgung an Atherosklerose erkrankt sind. Die Wände kleinerer Gefäße ohne *Vasa vasorum* (z.B. *A. thoracica interna*) werden durch Diffusion versorgt und sind daher laut dieser These nicht von mikrovaskulären Versorgungsstörungen betroffen [43].

### 2.1.2 Therapieansätze

Aufgrund der hohen Lebenszeitprävalenz der KHK und einem vielfältigen Spektrum an Therapieansätzen ist die „Nationale Versorgungsrichtlinie der chronischen KHK“ ein wichtiges Skriptum bei der Versorgung der KHK-Patienten. Die Nationale Versorgungsrichtlinie setzt sich zum Ziel,

- Die krankheitsbezogene Lebensqualität zu verbessern, d.h. Verminderung von AP-Beschwerden und den damit verbundenen somatischen und psychischen Leiden, sowie ein Erhalt der Belastungsfähigkeit
- Die Senkung einer kardiovaskulären Morbidität, des Myokardinfarkttrisikos und das Vermeiden von Herzinsuffizienzen
- Die Reduktion der Sterblichkeit durch die KHK

## Literaturübersicht

Neben medikamentösen und interventionellen Therapiemaßnahmen haben die Präventionsmaßnahmen, Beseitigung der Risikofaktoren und die Änderung des Lebensstils bei dieser Erkrankung einen großen Stellenwert [34].

### *2.1.2.1 Prävention und Lebensstilmodifikationen zur Senkung der Risikofaktoren*

Neben dem Management beeinflussbarer Risikofaktoren müssen bei den Präventionsmaßnahmen und Lebensstilmodifikationen auch unbeeinflussbare Faktoren wie Alter, familiär bedingte Prädispositionen (z.B. Myokardinfarkt oder Apoplex bei nahen Familienangehörigen in einem Alter <60 Jahre) und genetisch bedingte Erkrankungen (familiäre Hypercholesterinämie) frühzeitig erkannt und gezielt gegengesteuert werden [5]. Das Eingreifen auf dieser Ebene hat einen nachweislich positiven Einfluss auf den Verlauf der Erkrankung und ist in jedem Stadium der Erkrankung unerlässlich, sowohl präventiv, als auch in fortgeschrittenen Stadien der Erkrankung. Insbesondere bei nicht beeinflussbaren Risikofaktoren wie der familiären Hypercholesterinämie, kann durch frühzeitiges und gezieltes Eingreifen das Risiko einer Atheroskleroseentstehung deutlich gesenkt werden [35, 44, 45].

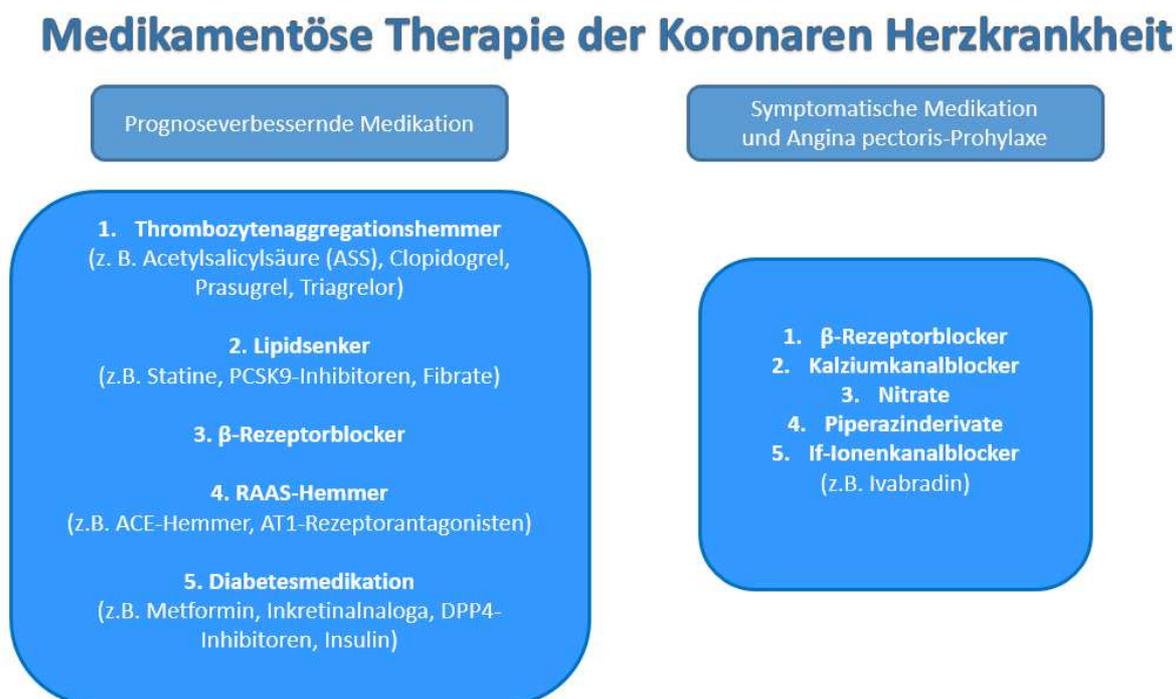
So kann bei Stoffwechselstörungen, wie einer Erhöhung des low-density-lipoprotein (LDL)-Cholesterins oder Diabetes mellitus Typ 2, durch eine Umstellung der Ernährung und gezielte Gewichtsreduktion eine signifikante Risikosenkung in Hinsicht auf kardiovaskuläre Ereignisse und Sterblichkeit erzielt werden [46-49]. Weiterhin sollten im Lebensstil ungesunde Angewohnheiten, wie z.B. Nikotinabusus vollständig unterbunden werden [35, 50]. Auch wird empfohlen, der KHK mit moderatem bis intensivem und regelmäßigem aeroben Training mehrmals pro Woche entgegenzuwirken [34].

Leider sind diese Lebensstilmodifikationen, insbesondere in fortgeschrittenen Stadien der KHK oder auch bei genetisch bedingt stark erhöhten LDL-Serumkonzentrationen (familiäre Hypercholesterinämie), allein oft nicht ausreichend und sollten ggf. um medikamentöse bzw. interventionelle Maßnahmen ergänzt werden [34, 51, 52].

### 2.1.2.2 Medikamentöse Therapie der Koronaren Herzkrankheit

Neben der Lebensstilmodifikation und anderen nicht-medikamentösen Präventionsmaßnahmen bei Personen mit erhöhtem Risiko für die Entstehung einer KHK und KHK-Patienten, stehen auch diverse pharmakologische Therapieoptionen zur Verfügung. Dabei kann zwischen einer prognoseverbessernden und einer symptomatischen Therapie unterschieden werden [34].

Die prognoseverbessernde Medikation hat sich bei der Behandlung der KHK zusammen mit den Lebensstilmodifikationen weitgehend durchgesetzt und nahezu jeder Patient mit koronarer Herzkrankheit erhält eine oder mehrere der in Abbildung 2 gelisteten Substanzen.



**Abb. 2** Übersicht über die medikamentösen Therapieoptionen bei der Koronaren Herzkrankheit (modifiziert und ergänzt nach der Nationalen Versorgungsleitlinie chronische KHK [34])

Die Thrombozytenaggregationshemmer, insbesondere die Acetylsalicylsäure (ASS), werden heutzutage standardmäßig bei KHK verabreicht und teilweise sogar als „Basistherapie“ bezeichnet. Diese senken im ausgewählten Patientenkollektiv das Myokardinfarkt- und Schlaganfallrisiko signifikant, indem sie eine lokale Thrombenbildung in den Koronararterien

## Literaturübersicht

und hirnversorgenden Arterien durch Hemmung der Thrombozytenaggregation inhibieren [5, 34, 53].

Weiterhin wirken lipidsenkende Substanzen, z.B. Statine oder die relativ neuen PCSK9-Inhibitoren, positiv auf die Blutlipidwerte und erzielen somit eine deutliche Risikominimierung für kardiovaskuläre Erkrankungen. Insbesondere das LDL-Cholesterin hat hierbei eine bedeutende Rolle, da dies durch Lebensstilveränderungen nur wenig beeinflusst werden kann. Daher wird hier nach dem Grundsatz „lower is better“ zur Senkung dieses Parameters bei Patienten mit manifester KHK auf eine medikamentöse Unterstützung zurückgegriffen, insbesondere wenn familiäre Hypercholesterinämien vorliegen [34, 54, 55].

Eine weitere bedeutende Rolle bei der medikamentösen, prognoseverbessernden KHK-Therapie spielen die (oralen) Antidiabetika zur Therapie von Diabetes mellitus Typ 2. Hierzu zählen zahlreiche Wirkstoffgruppen, die an unterschiedlichen Stellen im Metabolismus ansetzen um letztendlich eine Blutzuckersenkung zu bewirken. Derzeit wird hier Metformin als Mittel der Wahl angesehen, da dieses neben einer guten Blutglukosekontrolle auch positive Effekte auf Körpergewicht, Insulin- und Blutlipidspiegel, sowie Blutdruck hat [56, 57]. Eine weitere Wirkstoffgruppe in der Therapie des T2DM sind die Gliptine, Inhibitoren der Dipeptidylpeptidase-4 (DPP4i). Mit diesen kann eine gute Blutglukosekontrolle durch Erhöhung der Inkretinkonzentrationen (GLP1 und GIP) erzielt werden [58]. Aufgrund ihrer insulinabhängigen Wirkung besteht bei Verabreichung der Gliptine keine Gefahr einer Hypoglykämie durch Überdosierung oder einer Gewichtszunahme [59]. Zudem konnten neben diversen positiven Effekten auf das kardiovaskuläre System auch eine gute Verträglichkeit bei KHK-Patienten nachgewiesen werden [10, 60, 61].

Bei der symptomatischen Medikation steht die Linderung der Angina pectoris Beschwerden im Vordergrund. Hier werden neben den  $\beta$ -Blockern auch Kalziumkanalblocker, Nitrate, Piperazinderivate und If-Ionenkanalblocker verwendet [34].

### 2.1.2.3 Interventionelle Therapie der Koronaren Herzkrankheit

Bei der Entscheidung über die Durchführung einer interventionellen Revaskularisation einer verengten Koronararterie gelten die Leitlinien der Europäischen Gesellschaft für Kardiologie. Neben einer Intervention bei akutem Myokardinfarkt gilt die Indikation für eine solche u.a. als gegeben, wenn hämodynamisch relevante Stenosen der Koronararterien vorliegen oder >10 % des Myokards eine Belastungsischämie aufweisen. Ziel der interventionellen Eingriffe sollte immer eine vollständige Wiederherstellung der Myokardperfusion sein. Derzeit stehen hierfür zwei grundsätzlich verschiedene Verfahren zur Verfügung. Einerseits die perkutane transluminale koronare Angioplastie (PTCA), sowie die koronare Bypassoperation [62].

#### 2.1.2.3.1 Die perkutane transluminale koronare Angioplastie

Bei der perkutanen transluminalen koronaren Angioplastie handelt es sich um eine minimalinvasive Methode. Dieses Verfahren wurde in den letzten vier Jahrzehnten stetig weiterentwickelt und ist derzeit die bevorzugt angewandte Methode zur Revaskularisation einer koronaren Herzerkrankung [63-66].

Zu Anfang wurde bei der PTCA lediglich Ballon-Angioplastien durchgeführt. Hierbei wird die Stenose durch Aufblasen eines Ballons an der Katheterspitze dilatiert. Die atherosklerotischen Plaques werden bei dieser Methode an die Arterienwand gedrückt und der Blutfluss wieder hergestellt [63].

Heute ist die Angioplastie inzwischen im Regelfall einhergehend mit einer Stentimplantation. Nachdem Jaques Puel 1986 in Toulouse den ersten Koronarstent in einem Notfalleingriff implantiert hat, wurde die Methode kurz darauf von Sigwart *et al.* weiter etabliert [67, 68]. Diese Stents sollen nach einer Ballon-Angioplastie durch andauernde Dehnung der Gefäßwände bei der Ballon-Angioplastie induzierte Gefäßwand-Dissektionen abdecken und Rückstellkräften („Recoil“) entgegenwirken, um so einen ungestörten Blutfluss zu unterstützen [66, 69-72]. Um das Risiko für Re-stenosen zu verhindern werden aktuell praktisch ausschließlich medikamentenbeschichtete Koronarstents (drug eluting stents, DES)

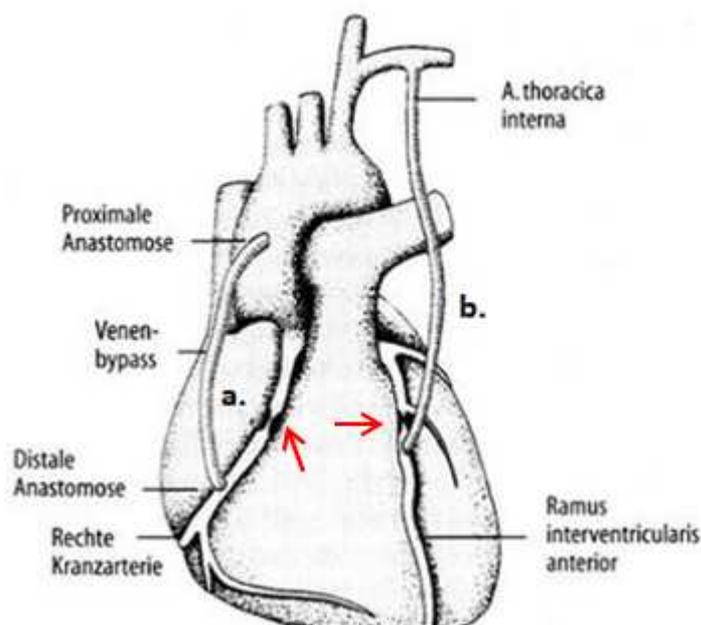
## Literaturübersicht

verwendet [73]. Diese setzen lokal an der Implantationsstelle unterschiedliche Zellgifte, wie z.B. Sirolimus, frei und verhindern so die übermäßige Bildung von Neointima.

Eine weitere potenzielle Möglichkeit Re-stenosen zu vermeiden, welche derzeit noch keine klinische Anwendung findet, sind die sogenannten Endothelial Progenitor Cell (EPC) Capturing Stents. Diese sind mit monoklonalen Mouse-anti-human CD34-Antikörpern beschichtet. So sollen CD34<sup>+</sup> ciPCs rekrutiert werden und die Reendothelialisierung der Gefäße in den mit Stents versehenen Gefäßsegmenten beschleunigt werden. Durch eine schnelle Reendothelialisierung sollen Neointimaformation und Thrombenbildung verhindert werden und somit das Risiko einer Restenose oder Stentthrombose gesenkt werden [5, 74-76]. Ein ähnliches Prinzip zur Förderung einer schnellen Reendothelialisierung liegt auch „gene eluting stents“ und „plasmid eluting stents“ zu Grunde. Die Stents sind mit einem Plasmid (z.B. phVEGF 2 -Plasmid) beschichtet, welches lokal freigesetzt wird. Das Plasmid soll in die DNA der Gefäßwandzellen integriert werden und somit eine schnelle Endothelheilung nach der Intervention fördern um Restenosen durch Neointimahyperplasie zu verhindern [77, 78]. Diese Stents befinden sich jedoch ebenfalls noch in den Anfängen ihrer Entwicklung und es besteht sicherlich noch einige Jahre der Bedarf an anderen Maßnahmen zur Förderung einer raschen Reendothelialisierung nach akutem Endothelaschaden.

### 2.1.2.3.2 Die Bypassoperation

Bei der Bypassoperation handelt es sich um die invasivere der zwei beschriebenen Methoden. Für diese Operation muss der Thorax des Patienten chirurgisch eröffnet werden. Über diesen Zugang zum Herzen können Koronararterienstenosen anschließend durch Implantation eines Gefäßes überbrückt werden. Hierfür werden in der Regel körpereigene Gefäße verwendet. Zumeist wird die *A. thoracica interna (mammaria)*, *V. saphena* oder *A. radialis* verwendet. [5, 65]. Die Überbrückung erfolgt meist von der *Aorta ascendens* zu einem sich distal des stenosierten Segments befindlichen Teil der Koronargefäße [79] (siehe Abb. 3).



**Abb. 3** a. Aortakoronarer Venenbypass von der Aorta ascendens zum rechten Herzkranzgefäß, b. A. thoracica interna-Anastomose zum R. interventricularis anterior. Die roten Pfeile markieren die Stenose (modifiziert nach Erdmann et al. [79]).

### 2.1.3 Re-stenose und Stentthrombose

Bei einer Re-stenose handelt es sich um eine erneute Verengung oder einen Verschluss eines Gefäßes nach vorangegangener interventioneller Rekanalisation, welche häufig innerhalb von 6 Monaten nach dem Eingriff auftritt [80]. Ursache hierfür ist die Bildung von Narbengewebe, der Neointima, in den betroffenen Bereichen des Gefäßes. Verantwortlich für die Bildung der Neointima ist vor allem die übermäßige Proliferation von glatten Muskelzellen [5, 79-81]. Als Hauptursache für die Neointimaformation werden die aufgrund interventioneller Eingriffe (z.B.: Stentimplantation) verursachten Endothelläsionen angesehen, welche eine Leukozytenmigration und Thrombozytenanlagerung zur Folge haben [82, 83]. Durch von diesen Zellen sezernierte Zytokine und Wachstumsfaktoren wird anschließend die Proliferation von glatten Muskelzellen und extrazellulärer Matrix verursacht (vaskuläres Remodeling) [66, 81, 84, 85]. Folglich sollte eine möglichst schnelle, komplette Wiederherstellung des Endothels nach kardiovaskulären Interventionen das Ziel sein, um Re-stenosen nach Stentimplantation und Ballon-Angioplastien zu vermeiden [86].

## Literaturübersicht

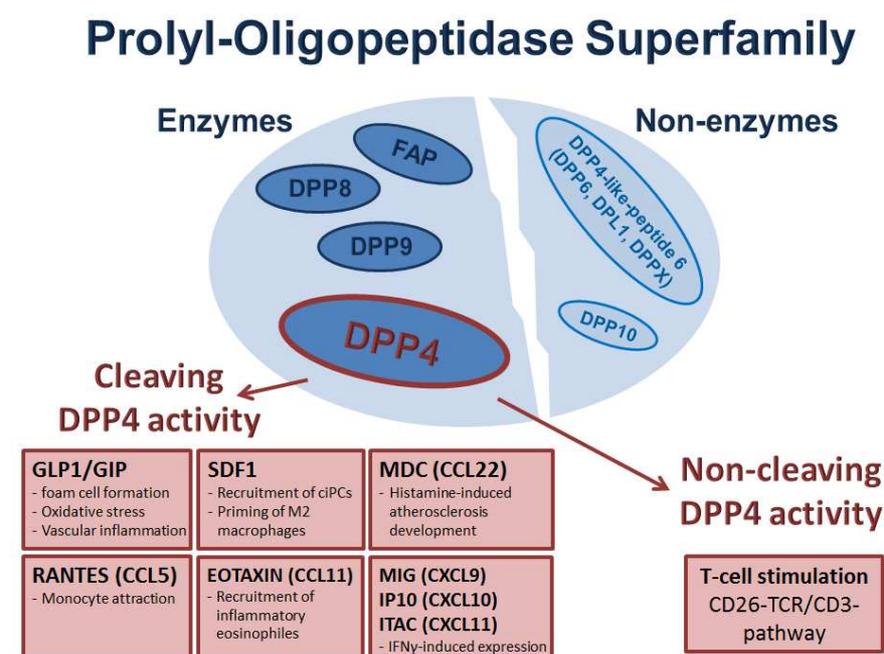
Eine weitere Komplikation nach Stentimplantation sind akute thrombotische Okklusionen der Koronarstents, sogenannte Stentthrombosen. Im Gegensatz zu Re-stenosen, welche häufig durch AP-Beschwerden in Erscheinung treten, handelt es sich hierbei um ein plötzliches Geschehen, welches sich durch die Symptomatik eines akuten Koronarsyndroms äußern kann [87]. Die Risikofaktoren für eine Stentthrombose können vielfältig sein und lassen sich am besten auf den physischen Zustand der Patienten, die angewandte Implantationsmethode des Stents oder den Stent selbst beziehen. So können neben weiteren Erkrankungen des Patienten (z.B. Diabetes) auch das Material des Stents (Bare Metal Stent, DES, ...) oder ein während des Eingriffs zu klein gewählter Stent eine Rolle spielen [88]. Um das Risiko einer Stentthrombose zu senken, wird vor allem eine antithrombozytäre Therapie nach der Intervention empfohlen. Derzeit findet in erster Linie die Duale-Anti-Plättchen-Therapie Anwendung, eine Kombination aus Acetylsalicylsäure und P2Y<sub>12</sub>-Inhibitor (z.B. Clopidogrel) [89, 90]. Durch eine rasche Stent-Endothelialisierung kann das Risiko für Stentthrombosen ebenfalls relevant reduziert werden.

## 2.2 Progenitorzellen

Zirkulierende endotheliale Progenitorzellen (ciPCs) werden als im Blutstrom schwimmende Zellen beschrieben, die sich durch eine Vielzahl unterschiedlicher Oberflächenmarker definieren lassen. Sie weisen sowohl Oberflächenantigene von Vorläuferzellen, als auch Oberflächenantigene ausdifferenzierter Endothelzellen auf [91, 92]. Neben CXCR4 (CD184) zählen unter anderem auch CD133 und der vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR-2/Flk-1) zu den Oberflächenantigenen der ciPCs [93, 94]. Diese spielen bei der Rekrutierung und Migration der ciPCs eine Rolle, wodurch ihnen auch bei der Angiogenese eine offensichtliche Funktion zukommt. Peichev *et al.* konnten zeigen, dass durch Bindung der Chemokine SDF1 und vascular endothelial growth factor (VEGF) an ihre entsprechenden Rezeptoren (CXCR4 bzw. VEGFR-2/Flk-1) die Angiogenese induziert wird [94]. Als Reservoir dieser Zellen gilt das Knochenmark, in dem sie sich in einem dreidimensionalen Gerüst aus Stromazellen und extrazellulärer Matrix befinden [95, 96].

## 2.3 Dipeptidyl-Peptidase 4

Bei der Dipeptidyl-Peptidase 4 (CD26) handelt es sich um ein Enzym aus der Familie der Prolyl-Oligopeptidasen. Diese Gruppe besteht neben der DPP4 aus drei weiteren Enzymen (DPP8, DPP9, FAP) und zwei nicht-Enzymen (DPP10 und DPP4-like-Peptide 6) (siehe Abb. 4) [6, 20].



**Abb. 4** Die Prolyl-Oligopeptidasen, enzymatische und nicht-enzymatische Mitglieder. Die enzymatische Funktion der DPP4 erstreckt sich neben der Inkretinspaltung auch auf diverse Zytokine, wie z.B. SDF1. Zu den nicht-enzymatischen Funktionen der DPP4 zählt insbesondere die T-Zell-Aktivierung über die Aktivierung des T-Zell-Rezeptor-Komplexes (nach Remm et al. [6]).

Die DPP4 selbst liegt im Körper in zwei Formen vor. Der enzymatischen, löslichen Form im Serum und der zellgebundenen Form. Die zellgebundene Form liegt co-lokalisiert zum T-Zell-Rezeptor (TCR)/CD3-Komplex, dient dort als Rezeptor für die Adenosin-Deaminase (ADA) und hat eine wichtige Funktion in der T-Zell-Aktivierung [97].

Mittels Abspaltung zweier Aminosäuren vom N-Terminus der unterschiedlichen Substrate (X-Pro) durch die lösliche Form der DPP4, kommt es meist zu einer funktionellen Inaktivierung ihrer Substrate [98-100]. Neben der Inkretinspaltung (GLP1/GIP), welche für die

## Literaturübersicht

Insulinsekretion eine bedeutende Funktion hat, und der Spaltung von SDF1, welches an diversen vasoprotektiven Mechanismen beteiligt ist, werden diverse weitere Zytokine (MDC, RANTES, EOTAXIN, MIG/IP10/ITAC) von der DPP4 gespalten [21, 22]. Die relevantesten DPP4-Substrate für das Gefäßsystem sind jedoch die Inkretine GLP1/GIP und das Zytokin SDF1. Sie haben einen wesentlichen Anteil an der Glukosehämostase, der Rekrutierung zirkulierender Progenitorzellen in verletztes Gewebe, der Atheroskleroseprogression und dem vaskulären Entzündungsgeschehen [7, 9, 22, 58, 101].

## 2.4 SDF1-CXCR4-Achse

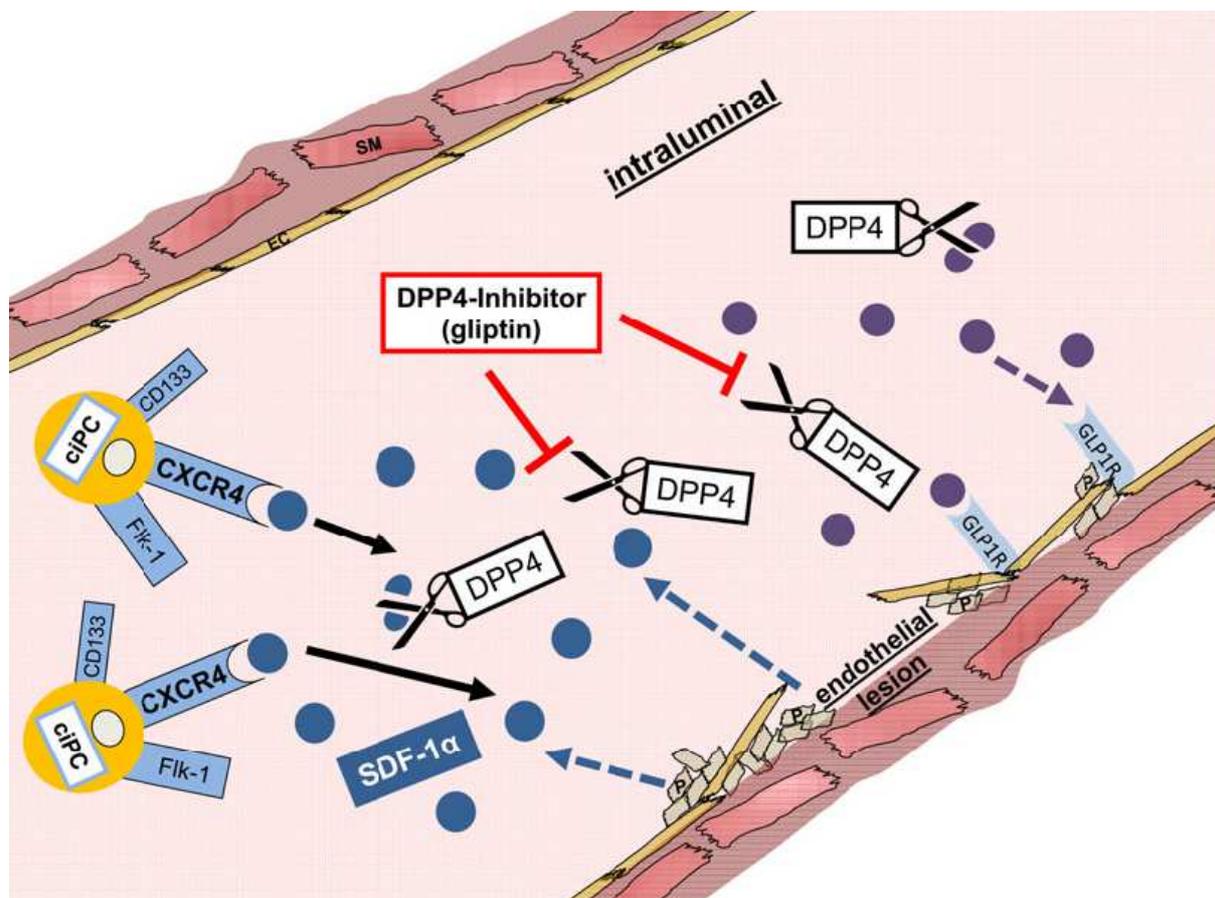
Wie eingehend erwähnt, spielt die SDF1-CXCR4-Achse bei der Reendothelialisierung von Endothelläsionen eine bedeutende Rolle [12, 18, 19].

Das Zytokin SDF1 (CXCL12) gilt als hochpotenter Lockstoff für diverse an entzündlichen Prozessen beteiligte Zellen, wie z.B. Lymphozyten, Monozyten und hämatopoetische Progenitorzellen. Auch ist SDF1 ein bedeutender Ligand des G-Protein-gekoppelten CXCR-Rezeptors 4 (CXCR4) [102, 103]. Synthetisiert wird SDF1 in den meisten Geweben und im Knochenmarkstroma, wo es in zwei verschiedenen Isoformen vorliegt: SDF1 $\alpha$  und das am C-Terminus um 4 Aminosäuren längere SDF1 $\beta$ . Schon während der Ontogenese spielt SDF1 eine große Rolle in der Entwicklung der fetalen Leber, wo es die Migration hämatopoetischer Progenitorzellen induziert [104, 105]. Später spielt SDF1 dann insbesondere bei der Angiogenese, Zelldifferenzierung und Zellmigration, sowie der Mobilisierung von ciPC aus dem Knochenmark eine bedeutende Rolle [106, 107]. Durch Bindung an CXCR4 können zum einen ciPC zu Endothelläsionen rekrutiert werden, zum anderen kann auch die Monozytendifferenzierung positiv beeinflusst werden. Sowohl bei der Schädigung des Endothels, als auch bei Atherosklerose kommt es im Gefäß zur Expression von SDF1. SDF1 wird von an die Läsionen anhaftenden Thrombozyten, vaskulären SMC sowie aktivierten Endothelzellen exprimiert [17, 81]. Das freigesetzte SDF1 kann dann an den CXCR4 Rezeptor der Zielzellen binden und dort weitere regenerative Prozessen in Gang setzen [12, 108-110].

Wird am geschädigten Endothel SDF1 frei, so wird die Rekrutierung zirkulierender Progenitorzellen über die SDF1-CXCR4-Achse in Gang gesetzt. Über parakrine Effekte wird dann die Proliferation lokaler, noch intakter Endothelzellen induziert und das Gefäßendothel

## Literaturübersicht

kann regenerieren. Durch die lösliche Form der DPP4 kann diese Rekrutierung reguliert werden, da SDF1 durch die enzymatische Spaltung vom N-Terminus des Moleküls her inaktiviert und die SDF1-CXCR4-Achse somit unterbrochen wird [6, 100] (siehe Abb. 5).



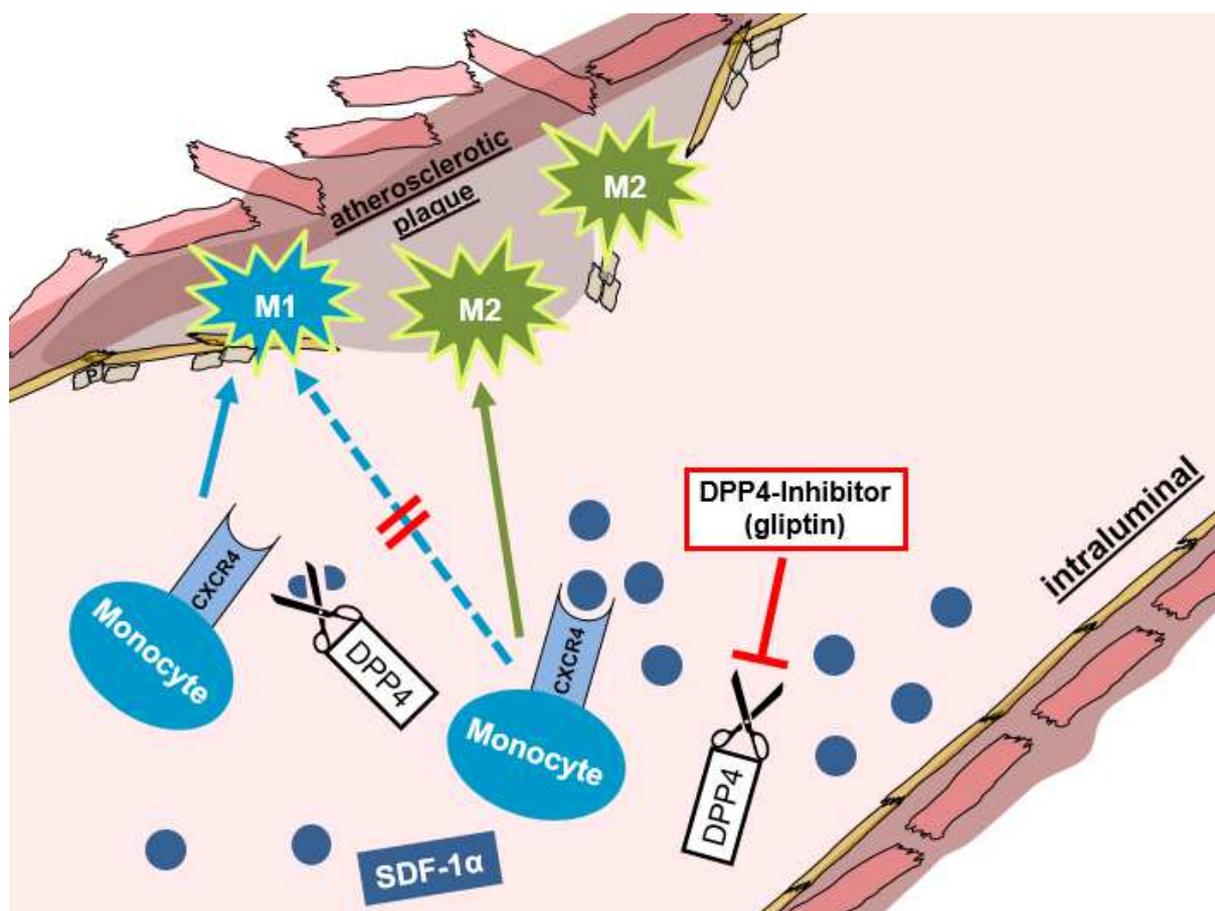
**Abb. 5** Schematische Darstellung der SDF1-CXCR4-Achse nach Endothelläsion und Wirkung der DPP4-Inhibition auf die Endothelregeneration. SDF1 aus Thrombozyten und vaskulären SMC bindet an den CXCR4-Rezeptor auf ciPCs und rekrutiert diese zu den Endothelläsionen.

GLP1 bindet an GLP1-Rezeptoren in der Gefäßwand und verbessert somit die Gefäßfunktion. Durch die DPP4-Inhibition wird auch GLP1 vermindert gespalten und kann somit die Gefäßregeneration zusätzlich unterstützen (nach Remm et al. [6]).

Da sich der CXCR4 auch auf diversen Monozyten- und Makrophagensubtypen findet [111-114], kann über die SDF1-CXCR4-Achse eine veränderte Differenzierung zirkulierender Monozyten vermittelt werden. Durch Bindung von SDF1 an den CXCR4 auf Monozyten werden diese „alternativ“ zu reparativen M2 Makrophagen differenziert [7, 23] (siehe Abb. 6). Diese

## Literaturübersicht

M2 Makrophagen werden auch als „regenerative Makrophagen“ beschrieben. Im Frühstadium der Atherosklerose haben Sie noch einen maßgeblich regenerativen und hemmenden Einfluss auf die Atheroskleroseprogression und können durch Cholesterolexport und antiinflammatorische Wirkung die Plaquebildung in diesem Stadium der Erkrankung bremsen [115-117]. In späteren Stadien der Erkrankungen können die M2 Makrophagen aber auch eine Plaqueinstabilität bis hin zur Ruptur auslösen [118].



**Abb. 6** Schematische Darstellung der SDF1-CXCR4-Achse und ihrer Wirkung auf die Monozytendifferenzierung. Durch die SDF1-CXCR4-Bindung werden die zirkulierenden Monozyten insofern „programmiert“, dass sie sich hin zum reparativen M2 Subtyp differenzieren. Durch Inhibition der DPP4 kann dieser Signalweg verstärkt werden (modifiziert nach Remm et al. [6]).

Somit wird deutlich, dass die SDF1-CXCR4-Achse ein bedeutender Signalweg ist, welcher durch pharmakologische Intervention, z.B. Inhibition der DPP4, positiv beeinflusst werden kann. Zum einen präventiv im Stadium der Frühatherosklerose, um das Fortschreiten der

## Literaturübersicht

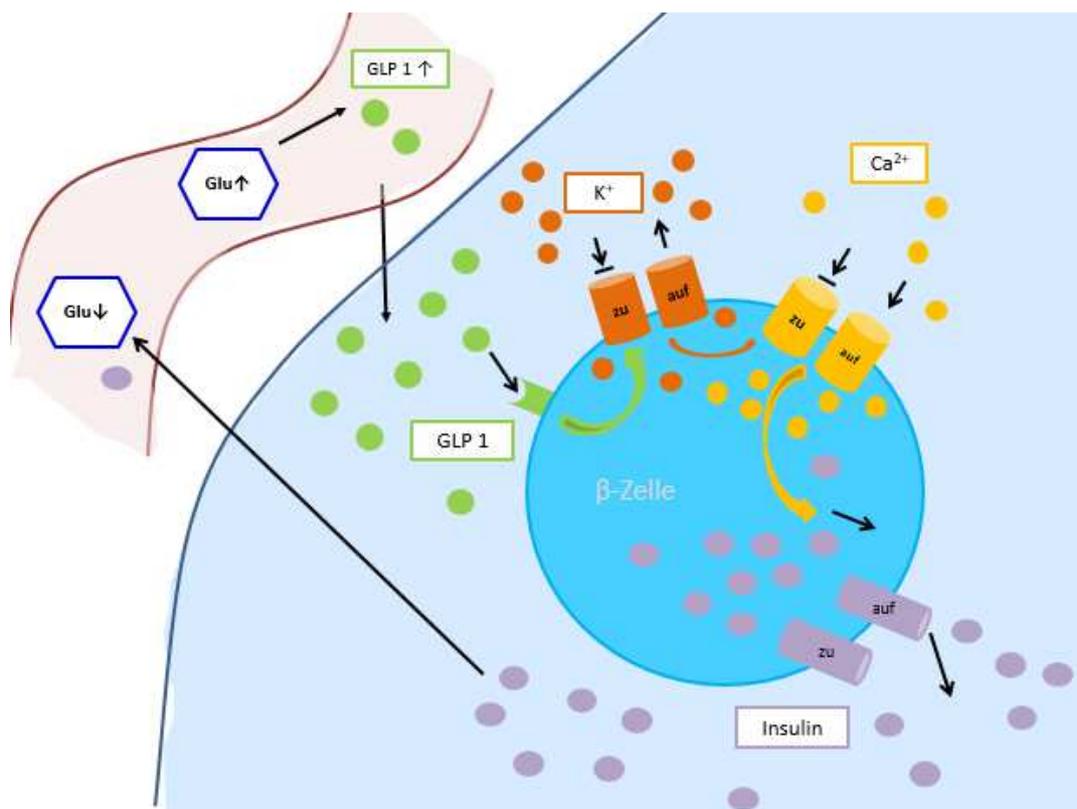
Erkrankung zu verlangsamen. Zum anderen um die Reendothelialisierung nach Endothelverletzung zu beschleunigen und somit Neointimaformation und daraus resultierenden Restenosen und in-stent-Restenosen vorzubeugen.

Weiterhin ist zu erwähnen, dass durch erhöhte SDF1 Konzentrationen eine verstärkte Angiogenese und Endothelzellmigration induziert werden kann und SDF1 auf andere Zelltypen (z.B. Astrozyten) eine pro-proliferative Wirkung haben kann [31-33].

## 2.5 Rolle der Inkretine

Bei den Inkretinen handelt es sich um Peptidhormone, welche neben ihrer gastrointestinalen Funktion auch eine bedeutende Rolle für das kardiovaskuläre System spielen. Glucagon-like Peptid 1 (GLP1) und das Glucose-dependent Insulinotropic Polypeptide (GIP) werden nach der Nahrungsaufnahme im Darm freigesetzt. Aufgrund der Stimulation der Insulin- und Somatostatinexpression tragen sie zur Glukosehämostase und zur verzögerten Magenentleerung bei und rufen das Sättigungsgefühl hervor. GLP1 und GIP haben eine kurze Halbwertszeit, da sie innerhalb kurzer Zeit nach der Expression durch die Serum-DPP4 gespalten und inaktiviert werden [27, 119, 120].

Da sie maßgeblich an der Insulinsekretion beteiligt sind (siehe Abb. 7), spielen die Inkretine vor allem therapeutisch bei der Therapie von T2DM eine Rolle. Dies geschieht direkt in Form von Inkretinanaloga oder indirekt durch DPP4-Inhibition über eine verminderte GLP1/GIP-Spaltung, was beides eine verstärkte Insulinsekretion zur Folge hat [119, 121].



**Abb. 7** Bei der Nahrungsaufnahme und dem daraus resultierenden Anstieg des Blutglukosespiegels wird GLP1 ausgeschüttet und bindet an den GLP1-Rezeptor der  $\beta$ Zellen im Pankreas. Somit wird über cAMP vermittelte Signalkaskaden eine Öffnung der  $K^+$  Ionenkanäle erreicht und es kommt zu einem  $K^+$ -Efflux aus dem  $\beta$ -Zellen. Hierdurch öffnen sich spannungsabhängige  $Ca^{2+}$ -Kanäle, wodurch diese Ionen einströmen können. Dieser  $Ca^{2+}$ -Einstrom hat die Insulinsekretion und Freisetzung ins Blut zur Folge, wodurch der Blutglukosespiegel wieder gesenkt wird (modifiziert nach Herdegen et al. [122]).

Im kardiovaskulären System zeigen die Inkretine zusätzlich, nicht nur über verringerte Blutzuckerspiegel, sondern auch über einen direkten Effekt auf die Gefäße, eine positive Wirkung auf den Verlauf kardiovaskulärer Erkrankungen. Einen Hinweis hierfür gibt zudem die hohe Expression der GLP1-Rezeptoren auf vaskulären SMCs, Kardiomyozyten, Endokard und Endothel der Koronararterien [123, 124]. So scheint GLP1 bei der Prävention einer Hypertension ein gewisses Potenzial zu hegen, wie von Yu *et al.* im Versuch mit Dahl salzsensitiven Ratten (engl. Dahl/salt-sensitive rats) beschrieben wird [125]. Hervorzuheben ist, dass dieser positive Effekt auf die Vasomotion auch schon beim Menschen beschrieben wurde. So konnte in klinischen Studien gezeigt werden, dass die Vasomotion auch beim Menschen nach GLP1- oder Exendin-4 (GLP1 Analogon)-Infusion verbessert ist. Dies wurde sowohl in diabetischen und nicht diabetischen Patienten [126], wie auch bei Patienten mit

## Literaturübersicht

KHK [127] gezeigt. Weiterhin scheint GLP1 auch für die Herzfunktion eine bedeutende Rolle spielen. Nikolaidis *et al.* konnten zeigen, dass die linksventrikuläre Herzfunktion (systolisch und diastolisch) bei Patienten mit drohendem Herzversagen durch eine 48-stündige GLP1-Infusion deutlich verbessert werden konnte. Auch die Insulinsensitivität und Glukoseaufnahme im Myokard konnten von dieser Arbeitsgruppe im Tiermodell und klinischen Studien durch die GLP1-Behandlung deutlich erhöht werden [128-130].

Weiterhin konnte von Terasaki *et al.* im Tiermodell (*ApoE<sup>-/-</sup>*) durch Therapie mit Inkretinanaloga eine signifikant geringere Atheroskleroseprogression im Vergleich zu Placebokontrollen gezeigt werden. Diese Behandlung scheint sich in diesem Zusammenhang positiv auf das inflammatorische Geschehen auszuwirken, da die Schaumzellbildung bei den Inkretinanaloga-therapierten Tieren deutlich geringer ausfiel [120]. Weitere Arbeiten, wie zum Beispiel von Liu *et al.* bestätigen die positiven GLP1 Effekte und berichten unter anderem von einer Hochregulation der NO-Synthese, sowie einer reduzierten Menge reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und verminderter Cyclooxygenase 2-Expression [26].

Zusammenfassend kann also gesagt werden, dass die GLP1 im Gefäßsystem nicht nur antihypertensiv, sondern auch antiinflammatorisch und damit hemmend auf die Atheroskleroseprogression wirkt und so das Fortschreiten dieser Erkrankung verlangsamt. Insbesondere der letztere Effekt birgt ein gewisses Potenzial in Hinsicht auf die kardiovaskuläre Regeneration.

## 2.6 Wirkungsmechanismus der Gliptine

Zur Blutzuckerkontrolle bei T2DM macht man sich in den letzten Jahren die Dipeptidyl-Peptidase 4-inhibierende Wirkung der Gliptine zu Nutzen. Diese wurden mit dem Wirkstoff Sitagliptin 2006 (U.S. Food and Drug Administration, FDA [131]) bzw. 2007 (European Medicines Agency, EMA [132]) erstmals zur Therapie der Erkrankung zugelassen. Weitere Wirkstoffe, wie z.B. Vildagliptin oder Linagliptin, folgten [133]. Derzeit sind 17 Wirkstoffe aus dieser Gruppe bekannt und 5 davon als Arzneimittel in der Europäischen Union zugelassen [24, 132]. Auch in den Leitlinien der Europäischen Kardiologischen Gesellschaft werden die DDP4i als Therapieoption bei T2DM aufgelistet [134].

## Literaturübersicht

Neben dem inhibierten Abbau der Inkretine GLP1 und GIP [25, 58] wurde in zahlreichen Studien bestätigt, dass die Inhibition der DPP4 auch deutlich positive Effekte auf die Regeneration nach endothelialer Schädigung [9], auf die Vasomotion [135, 136] und die Atheroskleroseprogression [7, 8, 137] aufweisen. Insbesondere bei der endothelialen Regeneration und der verringerten Atheroskleroseprogression spielt hier nicht die Blutzuckerkontrolle eine Rolle, sondern vermutlich die inhibierte Spaltung des Zytokins SDF1. Aufgrund dieser vielversprechenden Ergebnisse und der klinischen Sicherheit [61, 138-140] könnte die Therapie mit DPP4-Inhibitoren in Zukunft eine bedeutende Rolle für den prophylaktischen und therapeutischen Einsatz bei vaskulären Erkrankungen, insbesondere der KHK, eine bedeutende Rolle einnehmen.

Es konnte gezeigt werden, dass die Endothelfunktion unter Gliptin-Therapie deutlich verbessert werden kann. Durch Inkubation segmentaler Mauseortenringe mit Gliptinen konnten diverse Arbeitsgruppen eine deutlich bessere vasomotorische Funktion durch erhöhte eNOS-Aktivität, verstärkte NO-Expression und Aktivierung von vaskulären Kaliumkanälen erzielt werden. Trotz deutlich erhöhter GLP1-Serumkonzentration, scheint diese Wirkung auch teilweise GLP1 unabhängig zu sein [8, 141, 142]. Diese *in vitro* gewonnenen Erkenntnisse wurden auch in klinischen Untersuchungen bestätigt. So wiesen Matsubara *et al.* mittels nichtinvasiver Ultraschallmessungen eine Verbesserung des peripheren Gefäßtonus durch Sitagliptin-Therapie nach [135]. Noda *et al.* konnten diese Ergebnisse mit anderen Methoden (Messung der flow-mediated dilatation) unter Alogliptin-Therapie bestätigen [136]. Mechanistisch konnten diese Effekte noch nicht vollständig entschlüsselt werden. Lediglich eine reduzierte Expression diverser Zytokine (IL-1, IL-6, TNF $\alpha$ ,...) unter Gliptin-Therapie könnte ein Hinweis als Grundlage für weitere Studien sein [22, 116, 143].

Durch zahlreiche Studien im Tiermodell konnte auch gezeigt werden, dass der inhibierte SDF1-Abbau zu einer signifikant besseren endothelialen Regeneration nach akutem Endothelschaden führen kann. So zeigten Noels *et al.* eine durch SDF1 verbesserte Endothelzellproliferation zuerst *in vitro* und die Abhängigkeit der SDF1-CXCR4-Achse für diese Wirkung wurde nachfolgend in einem CXCR4-knock-out Mausmodell bestätigt [144]. Auch von unserer Arbeitsgruppe konnte *in vivo* in einem C57BL/6 Wildtyp Mausmodell unter Sitagliptin eine signifikant verbesserte Regeneration des Gefäßendothels nach akuter Schädigung erzielt werden. Durch zusätzliche Gabe des CXCR4-Rezeptorblockers AMD3100, in einer Rezeptor-

## Literaturübersicht

blockierenden, aber nicht ciPC mobilisierenden Dosierung [101], wurde die Wirkungsweise der Gliptine über den SDF1-CXCR4-Signalweg mechanistisch bestätigt. Aufgrund dieser Blockade durch AMD3100 am CXCR4 auf den ciPCs wurde die SDF1-CXCR4-Achse unterbrochen, wodurch ebendiese nicht durch die Gabe der Gliptine unterstützt werden konnte [9] (siehe Abb. 5).

Zudem führt die Gliptin-Therapie auch zu einer verlangsamten Progression der Atherosklerose im Frühstadium der Erkrankung. In zahlreichen vorklinischen Studien wurde eine vom Blutglukosespiegel unabhängige, reduzierte Plaqueeentwicklung unter Gliptin-Therapie gezeigt. Hier spielen unter anderem reduzierte Blutlipidspiegel eine Rolle [136, 145, 146]. Des Weiteren sind auch ein reduzierter systolischer Blutdruck, verbesserte  $\beta$ -Zellfunktion, sowie reduzierte TNF $\alpha$ - und IL-6-Spiegel von Bedeutung [115]. Insbesondere das reduzierte Inflammationspotenzial unter Gliptin-Therapie kann einen großen Beitrag leisten. In zahlreichen Studien wurde gezeigt, dass die verschiedenen Vertreter der Gliptine allesamt das inflammatorische Krankheitsgeschehen abschwächen. So zeigten zahlreiche Arbeitsgruppen, dass der Gehalt an Makrophagen und Schaumzellen in den Gefäßwänden unter Gliptin-Therapie signifikant reduziert werden kann [22, 115, 142, 147]. Diese Erklärung scheint aber nicht die alleinige für die Wirkung der Gliptine auf das pathologische Geschehen der Atherosklerose zu sein. Brenner *et al.* konnten zwar eine verringerte Gesamtmakrophagenzahl in der Gefäßwand nicht bestätigen, jedoch durch die Therapie mit Sitagliptin im *ApoE<sup>-/-</sup>* Mausmodell eine Monozytendifferenzierung hin zu regenerativen M2 Makrophagen erzielen. Diese alternative Monozytendifferenzierung hin zu den reparativen M2 Makrophagen, auf Kosten der inflammatorischen M1 Makrophagen, wird durch die Bindung von SDF1 an den CXCR4-Rezeptor zirkulierender Monozyten ausgelöst. Im Stadium der Frühatherosklerose kann dies eine reduzierte Plaquebildung bewirken [7] (siehe Abb. 6). Chatterjee *et al.* bestätigen die These. So zeigte diese Arbeitsgruppe *in vitro* eine vermehrte Rekrutierung humaner Monozyten und eine darauf folgende Differenzierung vermehrt zu den M2 Makrophagen [23]. Um jedoch die genauen Mechanismen der reduzierten Atheroskleroseprogression unter Gliptin-Therapie detaillierter zu entschlüsseln werden noch zahlreiche präklinische Studien nötig sein.

Letztendlich muss noch die tatsächliche Relevanz der Gliptine für die klinische Anwendung bei kardiovaskulären Erkrankungen genauer untersucht werden. Derzeit werden Parameter wie Neointimaformation und Atheroskleroseprogression nur in wenigen Studien (z.B. PROLOGUE

## Literaturübersicht

[148], TRUST [149], SPIKE [139]) detailliert betrachtet oder die finalen Analysen stehen noch aus.

## 2.7 Atherosklerose im Tiermodell

Die Ruptur atherosklerotischer Plaques gilt nach wie vor als eine der Hauptauslöser von Myokardinfarkten bei KHK-Patienten. Um die zugrunde liegenden Mechanismen zu verstehen und detailliert zu erforschen, werden in der Wissenschaft unter anderem Tiermodelle der Atherosklerose benötigt. Jedoch entwickeln kaum andere Spezies als der Mensch spontan kalzifizierte, atherosklerotische Plaques und leiden daher auch nicht an Folgeerkrankungen wie Myokardinfarkten oder Schlaganfällen. Neben dem Menschen zählen hierzu lediglich einige Primatenarten [150] und mit Limitationen das Schwein. Vor allem aus ethischen Gründen, welche insbesondere bei der Verwendung von Primaten im Tierversuch eine Rolle spielen, sprechen auch Kosten- und Platzgründe häufig gegen diese Großtiermodelle. Wesentlich unkomplizierter ist die Verwendung kleinerer Versuchstiere wie z.B. Mäuse und Kaninchen, für die inzwischen auch durch genetische Veränderungen einige brauchbare Atherosklerose-Tiermodelle entwickelt wurden [151-153].

Das am häufigsten verwendete Tiermodell für Atherosklerose ist, wie bei den meisten anderen Krankheitsbildern, die Maus. Hierfür wurden spezielle knock-out Mutanten generiert, da genetisch unveränderte Tiere einen vom Menschen sehr unterschiedlichen Lipidstoffwechsel besitzen. So wird in Mäusen Cholesterol hauptsächlich in high-density-lipoprotein (HDL)-Molekülen transportiert, was zur Folge hat, dass sie nur niedere Serumkonzentrationen der atherogenen Lipide LDL und very-low-density-lipoprotein (VLDL) aufweisen [153]. Derzeit werden hauptsächlich *ApoE knock-out* (*ApoE<sup>-/-</sup>*) und *Low Density Lipoprotein-Receptor knock-out* (*Ldlr<sup>-/-</sup>*) Mäuse verwendet [151, 152]. Der Atherosklerosebildung in diesen zwei Modellen liegen unterschiedliche Mechanismen zu Grunde. Im *ApoE<sup>-/-</sup>* Modell entwickeln die Tiere ausgeprägte atherosklerotische Läsionen, welche in Lokalisation und Bau den humanen Plaques durchaus vergleichbar sind [154]. Durch den knock-out des Apolipoprotein E (ApoE)-Gens fehlt den Tieren das Vermögen einer effektiven Clearance von Plasmalipoproteinen, alimentär bedingten Chylomikronen und VLDL-Remnants aus der Leber. Dies führt zu starken Hypercholesterinämien und -lipidämien, wodurch es sogar zu einer spontanen

## Literaturübersicht

Atheroskleroseentwicklung kommt [155, 156]. Beim *Ldlr*<sup>-/-</sup> Mausmodell hingegen ist eine hochcholesterolhaltige Diät Voraussetzung für die Entwicklung einer Atherosklerose. Diese Tiere verfügen aufgrund des genetischen knock-outs über keine LDL-Rezeptoren, deren funktioneller Mangel im Mensch zur sogenannten familiären Hypercholesterinämie führt [151]. Der LDL-Rezeptor dient dazu den Blutcholesterolspiegel zu regulieren, indem er in der Leber für eine Aufnahme von LDL und intermediate-density-lipoprotein (IDL) aus dem Plasma sorgt [157]. Unter cholesterolhaltiger Diät bilden auch die *Ldlr*<sup>-/-</sup> Mäuse eine ausgeprägte Atherosklerose und werden daher insbesondere als Modell für die familiäre Hypercholesterinämie verwendet. Neben diesen beiden Stämmen wurden noch weitere, weniger häufig verwendete, Mausmodelle generiert. Hierzu zählen unter anderem *ApoE*<sup>-/-</sup> *Ldlr*<sup>-/-</sup> Mäuse und *ApoE3-Leiden*<sup>-/-</sup> Tiere. Weiterhin wurde 2014 unabhängig voneinander von zwei Arbeitsgruppen die PCSK9-AAV Maus vorgestellt, welche zwar nicht genetisch verändert, jedoch mit adenoassoziierten Viren infiziert wurde [158, 159]. Dies resultiert letztendlich in erhöhten PCSK9 Spiegeln und massiv verminderter LDL-Metabolisierung, was letztendlich in erhöhten Plasmacholesterolspiegeln resultiert [153]. Nachteil all dieser Modelle ist, dass sie keine spontane Plaqueruptur und deren Folgen, wie zum Beispiel Myokardinfarkte aufzeigen. Hierfür wurde das *ApoE*<sup>-/-</sup> *Fbn1*<sup>C1039G+/-</sup> (Fibrillin 1-Mutante) Mausmodell generiert. Diese Tiere weisen neben exzessiver Plaqueformation auch die im Menschen typischen Folgen wie Myokardinfarkte und Schlaganfälle auf [160, 161].

Eine weitere häufig verwendete Spezies in der Atheroskleroseforschung sind Kaninchen, da diese aufgrund ihres dem Menschen ähnlichen Lipoproteinmetabolismus sehr sensitiv auf hochcholesterolhaltige Diät reagieren. So besitzen Kaninchen ein dem Menschen ähnliches Cholesterolresorptionsvermögen und Cholesteryl-Ester-Transportprotein, welches mitverantwortlich für die HDL-Metabolisierung in der Leber ist [162]. Ein häufig verwendetes Wildtyp-Kaninchenmodell ist das New Zealand White Kaninchen (NZW). Weiterhin existieren auch diverse genetisch veränderte Kaninchenmodelle, wie z.B. das Watanabe Heritable Hyperlipidemic Kaninchen (WHHL) oder *ApoE*<sup>-/-</sup> Kaninchen. Das WHHL Kaninchen besitzt einen natürlichen LDL-Rezeptormangel, entspricht somit dem *Ldlr*<sup>-/-</sup> Mausmodell und dient als Modell für die familiäre Hypercholesterinämie [151, 152]. Die erfolgreiche Generierung eines *ApoE*<sup>-/-</sup> Kaninchenmodells konnte erst im Jahr 2015 berichtet werden. Sie entsprechen mit ihren erhöhten Cholesterol- und Triglyzeridspiegeln dem *ApoE*<sup>-/-</sup> Mausmodell [163].

## Literaturübersicht

Hin und wieder wird auch das Schwein als Modell in der Atheroskleroserecherche verwendet. Diese Spezies kann schon unter Normaldiät geringe atherosklerotische Veränderungen und unter Cholesterolvereicher Diät eine ausgeprägte Atherosklerose mit Läsionen entwickeln, welche dem Mensch in Ausprägung und Lokalisation entsprechen [151]. Weiterhin wird ein Stamm beschrieben, welcher aufgrund drei unterschiedlicher genetischer Lipoproteinmutationen auch unter Normaldiät eine hochgradige Atherosklerose entwickelt [164, 165], sowie ein Minipig-Modell, welches der *PCSK9-ΔV*-Maus entspricht [166]. Vor- und Nachteile bei diesem Tiermodell liegen jedoch auf der Hand. Einerseits können Analysen und Untersuchungen aufgrund der Größe der Tiere einfach erfolgen, andererseits birgt diese Größe auch den Bedarf an ausreichend großen Haltungseinrichtungen. Zu bedenken ist außerdem, dass Schweine die atherosklerotischen Veränderungen zumeist erst in einem Alter von ca. 2 Jahren entwickeln und hier eine lange und teure Haltung der Tiere vorangeht [151, 152].

Tiermodelle wie einige Primatenarten, Hunde, Hamster, Meerschweinchen und auch Vögel sollen nicht unerwähnt bleiben. Keines dieser Tiermodelle konnte sich jedoch bisher in der Recherche durchsetzen. Bei den Primaten steht hier vor allem der ethische Aspekt im Vordergrund. Versuche mit diesen Tieren sind in Deutschland sogar laut Tierschutz-Versuchstierverordnung grundsätzlich verboten und dürfen, wenn überhaupt, nur unter strengsten Auflagen durchgeführt werden (§23 Tierschutz Versuchstierverordnung „Verwendung von Primaten“ [167]). Die anderen in diesem Absatz genannten Spezies weisen zu viele limitierende Faktoren für reproduzierbare, wissenschaftlich korrekte und dem Menschen getreue Ergebnisse auf [152].

Zielsetzung

### 3 Zielsetzung

In den letzten Jahren wurden auf dem Gebiet der minimalinvasiven, interventionellen Kardiologie (PTCA) viele Fortschritte zur Therapie der KHK gemacht [64-66]. Auch die medikamentöse Prävention und Therapie der KHK wurden durch diverse innovative Wirkstoffklassen (z.B. PCSK9-Inhibitoren [168]) erweitert.

Komplikationen wie Stentthrombosen und Restenosen stellen jedoch immer noch ein Risiko für Patienten nach PTCA dar. Neben einer antithrombozytären Therapie und der Implantation moderner Stents, ist eine schnelle Reendothelialisierung nach der Intervention essentiell, um hier entgegenzuwirken [80, 88, 169, 170]. Die rasche Endothelheilung nach PTCA ist notwendig, da es am verletzten Endothel zu einer Thrombozytenaggregation kommt, welche zu Thrombenbildung führen kann (Stentthrombose) [171]. Weiterhin können Endothelläsionen zu einer übermäßigen Neointimaformation führen und somit zu einer zunehmenden Lumeneinengung des Gefäßes (Restenose) [5, 79, 80].

Die Gliptine stellen für die schnelle Reendothelialisierung eine vielversprechende Therapieoption dar. Durch ihre verstärkende Wirkung auf die SDF1-CXCR4-Achse und die daraus resultierende vermehrte Rekrutierung zirkulierender CXCR4<sup>+</sup> Progenitorzellen bewirken sie eine verbesserte und schnellere vaskuläre Regeneration nach akuter Endothelschädigung im Tiermodell [9].

Das Inkretin GLP1, als weiteres Substrat der DPP4, scheint neben seiner Funktion im Glukosestoffwechsel auch zusätzlich protektive und regenerative Effekte auf das Gefäßsystem zu haben. Dies kann mit positiven Einflüssen auf die Endothelfunktion, das Blutlipid-Profil und das entzündliche Geschehen bei Gefäßerkrankungen erklärt werden [27, 120, 146, 172].

Da durch die pharmakologische Inhibition der DPP4 sowohl der Abbau von SDF1, als auch der GLP1-Abbau gehemmt werden, kommt es bei der Gabe von Gliptinen zu einer Erhöhung beider Stoffe im Serum. Um zu untersuchen, welchen Anteil die jeweiligen Signalwege (SDF1-CXCR4-Achse, GLP1-Rezeptor-Signalweg) bei der Endothelregeneration spielen, wurde in dieser Arbeit ein *Glp1r*<sup>-/-</sup> Mausmodell verwendet und so die Relevanz des GLP1-Rezeptor-Signalwegs untersucht. Durch den Verlust des GLP1-Rezeptors kann im *Glp1r*<sup>-/-</sup> Mausmodell eine Wirkung des Inkretins über seinen Rezeptor ausgeschlossen werden.

## Zielsetzung

Weiterhin soll die Endothelzellproliferation unter dosisabhängigem SDF1 Einfluss untersucht werden. Hierfür wird ein sogenannter Scratch-Assay mit humanen Nabelschnur-Endothelzellen (human umbilical vein endothelial Cells, HUVECs) durchgeführt.

Am Ende dieser Versuchsreihe soll folglich geklärt werden:

- Ist der SDF1-CXCR4-Signalweg hinreichend für die verbesserte Endothelregeneration unter Gliptin-Therapie und welche Relevanz hat das Inkretin GLP1 in diesem Prozess?
- Wirken die Gliptine auch ohne die Inkretinwirkung positiv auf die endotheliale Regeneration?
- Hat SDF1 auch eine direkte Wirkung auf die endotheliale Regeneration?

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Versuchstiere

#### 4.1.1 Gesetzliche Grundlage

Die Tierversuche sowie die Zucht der *Glp1r<sup>-/-</sup>* Mäuse wurden auf Grundlage des österreichischen Tierschutzgesetzes (TSchG) und des österreichischen Tierversuchsgesetzes (TVG) durchgeführt. Die Genehmigung erfolgte durch das Bundesministerium für Wissenschaft, Forschung und Wirtschaft (Geschäftszeichen: BMWFW-66.011/0160-WF/V/3b/2014).

#### 4.1.2 Verwendete Tiere

In den Versuchen wurden zwei verschiedene Mausstämmen verwendet, C57BL/6 und GLP1R-knock out (*Glp1r<sup>-/-</sup>*). Von beiden Stämmen wurden männliche Tiere im Alter von 10-12 Wochen mit einem durchschnittlichen Gewicht von 25 g in den Versuch genommen. Die *Glp1r<sup>-/-</sup>* Mäuse stammten ausschließlich aus Eigenzucht, wohingegen die C57BL/6 zum Teil ebenfalls aus Eigenzucht, hauptsächlich jedoch von dem kommerziellen Zuchtbetrieb Charles River geliefert wurden.

Die C57BL/6 Wildtyp-Tiere wurden für die Versuche gewählt, da sie den *Glp1r<sup>-/-</sup>* Tieren als genetischer Background dienen. Diese C57BL/6 Wildtypen wurden auch regelmäßig wieder in die *Glp1r<sup>-/-</sup>* Eigenzucht eingekreuzt und so durch Genotypisierung und gezieltes Kreuzen immer wieder neues Genmaterial in die Eigenzucht eingebracht.

Der C57BL/6-Stamm wurde 1937 aus der 1921 von C. C. Little generierten C57BL-Linie separiert, welche aus einer Verpaarung von Abbie Lathrop stammt. Seit 1974 wird dieser Inzuchtstamm von Charles River gezüchtet und vertrieben [173].

Die *Glp1r<sup>-/-</sup>* Mäuse sind ein von D. J. Drucker und L. A. Scrocchi generierter und 1996 erstmals erwähnter Stamm mit gezieltem knock-out des GLP1-Rezeptor-Gens [174, 175]. Die Funktion des *Glp1r<sup>-/-</sup>* Gens in diesen Mäusen wurde durch Ersatz zweier codierender Exons mit einer

## Material und Methoden

PGK-neo-Kassette ausgeschaltet. Diese linearen Neo-Sequenzen wurden mit Hilfe der Elektroporation in Embryonale Stammzellen (ES) der Linie R1 eingebracht. Zu Beginn wurden hierfür ES (Morula-Stadium) der Mauslinie CD1 verwendet um Chimären zu generieren [174]. Bei der Elektroporation handelt es sich um eine gentechnische Methode bei der Genmaterial mittels kurzer elektrischer Impulse in Zellen eingebracht werden kann [176] und welche heutzutage in der Regel genutzt wird, um zusätzliche Gene in Zellen einzubringen [177]. Später wurde von derselben Arbeitsgruppe C57BL/6 als genetischer Background für die *Glp1r<sup>-/-</sup>* Linie gewählt [175].

Mit freundlicher Genehmigung von D. J. Drucker war es unserer Arbeitsgruppe ermöglicht die *Glp1r<sup>-/-</sup>* Tiere zu züchten und sie auch für die Versuche dieser Arbeit zu verwenden. Durch den spezifischen knock-out ist die physiologische Wirkung des GLP1-Hormons (weitgehend) außer Funktion gesetzt. Die ersten Zuchtpaare unserer Eigenzucht wurden von Taconic Biosciences geliefert und mittels Embryotransfer in den SOPF-Bereich des Zentrums für Biomodelle und Experimentelle Medizin (CBEM) der Medizinischen Universität Innsbruck (MUI) transferiert. Hier wurde durch permanentes Genotypisieren eine homozygote *Glp1r<sup>-/-</sup>* Zucht aufgebaut. Dieses Tiermodell haben wir gewählt, um die Gliptin-Wirkung ohne den Einfluss des GLP1-Rezeptor-Signalwegs zu untersuchen. Die C57BL/6 Mäuse dienten als Kontrollgruppe.

### 4.1.3 Haltungsbedingungen

Die Versuchstiere wurden während der ganzen Zeit im Tierhaus CBEM gehalten. Sowohl im SOPF- (Zuchtbereich, kein Zugang für Wissenschaftler) als auch im SPF-Bereich (Versuchshaltung, Zugang für Wissenschaftler) wurden die Tiere regelmäßig vom Tierpflegepersonal des CBEM kontrolliert.

Alle Tiere wurden, nach den Richtlinien der GV-SOLAS in IVC-Käfigen mit einer Grundfläche von 45 cm<sup>2</sup> auf Einstreu gehalten [178]. Die durchschnittliche Raumtemperatur (RT) lag bei 22 ± 1 °C, die relative Luftfeuchtigkeit bei 55 ± 5 % und die Beleuchtung erfolgte mittels Zeitschaltuhr (Lichtperiode 7.00 – 19.00 Uhr). Die Fütterung erfolgte *ad libitum* mit Alleinfuttermitteln der Firma ssniff, welche vor der Fütterung autoklaviert (Standarddiät) oder bestrahlt (Sitagliptin-Spezialdiät) wurden, um einen Eintrag von Krankheitserregern auszuschließen. Alle weiteren sich in den IVCs befindenden Gegenstände und Materialien

## Material und Methoden

(Schlafhäuschen, Nagehölzer, Einstreu) wurden dementsprechend behandelt. Trinkwasser wurde ebenfalls *ad libitum* aus Nippeltränken bereitgestellt.

Um den S(O)PF-Status aufrecht zu erhalten wird im CBEM alle drei Monate ein Gesundheitsmonitoring nach FELASA-Richtlinien durchgeführt [179]. Weiterhin erfolgten regelmäßige Inspektionen der Tiere und der Tierhaltung durch die versuchstierkundlich erfahrene Tierhausleiterin (Veterinärmedizinerin).

## 4.2 Materialien für die Versuche

### 4.2.1 Versuchstier-Zubehör

Einstreu	Abedd, Lab & Vet Service; Wien, Österreich
IVC-Käfige	Tecniplast, Buguggiate, Italien
Nagehölzer aus Aspenholz	ZOONLAB GmbH, Castrop-Rauxel, Deutschland
Polycarbonat Schlafhäuschen	ZOONLAB GmbH, Castrop-Rauxel, Deutschland
Standarddiät für Mäuse	ssniff, Soest, Deutschland
Trinkflaschen	Tecniplast, Buguggiate, Italien

### 4.2.2 DPP4 Aktivitätsbestimmung

96 Well Zellkultur Mikroplatte	greiner bio-one, Kremsmünster, Österreich
DPP4 Activity Fluorometric Assay Kit	BioVision, Milpitas, USA
Micorplate Reader (Infinite® 200)	Tecan Trading AG, Männedorf, Schweiz

## Material und Methoden

## 4.2.3 Genotypisierung, Polymerase Kettenreaktion (PCR)

1x TAE-Electrophoresis-Buffer:	eigene Herstellung
- Tris Base (Pufferan®)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
- Essigsäure 100 % (Eisessig)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
- EDTA	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
- Aqua dest.	
6x DNA Gel Loading Dye	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Agarosepulver (SeaKem®)	Lonza, Basel, Schweiz
Base Pair Marker, 1kbp DNA ladder	peqlab, Erlangen, Deutschland
Deckel für PCR-Tubes	greiner bio-one, Kremsmünster, Deutschland
Direct PCR Lysis Reagent (Mouse Tail)	Viagen Biotech, Los Angeles, USA
DNA-Farbstoff (Midori Green Advance)	NIPPON genetics EUROPE, Düren, Deutschland
dNTPs (100mM)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Gelschlitten und Kämme	Bio-Rad, München, Deutschland
PCR-Maschine (T GRADIENT)	Biometra, Göttingen, Deutschland
PCR-Primer	eurofins Genomics, Ebersberg, Deutschland
PCR-Tubes	greiner bio-one, Kremsmünster, Deutschland
Power supply (Power Bac Basic)	Bio-Rad, München, Deutschland
Proteinase K	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
recombinant Taq Polymerase (inkl. 10x PCR Buffer & MgCl <sub>2</sub> )	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg, Germany
UV-Fotogerät (UV solo TS Imaging System)	Biometra, Göttingen, Deutschland

## Material und Methoden

## 4.2.4 „Carotid Injury“ und “Carotid Harvest”

4.2.4.1 *Anästhetika, Analgetika, pharmakologische Substanzen*

AMD3100 (Octahydrochloride Hydrate)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Aqua bidest.	Fresenius Kabi, Graz, Österreich
Dexpanthenol (Bepanthen Augensalbe®)	Bayer, Leverkusen
Heparin-Natrium 25 000	ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland
Isofluran (Forane®)	Baxter, Wien, Österreich
Ketamin (Ketasol®)	OGRIS Pharma, Wels, Österreich
Meloxicam (Metacam®)	Boehringer Ingelheim, Ingelheim, Deutschland
Sitagliptin (Januvia®)	MSD SHARP & DOHME GmbH, Haar, Deutschland
Sitagliptin-Futter	ssniff, Soest, Deutschland
Tramal (Tramadol®)	A1 Pharma, Oberhaching, Deutschland
Xylazin (Xylasol®)	OGRIS Pharma, Wels, Österreich

4.2.4.2 *Reendothelialisierungs-Assay*

Deckgläser	Thermo Fisher Scientific Gerhard Menzel, Braunschweig, Deutschland
Digitalkamera (NEX-5TL)	Sony, Minato - Tokyo, Japan
Eindeckmittel (Vitro Clud®)	R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland
Evans blue Dye $\geq 75\%$	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
sämtliches (mikrochirurgisches) Operationsbesteck	fine science tools, Heidelberg, Deutschland
Mikroskop (Axiovert 135)	Zeiss, Oberkochen, Deutschland

## Material und Methoden

Objektiv (EC Plan NanoFluar, 1x0,025)	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Objektträger	R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland
physiologische Kochsalzlösung 0,9%	Fresenius Kabi, Graz, Österreich

## 4.2.4.3 Durchflusszytometrie (FACS-Analysen)

7-Actinoaminomycin Farbstoff	BD Biosciences, Heidelberg Deutschland
APC anti-mouse CD 206, Clone C068C2	BioLegend, San Diego, USA
APC anti-mouse CD309 (VEGFR2, Flk-1), Clone Avas12	BioLegend, San Diego, USA
Brilliant Violet 421™ anti-mouse CD 133, Clone 315-2C11	BioLegend, San Diego, USA
Brilliant Violet 421™ anti-mouse Gr-1, Clone RB6-8C5	BioLegend, San Diego, USA
BSA (Bovine Serum Albumin)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Collagenase, Type 1	Worthington
DNase	Roche, Basel, Schweiz
Dulbecco's Modified Eagle Medium	Lonza, Basel, Schweiz
FACS Gerät (LSRFortessa)	BD Biosciences, Heidelberg Deutschland
FACS Tubes (BD Falcon 5 ml)	BD, Heidelberg, Deutschland
FACSDiva v6.1.2 Software	BD Biosciences, Heidelberg Deutschland
FlowJo v8.8.7. Software	TreeStar Inc., Ashland, USA
mikrochirurgisches Operationsbesteck	fine science tools, Heidelberg, Deutschland
PE anti-mouse F4/80, Clone BM8	BioLegend, San Diego, USA
PE Rat Anti-Mouse CD 184 (CXCR4), Clone 2B11/CXCR4	BD, Heidelberg, Deutschland

## Material und Methoden

V500 Rat Anti-Mouse CD 45, Clone 30-F11      BD Horizon, Heidelberg Deutschland

## 4.2.4.4 Histologie

Einbettmedium für Kryoschnitte (Tissue-Tek® O.C.T. Compound)      Sakura Fintek, Torrance, USA

Eindeckmedium (Roti®-Mount)      Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

Embedding Molds (Shandon™ Peel-A-Way)      Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

SAV Formaldehydlösung,  
neutral gepuffert 4 %      SV Liquid Production GmbH,  
Flintsbach am Inn, Deutschland

Mikroskop mit Kamera (MC120 HD)      Leica Microsystems, Heerbrugg, Schweiz

Mikrotom (Leica CM 1950)      Leica, Nußloch, Deutschland

Weigert - Van Gieson fast method, Färbekit      DiaPath, Martinengo, Italien

## 4.2.5 Scratch-Assay

CB 150 CO2 Incubator      Fa. BINDER GmbH, Tuttlingen, Deutschland

Cedex XS Cell Analyzer      Roche, Rotkreuz, Schweiz

Cedex XS Trypan Blue Solution      Roche, Rotkreuz, Schweiz

Cryo-SFM (Einfriermedium)      PromoCell, Heidelberg, Deutschland

EBM 2 Basal Medium      Lonza, Basel, Schweiz

EGM-MV SingleQuot Kit Suppl. & Growth  
Factors      Lonza, Basel, Schweiz

Human Umbilical Vein Endothelial Cells      PromoCell, Heidelberg, Deutschland

Leica Mikroskop mit Kamera (MC 120 MD)      Leica, Wetzlar, Deutschland

## Material und Methoden

Multiwellplatten, 6 Well	BD Falcon, Heidelberg, Deutschland
Neubauer Zählkammer	Marienfeld, Lauda Königshofen, Deutschland
PBS	Lonza, Basel, Schweiz
Recombinant Human/Feline/Rhesus Maqaque CXCL12/SDF1	R&D Systems, Minneapolis, USA
Smart Slides	Roche, Rotkreuz, Schweiz
Spritzenfilter 0,22µm (MILLEX GP)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Trypsin-Versene EDTA	Lonza, Basel, Schweiz
Zellkulturflaschen 75 ml	TPP Techno Plastic Products, Trasadingen, Schweiz

## 4.2.6 Allgemeine Substanzen und Diverses

GraphPad Prism (Version 7)	Graph Pad Software, La Jolla, California USA
Image J (Open Source Software)	Schneider, C. A.; Rasband, W. S. & Eliceiri, K. W. (2012)
PBS	Lonza, Basel, Schweiz
Pipetten (diverse Größen)	Gilson Inc., Middleton, USA
Pipettenspitzen Tip one <sup>®</sup> (diverse Größen)	STARLAB INTERNATIONAL, Hamburg, Deutschland
Power and Sample Size Program (Version 3.1.2, July 2014; Open Source Software)	William D. Dupont and W. Dale Plummer, Jr
Reaktionsgefäße, Eppendorf Safe-lock Tubes	Eppendorf AG, Hamburg, Germany
Tierverwaltungsdatenbank PyRAT (Python-based Rational Animal Tracking)	Scionics Computer Innovation, Dresden, Deutschland
Wasser (RNase-, DNase- & Proteasefrei)	5Prime, Hilden, Deutschland

## 4.3 Methoden

### 4.3.1 Versuchstiere

#### 4.3.1.1 Zucht der *Glp1r*<sup>-/-</sup> Mäuse

Da die *Glp1r*<sup>-/-</sup> Mäuse standardmäßig nicht von kommerziellen Züchtern vertrieben werden, haben wir eine eigene *GLP1r*<sup>-/-</sup>-Zucht aufgebaut. Die ersten Tiere (9 Weibchen und 4 Männchen) wurden von Taconic Biosciences bezogen, um sie durch Embryotransfer in den SOPF-/Zucht-Bereich des CBEM zu importieren. Diese homozygoten *Glp1r*<sup>-/-</sup> Tiere wurden untereinander verpaart und der Embryotransfer von geschultem Personal des CBEM durchgeführt. Um den Transfer zu beschleunigen wurden die männlichen homozygoten *Glp1r*<sup>-/-</sup> Tiere zusätzlich mit weiblichen C57BL/6 verpaart und deren Embryonen ebenfalls entnommen und transferiert. Nachdem die ersten durch Ammen ausgetragenen Nachkommen hinter der Barriere im SOPF-Bereich geboren waren, wurden diese konsequent im Rahmen der Ohrmarkierung biopsiert und genotypisiert. Dies war notwendig, um heterozygote Tiere aus der Zucht zu nehmen und eine homozygote Zucht aufzubauen.

Die Verpaarungen erfolgten grundsätzlich als 1:1-Verpaarungen und in der Regel waren die Tiere bei der ersten Verpaarung 8 bis 10 Wochen alt. Um regelmäßig neues genetisches Material in die Zucht einzubringen, wurden die homozygoten Zuchttiere in regelmäßigen Abständen mit dem genetischen Background C57BL/6 rückgekreuzt. Die heterozygoten Nachkommen aus diesen Verpaarungen wurden anschließend mit homozygoten *Glp1r*<sup>-/-</sup> Tieren verpaart und deren homozygoten *Glp1r*<sup>-/-</sup> Nachkommen ausschließlich für die weitere Zucht verwendet. Zur Verwaltung der Zuchttiere und des Mausbestands für die Versuche diente die Tierkolonie-Management-Software „PyRAT“ (Python-based Rational Animal Tracking).

#### 4.3.1.2 Genotypisierung der *GLP1<sup>r/-</sup>* Mäuse mittels PCR

Zur Gewährleistung, dass in den Versuchen lediglich homozygote *Glp1<sup>r/-</sup>* Tiere zur Verwendung kamen, wurden alle Nachkommen der Zucht kontinuierlich mittels der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) genotypisiert.

Bei der PCR handelt es sich um eine molekularbiologische Methode zur Amplifizierung spezifischer DNA-Sequenzen. Die doppelsträngige DNA hierbei exponentiell vermehrt, damit sie später mithilfe einer Gelelektrophorese getrennt und spezifische Sequenzen sichtbar gemacht werden können. Hierfür werden die DNA-Doppelstränge durch Hitze (94 °C) denaturiert bzw. getrennt, damit sich im Folgeschritt die spezifischen Primer am 3' Ende der DNA anlagern können. Daraufhin erfolgt mit Hilfe des Enzyms Taq Polymerase eine Komplementierung der Sequenzen in 3' → 5' Richtung. Diese Zyklen werden mehrfach wiederholt, um am Ende eine ausreichende Menge DNA-Doppelstränge für die Gelelektrophorese zu erhalten [180, 181].

Die Trennung der spezifisch amplifizierten DNA-Fragmente durch Gelelektrophorese erfolgt dann in einem Agarosegel (Trennmedium) welchem ein DNA-Farbstoff (Midori Green) zugefügt ist. Für die elektrophoretische Trennung wird das Gel während des Trennverfahrens in einen leitfähiger Puffer (TAE-Puffer) gelegt. Je nach Länge wandern die negativ geladenen DNA-Fragmente, durch das Anlegen von Spannung mittels einem Power-Supply-Gerät, unterschiedlich schnell im Agarosegel zum Pluspol der Elektrophoresekammer hin. Schlussendlich können die Fragmente aufgrund ihrer Wechselwirkungen mit dem DNA-Farbstoff unter UV-Licht (ca. 250-350 nm) sichtbar gemacht werden [181, 182].

Das Genmaterial (DNA) für die PCR wird bei Mäusen in der Regel in Form von Schwanz- oder Ohrbiopsien entnommen [183]. Für unsere Versuche wurden die Ohrbiopsien vom Tierpflegepersonal des CBEM obligatorisch zur individuellen Markierung der Mäuse entnommen. Somit konnte den Tieren unnötiges Handling und eine zusätzliche Gewebeentnahme für die Genotypisierung erspart werden.

Für diese Arbeit wurde die PCR nach dem folgendem Protokoll durchgeführt, welches auf dem von Taconic zur Verfügung gestellten Genotypisierungsprotokoll basiert.

## Material und Methoden

1. Lysieren der Ohrbiopsien

Die Ohrbiopsien wurden mit 90 µl Direct PCR Lysis Reagent und 10 µl Proteinkinase K, aus dem Bakterium *Tritirachium album* gewonnen, über Nacht im Thermomixer bei 55 °C inkubiert, um das Gewebe enzymatisch zu verdauen. Anschließend wurde der enzymatische Verdau durch Hitzeinaktivierung der Proteinkinase K (85°C, 60 min) gestoppt. Das Lysieren der Ohrbiopsien ist notwendig, damit die DNA aus dem Zellkern frei wird und später amplifiziert werden kann.

2. Herstellung des PCR-Mastermix

Für die PCR wurde ein Mastermix mit folgenden Substanzen (Mengenangabe je Sample) für n+2 Biopsien hergestellt. Alle Substanzen wurden vor der Verwendung kurz gevortext und anschließend ggf. zentrifugiert.

**Tab. 1** Auflistung der Substanzen für den PCR-Mastermix.

10xPCR Buffer (NH <sub>4</sub> )SO <sub>2</sub> (-MgCl <sub>2</sub> )	2,5 µl
MgCl <sub>2</sub>	1 µl
dNTP	1 µl
Primer Neo F1 (siehe Tab. 3)	1 µl
Primer Neo B2 (siehe Tab. 3)	1 µl
Primer GLP1R Intron (siehe Tab. 3)	1 µl
Primer Exon E535 2 (siehe Tab. 3)	1 µl
Polymerase	0,25 µl

3. Befüllung der PCR-Reaktionsgefäße

Nach der Herstellung des Mastermix wurden PCR-Reaktionsgefäße (PCR-Tubes) mit je 1 µl lysierter DNA-Lösung und 8,75 µl Mastermix befüllt. Anschließend wurde das Volumen in allen Tubes mit gereinigtem Wasser auf ein Volumen von 25 µl aufgefüllt. Nach dem Verschließen der Tubes wurden diese nochmals gevortext und der Inhalt herunterzentrifugiert.

#### 4. PCR-Reaktion

Die PCR-Reaktion wurde mit einer herkömmlichen PCR-Maschine, auf welcher für die *Glp1r*<sup>-/-</sup>-Genotypisierung folgendes Programm eingestellt war, durchgeführt:

**Tab.2** Darstellung der PCR-Zyklen für die PCR zur Genotypisierung der *Glp1r*<sup>-/-</sup> Mäuse.

Temperatur	Zyklen	Dauer	Zweck
94°C		2 min	Denaturierung der Doppelstränge
94°C	36	20 s	
60°C	36	30 s	Annealing
72°C	36	45 s	Komplementierung der DNA-Doppelstränge
72°C		5 min	
4°C		-	Pause/Ende

#### 5. Herstellung des Agarosegels für die Gelelektrophorese

Währenddessen wurde das 2%ige Agarosegel für die Gelelektrophorese hergestellt. Je nach Probenmenge wurden hierfür 70 ml oder 200ml (kleines bzw. großes Gel) 1xTAE-Buffer mit 1,4 g bzw. 4g Agarosepulver in einem Erlenmeyerkolben mit Hilfe der Mikrowelle aufgekocht, bis das Pulver komplett im Puffer gelöst war. Diesem heißen, noch flüssigen Agarosegel wurden 4 µl bzw. 10 µl des DNA-Farbstoffs Midori-Green hinzugegeben. Das Gel wurde dann in einen Gelschlitten, welcher mit eigens hierfür vorgesehenen Kämmen versehen war, gegossen und abgekühlt. Die Kavitäten, welche durch die Kammzinken entstanden, waren für die Zugabe der einzelnen DNA-Proben gedacht.

#### 6. Beladen des Agarosegels und Gelelektrophorese

Nachdem die PCR-Reaktion komplett durchlaufen war, wurde zu jedem Sample ein 6x DNA-Loading-Dye hinzugegeben (5 µl). Dieser dient dazu, die Laufweite der DNA-Fragmente im Gel während der Gelelektrophorese beurteilen zu können. Anschließend wurde das Gel mit den Proben (10 µl) beladen und in die jeweils erste Kavität einer Reihe 12 µl eines Basenpaar-Markers hinzugegeben. Zusätzlich zu den DNA-Proben eines jeden *Glp1r*<sup>-/-</sup> Wurfs wurden bei jeder Genotypisierung Positivkontrollen für homozygote und heterozygote *Glp1r*<sup>-/-</sup> Tiere, den Background (C57BL/6) und eine Negativkontrolle (H<sub>2</sub>O) mit in das Gel pipettiert.

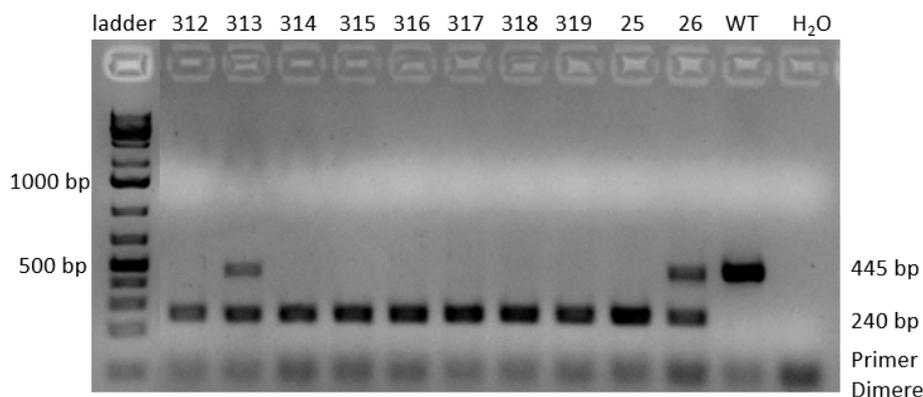
## Material und Methoden

Die Gelelektrophorese wurde in einem 1xTAE-Puffer-Bad bei einer Spannung von 90 V bzw. 130 V durchgeführt. Zur Erzeugung der Spannung wurde ein Power-Supply-Gerät verwendet.

### 7. Aufnahme und Auswertung des Genotypisierungs-Ergebnisses

Nach 25-30 min wurde das Gel aus dem 1xTAE-Puffer-Bad genommen, die aufgetrennten DNA-Fragmente unter UV-Licht in einem UV-Fotogerät sichtbar gemacht und fotografiert.

Je nach Länge der DNA-Fragmente sind diese unterschiedlich schnell im Gel gewandert. Somit konnten 1. homozygote *Glp1r<sup>-/-</sup>* Mäuse, 2. heterozygote *Glp1r<sup>+/-</sup>* Mäuse und 3. Wildtyp-Tiere (C57BL/6) erkannt werden (siehe Abb. 8).



Ergebnis eines Wurfs mit einem heterozygoten *Glp1r<sup>+/-</sup>* Elterntier (CBRE00195, ♂) aus einer Rückkreuzung mit C57BL/6N und einem homozygoten *Glp1r<sup>-/-</sup>* Elterntier (CBRE00162, ♀). Weiterhin sind 4 Kontrollproben sichtbar (25, 26, WT, H<sub>2</sub>O). Die Genotypen des Wurfs sind im Folgenden aufgeführt:  
heterozygot *Glp1r<sup>+/-</sup>*: **313**  
homozygot *Glp1r<sup>-/-</sup>*: **312, 314, 315, 316, 317, 318, 319**

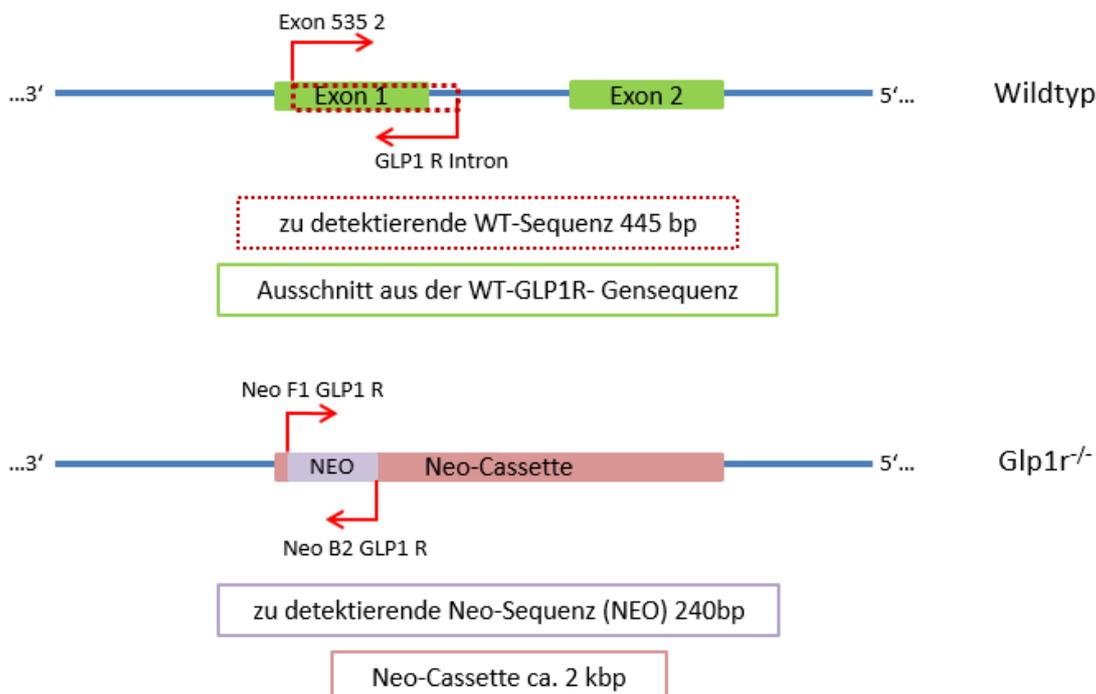
Kontrollen: **25** – homozygote *Glp1r<sup>-/-</sup>*, **26** – heterozygote *Glp1r<sup>+/-</sup>* **WT** – Wildtyp bzw. C57BL/6N,  
**H<sub>2</sub>O** – Wasser (um Kontaminationen auszuschließen)

**Abb. 8** Beispiel für das Ergebnis der Genotypisierung aus der Kreuzung einer hetero-homozygoten Verpaarung.

## Material und Methoden

**Tab. 3** Darstellung der verwendeten Primersequenzen. Die 445 bp langen Genabschnitte sind auf dem Wildtyp-Glp1-Gen zu finden und die 240 bp langen Genfragmente finden sich auf der Neo-Kassette.

Name	Sequenz (3' → 5')	Länge des amplifizierten Genabschnitts
Neo F1	CAA TAT CAC GGG TAG CCA ACG C	240 bp
Neo B2	GTC TTG TCG ATC AGG ATG ATC TG	
GLP1R Intron	ACG GCC TCT CAC ATC AGA CTA G	445 bp
Exon E535 2	CAG GAA CTA CAT CCA CCT GAA CCT GTT TGC GTC CT	



**Abb.9** Darstellung der *Glp1r*-Gensequenzen, welche für die Genotypisierung relevant sind. Es sind die Wildtyp-Gensequenz (oben) mit den zwei Exons, welche im *Glp1r*<sup>-/-</sup> durch die Neo-Kassette ersetzt wurden, sowie die Gensequenz mit Neo-Cassette der *Glp1r*<sup>-/-</sup> Mäuse (unten) abgebildet. Weiterhin ist gekennzeichnet, wo die PCR-Primer für die Genotypisierung ansetzen. Die Primer „Exon 535 2“ und „GLP1 R Intron“ sind zur Detektion des Wildtyp-Gens notwendig, die Primer „Neo F1 GLP1 R“ und „Neo B2 GLP1 R“ zur Detektion des *Glp1r* Knock-outs.

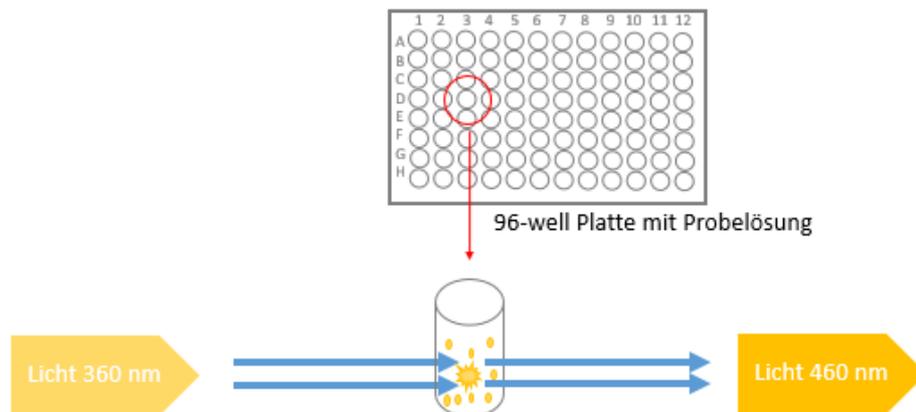
#### 4.3.2 DPP4-Aktivitätsbestimmung

##### 4.3.2.1 *Prinzip der fluorometrischen DPP4-Aktivitätsmessung*

Zur Bestimmung der DPP4-Serumaktivität und um die Wirkung der Sitagliptin-Experimentaldiät zu bestätigen, wurde das „DPP4 Activity Fluorometric Assay Kit“ der Firma BioVision verwendet.

Das diesem Assay zu Grunde liegende Prinzip basiert auf der fluorometrischen Bestimmung der Konzentration an Spaltprodukten von dem im Kit gelieferten DPP4 Substrat. Dieses Substrat (H-Gly-Pro-AMC) wird von der sich im Serum befindenden Dipeptidyl-Peptidase 4 so gespalten, dass ein fluoreszierendes Spaltprodukt (7-Amino-4-Methyl-Coumarin; AMC) frei wird. Abhängig von der DPP4 Aktivität in den Proben wird mehr oder weniger Spaltprodukt frei. Bei der fluorometrischen Messung wird diese Menge an Spaltprodukt nach folgendem Prinzip gemessen.

Durch das in die Probelösung gestrahlte (Extinktion (Ex)=360 nm) und absorbierte Licht wird das fluoreszierende AMC, angeregt und kann somit energieärmeres Licht wieder abgeben (Emission (Em) = 460 nm). Diese Sekundärstrahlung wird Fluoreszenz genannt und wird zur Bestimmung der AMC-Menge in der Probelösung in Ihrer Intensität gemessen. Bei der Methode der Fluorometrie handelt es sich um eine sehr empfindliche Messmethode mit der die DPP4-Serumaktivität zuverlässig bestimmt werden kann [184] (siehe Abb. 10).



**Abb. 10** Prinzip der Fluorometrie (modifiziert nach Kraft et al. [184])

#### 4.3.2.2 Versuchsaufbau und Probenahme

Die Fütterung in diesem Versuch erfolgte mit einem speziell für unsere Versuche angefertigten Sitagliptin-Experimentalfutter, bei dessen Gabe eine Dosierung von 500 mg/kg/d gewährleistet werden konnte.

Die Serumaktivität der DPP4 wurde nach dreitägiger Fütterung mit der Experimentaldiät bestimmt. Hierfür wurden die Mäuse mit Ketamin-Xylazin anästhesiert (100 mg/5-10 mg je kg KG) und anschließend mittels kardialer Punktion entblutet. Die Punktion erfolgte mit heparinisierten Kanülen der Stärke 20G und um eine vorzeitige Gerinnung zu vermeiden wurde das gewonnene Blut 1:10 mit Heparin 25 000 IU antikoaguliert. Damit für jede Messung eine ausreichende Menge Serum gewonnen werden konnte wurde das Blut von immer jeweils 3 Tieren gepooled. Zur Serumgewinnung wurden die Proben anschließend 5 min bei 1589 G zentrifugiert und das Serum abpipettiert. Die Lagerung des Serums bis zur DPP4 Aktivitätsmessung erfolgte bei -80°C.

#### 4.3.2.3 Durchführung der Aktivitätsmessungen

Für die Durchführung der Aktivitätsmessungen wurden Serum und Reagenzien nach folgendem Protokoll in 96-well Mikrotiterplatten pipettiert und anschließend in einem Microplate Reader gemessen.

Protokoll für die DPP4-Aktivitätsmessung:

1. Zuerst wurde der AMC Standard (AMC) vorbereitet: 10µl Standard (1mM) +99µl H<sub>2</sub>O.
2. Anschließend wurde dieser, wie im Data Sheet des Assay-Kits angegeben, in die Platte pipettiert und mit Assay Buffer (AB) auf 100µl aufgefüllt (z.B. 6µl Standard + 94µl AB).
3. Als nächstes war die Positivkontrolle (PK) zu pipettieren: 1 bzw. 2 µl je Well und mit Assay Buffer auf 50µl auffüllen (z.B. 2µl PK + 48µl AB).
4. Weiterhin waren die Serumproben (S) zu pipettieren. Sie wurden in folgenden Mengen eingesetzt und pipettiert: 50 – 10 – 5 – 1 µl je Well (jeweils mit Duplikat) und dann auf ein Volumen von 60µl mit Assay Buffer aufgefüllt (z.B. 10µl Serum + 50µl AB).
5. Nun wurde für jede Konzentration ein „Background“ pipettiert (jeweils mit Duplikat). Diesem wurde zusätzlich ein DPP4-Inhibitor (DPP4i) hinzugegeben. Auch hier wurde das Serum in definierter Menge (siehe Punkt 4.) verwendet, dann mit Assay Buffer auf 50 µl aufgefüllt und als letztes 10 µl Inhibitor hinzugegeben (z.B. 10µl Serum + 40µl AB + 10 µl DPP4i).
6. Alles wurde bei 37°C für 10 min inkubiert.
7. Währenddessen wurde der sogenannte „Mix“ (=DPP4 Substrat und AB) vorbereitet. Hierfür wurden je Well (exklusive Standard!) 38µl Assay Buffer und 2µl DPP4 Substrat (=40µl „Mix“ je Well) angemischt.
8. Nach den 10 min Inkubationszeit wurden je Well (Serum, „Background“, Positivkontrolle) 40µl „Mix“ hinzugegeben und sofort im Plate Reader gemessen.

##### Messbedingungen:

Zeitpunkte:  $t = 0 \text{ min}$ ,  $t = 30 \text{ min}$

Wellenlänge: 360/460 nm

## Material und Methoden

**Tab.4** Schematische Darstellung des Pipettierschemas auf einer 96-well Mikrotiterplatte für die DPP4-Aktivitätsmessung. AMC = AMC-Standard, AB = Assay Buffer, PK = Positivkontrolle,

S = Serum, Mix = Mischung aus AB und Substrat, DPP4i = DPP4-Inhibitor.

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	0µl AMC 100µl AB	2µl AMC 98 µl AB	4µl AMC 96 µl AB	6µl AMC 94 µl AB	8µl AMC 92 µl AB	10µl AMC	1µl PK 49µl AB 40µl Mix	2µl PK 48µl AB 40µl Mix
B	50µl S 10µl AB 40µl Mix	10µl S 50µl AB 40µl Mix	5µl S 55µl AB 40µl Mix	1µl S 59µl AB 40µl Mix				
C	50µl S 10µl DPP4i 40µl Mix	10µl S 40 µl AB 10µl DPP4i 40µl Mix	5µl S 45 µl AB 10µl DPP4i 40µl Mix	1µl S 49 µl AB 10µl DPP4i 40µl Mix				

## 4.3.2.4 Auswertung

Die Ermittlung der DPP4 Aktivität in RFU (relative fluorometric units) erfolgte mit Hilfe der im Kit angegebenen Formeln. Die RFU geben an, wieviel Substrat pro Zeit bei 37 °C durch die DPP4 in der Probe gespalten wurde und werden mit folgenden Formeln berechnet:

$$\Delta \text{RFU} = y_2 - y_1 = (\text{RS}(t_2) - \text{RB}(t_2)) - (\text{RS}(t_1) - \text{RB}(t_1))$$

$$\text{Aktivität RFU } [\mu\text{U}/\text{ml}] = \left[ \frac{y_2 - b}{(t_2 - t_1) * V} \right] * \text{Verdünnungsfaktor}$$

Es gilt:

$x_1$  bzw. 2 = Fluoreszenz

$y_1$  bzw. 2

= Differenz der gemessenen Fluoreszenz von Serum minus inhibierter Background

$t_1$  = Werte zum Zeitpunkt der 1. Messung (0 min)

$t_2$  = Werte zum Zeitpunkt der 2. Messung (30 min)

$V$  = Serumvolumen der Probe

$R = \text{RFU}, S = \text{Serum}, B = \text{Background}$

Material und Methoden

Weiterhin gilt für

die Standardkurve:

$$y = m x(\text{Standard}) + b$$

die Fluoreszenz:

$$x1 = \frac{(y1-b)}{m} \text{ bzw. } x2 = \frac{(y2-b)}{m}$$

$R^2$  gilt als Vergleichswert, um die Messgenauigkeit des Geräts zu überprüfen. Dieser ist im Produktdatenblatt mit 0,99 angegeben und sollte ungefähr diesem Wert entsprechen.

Für die rechnerische Auswertung wurde das Tabellenkalkulationsprogramm Excel verwendet.

### **Beispiel:**

Beispielhaft wird hier die Auswertung der DPP4 Aktivität mit den Messwerten aus einer Serumprobe, welche von Tieren mit Sitagliptin-Fütterung gewonnen wurde, beschrieben.

#### 1. Erstellung der Standardkurve

Zur Erstellung der Standardkurve wurde aus den Messwerten des AMC-Standards eine Kurve erstellt, um somit die benötigten Werte zu ermitteln. Die Messung erfolgte zu den Zeitpunkten 0 und 30 min bei Proben mit unterschiedlicher Konzentration des Standards.

Daraus ergibt sich zum Zeitpunkt 30 min (siehe Tab. 5):

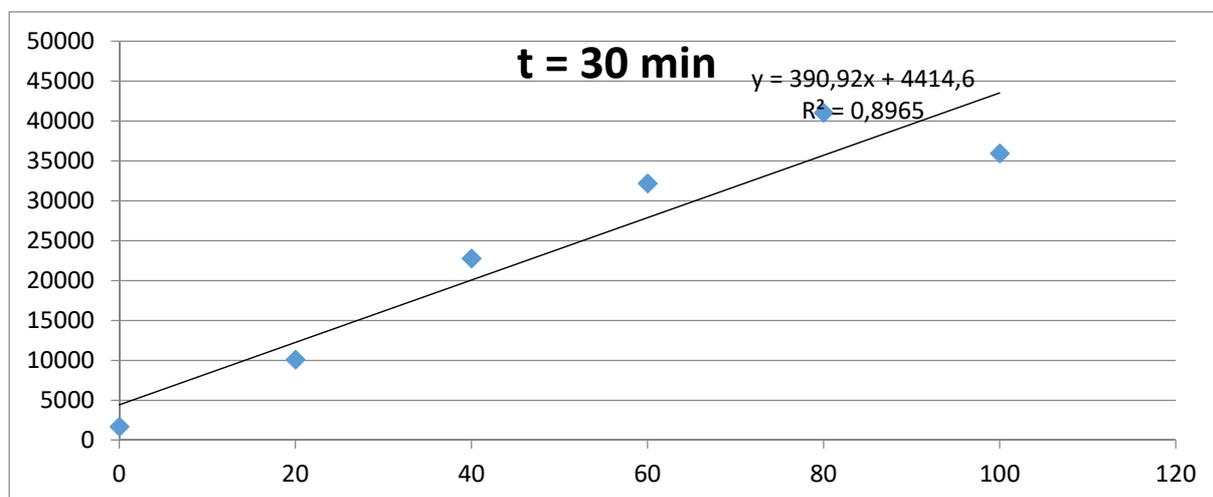
$$y = m x(\text{Standard}) + b$$

$$y2 = 390,92x + 4414,6 \text{ und } R^2 = 0,8965$$

(siehe Tab. 5 und Abb. 11)

**Tab. 5** Darstellung der Messwerte zur Erstellung der Standardkurve.

	0 Min (t1) ( y-Achse)	30 Min (t2) (y-Achse)
pmol AMC-Standard (x-Achse)		
0	1849	1697
20	11140	10085
40	25373	22786
60	35249	32179
80	45122	41045
100	39734	35971

**Abb. 11** Standardkurve zum Zeitpunkt  $t = 30 \text{ min}$  ( $t_2$ ), welche aus den gemessenen Standardwerten (verschiedene Konzentrationen des AMC-Standards in pmol) ermittelt wurden.

## 2. Berechnung der DPP4-Aktivität:

a) Berechnung der RFU nach 30 min mit der Formel (siehe Tab. 6):

$$\Delta RFU = y_2 - y_1 = (RS(t_2) - RB(t_2)) - (RS(t_1) - RB(t_1))$$

$$\Delta RFU = (19594 - 17512) - (7675 - 6776) = 2037 - 899 = 1138$$

**Tab. 6** Messwerte aus den Serumproben zur Bestimmung der DPP4-Aktivität. S = Serum, B = Background

	t 1	t 2	0 min	30 min
	0 min	30 min	S(t1) – B(t1)	S(t2) – B(t2)
	<b>Sitagliptin 1</b>			
S 50µl	7675	19549	899	2037
S 10µl	4284	8902	300	2115
S 5µl	3506	6666	11	1883
S 1µl	3438	5479	357	2189
B 50µl	6776	17512		
B 10µl	3984	6787		
B 5µl	3495	4783		
B 1µl	3081	3290		

b) Berechnung der Aktivität mittels der Formel:

$$\begin{aligned}
 \text{Aktivität RFU } [\mu\text{U/ml}] &= \left[ \frac{y_2 - b}{(t_2 - t_1) * V} \right] * \text{Verdünnungsfaktor} \\
 &= \left( \frac{x_2}{(t_2 - t_1) * V} \right) * \text{Verdünnungsfaktor}
 \end{aligned}$$

Hierfür wird noch der Wert  $x_2$  benötigt, welcher in diesem Beispiel separat berechnet wurde:

$$x_2 = \frac{(y_2 - b)}{m}$$

$$x_2 = (2037 - 4414,6)/390,92 = -6,08206283$$

Hieraus ergibt sich dann (siehe Tab. 7)

$$\text{RFU}_{30} = (-6,08206283 / ((30 - 0) * 0,1)) * 2 = -4,05470855$$

Zu beachten ist, dass negative RFU-Werte hier eine vollständige DPP4-Inhibition bedeuten, sprich keinerlei enzymatische Aktivität vorhanden ist. Es spielt keine Rolle, wie negativ der Wert ist.

**Tab. 7** DPP4-Aktivität in den Serumproben zum Zeitpunkt  $t = 30$  min (Anmerkung: alle negativen RFU-Werte entsprechen einer vollständigen DPP4 Inhibition).

Verdünnungs- faktor	ml Probe	Aktivität nach 30 min
2	0,1	-4,05470855
10	0,1	-19,608445
20	0,1	-43,1733688
100	0,1	-189,774549

#### 4.3.3 „Carotid Injury“ und „Carotid harvest“

##### 4.3.3.1 Die „Carotid Injury“-Operation

Das Modell der Carotid Injury (CI) diente in allen Versuchen für diese Arbeit als Grundlage zur Untersuchung der Gliptin-Wirkung und ciPC-Rekrutierung. Für diese Operation wurden die Mäuse mit einer Isofluran-Inhalationsnarkose (5 % Einleitung, 2-3 % Erhalt) anästhesiert.

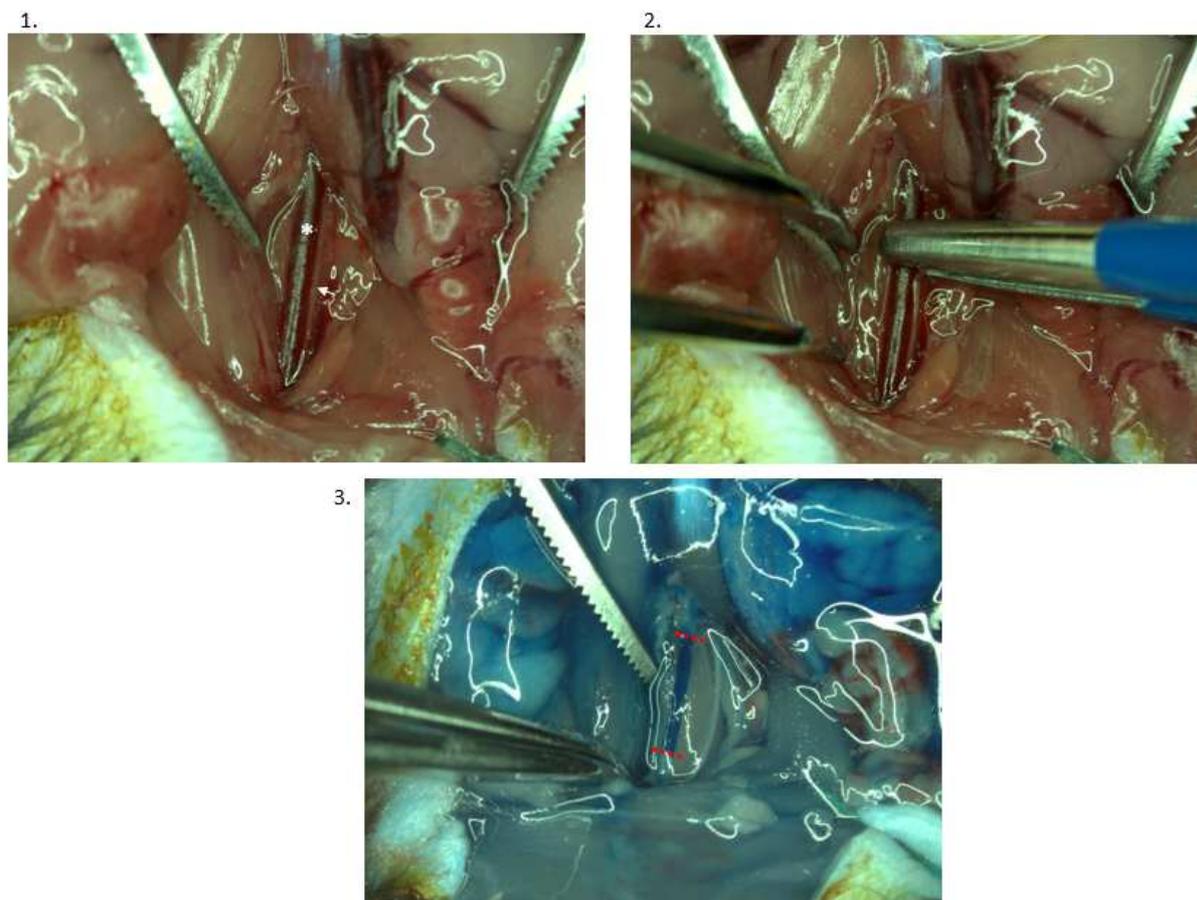
Sobald die Tiere das chirurgische Toleranzstadium erreicht hatten, wurden sie auf einer Wärmeplatte mit Hilfe von Klebesteifen an den Gliedmaßen fixiert. Der Oberkiefer wurde mit einem Gummiband ebenfalls an der Wärmeplatte fixiert, um während der Operation störende Bewegungen des OP-Felds zu vermeiden. Als Unterlage für den Kopf diente ein Zellstofftupfer. Die Augen der Mäuse wurden mit Dexpanthenol-Augensalbe vor dem Austrocknen geschützt. Um eine konstante Körpertemperatur von 37 °C während der Operation zu gewährleisten, wurde den Tieren zusätzlich ein mit der Steuerungseinheit der Wärmeplatte verbundener Temperaturfühler rektal eingeführt. Um Verletzungen zu vermeiden, wurde dieser zuvor mit Vaseline versehen.

Vor Beginn des eigentlichen Eingriffs wurde das OP-Feld, die ventrale Seite des Halses, mit Enthaarungscreme in einem Bereich von ca. 1,5 x 2 cm gründlich enthaart. Anschließend wurde die Stelle mit einem jodhaltigen Antiseptikum desinfiziert. Zusätzlich bekamen die Tiere zur postoperativen Analgesie s.c. Meloxicam (1 mg/kg) verabreicht.

## Material und Methoden

Nach Enthaarung und Desinfektion des OP-Felds wurde mit einer Hautschere eine 1,5 cm lange Hautinzision an der ventralen Halsseite gesetzt, so dass die Speicheldrüsen (*Gll. mandibulares*) gut sichtbar waren. Diese wurden mit zwei feinen anatomischen, gebogenen Pinzetten stumpf zur Seite präpariert, damit die ventrale Halsmuskulatur gut sichtbar war. Die linke *Gl. mandibularis* wurde mit einer der Pinzetten seitlich, außerhalb des OP-Feldes temporär fixiert. Mit Hilfe eines gekürzten chirurgischen Fadens (Stärke 5-0) wurde nun der *M. sternocleidomastoideus* umstochen und der Faden so seitlich mit einem Klebestreifen auf der Wärmeplatte fixiert, dass der Muskel nach links verlagert wurde und die Sicht auf die *A. carotis communis* ermöglicht war. Nun war die linke, pulsierende *A. carotis communis* gut sichtbar und konnte mit mikrochirurgischen Pinzetten stumpf freipräpariert und der *N. vagus* vorsichtig zur Seite geschoben werden. Nachdem die *A. carotis communis* gut freipräpariert war, wurde mit der bipolaren Pinzette (1 mm) die Deendothelialisierung der *A. carotis communis* auf einer Länge von 4 mm durchgeführt (siehe Abb. 12). Hierfür wurde die bipolare Pinzette, welche mit dem bipolaren Mikroregulator verbunden war, an die Arterie angelegt und über das Fußpedal des Mikroregulators kurz ein Stromfluss von 2 W ausgelöst, welcher eine Ablösung des Gefäßendothels bewirkte. Hierbei musste darauf geachtet werden, dass es nicht zu einer Obliteration des Gefäßes kam. Die Länge des verletzten und deendothelialisierten Bereichs war durch ihre matt erscheinende Oberfläche und die verminderte Gefäßpulsation erkennbar. Mit Hilfe einer modifizierten Büroklammer, welche mit einer 4 mm langen Markierung versehen war, wurde die exakt definierte Verletzungslänge überprüft.

Nachdem die Deendothelialisierung erfolgt war, wurden der *M. sternocleidomastoideus* und die *Gll. mandibulares* wieder in ihre ursprüngliche Lage verbracht. Die Haut wurde durch eine fortlaufende Naht mit einem resorbierbaren chirurgischen Faden der Stärke 5-0 verschlossen. Zuletzt wurde die Operationswunde nochmals mit dem jodhaltigen Antiseptikum desinfiziert und die Mäuse zum Aufwachen in einen sauberen Käfig gelegt. Dieser wurde bis zum völligen Erwachen der Tiere mit einer Rotlichtlampe gewärmt, um eine Hypothermie zu vermeiden.



**Abb. 12** 1. freipräparierte *A. carotis communis* (\*) vor der Carotid Injury, → *N. vagus*; 2. Induktion der Endothelverletzung mit dem Elektrokauter; 3. *A. carotis communis* nach der Carotid Injury und der Evans blue Färbung an Tag 0, die verletzte Endothelfläche ist gut in dunkelblauer Färbung zu erkennen.

#### 4.3.3.2 Die „Carotid Harvest“-Operation

Bei der Carotid Harvest (CH) handelt es sich um die Entnahme der *A. carotis communis* für weitere Analysen wie z.B. die Evans blue-Färbung zur Quantifizierung der Endothelregeneration oder FACS-Analysen zum Nachweis rekrutierter ciPC in die verletzten Bereiche des Gefäßes.

Für diese Operation wurden die Mäuse mit einer Ketamin-Xylazin-i.p.-Injektionsnarkose (100 mg/5-10 mg je kg KG) anästhesiert und anschließend mit CO<sub>2</sub> euthanasiert. Hierfür wurden die Tiere in einen Käfig mit gasdichter Abdeckung verbracht und durch CO<sub>2</sub>-Begasung getötet. Nach 5-10 min im CO<sub>2</sub>-befüllten Käfig wurden die Tiere entnommen und der Tod durch Reflexprüfung eindeutig sichergestellt. Dann wurden sie analog zur CI fixiert und die linke A.

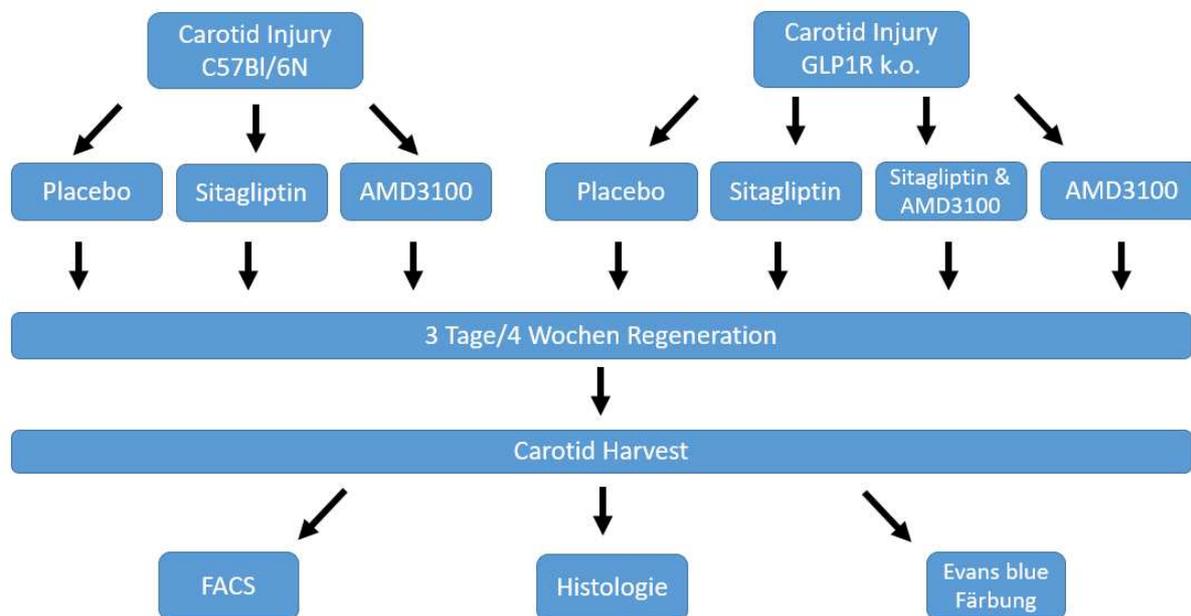
## Material und Methoden

*carotis communis* freipräpariert. Für die CH wurde, im Vergleich zur CI, das Gefäß weiter cranial und caudal des verletzten Bereichs sauber freipräpariert, um dieses dann auf Höhe der Bifurkation der *A. carotis communis* in *A. carotis externa* und *interna* mit einer mikrochirurgischen Pinzette zu fassen und es cranial davon abzuschneiden. Nun wurde das schon einseitig abgeschnittene Gefäß vorsichtig auf Spannung gebracht und so weit caudal wie möglich ebenfalls abgeschnitten. Die entnommene *A. carotis* wurde nun in eine mit NaCl gefüllte Petrischale gelegt und durch sanftes Schwenken kurz gewaschen. Je nach anschließender Analysemethode (Evans blue Färbung, FACS, Histologie) wurde die *A. carotis communis* dann weiter aufbereitet.

### 4.3.3.3 Versuchsaufbau

Alle Tiere wurden zu Anfang des Versuchs der Carotid Injury unterzogen. Anschließend wurden die Tiere in drei bzw. vier Gruppen randomisiert: Placebo, Sitagliptin und ggf. Sitagliptin & AMD3100 oder AMD3100 allein (nur CI). Nach drei bzw. 28 Tagen Regenerationsdauer wurde die *A. carotis communis* für weitere Analysen entnommen (siehe Abb. 13).

## Versuchsaufbau Endothelregeneration durch ciPCs



**Abb. 13** Übersicht über den Versuchsaufbau dieser Arbeit.

### 4.3.3.4 Sitagliptin

Das Sitagliptin wurde als Experimentalfutter verabreicht. Der Wirkstoff war so eingemischt, dass bei einer durchschnittlichen Futteraufnahme der Mäuse (4,9 g/Tag je 25 g Maus) eine Dosierung von ca. 500 mg/kg/d gewährleistet war. Als Grundlage für diese Diät diente eine normale Standarddiät des Herstellers für Mäuse in der Haltung, in welche pulverisierte Sitagliptin-Tabletten (2550 mg/kg Experimentaldiät) und zusätzlich ein roter Farbstoff zur Unterscheidung von normalem Futter eingemischt wurden. Durch die anteilmäßig geringe Beimischung von 0,255 % der pulverisierten Sitagliptin-Tabletten (Angabe laut Hersteller) konnte mit diesem Experimentalfutter der Nährstoffbedarf der Tiere gedeckt werden und es war aufgrund der Spezialfütterung keine Nährstoffsubstitution zur Vermeidung von Mangelerscheinungen notwendig. Die Fütterung der Mäuse erfolgte auch bei Gabe des Spezialfutters zu jedem Zeitpunkt des Experiments ad libitum.

#### 4.3.3.5 AMD3100

Der CXCR4-Rezeptorblocker AMD3100 wurde den Tieren als i.p.-Injektion einmal täglich über den gesamten Versuchszeitraum verabreicht. Der Wirkstoff AMD3100 wurde in Aqua ad inj. gelöst, so dass die Endkonzentration der Lösung 0,625 mg/ml betrug. Diese Gebrauchslösung konnte zu je 50 µl aliquotiert werden und erleichterte so die Applikation des Wirkstoffs. 50 µl der Lösung enthielten 0,03125 mg AMD3100, was für eine Maus mit 25 g der gewünschten Dosierung von 1,25 µg/kg/d entsprach.

#### 4.3.4 Reendothelialisierungs-Assay

##### 4.3.4.1 Prinzip und Durchführung des Reendothelialisierungs-Assay

Der Reendothelialisierungs-Assay (Re-A) wurde durchgeführt, um die endotheliale Regeneration der *A. carotis communis* quantifizieren zu können (siehe Abb. 12 & 14).

Für diesen wurden die Tiere zur CH, wie oben beschrieben, anästhesiert und nach Erreichen des chirurgischen Toleranzstadiums zuerst noch der Farbstoff Evans blue intravenös verabreicht. Hierfür wurde die Schwanzvene mit warmem Wasser (ca. 40-42°C) hyperämisiert und dann mit einer 30G Kanüle punktiert, um rund 100 µl Farbstoff zu applizieren. Anschließend konnte der Farbstoff ca. 2-3 min im Kreislauf zirkulieren und sich so gut an verletzte deendothelialisierte Bereiche anlagern [9, 185]. Die Tiere nahmen hierbei eine deutliche Blaufärbung an. Anschließend wurden die Tiere, wie oben beschrieben, mit CO<sub>2</sub> getötet.

Die toten Mäuse wurden dann an allen vier Gliedmaßen und Oberkiefer fixiert, Abdomen und Thorax eröffnet und die Leber eingeschnitten. Anschließend wurde die linke Herzkammer mit einer 20G Kanüle punktiert und das Gefäßsystem mit 30-40 ml 0,9% NaCl gespült. Hierfür wurde eine 50 ml Einmalspritze verwendet. Die Spülflüssigkeit konnte über die Leberinzision abfließen und wurde mit Zellstofftupfern aufgefangen.

Nach diesem Schritt wurde die *A. carotis communis* wie im Abschnitt „Die „Carotid Harvest“-Operation“ beschrieben, entnommen, in NaCl gewaschen und auf einen Objektträger aufgebracht. Hierbei wurde darauf geachtet, dass die *A. carotis communis* äußerst gerade auf

## Material und Methoden

dem Objektträger auflag. Anschließend wurde ein Tropfen Vitro Clud®-Eindeckmedium auf das Gefäß getropft und dann vorsichtig ein Deckglas zur Fixation aufgelegt.

Diese Präparate wurden nach dem Trocknen zur Quantifizierung der Reendothelialisierung verwendet.

### *4.3.4.2 Auswertung*

Für die Auswertung der mit Evans blue gefärbten Gefäße wurden diese nach Fixation und Einbettung über ein Lichtmikroskop mit angeschlossener Digitalkamera fotografiert. Alle Fotografien wurden mit derselben Vergrößerung ( $1 \times 0,025$ ) aufgenommen.

Das Bildverarbeitungsprogramm „Image J“ [186] wurde zur Längenbestimmung der blau gefärbten Areale verwendet. Hierfür wurden die Seitenlängen der Bereiche links und rechts abgemessen (1 mm wurde mithilfe eines Objektmikrometers als 548 Pixel definiert) und hieraus ein Mittelwert je Gefäß bestimmt (siehe Abb. 14).

## Material und Methoden

A.



B.

ImageJ

File Edit Image Process Analyze Plugins Window Help

ImageJ 1.46r / Java 1.6.0\_20 (32-bit)

Results

	Area	Mean	Min	Max	Length
1	1543	175.396	44.679	255	1543.488
2	1724	150.014	33.679	255	1723.966

548 Pixel = 1mm  $\rightarrow$   $1543,488 / 548 = 2,81$  mm  
 $1723,966 / 548 = 3,14$  mm

Messwerte Zeiss-Mikroskop-Fotos - Microsoft Excel

	A	B	C	D	E	F	G	H
1	Referenz/Objektmikrometer	548 pixel (1mm)						
2								
3	Tier ID	Tag	Behandlung	Länge in Pixel rechts	Länge in Pixel links	Länge in mm rechts	Länge in mm links	Mittelwert
4	CBRE00981	0		1723,966	1543,488	3,145923358	2,816583942	2,98125365

**Abb. 14** Beispiel für die Auswertung des Reendothelialisierungs-Assays mit Excel am Tag 0 (B.) mit dem Programm „Image J“. In orange sind die abgemessenen Strecken an der Carotis gekennzeichnet (A.).

#### 4.3.5 Durchflusszytometrie (FACS-Analysen)

##### 4.3.5.1 Prinzip der FACS-Analyse

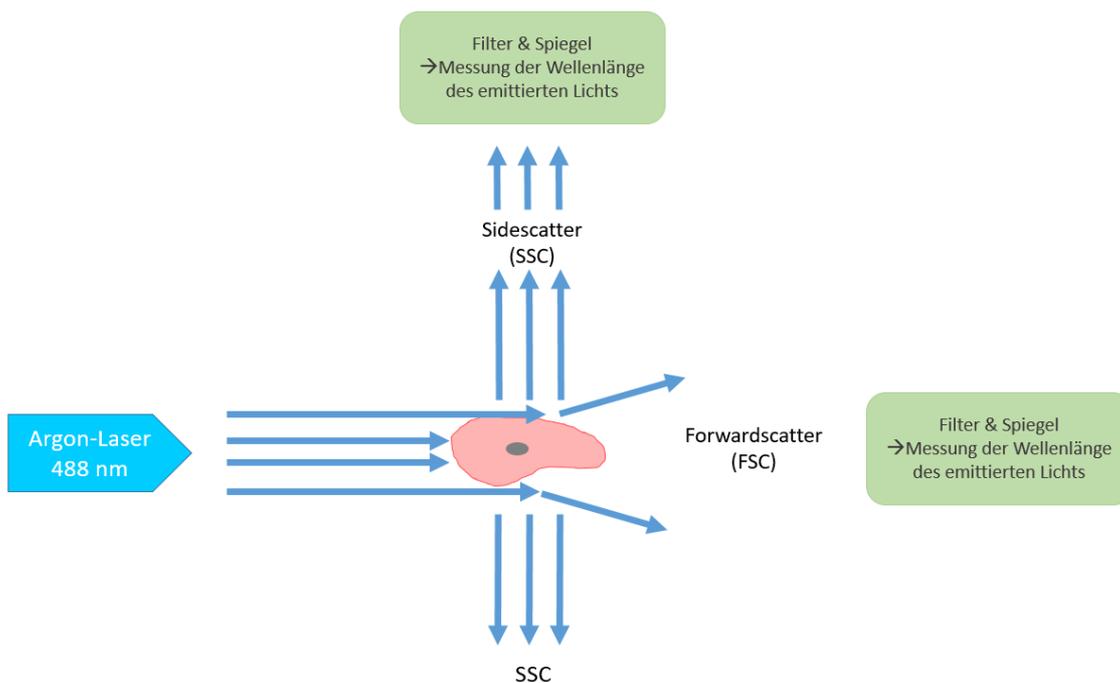
Bei der Durchflusszytometrie, auch FACS-Analyse (Fluorescence Activated Cell Sorting) genannt, handelt es sich um eine Methode zur Analyse von Zellmorphologie und -eigenschaften. Die FACS-Analyse basiert auf der durch einen Laser erzeugten, spezifischen Fluoreszenz der einzelnen Zelltypen und wurde erstmals 1954 von Wallace

## Material und Methoden

Coulter beschrieben. Hierbei passieren Zellen in einem laminaren Strom den Laserstrahl, wodurch die mit Fluoreszenzfarbstoffen (z.B. zelltypspezifische fluoreszenzgekoppelte Antikörper) markierten Zellen durch unterschiedliche Lichtstreuung spezifische Signale aussenden. Je nach Streurichtung des fluoreszierten Lichtes können Größe und Granularität der Zellen bestimmt werden.

Für die Messung passieren die markierten Zellen einzeln eine Messküvette und somit den Laserstrahl. Dies geschieht unter Druck, vorbei an einer Trägerflüssigkeit, welche die zu messende Zelllösung zu einem laminaren Strahl bündelt (hydrodynamische Fokussierung) und die Zellen so akkurat für die Messung positioniert. Je nach Anwendung kommen unterschiedliche Laser zum Einsatz, üblich sind derzeit Helium-Neon-Laser (633 nm) oder Argon-Laser (488 nm). Je nach Streurichtung des fluoreszierten Lichts können dann Größe und Granularität der Zellen gemessen werden. Das „vorwärts“ gestreute Licht (Forwardscatter, FSC) gibt Information über die Zellgröße, das „seitwärts“ gestreute Licht (Sidescatter, SSC) über die Zellgranularität. Weitere Information über die Zellen kann dann aufgrund des emittierten Lichts gewonnen werden. Je nach verwendetem Fluoreszenzfarbstoff, wird ein bestimmtes Fluorochrom absorbiert und höherwelliges Licht wieder emittiert. So können mit Hilfe verschiedener Filter spezifische Zellen genau detektiert werden [187] (siehe Abb. 15).

Die FACS-Analysen in unserem Projekt wurden durchgeführt, um die in die verletzten Areale der *A. carotis communis* rekrutierten ciPCs nachzuweisen und zu quantifizieren.



**Abb. 15** Prinzip der Durchflusszytometrie (modifiziert nach Luttmann et al. [188]).

#### 4.3.5.2 Probenahme und Versuchsaufbau

Vor der Entnahme der Gefäße für die FACS-Analysen wurde die *A. carotis communis*, wie zu Beginn der anderen Experimente, zuerst mit einem Endothelschaden versehen (CI) und nach drei Tagen entnommen (CH). Diese Versuche wurden ausschließlich mit *Glpr1<sup>-/-</sup>* Mäusen durchgeführt, da die zusätzliche Verwendung von C57BL/6 Tieren keine weiteren gewinnbringenden Informationen versprach und so im Sinne der 3R (Reduction) keine unnötigen Versuchstiere gebraucht wurden. Die *A. carotis communis* wurde den Tieren für diese Analysen ohne vorherige Evans blue-Färbung entnommen und dann wie folgt für die Durchflusszytometrie aufbereitet:

- 1) Jeweils 2 Gefäße wurden „gepooled“ und in mit 200 µl 0,2 %iger Collagenaselösung und 2 µl 1% DNaselösung befüllte Eppendorf Tubes gegeben und dort mit einer mikrochirurgischen Schere zerkleinert (< 0,5 mm).
- 2) Anschließend folgte eine 45 minütige Inkubation bei 37 °C, während der die Lösung alle 10 min auf- und abpipettiert wurde.
- 3) Nach 5 minütiger Zentrifugation bei Raumtemperatur (RT) und 243 G wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit 100 µl PBS resuspendiert.

## Material und Methoden

- 4) Nun wurden die Proben zur Färbung für ciPCs und Makrophagen aufgeteilt (je 50  $\mu$ l) und konjugierte Antikörper hinzugegeben. Es wurden folgende Antikörper verwendet:  
ciPC-Färbung: CD45-V500, CXCR4-PE, Flk-1-APC, CD133-Brilliant Violet 421  
Makrophagen-Färbung: CD45-V500, F4/80-PE, Gr-1- Brilliant Violet 421, CD206-APC
- 5) Daraufhin wurden die Proben abermals für 30 min im Dunklen bei Raumtemperatur inkubiert.
- 6) Nach Zugabe von 500-800  $\mu$ l 1% BSA-Lösung wurden die Ansätze gevortext und anschließend erneut zentrifugiert (5 min, 243 G).
- 7) Der Überstand wurde anschließend abgeschüttet, das Pellet mit 300  $\mu$ l PBS resuspendiert und in ein FACS-Röhrchen überführt.
- 8) Kurz vor der Messung wurde dann noch der Lebend-Tot-Farbstoff 7-AAD hinzugegeben, um die lebenden Zellen besser von toten Zellen und anderen Teilchen differenzieren zu können.

Die unterschiedlichen Färbungen wurden durchgeführt, um die rekrutierten CXCR4<sup>+</sup> Flk-1<sup>+</sup> und CXCR4<sup>+</sup> CD133<sup>+</sup> zirkulierenden Progenitorzellen zu quantifizieren. Zudem wurde die Makrophagenfärbung durchgeführt, um einen eventuellen Einfluss der Gliptin-Therapie auf Makrophagengehalt und -differenzierung (Gesamtmakrophagengehalt: F4/80<sup>+</sup>; inflammatorische M1 Makrophagen: F4/80<sup>+</sup>Gr-1<sup>+</sup>; regenerative M2 Makrophagen: F4/80<sup>+</sup>CD206<sup>+</sup>) im akuten Endothelschaden näher zu untersuchen.

Alle FACS-Analysen wurden ab der Probenvorbereitung und -färbung in der FACS Core Facility der Medizinischen Universität Innsbruck mit freundlicher Unterstützung von PD Dr. Sieghart Sopper gemessen und ausgewertet.

### 4.3.5.3 Auswertung

Die Messung der Proben erfolgte an einem Durchflusszytometer der Firma Beckton Dickinson, Modell LRSFortessa<sup>®</sup>. Die Aufnahme der Daten erfolgte mit der zum Gerät gehörenden Software („FACSDiva v6.1.2“), die Auswertung dann mit dem Programm „FlowJo v8.8.7.“. Die ermittelten Werte bzw. Zellzahlen der einzelnen Typen wurden weiterhin auf den Anteil an 10.000 Gesamtevents gerechnet und so der Prozentanteil des gewünschten Zelltyps in der jeweiligen Probe ermittelt.

#### 4.3.6 Histologie

##### 4.3.6.1 Probenahme und Versuchsaufbau

Die histologischen Analysen wurden zur Darstellung einer möglichen Neointimaformation im sich regenerierenden Gefäßendothel durchgeführt und erfolgten 28 Tage nach der Carotid Injury Operation. Die Behandlung mit Sitagliptin und AMD3100 erfolgte in diesem Versuch über einen Zeitraum von 6 Tagen nach der Operation.

Nach der 28-tägigen Beobachtungsperiode wurden die verletzten Carotiden der Tiere mit der oben beschriebenen Carotid Harvest Methode (ohne vorhergehende Evans blue Färbung) entnommen. Anschließend wurden die Gefäße in PBS gewaschen und für das weitere Prozedere aufgearbeitet.

Für die Anfertigung von Kryoschnitten wurden die Carotiden in Tissue Tek® Einbettmedium eingebettet. Hierfür wurde in kleine Einbettchalen etwas Tissue Tek® vorgelegt und das Gefäß dann mit einer feinen Pinzette senkrecht darin positioniert. Anschließend wurde, wenn notwendig, zusätzliches Einbettmedium hinzugegeben und das Einbettgefäß sofort in flüssigem Stickstoff zum Aushärten tiefgefroren. Die Lagerung bis zum Anfertigen der Kryoschnitte erfolgte bei -80 °C.

Zur Anfertigung der Kryoschnitte wurde ein Kryomikrotom verwendet. Die Schnitte wurden in einer Dicke von 5 µm angefertigt, dann mit Formaldehydlösung 4 % fixiert und anschließend gefärbt.

Zur Darstellung der Neointima, wurde die Weigert-Elastica-van-Gieson (WEG) Färbung verwendet. Diese WEG-Färbung dient zur Darstellung elastischer Fasern und kollagenem Bindegewebe. Die Färbung wurde mit einem eigens hierfür konzipierten Färbekit ausgeführt. Die Färbeschritte wurden nach dem im Kit mitgelieferten Protokoll durchgeführt, mit dem Unterschied, dass statt einer absteigenden Entwässerung mit Alkohol zu Beginn eine Formaldehyd-Fixierung durchgeführt wurde. Zu aller Letzt wurden die Schnitte mit einem xylol- und toluolfreien Eindeckmedium konserviert.

#### 4.3.6.2 Auswertung

Nach dem Färben wurden die histologischen Schnitte mit einem Lichtmikroskop in 20x-Vergrößerung fotografiert. Die Neointima wurde dann mit Hilfe des Bildverarbeitungsprogramms „Image J“ [186] quantifiziert. Zur Auswertung wurden folgende Parameter berechnet:

„Intima-zu-Media – Verhältnis“:  $\frac{Intima}{Intima+Media}$

und „Intima + Media – zu -Gesamtgefäßdurchmesser“:  $\frac{Intima+Media}{Gesamtgefäßdurchmesser}$

Hierfür wurde die Fläche drei verschiedener Gefäßquerschnitte (Intima = tatsächliches Gefäßlumen; Media = Gefäßlumen excl. Neointima; Gesamtgefäßdurchmesser = Außendurchmesser) gemessen und zueinander ins Verhältnis gesetzt (siehe Abb. 16). Je Maus wurden 6-8 Schnitte aus dem verletzten Bereich der *A. carotis* ausgewertet und der Durchschnitt aus diesen berechnet.



**Abb. 16** Darstellung der gemessenen Flächen mit farblich unterschiedlich gekennzeichneten Begrenzungen (1/rot = Begrenzung des tatsächlichen Gefäßlumens; 2/orange = Begrenzung des Gefäßlumens excl. Neointima; 3/blau = Gesamtgefäßdurchmesser).

Zur Flächenberechnung gilt: Intima = 2 - 1; Media = 3 - 2; Gesamtgefäßdurchmesser = 3.

#### 4.3.7 Scratch-Assay

##### 4.3.7.1 Versuchsaufbau, Zellkultivierung und Versuchsdurchführung

Zur Analyse einer möglichen verstärkten Proliferation der Endothelzellen unter erhöhter SDF1-Konzentration, welche aus der Behandlung mit Gliptinen resultiert, wurde ein sogenannter Scratch-Assay oder Cell-Proliferation-Assay durchgeführt. Bei diesem handelt es sich um eine Methode zur Darstellung und Quantifizierung der Zellproliferation [189]. Nach Kultivierung von Endothelzellen zu einer Monolayer, z.B. HUVECs, wird mittels einer 100 µl Pipettenspitze eine künstliche „Verletzung“ der Zellschicht erzeugt („Scratch“). Die Weite dieser wird dann nach definierten Zeitintervallen quantifiziert, um den Einfluss verschiedener Faktoren, z.B. SDF1, zu untersuchen.

## Material und Methoden

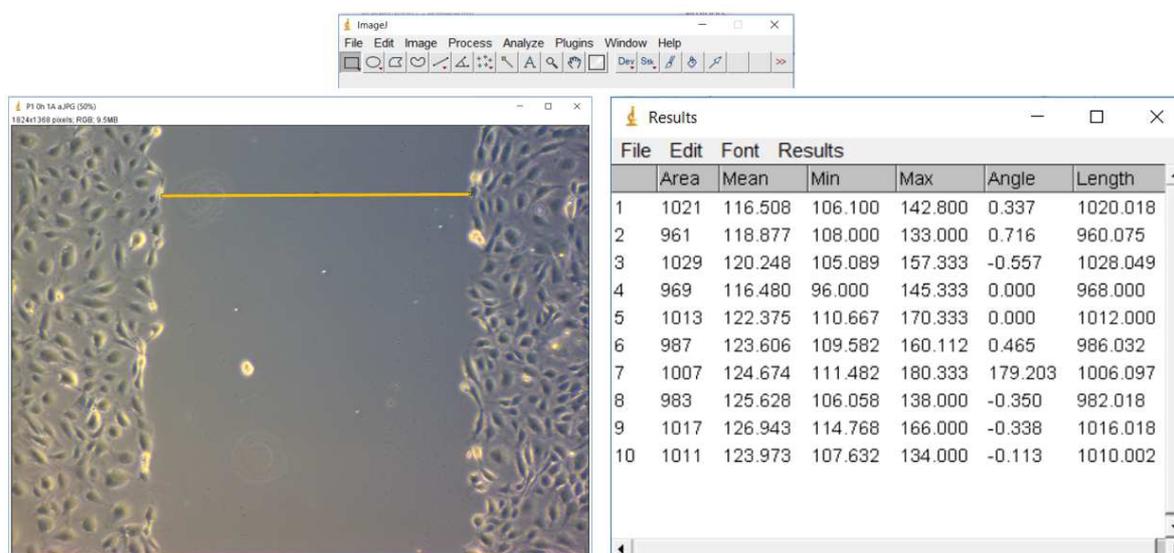
Zu Beginn wurden die in flüssigem Stickstoff gelagerten HUVEC Zellen aufgetaut und in EBM 2 Basal Medium für Endothelzellen mit Supplementen (Hydrocortison, Fetal Bovine Serum, Wachstumsfaktoren wie z.B. VEGF, etc.) gelöst. Die Zellsuspension wurde anschließend bei 37 °C in einer Zellkulturflasche im CO<sub>2</sub>-Inkubator kultiviert und täglich kontrolliert. Das Medium wurde je nach Wachstum der Endothelzellen und die Anzahl abgestorbenen Zellen nach ca. 24 h gewechselt. Spätestens nach 48 h wurden die Endothelzellen mit PBS gewaschen und mittels Trypsin vom Untergrund gelöst. Anschließend wurde die Trypsin-Reaktion durch erneute Zugabe von Basal Medium gestoppt, die Zellsuspension in ein Falcon-Tube überführt und für 10 min bei Raumtemperatur zentrifugiert (54 G). Anschließend konnte der Überstand abgekippt und das Zellpellet mit 1 ml des Basal Mediums ohne Supplemente gelöst werden. Zur Bestimmung der Zellkonzentration wurden 10 µl der Zellsuspension 1:2 mit Trypan Blau angefärbt und mit Hilfe eines Zellzählers ausgezählt. Anschließend wurden die Zellen im EBM 2 Basal Medium für Endothelzellen mit Supplementen zur weiteren Verwendung im Versuch so verdünnt, dass eine Konzentration von ca.  $1 \times 10^5$  Zellen/ml gegeben war. Für eine weitere Kultivierung wurden Zellen ggf. auch neu in einer Kulturflasche ausgesät.

Je 0,5 ml der Zellsuspension wurde dann in eine Kavität einer 12-Well-Zellkulturplatte überführt. Nach ca. 24 h, wenn sich eine Monolayer aus Endothelzellen gebildet hatte, wurde diese mit einem linearen Schaden versehen. Hierfür wurde eine 100 µl Pipettenspitze verwendet. Zusätzlich wurde SDF1 (in PBS gelöst) in den Konzentrationen 1 ng/ml, 10 ng/ml und 100 ng/ml hinzugegeben. Auch hier wurde eine Placebokontrolle mitgeführt. Während des Versuchs wurde das Medium außerdem durch EBM 2 Basal Medium ohne Supplemente ersetzt, um mögliche Einflüsse dieser, insbesondere von Wachstumsfaktoren, auf die Zellproliferation auszuschließen. Der Scratch wurde dann unmittelbar nach Schadensinduktion (0 h) und nach 24 h fotografiert und die Weite quantifiziert.

## Material und Methoden

## 4.3.7.2 Auswertung

Zur fotografischen Dokumentation wurde ein Lichtmikroskop mit Kamera verwendet. Die Aufnahmen wurden mit einer 10 fachen Vergrößerung angefertigt und anschließend mit dem Bildverarbeitungsprogramm „Image J“ [186] ausgewertet. Hierfür wurde der Abstand zu allen Zeitpunkten zwischen den Rändern der Läsion an 10 Stellen gemessen und die Heilung in % ermittelt (siehe Abb. 17).



Bsp.: 1190 Pixel = 1mm  $\rightarrow$  1020,018/ 1190 = 0,857157983 mm

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
1		10x Vergrößerung	1mm in Pixel	1190						
2										
3	Datum Beginn	Platte/Quadrant	Distanz 0h	in mm	Durchschnitt 0 in mm	Distanz 24h	in mm	Durchschnitt 24 in mm	Heilungslänge	% Heilung
4	08.03.2017	P1 A1 a	1020,018	0,857157983	0,86	949,052	0,797522689	0,759821345	0,10	11,35574078
5			960,075	0,806795714		896,109	0,753032773			
6			1028,049	0,863906723		796,003	0,668910084			
7			969	0,813445378		934,034	0,784902521			
8			1012	0,850420168		864,302	0,726304202			
9			986,032	0,828598319		954,034	0,801709244			
10			1006,097	0,845459664		948,246	0,796845378			
11			982,018	0,82522521		942,002	0,791598319			
12			1016,018	0,853796639		910,09	0,764781513			
13			1010,002	0,848741176		848,002	0,712606723			

**Abb. 17** Beispiel für die Auswertung des Scratch-Assays. Zu sehen sind die Aufnahme des Scratches zum Zeitpunkt 0 h und die dazugehörigen Messwerte. In der abgebildeten Excel-Tabelle sind weiterhin die Messwerte zum Zeitpunkt 24h und die Gesamtauswertung (Heilung %) dargestellt.

#### 4.3.8 Statistische Versuchsauswertung

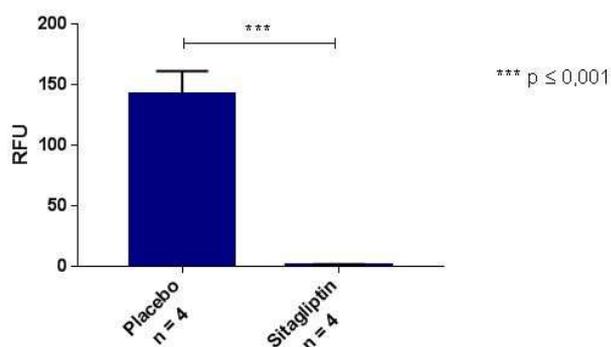
Zur Schätzung der Gruppengrößen für die Experimente (Reendothelialisierungs-Assay, Durchflusszytometrie, Histologie) wurde das Programm Power and Sample Size Program, Version 3.1.2, July 2014" verwendet [190].

Zur statistischen Auswertung das Programm GraphPad Prism Software (Version 7) verwendet. Alle Ergebnisse sind als Mittelwerte mit Standardfehler ausgedrückt, Normalverteilung und Varianzgleichheit wurden für multiple Gruppenvergleiche bestätigt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels des Student's t-test bzw. eine einseitige Varianzanalyse (ANOVA). Die ANOVA wurde durch die Bonferroni-Korrektur bei mehrfachen Gruppenvergleichen angepasst. Als signifikanter Unterschied wurde ein p-Wert von  $\leq 0,05$  angesehen.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Inhibition der DPP4-Serumaktivität unter oraler Gliptin-Therapie – Nachweis mittels fluorometrischer Aktivitätsmessungen

Durch die DPP4-Aktivitätsmessungen konnte bestätigt werden, dass die Sitagliptin-Dosis von 500 mg/kg/d ausreichend war, um die DPP4 im Serum nahezu vollständig zu inhibieren. Die Verabreichung von Sitagliptin über 3 Tage reduzierte die DPP4-Aktivität im Vergleich zu den Placebo-behandelten Tieren um 99,14 % ( $141,9 \pm 19,11$  vs.  $1,22 \pm 0,71$  RFU) (siehe Abb. 18).



**Abb. 18** Aktivität der Dipeptidyl-Peptidase 4 im Serum, Placebokontrolle im Vergleich zur Sitagliptin-Therapie (3 Tage). Einheit relative fluorometric units, RFU. \*\*\*  $p \leq 0,001$ .

### 5.2 Reendothelialisierungs-Assay

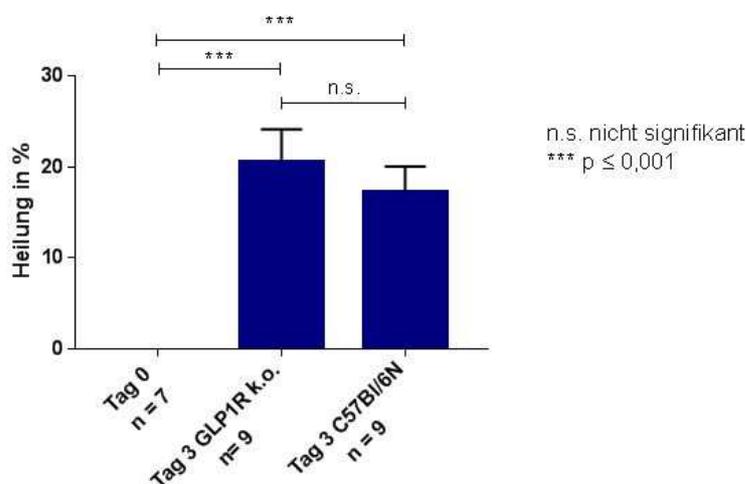
#### 5.2.1 Etablierung des Reendothelialisierungs-Assays im Labor

Für die *in vivo* Analysen zur Untersuchung der Gliptin-Effekte auf die SDF1-CXCR4-Achse etablierten wir zu Beginn der Arbeit die Methode der Carotid Injury in unserem neuen Labor. Diese leicht durchzuführende und reproduzierbare Methode zur Erzeugung eines Endothelschadens wurde in unserer Arbeitsgruppe ursprünglich in Kooperation mit der Arbeitsgruppe um Prof. Ulf Landmesser (Zürich, Schweiz) etabliert.

## Ergebnisse

Vorteil der Methode ist die geringe Belastung der Tiere, welche sich unmittelbar nach Erwachen aus der Isoflurannarkose wieder nahezu problemlos bewegen und artgemäß verhalten, was in Hinsicht auf die Versuchsbedingungen und die 3R (Refinement) erstrebenswert war. Weiterhin gibt die Methode die Möglichkeit einen Endothelschaden von einer definierten Länge zu setzen und die Heilung zu quantifizieren.

Zuerst wurde für die folgenden Versuche ein Standard unter Placebo-Behandlung erstellt. Dazu wurde sowohl bei C57BL/6 Wildtypen, als auch *Glp1r*<sup>-/-</sup> Tieren mithilfe des Elektrokauters ein Endothelschaden von 4 mm induziert und der Heilungsfortschritt ohne Therapie nach 3 Tagen quantifiziert. Hier wurde die Länge der deendothelialisierten Fläche an Tag 3 in Relation zur Deendothelialisierung unmittelbar nach Erzeugung des Carotisschadens (Tag 0) gesetzt. Drei Tage ohne Therapie (spontaner Heilungsverlauf) lag die durchschnittliche Reendothelialisierung bei  $17,18 \pm 2,86$  % (C57BL/6) bzw.  $20,55 \pm 3,57$  % (*Glp1r*<sup>-/-</sup>) der ursprünglich verletzten Fläche (siehe Abb. 19).



**Abb. 19** Endothelheilung an Tag 3 nach Carotid Injury in C57BL/6- und *Glp1r*<sup>-/-</sup> Mäusen. Im Vergleich dazu keine Heilung unmittelbar nach Verletzung. n.s. = nicht signifikant; \*\*\*  $p \leq 0,001$ .

## Ergebnisse

5.2.2 Einfluss der Sitagliptin-Therapie auf die Reendothelialisierung im *Glp1r<sup>-/-</sup>* Mausmodell und C57BL/6 Wildtyp

In den folgenden Versuchen sollte untersucht werden, inwieweit die Gliptin-Therapie bei Betrachtung der Endothelregeneration einen Einfluss auf die SDF1-CXCR4-Achse und ob der GLP1R-Signalweg hierbei ebenfalls eine Rolle spielt.

Hierfür wurde zuerst im *Glp1r<sup>-/-</sup>* Mausmodell der Einfluss der Sitagliptin-Behandlung auf die Regeneration nach akuter Endothelschädigung im Carotid Injury Modell untersucht. Weiterhin wurde die Regeneration unter Sitagliptin-Behandlung im *Glp1r<sup>-/-</sup>* Mausmodell mit der Regeneration bei C57BL/6 Wildtypen verglichen. Diese Ergebnisse wurden jeweils noch mit einer Placebo-behandelten Gruppe des entsprechenden Mausstammes verglichen.

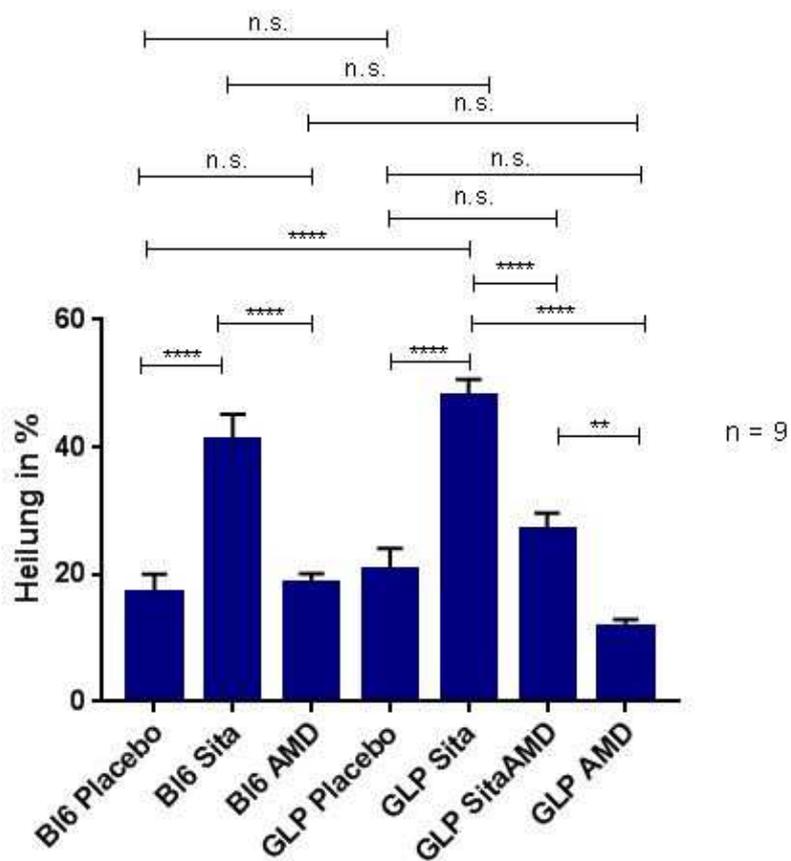
Es zeigte sich, dass drei Tage nach CI in beiden Sitagliptin-Therapiegruppen, *Glp1r<sup>-/-</sup>* und C57BL/6, eine signifikant bessere Heilung zu verzeichnen war, als in der Placebo-behandelten Gruppe. Bei den *Glp1r<sup>-/-</sup>* Tieren der Sitagliptin-Gruppe war eine Heilung von  $48,0 \pm 2,61$  % zu verzeichnen, in der Placebo-behandelten Gruppe eine Heilung von nur  $20,55 \pm 3,57$  %. Die C57BL/6 Tiere zeigten eine Reendothelialisierung von  $41,12 \pm 4,05$  % in der Sitagliptin-Gruppe und  $17,18 \pm 2,86$  % in der Kontrollgruppe (siehe Abb. 20 & 21).

Zur mechanistischen Analyse der verbesserten Regeneration durch die Sitagliptin-Therapie über die SDF1-CXCR4-Achse, wurde bei den *Glp1r<sup>-/-</sup>* Mäusen nach der Carotid Injury Operation in einer Gruppe, zusätzlich zur Sitagliptin-Therapie, der CXCR4-Rezeptorblocker AMD3100 ( $1,25 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{d}$ ) verabreicht. Dieser CXCR4-Rezeptorblocker bindet spezifisch an den CXCR4-Rezeptor zirkulierender Progenitorzellen und blockiert somit den SDF1-CXCR4-Signalweg. Wir konnten zeigen, dass durch die zusätzliche Gabe von AMD3100 der positive Effekt von Sitagliptin aufgehoben werden konnte. Die Gruppe, die mit Sitagliptin und AMD3100 behandelt wurde, zeigte eine Regeneration des Endothels um  $26,87 \pm 2,79$  %. Somit unterschied sich die Endothelheilung nicht signifikant zwischen den Sitagliptin+AMD3100- und den Placebo-behandelten ( $20,55 \pm 3,57$  %) *Glp1r<sup>-/-</sup>*-Tieren (siehe Abb. 20 & 21).

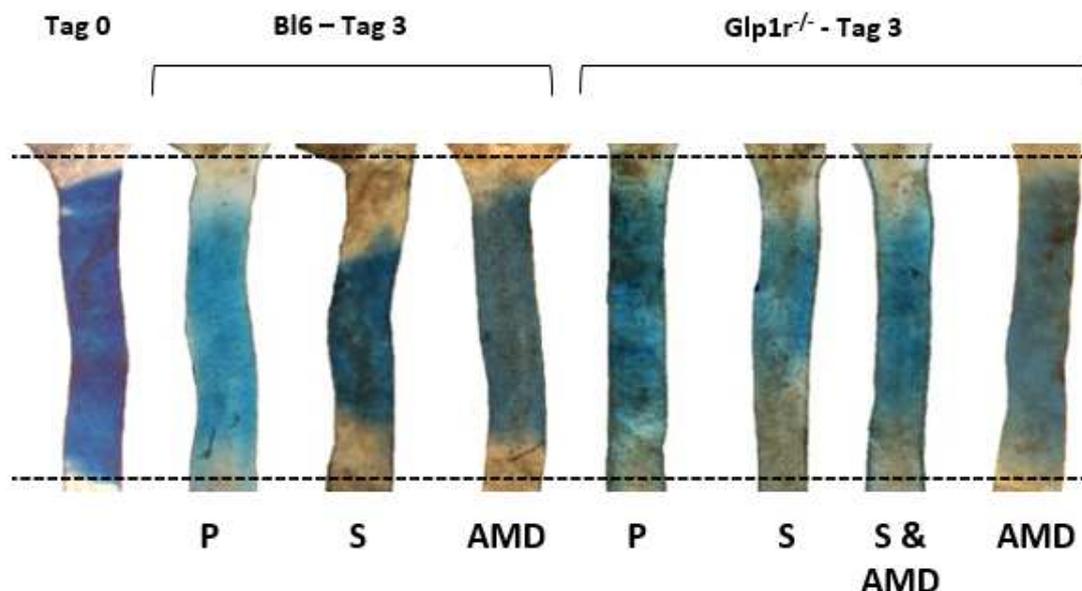
Weiterhin konnte bei einer alleinigen Behandlung mit AMD3100 nach der Carotid Injury gezeigt werden, dass dieser Wirkstoff in der von uns verabreichten Dosierung keine Effekte auf die Endothelregeneration hat. Sowohl im *Glp1r<sup>-/-</sup>* Mausmodell ( $11,55 \pm 1,39$  %), als auch

## Ergebnisse

im Wildtyp ( $18,52 \pm 1,58$  %) unterschied sich der prozentuale Anteil der regenerierten Endothelfläche nicht signifikant von der Placebo-behandelten Gruppe (siehe Abb. 20 & 21).



**Abb. 20** Endothelheilung bei den *Glp1r<sup>-/-</sup>* und Wildtyp-Mäusen. n.s. = nicht signifikant; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$ .



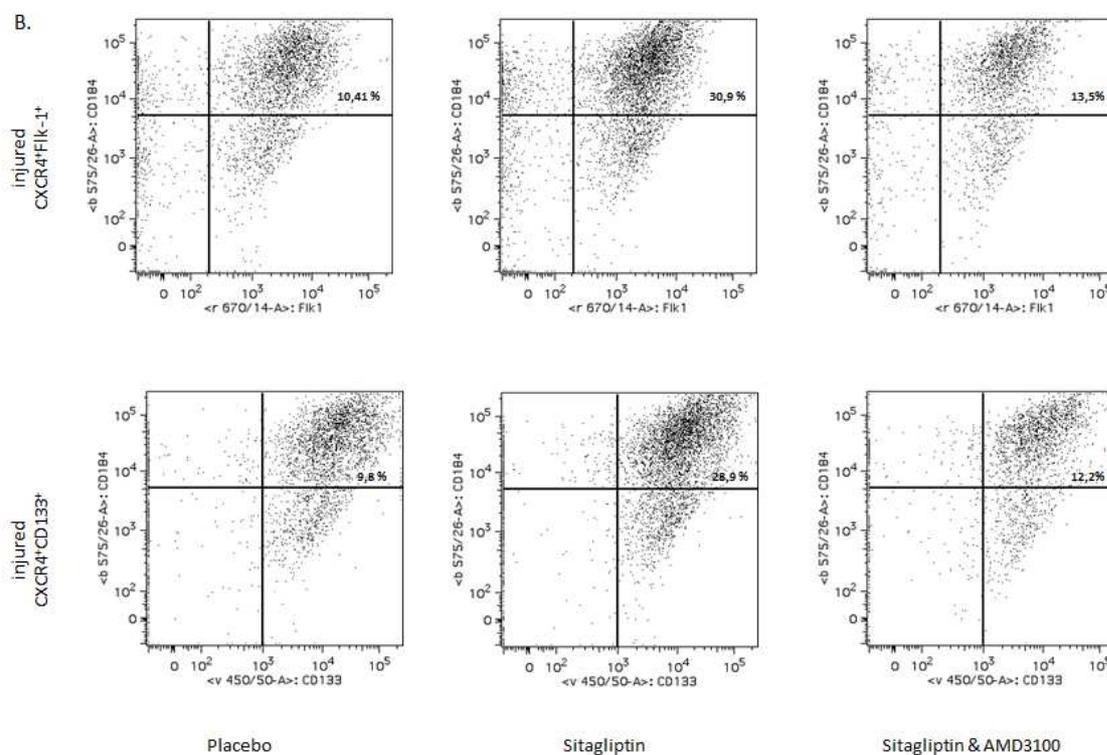
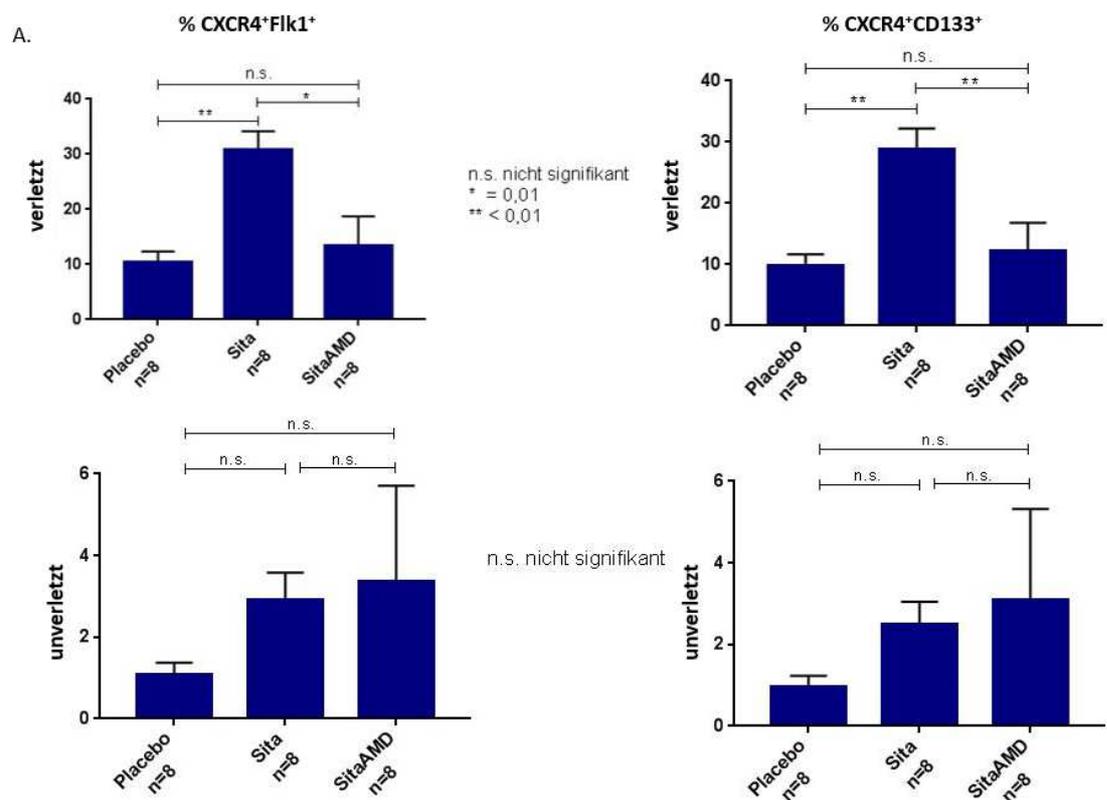
**Abb. 21** Darstellung der endothelialen Heilung an Tag 0 und Tag 3. Vergleich C57BL/6 mit  $Glp1r^{-/-}$ . d0 = Tag 0, P = Placebo, S = Sitagliptin, S & AMD = Sitagliptin & AMD, AMD = nur AMD, Bl6 = C57BL/6.

### 5.3 Quantifizierung der rekrutierten Progenitorzellen (CXCR4<sup>+</sup> CD133<sup>+</sup> und CXCR4<sup>+</sup> Flk-1<sup>+</sup>)

Mit Hilfe der FACS-Analysen konnten wir zeigen, dass bei den Sitagliptin behandelten  $Glp1r^{-/-}$  Mäusen, im Vergleich zu den Placebo-behandelten Tieren, vermehrt CXCR4<sup>+</sup> Flk-1<sup>+</sup> und CXCR4<sup>+</sup> CD133<sup>+</sup> zirkulierende Progenitorzellen in die verletzten Carotiden rekrutiert wurden. In der Sitagliptin-Gruppe konnte mit  $28,9 \pm 3,41$  % CXCR4<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup> bzw.  $30,9 \pm 3,27$  % CXCR4<sup>+</sup>Flk-1<sup>+</sup> zirkulierenden Progenitorzellen ein signifikant höherer Anteil, als in der Placebo-Gruppe ( $9,8 \pm 1,84$  % CXCR4<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup> bzw.  $10,41 \pm 1,96$  % CXCR4<sup>+</sup>Flk-1<sup>+</sup>) detektiert werden. Übereinstimmend mit den Ergebnissen aus dem Reendothelialisierungs-Assay konnte die Wirkung von Sitagliptin in den  $Glp1r^{-/-}$  Mäusen durch die zusätzliche Behandlung mit AMD3100 verhindert werden. Hier wurden  $12,2 \pm 4,64$  % CXCR4<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup> bzw.  $13,5 \pm 5,22$  % CXCR4<sup>+</sup>Flk-1<sup>+</sup> zirkulierende Progenitorzellen in den verletzten Carotiden nachgewiesen (siehe Abb. 22 A. & B.).

Bei Betrachtung der unverletzten Carotiden zeigte sich, dass hier eine vergleichsweise geringe Anzahl zirkulierender Progenitorzellen zu finden war und dass der Anteil dieser auch nicht von der jeweiligen Behandlung beeinflusst wurde (siehe Abb. 21 A.).

## Ergebnisse



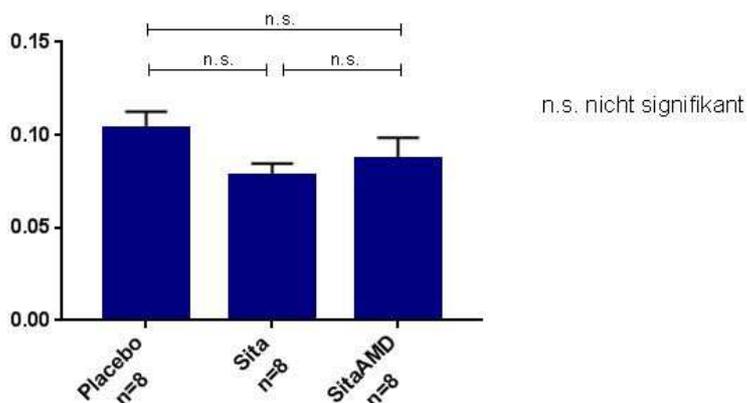
**Abb. 22 A.** Anteil rekrutierter CXCR4<sup>+</sup>Flk1<sup>+</sup> und CXCR4<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup> ciPCs in den verletzten und unverletzten Carotiden an Tag 3 post OP. n.s. = nicht signifikant; \*  $p = 0,01$ , \*\*  $p \leq 0,01$ . **B.** Repräsentative Dot Plots aus FACS-Analysen der verletzten Carotiden.

## Ergebnisse

## 5.4 Histologische Analysen - Einfluss der Sitagliptin-Therapie auf die Neointimaformation (Weigert-Elastica-van Gieson)

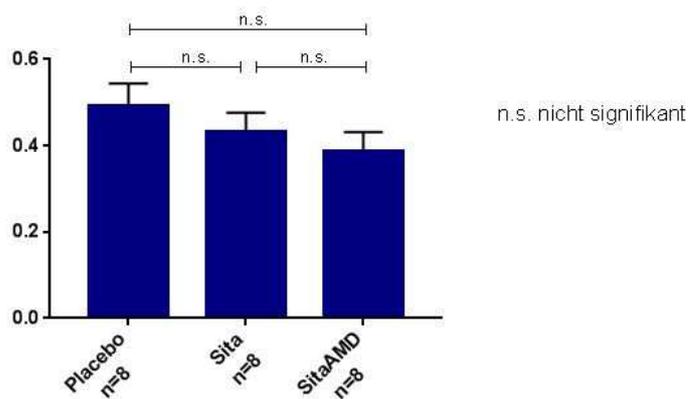
Die histologischen Analysen zur Quantifizierung der Neointimaformation, 28 Tage nach der Carotid Injury Operation, zeigten, dass die unterschiedlichen Behandlungen keinen Einfluss auf diesen Parameter hatten.

Sowohl „Intima-zu-Media-Verhältnis“ (Placebo  $0,1 \pm 0,008$ ; Sitagliptin  $0,08 \pm 0,006$ ; Sitagliptin & AMD3100  $0,09 \pm 0,01$ ), als auch „Intima + Media – zu -Gesamtgefäßdurchmesser“ (Placebo  $0,49 \pm 0,05$ ; Sitagliptin  $0,43 \pm 0,04$ ; Sitagliptin & AMD  $0,38 \pm 0,04$ ) wiesen keine signifikanten Unterschiede in der Neointimaformation zwischen den einzelnen Gruppen auf (siehe Abb. 23-25).

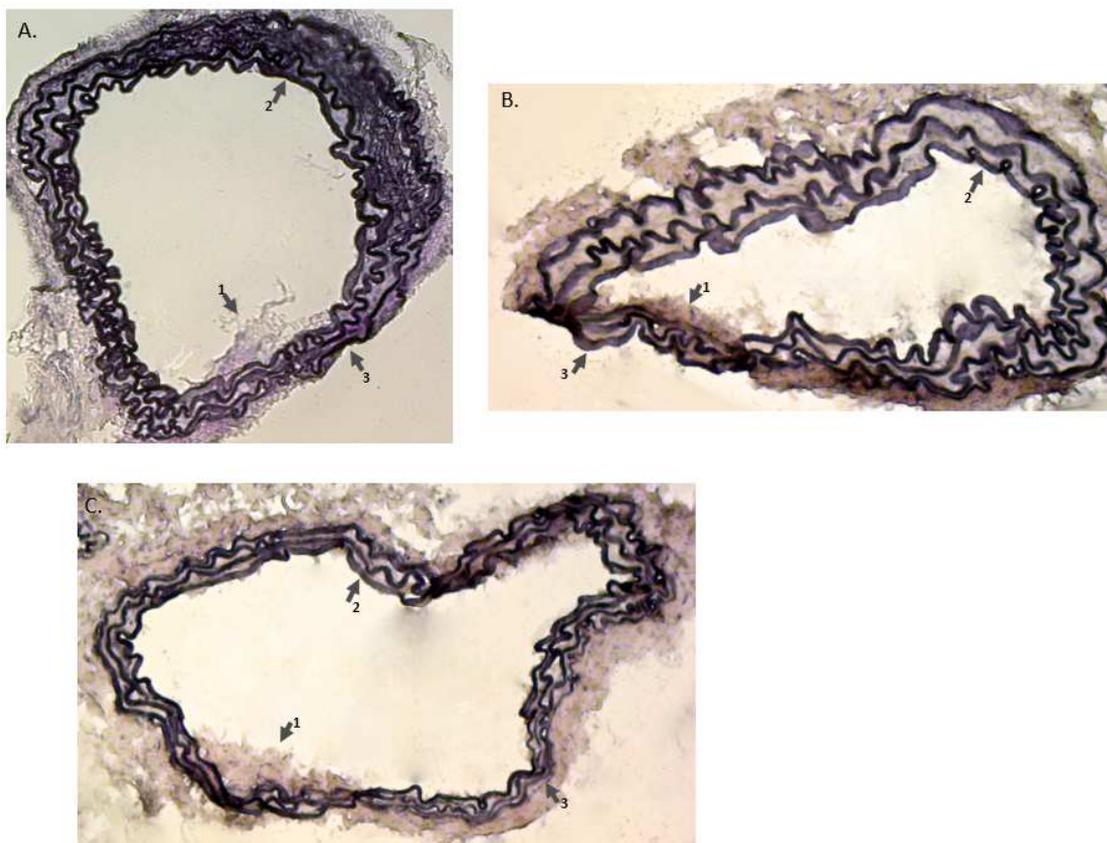


**Abb. 23** „Intima-zu-Media-Verhältnis“ der verschiedenen Behandlungsgruppen 28 Tage nach Carotid Injury Operation. n.s. = nicht signifikant.

## Ergebnisse



**Abb. 24** „Intima + Media – zu -Gesamtgefäßdurchmesser“ der verschiedenen Behandlungsgruppen 28 Tage nach Carotid Injury Operation. n.s. = nicht signifikant.



**Abb. 25** Darstellung der Gefäßquerschnitte 28 Tage nach der Carotid Injury Operation. 1. Neointima, 2. Media, 3. Gesamtgefäßdurchmesser. A. Placebo, B. Sitagliptin, C. Sitagliptin & AMD

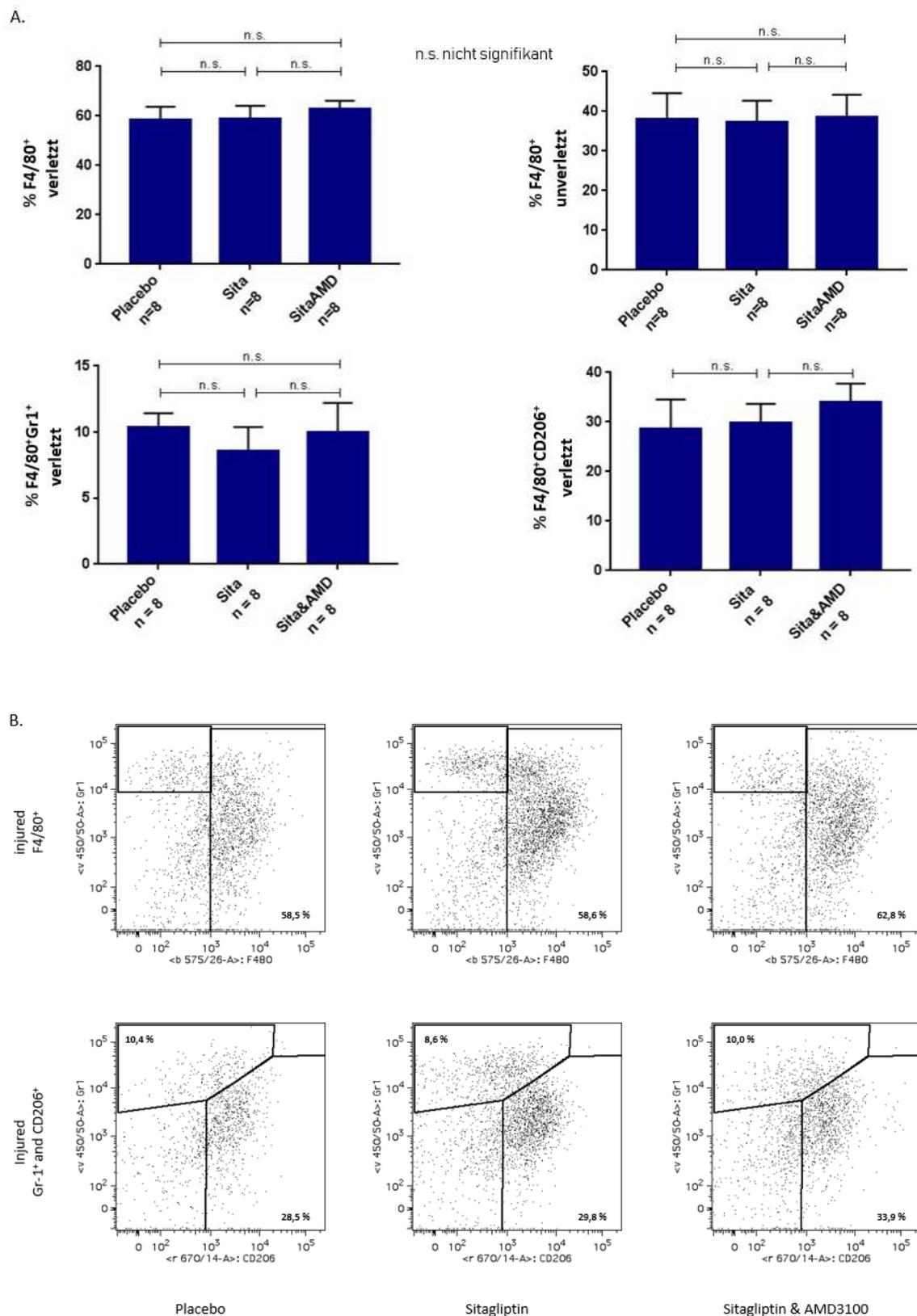
## 5.5 Quantifizierung der intramuralen Makrophagen und ihrer Subtypen in den Carotiden

Mit der durchflusszytometrischen Quantifizierung des intramuralen Makrophagengehalts sollte untersucht werden, ob die Therapie mit Sitagliptin nach akutem endothelialeem Schaden die lokale Makrophagendifferenzierung beeinflusst.

Wir konnten zeigen, dass zwischen den einzelnen Gruppen keine signifikanten Unterschiede festzustellen waren. So lag die Anzahl der F4/80<sup>+</sup> Gesamtmakrophagen bei  $58,47 \pm 5,27$  % (Placebo),  $58,61 \pm 5,55$  % (Sitagliptin) bzw.  $62,83 \pm 3,27$  % (Sitagliptin & AMD3100). Der Gehalt an inflammatorischen F4/80<sup>+</sup>Gr-1<sup>+</sup> M1 Makrophagen lag bei  $10,4 \pm 1,04$  % (Placebo),  $8,6 \pm 1,8$  % (Sitagliptin) und  $10 \pm 2,23$  % (Sitagliptin & AMD3100). Weiterhin konnten  $28,5 \pm 6,04$  % (Placebo),  $29,8 \pm 3,86$  % (Sitagliptin) bzw.  $33,9 \pm 3,84$  % F4/80<sup>+</sup>CD206<sup>+</sup> reparative M2 Makrophagen nachgewiesen werden (siehe Abb. 26 A. & B.).

Die unverletzten Carotiden wiesen einen geringeren Anteil an F4/80<sup>+</sup> Gesamtmakrophagen auf und unterschieden sich mit  $37,9 \pm 6,62$  % (Placebo),  $37,3 \pm 5,38$  (Sitagliptin) und  $38,5 \pm 5,74$  % (Sitagliptin & AMD3100) ebenfalls nicht signifikant zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen.

## Ergebnisse



**Abb. 26 A.** Darstellung des %-Anteils der F4/80<sup>+</sup> Gesamtmakrophagen (verletzt und unverletzt) und ihrer jeweiligen Subtypen (F4/80<sup>+</sup>Gr-1<sup>+</sup> M1 und F4/80<sup>+</sup>CD206<sup>+</sup> M2; verletzte Carotiden) in den Carotiden der *Glp1r*<sup>-/-</sup> Mäuse 3 Tage nach CI. n.s. = nicht signifikant. **B.** Repräsentative Dot Plots der FACS-Analysen.

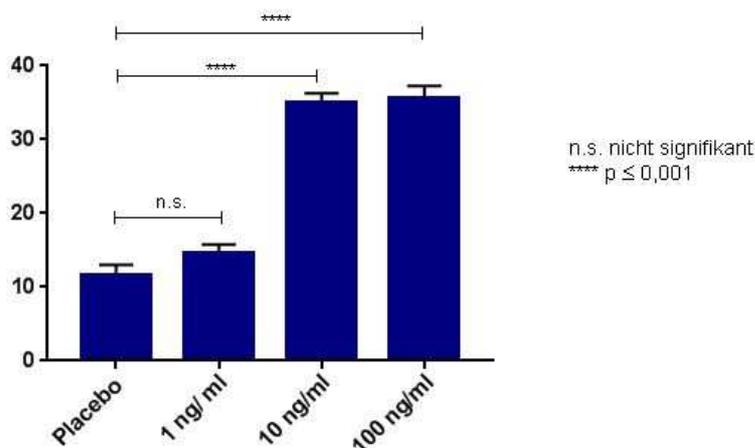
Ergebnisse

## 5.6 Scratch-Assay

### 5.6.1 Einfluss der SDF1 Konzentration auf die Endothelzellproliferation (HUVEC) nach 24 h

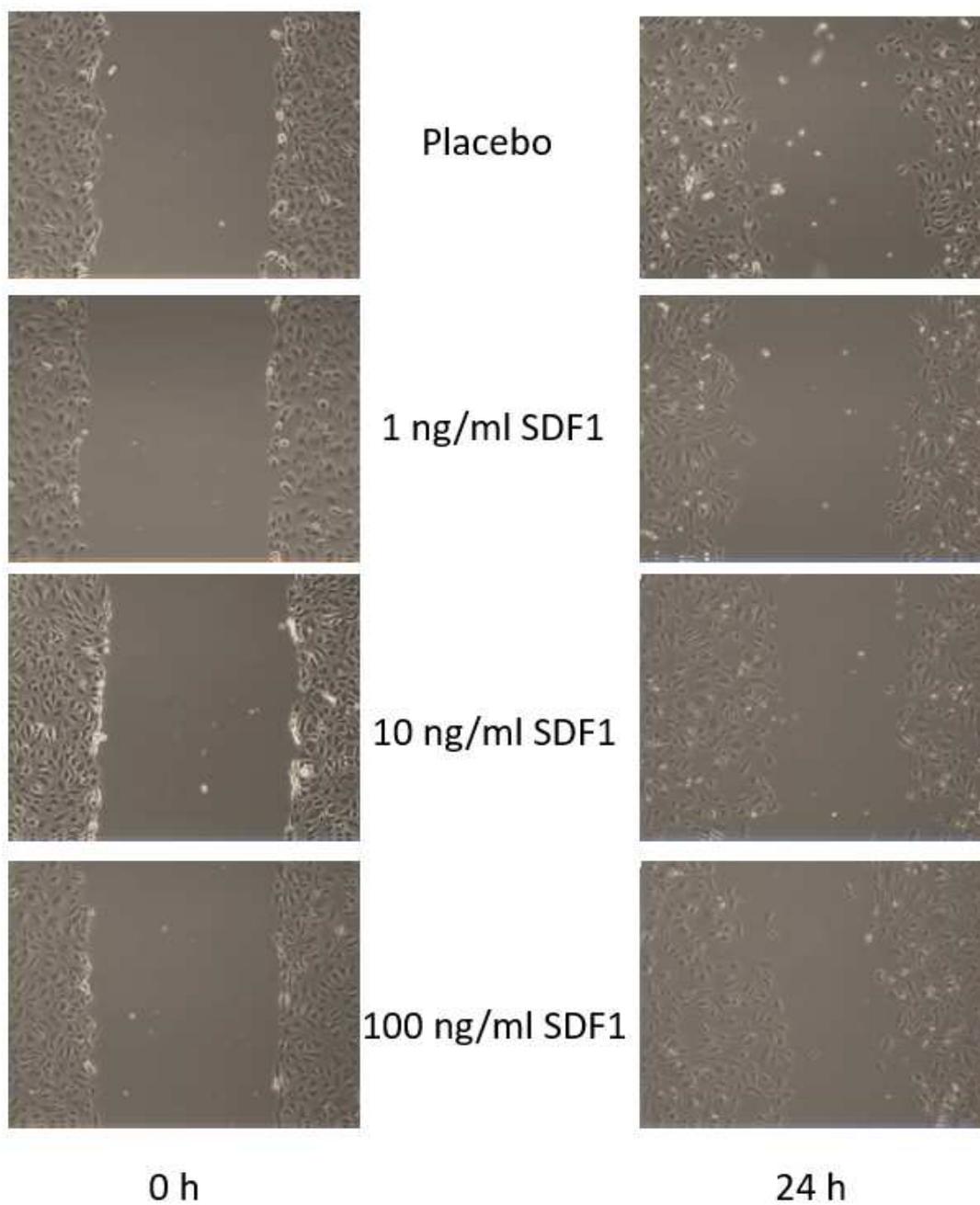
Die Auswertung des Scratch-Assays ergab, dass SDF1 einen dosisabhängigen Effekt auf die Proliferationsrate der HUVECs hat.

Im Vergleich zur Placebo-Gruppe ( $11,64 \pm 1,38$  % Verschmälerung des Scratches) konnten höhere SDF1-Konzentrationen eine stärkere Zellproliferation erzielen. Die SDF1-Konzentration von 10 ng/ml erzielte eine Verschmälerung des Scratches um  $34,91 \pm 1,38$  %, die Konzentration von 100 ng/ml eine Verschmälerung um  $35,53 \pm 1,76$  %. Mit einer Verschmälerung um  $14,67 \pm 1,12$  % unterscheidet sich die niedrigste der drei untersuchten SDF1-Konzentrationen (1 ng/ml) nicht signifikant von der Placebo-Gruppe (Abb. 27 & 28).



**Abb. 27** Verschmälerung des Scratches (%) nach 24h Inkubation mit unterschiedlich hohen SDF1-Konzentrationen. n.s. = nicht signifikant; \*\*\*\*  $p \leq 0,001$

## Ergebnisse



**Abb. 28** Exemplarische Darstellung der Zellproliferation unter Inkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen von SDF1. Links ist der Scratch unmittelbar nach Induktion abgebildet, rechts nach 24h.

## 6 Diskussion

Gliptine, als Inhibitoren der DPP4, vermitteln ihre vasoprotektiven Effekte über diverse molekulare Signalwege und zelluläre Mechanismen. Sie verhindern unter anderem die Spaltung des Inkretins GLP1 und des Zytokins SDF1. Während über die SDF1-CXCR4-Achse eine verstärkte Rekrutierung von zirkulierenden Progenitorzellen und dadurch eine parakrine Stimulation der Proliferation von lokalen Endothelzellen vermittelt wird, könnte GLP1 über die GLP1R/cAMP-abhängige Aktivierung des AMPK/PI3K-AKT/eNOS-Signalwegs ebenfalls eine Regeneration im erkrankten Gefäßsystem induzieren [6, 191].

Bisher ist jedoch unklar, welcher der beiden Gliptin-vermittelten Effekte tatsächlich für die verbesserte Endothelheilung unter medikamentöser Inhibition der DPP4 verantwortlich ist. Daher wurde für diese Arbeit das *Glp1r*<sup>-/-</sup> Mausmodell verwendet, um den SDF1-Signalweg isoliert betrachten zu können.

Zusätzlich zu den *in vivo* Versuchen wurde *in vitro* mit Hilfe eines Cell Proliferation Assays untersucht, inwieweit SDF1 auch einen direkten pro-proliferativen Einfluss auf residente Endothelzellen ausüben könnte.

### 6.1 Die verbesserte endotheliale Regeneration nach akutem Endothelschaden im *Glp1r*<sup>-/-</sup> Mausmodell

Dem Inkretin GLP1 können diverse vasoprotektive Effekte zugeschrieben werden. Liu *et al.* entschlüsselten einige dieser Mechanismen, wie die Hochregulation der NO-Synthese, sowie die Reduktion der ROS-Spezies- und COX2-Expression [26]. Ähnliche Mechanismen, wie vermindertes Inflammationspotenzial, verbesserte Endothelfunktion und verminderte ROS-Expression werden auch von Ceriello *et al.* beschrieben [27]. Bei Betrachtung dieser Fakten liegt die Vermutung nahe, dass die durch Sitagliptin verbesserte Endothelregeneration, zumindest teilweise auch durch GLP1 mediiert sein könnte.

In der vorliegenden Arbeit konnten wir zeigen, dass eine Akzeleration der Endothelheilung unter medikamentöser Inhibition der DPP4 unabhängig vom GLP1-Signalweg funktioniert. So ist die Gliptin-vermittelte verbesserte Endothelregeneration auch im *Glp1r*<sup>-/-</sup> vollständig

## Diskussion

erhalten, was die Ergebnisse vorhergehender Arbeiten unserer Arbeitsgruppe im C57BL/6 Wildtyp untermauert. Durch die zusätzliche Gabe von AMD3100 wurde für diesen Effekt die SDF1-CXCR4-Achse als zu Grunde liegender Mechanismus sowohl im C57BL/6 Wildtyp [9], als nun auch im *Glp1r*<sup>-/-</sup> Mausmodell bestätigt. Entsprechend hierzu konnten auch Ohnishi *et al.* eine vermehrte Rekrutierung von „endothelium-like cells“, nach ischämischer Schädigung der Nieren, in peritubuläre Gefäße über die SDF1-CXCR4-Achse zeigen [192]. Noels *et al.* wiesen weiterhin nach, dass der Verlust des endothelialen CXCR4-Rezeptors zu einer beeinträchtigten Endothelregeneration führt. Diese Arbeiten verdeutlichen zusätzlich, dass die SDF1-CXCR4-Achse der maßgebliche Signalweg für die Regeneration des Endothels nach akuter Schädigung ist.

### 6.2 Die verstärkte Rekrutierung zirkulierender Progenitorzellen durch Gliptin-Therapie ist verantwortlich für eine verbesserte Endothelregeneration

Wie in Vorarbeiten bereits gezeigt wurde, sind sowohl ciPCs als auch Monozyten/Makrophagen an der vaskulären Regeneration beteiligt [7, 9]. Im C57BL/6 Mausmodell konnte nach akuter Endothelschädigung in den Sitagliptin-behandelten Tieren eine verbesserte Regeneration beobachtet werden, welche von den Randbereichen der Läsion her beginnt. Da die DPP4-Inhibition zu einer verstärkten Rekrutierung zirkulierender Progenitorzellen führt, lässt sich aufgrund des Heilungsmusters schlussfolgern, dass diese in den betroffenen Arealen die Proliferation residenter Endothelzellen/endothelialer Progenitorzellen über parakrine Mechanismen in Gang setzt. Bei einer substanziellen Transdifferenzierung rekrutierter ciPCs würden wir eher eine inselartige Regeneration im Bereich des geschädigten Endothels erwarten [9]. Eine weitere Arbeit bestätigt diese These. Die Gruppe um Guo *et al.* zeigt, dass eine Behandlung mit SDF1 die Wundheilung der Haut bei Sprague-Dawley Ratten signifikant verbessert. Als zu Grunde liegenden Mechanismus beschreibt die Gruppe eine SDF1-vermittelte, verstärkte Migration epidermaler Stammzellen aus den Bereichen der Wundränder. Auch hier wird der SDF1-Effekt durch den CXCR4-Rezeptor-Blocker AMD3100 inhibiert [29].

Aktuell konnten wir nun in den *Glp1r*<sup>-/-</sup> Mäusen eine verstärkte Rekrutierung CXCR4<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup> und CXCR4<sup>+</sup>Flk-1<sup>+</sup> ciPCs nachweisen. Trotz der GLP1-Rezeptor-Defizienz ist die

## Diskussion

Endothelregeneration in diesen Tieren unter Sitagliptin-Therapie verbessert und somit wird auch deutlich, dass die vermehrte ciPC Rekrutierung über die SDF1-CXCR4-Achse für diesen Effekt verantwortlich ist. Weiterhin lässt sich dies noch mit Ergebnissen von Jungraithmayr *et al.* belegen. Die Ergebnisse der Gruppe zeigen, dass auch lokal erhöhte SDF1-Level, verursacht durch Ischämie-Reperfusionsschäden nach einer Lungentransplantation, den SDF1-CXCR4-Signalweg verstärken und somit die Rekrutierung zirkulierender Progenitorzellen aufgrund einer Gewebsschädigung über ebendiesen Signalweg unterstützen [193].

Diese Theorie konnte zudem durch die Behandlung mit AMD3100 allein (*Glp1r<sup>-/-</sup>* und Wildtyp) oder in Kombination mit Sitagliptin (*Glp1r<sup>-/-</sup>*) bestätigt werden. AMD3100 verhinderte eine verbesserte Regeneration des geschädigten Endothels durch Blockade der CXCR4 auf den ciPCs, wodurch der Heilungsverlauf in diesen Tieren dem der Placebo-Gruppe entsprach. Aufgrund dessen erscheint der erhöhte Anteil rekrutierter ciPCs in den Carotiden der Sitagliptin-behandelten Tiere für das verbesserte Regenerationsvermögen nach akutem Endothelschaden verantwortlich.

Daneben ist bekannt, dass auch Monozyten auf ihrer Oberfläche den CXC-Rezeptor 4 exprimieren und dass der SDF1-CXCR4-Signalweg sowohl an der Monozytenrekrutierung, als auch deren Differenzierung beteiligt ist [7, 9, 23]. So führt die Gliptin-Behandlung in diesem Modell auf Kosten der inflammatorischen M1 Makrophagen zu einer vermehrten Monozytendifferenzierung hin zu den reparativen M2 Makrophagen, was einen vasoprotektiven Effekt in der Frühatherosklerose vermitteln kann. [7]. Chatterjee *et al.* bestätigen diese Hypothese in *vitro* Versuchen mit humanen Monozyten. Sie zeigen, dass über den SDF1-CXCR4-Signalweg zum einen vermehrt Monozyten rekrutiert werden und zum anderen ihre Differenzierung hin in Richtung M2 Makrophagen verschoben wird [23]. Im Modell des akuten Endothelschadens zeigte sich das Monozyten/Makrophagensystem allerdings nicht relevant durch eine Therapie mit Sitagliptin beeinflusst.

### 6.3 Die Gliptin-vermittelte endotheliale Regeneration ist unabhängig vom GLP1-Rezeptor-Signalweg

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Gliptin-vermittelte endotheliale Regeneration gleichermaßen in Wildtyp- und in *Glp1r*<sup>-/-</sup>-Mäusen abläuft. Diese Erkenntnis bestätigt, dass die Wirkung der DPP4i auf die Endothelregeneration über die SDF1-CXCR4-Achse vermittelt wird [9, 12, 194] - nicht aber über den GLP1R-Signalweg. Arbeiten von Eriksson *et al.* untermauern diese These. Die Gruppe konnte zeigen, dass der GLP1-Rezeptoragonist Exendin-4 keinen positiven Einfluss auf die Endothelregeneration nach Balloon-Injury der *A. carotis communis* in Sprague-Dawley Ratten hat [195]. Durch Verwendung des *Glp1r*<sup>-/-</sup> Mausmodells in dieser Arbeit konnten nicht nur die Ergebnisse von Eriksson *et al.* bestätigt werden, sondern es wurde zusätzlich gezeigt, dass die GLP1-Rezeptor-Defizienz der Tiere keinen negativen Einfluss auf die Endothelregeneration hat. Da weder die Stimulation des GLP1-Rezeptors, noch die GLP1R-Defizienz einen Einfluss auf die Reendothelialisierung haben, kann somit zusammengefasst werden, dass GLP1 in dem von uns untersuchten Tiermodell keinen relevanten Einfluss auf die Endothelzellproliferation nach akuter Schädigung zu haben scheint.

In Übereinstimmung mit Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe im C57BL/6 Wildtyp wurden auch in dieser Arbeit im *Glp1r*<sup>-/-</sup> Mausmodell keine Unterschiede in der Neointimaformation zwischen den Behandlungsgruppen beobachtet [9]. Dies ist insbesondere daher von Bedeutung, da vorhergehende Studien von Zerneck *et al.* postulieren, dass die SDF1-CXCR4-Achse bei der Rekrutierung von zirkulierenden SMC aus dem Knochenmark (bone-marrow derived smooth muscle cells, BM-SMC), als Reaktion auf die Endothelverletzungen und Apoptose, eine Rolle spielt und zu einer Neointimahyperplasie führt [16]. Karshovska *et al.* untersuchten diese Kontroverse und identifizierten eine verstärkte HIF1 $\alpha$ -Expression nach Gefäßschädigung zum einen als Stimulus für vermehrte SDF1-Expression aus Thrombozyten und zum anderen als Stimulus für die vermehrte Rekrutierung der BM-SMC [81]. Die alleinige Erhöhung der SDF1-Konzentration, ohne Erhöhung der HIF1 $\alpha$ -Spiegel, durch Inhibition der DPP4 könnte dieses Phänomen jedoch umgehen. SDF1 ist ein dem Faktor HIF1 $\alpha$  nachgestellter Faktor in der HIF1 $\alpha$ -SDF1-Kaskade und somit könnte auch erklärt werden, warum Sitagliptin keine nachteilige Wirkung auf die Neointimaformation nach akutem Endothelschaden hat.

#### 6.4 SDF1 hat eine direkte pro-proliferative Wirkung auf Gefäßendothelzellen

Neben der positiven Gliptin-Wirkung auf die Endothelregeneration über die SDF1-CXCR4-Achse im *Glp1r<sup>-/-</sup>* Mausmodell konnte in dieser Arbeit auch eine direkte pro-proliferative Wirkung von SDF1 auf Gefäßendothelzellen (HUVEC) *in vitro* mittels Durchführung eines Scratch-Assays demonstriert werden.

Zusammen mit dem Nachweis der verstärkten ciPC-Rekrutierung liegt somit die Annahme nahe, dass lokal erhöhte SDF1-Level *in vivo* die Regeneration nach akuter Endothelschädigung zusätzlich unterstützen könnten. Obwohl derzeit in der Literatur kaum Arbeiten zur proliferativen Wirkung von SDF1 zu finden sind, ist bekannt, dass SDF1 einen positiven Effekt auf die Migration von Endothelzellen und die Angiogenese hat [29, 32, 33]. Weiterhin beschreiben Bajetto *et al.*, dass SDF1 auch auf Astrozyten einen direkt pro-proliferativen Einfluss hat. Eine weitere Arbeit von Neuhaus *et al.* beschreibt eine erhöhte Proliferation von HAECs (human aortic endothelial cell) über eine SDF1-vermittelte Erhöhung der VEGF-Expression [32]. Dieser Synergismus von SDF1 und VEGF könnte ein möglicher zu Grunde liegender Mechanismus für die erhöhte Zellproliferation im Scratch-Assay unter Inkubation mit SDF1 sein.

#### 6.5 Begründung für die Durchführung der Tierexperimente

Die Idee für die Experimente dieser Arbeit basiert auf der positiven kardiovaskulären Wirkung des Wirkstoffs Sitagliptin. Derzeit ist dieser Wirkstoff jedoch nur zur Therapie von Diabetes mellitus Typ 2 für die Blutzuckerkontrolle zugelassen [132, 196]. Aufgrund der vielfältigen positiven Wirkungen im kardiovaskulären System auf Endothelregeneration, -funktion und Atheroskleroseprogression verspricht Sitagliptin jedoch ein therapeutisches Potenzial für einen klinischen Einsatz bei anderen Indikationen [6]. So liegt der Fokus dieser Arbeit auf der Endothelregeneration nach akutem endothelialen Schaden, wie er bei Koronarinterventionen entstehen kann. Hier ist eine möglichst schnelle Regeneration des Gefäßendothels anzustreben, um das Auftreten von vaskulären Restenosen oder Stentthrombosen zu vermeiden [86].

## Diskussion

Für die Entwicklung eines neuen Wirkstoffs bzw. Arzneimittels bis hin zu seiner endgültigen Zulassung für eine bestimmte klinische Indikation beim Menschen, ist ein langwieriger Prozess zu durchlaufen. Nachdem ein Wirkstoff als potenzielles Arzneimittel entdeckt ist, muss seine klinische Unbedenklichkeit in zahlreichen präklinischen Studien geprüft werden. Hierzu zählen unter anderem pharmakokinetische, pharmakologische und toxikologische Studien, welche nach den gesetzlichen Vorgaben unter anderem im Tiermodell durchzuführen sind [197]. Insbesondere auf die toxikologischen Studien wird großen Wert gelegt, da mit diesen auch Genotoxizität, Embryotoxizität, Kanzerogenität sowie die allgemeine Toxizität bei einmaliger oder wiederholter Verabreichung eingehend geprüft werden. Als Grundlage hierfür dienen die Leitlinien der International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH) [198]. In ihrem Ausmaß sind die vorgeschriebenen Studien verständlicherweise sehr weitreichend, da die Unbedenklichkeit für den Menschen in folgenden klinischen Studien zwingend gewährleistet sein muss. So werden beispielsweise bei den Toxizitätsstudien *in vivo* Versuche zur akuten Toxizität (Einzeldosis des Wirkstoffs und Beobachtungsdauer von meist 14 Tagen), zur Toxizität bei mehrmaliger Verabreichung (bis zu 9 Monate) und zur Genotoxizität verlangt. Lediglich die Genotoxizitätstests können teilweise durch *in vitro* Versuche an Säugerzellen ersetzt werden [199]. Die Einzel- und Mehrfachdosis-Toxizitätsversuche sollten in mindestens zwei Spezies, Nager (z.B. Maus, Ratte) und nicht-Nager (z.B. Hund, Schwein) durchgeführt werden. Zu beachten ist hier, dass für diese Versuche die dem Menschen am ehesten entsprechende Tierspezies („most human like species“) gewählt werden muss [197, 200].

Diese Fakten verdeutlichen, dass die Entwicklung eines neuen Medikaments zur schnelleren Heilung nach akuter Endothelschädigung aus tierschutzethischer Sicht extrem kritisch zu betrachten ist, da dies große Versuchstierzahlen bedeuten würde, um den Wirkstoff dann möglicherweise überhaupt bis zum Einsatz in klinischen Studien zu bringen. Somit stellt unser Versuchsdesign, die Untersuchung der Sitagliptin-Wirkung für eine andere Indikation als T2DM im *Glp1r<sup>-/-</sup>* Mausmodell, eine aus Sicht der 3R (Replacement, Reduction, Refinement; 1959 W. M. S. Russell and R. L. Burch [201]) eine gute Alternative zur Entwicklung neuer Wirkstoffe dar. Wir konnten im Tiermodell ein Medikament, welches schon für die Verwendung beim Menschen zugelassen ist, auf eine andere Indikation hin testen und weitere aussichtsreiche Erkenntnisse über dessen Wirkungsweise erzielen. Mit vergleichsweise geringen Versuchstierzahlen und der Verwendung von nur einer Spezies (Maus), konnte

## Diskussion

Sitagliptin im Sinne der 3R als potenzielles Therapeutikum für die Unterstützung der Endothelregeneration identifiziert werden.

Vor einer möglichen klinischen Anwendung muss natürlich die Wirksamkeit einer Sitagliptin-Therapie zur vaskulären Regeneration im Menschen in großen randomisierten Studien bestätigt werden. Vorherige umfassende präklinische Studien mit der Aufwendung hoher Versuchstierzahlen und/oder Großtiermodelle erscheinen dafür allerdings entbehrlich. Außerdem könnten Versuche, welche nicht immer mit möglichst wenigen Schmerzen, Leiden und Schäden verbunden sind, vermieden werden. Ein Gebot, das bei der Durchführung von Tierversuchen immer an erster Stelle stehen sollte!

## 6.6 Limitationen der Arbeit

In dieser Arbeit wurden komplexe Mechanismen untersucht, welche aufgrund vieler Parameter, u.a. Blutfluss und pathophysiologische Reaktionen auf die akute Endothelschädigung, größtenteils nur im Tiermodell zu untersuchen waren. Die Fragestellung der direkten SDF1 Wirkung auf die Endothelzellproliferation wurde, ganz im Sinne der 3R, im *in vitro* Modell (Scratch-Assay) untersucht. Für alle weiteren Versuche wurde das *Glp1r<sup>-/-</sup>* Mausmodell zur Untersuchung der pathophysiologischen Signalwege nach akuter Endothelschädigung gewählt. Dennoch sollte nicht vergessen werden, dass den in dieser Arbeit gewonnen *in vivo*-Ergebnissen in ihrer Übertragbarkeit auf den Menschen gewisse Grenzen gesetzt sind und die Ergebnisse nicht 1:1 übertragen werden können [202]. Zum einen aufgrund des unterschiedlichen Metabolismus zwischen Maus und Mensch, zum anderen da in den Versuchen ausschließlich junge, gesunde, männliche Tiere verwendet wurden. Patienten, welche potenziell für eine Therapie mit Gliptinen aufgrund von Schädigungen des Gefäßendothels in Frage kommen, sind meist durch weitere Vorerkrankungen (z.B. T2DM) und medikamentöse Behandlungen (z.B. Thrombozytenaggregationshemmer), sowie auch die behandelte Erkrankung selbst (i.d.R. KHK) vorbelastet [5, 203, 204]. Diese Faktoren können bei der Gliptin-Therapie eine wesentliche Rolle spielen und den Therapieerfolg mindern. Ein Beispiel hierfür sind die erfolgversprechenden Resultate der Gliptin-Therapie in Kombination mit G-CSF nach akutem Myokardinfarkt im Mausmodell. Im Tiermodell wurden, im Vergleich zur Placebo-Gruppe,

## Diskussion

eine verbesserte Myokardfunktion und eine höhere Überlebensrate, sowie eine erhöhte Anzahl rekrutierter ciPCs nachgewiesen [10, 100, 101]. In einer randomisierten klinischen Studie konnten diese erfolgversprechenden Ergebnisse jedoch im Menschen nicht reproduziert werden [61].

Ein weiterer Punkt, welcher zu beachten ist, ist die Dosierung des Medikaments. Beim Mensch werden in der Regel 100 mg/Tag, also 1-1,5 mg/kg/Tag verabreicht. In der Maus sind 500 mg/kg/Tag notwendig, um eine vergleichbare Inhibition der DPP4 zu erzielen. Dies könnte damit erklärt werden, dass Mäuse eine wesentlich höhere Stoffwechselrate aufzeigen [205]. Trotzdem sollte hier in weiteren Studien untersucht werden, ob dieser Unterschied in der Dosierung aufgrund unterschiedlicher Pharmakokinetik und Metabolismus in Mensch und Maus tatsächlich zu vernachlässigen ist, da hierfür derzeit noch keine aussagekräftigen Daten vorliegen.

## 6.7 Ausblick

Diese Arbeit verdeutlicht, dass die Gliptin-Therapie nach akutem Endothelschaden in der klinischen Anwendung eine vielversprechende Option darstellen könnte, um die Endothelregeneration zu unterstützen und so vaskuläre Komplikationen nach PTCA (Restenosen und Stentthrombosen) zu vermeiden. Wir konnten zeigen, dass die Sitagliptin-Therapie nach Schädigung der *A. carotis communis* im *Glp1r<sup>-/-</sup>* Mausmodell unabhängig vom GLP1-Signalweg über die Rekrutierung zirkulierender Progenitorzellen via SDF1-CXCR4-Achse zu einer signifikant verbesserten Endothelregeneration führt.

In zahlreichen klinischen Studien wurde bereits die kardiovaskuläre Sicherheit von Sitagliptin bestätigt. Sowohl in diabetischen [138, 140, 206], als auch in nicht diabetischen Patienten [61]. So wurde in der TECOS Studie gezeigt, dass die Therapie mit Sitagliptin in T2DM Patienten mit bereits vorhandener kardiovaskulärer Erkrankung zu keiner erhöhten Rate kardialer Ereignisse führt [138]. In der PROLOGUE Studie wurde zusätzlich gezeigt, dass die Sitagliptin-Therapie in T2DM Patienten keinen negativen Einfluss auf die Ausprägung der Neointima hat [148]. Die SITAGRAMI Studie wiederum beschäftigte sich mit der Sitagliptin-Wirkung (auch) in nicht-diabetischen Patienten. Auch hier wurde bestätigt, dass sich die Therapie mit Sitagliptin nach Myokardinfarkt nicht nachteilig auf die Prognose oder das Auftreten weiterer kardialer

## Diskussion

Ereignisse auswirkt. Zudem zeigte sich in der (u.a.) mit Sitagliptin behandelten Gruppe eine numerische, statistisch nicht signifikante Reduktion ( $p=0,084$ ) an im Zeitverlauf über ein Jahr neu aufgetretenen Koronararterienstenosen. Dies unterstützt die Theorie eines vasoregenerativen Potentials der DPP4-Inhibition [61].

Zusätzlich wurde in der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass SDF1 neben seiner Rolle im SDF1-CXCR4-Signalweg auch direkt pro-proliferative Effekte auf Endothelzellen hat. Die hier zu Grunde liegenden Mechanismen sind jedoch noch wenig untersucht. Mögliche Ansatzpunkte für weitere Forschungsarbeiten könnte hier, wie von Neuhaus *et al.* beschrieben, das Zusammenspiel mit dem Wachstumsfaktor VEGF sein [32].

Für eine klinische Anwendung von Gliptinen zur verbesserten Endothelregeneration nach PTCA oder zur Therapie anderer Schädigungen des Gefäßendothels sind jedoch noch weitere Erkenntnisse über die zu Grunde liegenden Mechanismen und auch noch ein Effektivitätsnachweis im Menschen notwendig. Hierzu sollten in Zukunft randomisierte klinische Studien mit dem Fokus „Endothelregeneration“ durchgeführt werden um zu evaluieren, ob die Gliptin-Therapie für eine klinische Anwendung zur verbesserten Endothelregeneration geeignet ist.



## 7 Zusammenfassung

Herz-Kreislauf-Erkrankungen gehören derzeit sowohl deutschland- als auch weltweit zu den am häufigsten vorkommenden Erkrankungen. An erster Stelle steht hier das Krankheitsbild der koronaren Herzerkrankung, welche als klinische Folge atherosklerotischer Gefäßveränderungen anzusehen ist. Therapeutisch wird bei der KHK neben medikamentöser Behandlung auch interventionell mittels perkutaner transluminaler koronarer Angioplastie oder chirurgischer Bypassoperation eingegriffen.

Eine häufige Komplikation der PTCA sind die Restenose und die Stentthrombose, zu denen es auch aufgrund der durch den Eingriff verursachten Endothelläsionen kommen kann. Um diese Komplikationen zu vermeiden ist eine möglichst schnelle Reendothelialisierung anzustreben.

Seit einiger Zeit ist bekannt, dass Gliptine als Inhibitoren der DPP4 neben ihrer blutzuckerregulierenden Wirkung auch diverse vasoprotektive Effekte besitzen und die Reendothelialisierung fördern können. In diversen Vorarbeiten wurde gezeigt, dass sich eine Gliptin-Therapie nach akuter Endothelschädigung fördernd auf die Endothelregeneration auswirkt. In dieser Arbeit wurde die Wirkung der Gliptine mechanistisch eingehend untersucht, da neben der Rekrutierung zirkulierender Progenitorzellen über die SDF1-CXCR4-Achse, auch ein Effekt der Gliptin-Therapie auf den GLP1-Signalweg nicht auszuschließen war. Sowohl GLP1 als auch SDF1 sind Substrate des Enzyms DPP4 und werden bei Gliptin-Behandlung in ihrem Abbau gehemmt. Daher wurde für diese Arbeit das *Glp1r<sup>-/-</sup>* Mausmodell gewählt, in dem eine Wirkung von GLP1 über seinen Rezeptor ausgeschlossen werden kann. Weiterhin wurde ergänzend *in vitro* mit HUVECs untersucht, ob SDF1 eine direkte pro-proliferative Wirkung auf Gefäßendothelzellen hat.

In dieser Arbeit konnten wir eindeutig zeigen, dass der SDF1-CXCR4-Signalweg den ausschlaggebenden Mechanismus zur Endothelregeneration nach akuter Schädigung darstellt. Durch die pharmakologische Inhibition der DPP4 kann auch im *Glp1r<sup>-/-</sup>* Mausmodell die Rekrutierung zirkulierender Progenitorzellen in die verletzten Gefäßareale erhöht und die Endothelregeneration verbessert werden. Weiterhin haben hohe SDF1 Konzentrationen *in vitro* eine direkte pro-proliferative Wirkung auf Endothelzellen (HUVECs) und somit könnten lokal erhöhte SDF1-Level *in vivo* zusätzliche synergistische Effekte im Regenerationsgeschehen haben. Durch die Verwendung des *Glp1r<sup>-/-</sup>* Modells konnte folglich gezeigt werden, dass GLP1

## Zusammenfassung

keinen ausschlaggebenden Einfluss auf die Endothelregeneration nach akuter Schädigung hat und dass die Gliptine unabhängig vom Inkretin GLP1 auf das Gefäßsystem wirken können.

Schlussendlich zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass die Gliptin-Therapie bei akuter Endothelschädigung, wie sie nach Interventionen aber auch bei diversen Gefäßerkrankungen vorkommen kann, ein bemerkenswertes therapeutisches Potenzial birgt. Somit stellen die Gliptine, als gut verträgliche Wirkstoffe, eine potenzielle Möglichkeit dar, die Reendothelialisierung nach akutem Endothelschaden medikamentös zu unterstützen. Bis zu einem klinischen Einsatz sind jedoch noch klinische Studien nötig, um die positive Wirkung auch im Menschen zu bestätigen.

## 8 Summary

### Gliptin-mediated regeneration after acute endothelial injury in the *Glp1r<sup>-/-</sup>* mouse model

Currently cardiovascular diseases, especially those affecting the coronary artery, are among the most common diseases, in Germany as well as worldwide. Cardiovascular interventions such as percutaneous coronary intervention (PCI) or bypass surgeries are possible therapeutic alternatives to pharmaceutical treatments.

The main complications of surgical interventions are restenosis and stent thrombosis as a result of endothelial lesions caused by the PCI itself. To avoid these complications it is desirable to achieve fast reendothelialization after acute endothelial injury.

In addition to their effect on blood glucose, gliptins, as inhibitors of the enzyme DPP4, are known for their vasoprotective and sustainable effects on reendothelialization. Previously several studies demonstrated the positive effects of gliptin treatment after acute endothelial injury. Here, the underlying mechanisms of gliptins were analyzed in more detail. Besides the recruitment of circulating progenitors via SDF1-CXCR4-axis, an effect of gliptins via the GLP1R-pathway offered a certain potential. GLP1 as well as SDF1 are substrates of DPP4 and stabilized by DPP4 inhibition. Therefore the *Glp1r<sup>-/-</sup>* mouse model, in which GLP1-GLP1R-signaling can be excluded, was chosen for this work. In addition the possible pro-proliferative effect of SDF1 on endothelial cells was analyzed *in vitro* (HUVEC).

Using several methods, this work identified the SDF1-CXCR4-axis as the most relevant for vascular regeneration after acute injuries. Pharmacological inhibition of DPP4 is responsible for an increased recruitment of circulating progenitor cells to the injured vascular sites and results in an improved endothelial regeneration, even in *Glp1r<sup>-/-</sup>* mice. Furthermore, high concentrations of SDF1 *in vitro* show some pro-proliferative effects on endothelial cells (HUVECs) and consequently local increased SDF1 levels might have some synergistic effects on regeneration *in vivo*. Thus, using the *Glp1r<sup>-/-</sup>* mouse model, this work demonstrates that GLP1 has no relevant influence on regeneration after acute endothelial injury and that gliptins may mediate their effects independently from GLP1.

## Summary

In conclusion, this work provides evidence that gliptins have a remarkable therapeutic potential for the treatment of acute vascular injury after interventional procedures or in cardiovascular diseases. Therefore gliptins, as well tolerated drugs, are promising substances to support reendothelialization after acute vascular injury. Nevertheless, for routine clinical use, further trials are necessary to confirm the positive effects on endothelium in patients.

## 9 Anhang

### Literaturverzeichnis

- [1] Destatis. RKIHGgVRu. Gesundheit in Deutschland. Gesundheitsberichterstattung des Bundes. . 2015.
- [2] Bundesamt D-S. DESTATIS, Internetseite des Statistischen Bundesamts.
- [3] Organization WH. World health statistics 2017: monitoring health for the SDGs, Sustainable Development Goals. 2017.
- [4] Ties Boerma CM, Carla AbouZahr, Somnath Chatterji, Daniel Hogan and Gretchen Stevens, assisted by Wahyu, Retno Mahanani JH, Florence Rusciano, Gary Humphreys et al. Health in 2015: from MDGs, Millennium Development Goals to SDGs, Sustainable Development Goals. 2015.
- [5] Herold G. Innere Medizin - eine vorlesungsorientierte Darstellung. 2012.
- [6] Remm F, Franz WM, Brenner C. Gliptins and their target dipeptidyl peptidase 4: implications for the treatment of vascular disease. *Eur Heart J Cardiovasc Pharmacother*. 2016;2:185-93.
- [7] Brenner C, Franz WM, Kuhlenthal S, Kuschnerus K, Remm F, Gross L, et al. DPP-4 inhibition ameliorates atherosclerosis by priming monocytes into M2 macrophages. *International journal of cardiology*. 2015;199:163-9.
- [8] Matsubara J, Sugiyama S, Sugamura K, Nakamura T, Fujiwara Y, Akiyama E, et al. A dipeptidyl peptidase-4 inhibitor, des-fluoro-sitagliptin, improves endothelial function and reduces atherosclerotic lesion formation in apolipoprotein E-deficient mice. *Journal of the American College of Cardiology*. 2012;59:265-76.
- [9] Brenner C, Krankel N, Kuhlenthal S, Israel L, Remm F, Fischer C, et al. Short-term inhibition of DPP-4 enhances endothelial regeneration after acute arterial injury via enhanced recruitment of circulating progenitor cells. *International journal of cardiology*. 2014;177:266-75.
- [10] Theiss HD, Gross L, Vallaster M, David R, Brunner S, Brenner C, et al. Antidiabetic gliptins in combination with G-CSF enhances myocardial function and survival after acute myocardial infarction. *International journal of cardiology*. 2013;168:3359-69.
- [11] Nakamura K, Oe H, Kihara H, Shimada K, Fukuda S, Watanabe K, et al. DPP-4 inhibitor and alpha-glucosidase inhibitor equally improve endothelial function in patients with type 2 diabetes: EDGE study. *Cardiovascular diabetology*. 2014;13:110.
- [12] Zampetaki A, Kirton JP, Xu Q. Vascular repair by endothelial progenitor cells. *Cardiovascular research*. 2008;78:413-21.
- [13] Hung HS, Shyu WC, Tsai CH, Hsu SH, Lin SZ. Transplantation of endothelial progenitor cells as therapeutics for cardiovascular diseases. *Cell Transplant*. 2009;18:1003-12.
- [14] Reyes M, Dudek A, Jahagirdar B, Koodie L, Marker PH, Verfaillie CM. Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow. *The Journal of clinical investigation*. 2002;109:337-46.
- [15] Asahara T, Masuda H, Takahashi T, Kalka C, Pastore C, Silver M, et al. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circulation research*. 1999;85:221-8.
- [16] Zerneck A, Schober A, Bot I, von Hundelshausen P, Liehn EA, Mopps B, et al. SDF-1alpha/CXCR4 axis is instrumental in neointimal hyperplasia and recruitment of smooth muscle progenitor cells. *Circulation research*. 2005;96:784-91.
- [17] Massberg S, Konrad I, Schurzinger K, Lorenz M, Schneider S, Zohlnhoefer D, et al. Platelets secrete stromal cell-derived factor 1alpha and recruit bone marrow-derived progenitor cells to arterial thrombi in vivo. *The Journal of experimental medicine*. 2006;203:1221-33.
- [18] Aguirre A, Planell JA, Engel E. Dynamics of bone marrow-derived endothelial progenitor cell/mesenchymal stem cell interaction in co-culture and its implications in angiogenesis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010;400:284-91.

- [19] Zentilin L, Tafuro S, Zacchigna S, Arsic N, Pattarini L, Sinigaglia M, et al. Bone marrow mononuclear cells are recruited to the sites of VEGF-induced neovascularization but are not incorporated into the newly formed vessels. *Blood*. 2006;107:3546-54.
- [20] Qi SY, Riviere PJ, Trojnar J, Junien JL, Akinsanya KO. Cloning and characterization of dipeptidyl peptidase 10, a new member of an emerging subgroup of serine proteases. *The Biochemical journal*. 2003;373:179-89.
- [21] Apostolakis S, Papadakis EG, Krambovitis E, Spandidos DA. Chemokines in vascular pathology (review). *International journal of molecular medicine*. 2006;17:691-701.
- [22] Ervinna N, Mita T, Yasunari E, Azuma K, Tanaka R, Fujimura S, et al. Anagliptin, a DPP-4 inhibitor, suppresses proliferation of vascular smooth muscles and monocyte inflammatory reaction and attenuates atherosclerosis in male apo E-deficient mice. *Endocrinology*. 2013;154:1260-70.
- [23] Chatterjee M, von Ungern-Sternberg SN, Seizer P, Schlegel F, Buttcher M, Sindhu NA, et al. Platelet-derived CXCL12 regulates monocyte function, survival, differentiation into macrophages and foam cells through differential involvement of CXCR4-CXCR7. *Cell death & disease*. 2015;6:e1989.
- [24] Sneha P, Doss CG. Gliptins in managing diabetes - Reviewing computational strategy. *Life sciences*. 2016;166:108-20.
- [25] Gerich J. DPP-4 inhibitors: what may be the clinical differentiators? *Diabetes Res Clin Pract*. 2010;90:131-40.
- [26] Liu L, Liu J, Huang Y. Protective Effects of Glucagon-like Peptide 1 on Endothelial Function in Hypertension. *Journal of cardiovascular pharmacology*. 2015;65:399-405.
- [27] Ceriello A, Novials A, Ortega E, Canivell S, La Sala L, Pujadas G, et al. Glucagon-like peptide 1 reduces endothelial dysfunction, inflammation, and oxidative stress induced by both hyperglycemia and hypoglycemia in type 1 diabetes. *Diabetes care*. 2013;36:2346-50.
- [28] Lataillade JJ, Clay D, Bourin P, Herodin F, Dupuy C, Jasmin C, et al. Stromal cell-derived factor 1 regulates primitive hematopoiesis by suppressing apoptosis and by promoting G(0)/G(1) transition in CD34(+) cells: evidence for an autocrine/paracrine mechanism. *Blood*. 2002;99:1117-29.
- [29] Guo R, Chai L, Chen L, Chen W, Ge L, Li X, et al. Stromal cell-derived factor 1 (SDF-1) accelerated skin wound healing by promoting the migration and proliferation of epidermal stem cells. *In vitro cellular & developmental biology Animal*. 2015;51:578-85.
- [30] Hwang JH, Kim SW, Park SE, Yun HJ, Lee Y, Kim S, et al. Overexpression of stromal cell-derived factor-1 enhances endothelium-supported transmigration, maintenance, and proliferation of hematopoietic progenitor cells. *Stem cells and development*. 2006;15:260-8.
- [31] Bajetto A, Barbero S, Bonavia R, Piccioli P, Pirani P, Florio T, et al. Stromal cell-derived factor-1alpha induces astrocyte proliferation through the activation of extracellular signal-regulated kinases 1/2 pathway. *Journal of neurochemistry*. 2001;77:1226-36.
- [32] Neuhaus T, Stier S, Totzke G, Gruenewald E, Fronhoffs S, Sachinidis A, et al. Stromal cell-derived factor 1alpha (SDF-1alpha) induces gene-expression of early growth response-1 (Egr-1) and VEGF in human arterial endothelial cells and enhances VEGF induced cell proliferation. *Cell proliferation*. 2003;36:75-86.
- [33] Molino M, Woolkalis MJ, Prevost N, Pratico D, Barnathan ES, Taraboletti G, et al. CXCR4 on human endothelial cells can serve as both a mediator of biological responses and as a receptor for HIV-2. *Biochimica et biophysica acta*. 2000;1500:227-40.
- [34] Bundesärztekammer (BÄK) KBK, Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF). Nationale VersorgungsLeitlinie Chronische KHK – Langfassung. 2016.
- [35] Dietz RR, B. Leitlinie zur Diagnose und Behandlung der chronischen koronaren Herzerkrankung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie – Herz- und Kreislaufforschung (DGK). *Zeitschrift für Kardiologie*. 2003;Band 92.
- [36] Rafieian-Kopaei M, Setorki M, Doudi M, Baradaran A, Nasri H. Atherosclerosis: process, indicators, risk factors and new hopes. *Int J Prev Med*. 2014;5:927-46.
- [37] Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *The New England journal of medicine*. 1999;340:115-26.
- [38] Hansson GK, Libby P. The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol*. 2006;6:508-19.

## Anhang

- [39] Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *The New England journal of medicine*. 2005;352:1685-95.
- [40] Adelman GA. *Cardiology Essentials in Clinical Practice*: Springer London; 2010.
- [41] Naghavi M, Libby P, Falk E, Casscells SW, Litovsky S, Rumberger J, et al. From vulnerable plaque to vulnerable patient: a call for new definitions and risk assessment strategies: Part I. *Circulation*. 2003;108:1664-72.
- [42] Riccioni G, Sblendorio V. Atherosclerosis: from biology to pharmacological treatment. *J Geriatr Cardiol*. 2012;9:305-17.
- [43] Haverich A. A Surgeon's View on the Pathogenesis of Atherosclerosis. *Circulation*. 2017;135:205-7.
- [44] Klose GL, U.; März, W.; Windler, E. Familiäre Hypercholesterinämie: Entwicklungen in Diagnostik und Behandlung. *Deutsches Ärzteblatt*. 2014.
- [45] Ärzteschaft AdD. Empfehlungen zur Prophylaxe und Therapie der stabilen koronaren Herzkrankheit. 2004.
- [46] de Lorgeril M, Salen P, Defaye P, Mabo P, Paillard F. Dietary prevention of sudden cardiac death. *European heart journal*. 2002;23:277-85.
- [47] Haskell WL, Alderman EL, Fair JM, Maron DJ, Mackey SF, Superko HR, et al. Effects of intensive multiple risk factor reduction on coronary atherosclerosis and clinical cardiac events in men and women with coronary artery disease. The Stanford Coronary Risk Intervention Project (SCRIP). *Circulation*. 1994;89:975-90.
- [48] Sdringola S, Nakagawa K, Nakagawa Y, Yusuf SW, Boccalandro F, Mullani N, et al. Combined intense lifestyle and pharmacologic lipid treatment further reduce coronary events and myocardial perfusion abnormalities compared with usual-care cholesterol-lowering drugs in coronary artery disease. *Journal of the American College of Cardiology*. 2003;41:263-72.
- [49] Willett WC, Dietz WH, Colditz GA. Guidelines for healthy weight. *The New England journal of medicine*. 1999;341:427-34.
- [50] Ärzteschaft D. Empfehlungen zur Therapie der Tabakabhängigkeit. 2010.
- [51] Smith SC, Jr., Allen J, Blair SN, Bonow RO, Brass LM, Fonarow GC, et al. AHA/ACC guidelines for secondary prevention for patients with coronary and other atherosclerotic vascular disease: 2006 update: endorsed by the National Heart, Lung, and Blood Institute. *Circulation*. 2006;113:2363-72.
- [52] Scheller BL, B.; Joner, M.; Zahn, R.; Klauss, V.; Naber, C.; Schächinger, V.; Elsässer, A. Supplementband Primärprävention kardiovaskulärer Erkrankungen. *Zeitschrift für Kardiologie*. 2005;Band 94.
- [53] Sutcliffe P, Connock M, Gurung T, Freeman K, Johnson S, Kandala NB, et al. Aspirin for prophylactic use in the primary prevention of cardiovascular disease and cancer: a systematic review and overview of reviews. *Health Technol Assess*. 2013;17:1-253.
- [54] Briel M, Ferreira-Gonzalez I, You JJ, Karanickolas PJ, Akl EA, Wu P, et al. Association between change in high density lipoprotein cholesterol and cardiovascular disease morbidity and mortality: systematic review and meta-regression analysis. *Bmj*. 2009;338:b92.
- [55] Jarcho JA, Keaney JF, Jr. Proof That Lower Is Better--LDL Cholesterol and IMPROVE-IT. *The New England journal of medicine*. 2015;372:2448-50.
- [56] Bundesärztekammer (BÄK) KBK, Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen, (AWMF) MF. Nationale VersorgungsLeitlinie - Therapie Typ 2 Diabetes - Langfassung. 2013.
- [57] Saenz A, Fernandez-Esteban I, Mataix A, Ausejo M, Roque M, Moher D. Metformin monotherapy for type 2 diabetes mellitus. *Cochrane Database Syst Rev*. 2005;CD002966.
- [58] Ahren B. Dipeptidyl peptidase-4 inhibitors: clinical data and clinical implications. *Diabetes care*. 2007;30:1344-50.
- [59] Karasik A, Aschner P, Katzeff H, Davies MJ, Stein PP. Sitagliptin, a DPP-4 inhibitor for the treatment of patients with type 2 diabetes: a review of recent clinical trials. *Current medical research and opinion*. 2008;24:489-96.
- [60] Gross L, Theiss HD, Grabmaier U, Adrion C, Mansmann U, Sohn HY, et al. Combined therapy with sitagliptin plus granulocyte-colony stimulating factor in patients with acute myocardial infarction - Long-term results of the SITAGRAMI trial. *International journal of cardiology*. 2016;215:441-5.

## Anhang

- [61] Brenner C, Adrion C, Grabmaier U, Theisen D, von Ziegler F, Leber A, et al. Sitagliptin plus granulocyte colony-stimulating factor in patients suffering from acute myocardial infarction: A double-blind, randomized placebo-controlled trial of efficacy and safety (SITAGRAMI trial). *International journal of cardiology*. 2016;205:23-30.
- [62] Authors/Task Force m, Windecker S, Kolh P, Alfonso F, Collet JP, Cremer J, et al. 2014 ESC/EACTS Guidelines on myocardial revascularization: The Task Force on Myocardial Revascularization of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS) Developed with the special contribution of the European Association of Percutaneous Cardiovascular Interventions (EAPCI). *European heart journal*. 2014;35:2541-619.
- [63] Kober G. Aller Anfang ist schwer: eine kurze Geschichte der Ballondilatation. *Cardio News*. 2017;07/08.2017:26-7.
- [64] Stents sind in, Bypässe out. *Ärztezeitung*. 2011.
- [65] Michaels AD, Chatterjee K. Cardiology patient pages. Angioplasty versus bypass surgery for coronary artery disease. *Circulation*. 2002;106:e187-90.
- [66] Bhargava B, Karthikeyan G, Abizaid AS, Mehran R. New approaches to preventing restenosis. *Bmj*. 2003;327:274-9.
- [67] Erbel R. Die Geschichte der Stent-Entwicklung: 40 Jahre Fortschritt. *Cardio News*. 2017;07/08.2017:28-9.
- [68] Sigwart U, Puel J, Mirkovitch V, Joffe F, Kappenberger L. Intravascular stents to prevent occlusion and restenosis after transluminal angioplasty. *The New England journal of medicine*. 1987;316:701-6.
- [69] Fischman DL, Leon MB, Baim DS, Schatz RA, Savage MP, Penn I, et al. A randomized comparison of coronary-stent placement and balloon angioplasty in the treatment of coronary artery disease. Stent Restenosis Study Investigators. *The New England journal of medicine*. 1994;331:496-501.
- [70] Erbel R, Haude M, Hopp HW, Franzen D, Rupprecht HJ, Heublein B, et al. Coronary-artery stenting compared with balloon angioplasty for restenosis after initial balloon angioplasty. Restenosis Stent Study Group. *The New England journal of medicine*. 1998;339:1672-8.
- [71] Serruys PW, de Jaegere P, Kiemeneij F, Macaya C, Rutsch W, Heyndrickx G, et al. A comparison of balloon-expandable-stent implantation with balloon angioplasty in patients with coronary artery disease. Benestent Study Group. *The New England journal of medicine*. 1994;331:489-95.
- [72] Rajan DK, Sidhu A, Noel-Lamy M, Mahajan A, Simons ME, Sniderman KW, et al. Elastic Recoil after Balloon Angioplasty in Hemodialysis Accesses: Does It Actually Occur and Is It Clinically Relevant? *Radiology*. 2016;279:961-7.
- [73] Wiebe J, Nef HM, Hamm CW. Current status of bioresorbable scaffolds in the treatment of coronary artery disease. *Journal of the American College of Cardiology*. 2014;64:2541-51.
- [74] Leopold JA. Prohealing endothelial progenitor cell capture stents: do the cells captured explain the clinical outcomes? *Circulation Cardiovascular interventions*. 2013;6:494-5.
- [75] Sethi R, Lee CH. Endothelial progenitor cell capture stent: safety and effectiveness. *Journal of interventional cardiology*. 2012;25:493-500.
- [76] Aoki J, Serruys PW, van Beusekom H, Ong AT, McFadden EP, Sianos G, et al. Endothelial progenitor cell capture by stents coated with antibody against CD34: the HEALING-FIM (Healthy Endothelial Accelerated Lining Inhibits Neointimal Growth-First In Man) Registry. *Journal of the American College of Cardiology*. 2005;45:1574-9.
- [77] Lekshmi KM, Che HL, Cho CS, Park IK. Drug- and Gene-eluting Stents for Preventing Coronary Restenosis. *Chonnam medical journal*. 2017;53:14-27.
- [78] Walter DH, Cejna M, Diaz-Sandoval L, Willis S, Kirkwood L, Stratford PW, et al. Local gene transfer of phVEGF-2 plasmid by gene-eluting stents: an alternative strategy for inhibition of restenosis. *Circulation*. 2004;110:36-45.
- [79] Erdmann E. *Klinische Kardiologie: Krankheiten des Herzens, des Kreislaufs und der herznahen Gefäße*: Springer Berlin Heidelberg; 2011.
- [80] Dangas G, Kuepper F. Cardiology patient page. Restenosis: repeat narrowing of a coronary artery: prevention and treatment. *Circulation*. 2002;105:2586-7.

- [81] Karshovska E, Zerneck A, Sevilmis G, Millet A, Hristov M, Cohen CD, et al. Expression of HIF-1 $\alpha$  in injured arteries controls SDF-1 $\alpha$  mediated neointima formation in apolipoprotein E deficient mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2007;27:2540-7.
- [82] Inoue T, Croce K, Morooka T, Sakuma M, Node K, Simon DI. Vascular inflammation and repair: implications for re-endothelialization, restenosis, and stent thrombosis. *JACC Cardiovasc Interv*. 2011;4:1057-66.
- [83] Kipshidze N, Dangas G, Tsapenko M, Moses J, Leon MB, Kutryk M, et al. Role of the endothelium in modulating neointimal formation: vasculoprotective approaches to attenuate restenosis after percutaneous coronary interventions. *Journal of the American College of Cardiology*. 2004;44:733-9.
- [84] Gruberg L, Waksman R, Satler LF, Pichard AD, Kent KM. Novel approaches for the prevention of restenosis. *Expert opinion on investigational drugs*. 2000;9:2555-78.
- [85] Fuster V, Topol EJ, Nabel EG. *Atherothrombosis and Coronary Artery Disease*: Lippincott Williams & Wilkins; 2005.
- [86] Douglas G, Van Kampen E, Hale AB, McNeill E, Patel J, Crabtree MJ, et al. Endothelial cell repopulation after stenting determines in-stent neointima formation: effects of bare-metal vs. drug-eluting stents and genetic endothelial cell modification. *European heart journal*. 2013;34:3378-88.
- [87] Bavry A. *Stent Thrombosis*. Cardiology Advisor - Decision Support in Medicine, LLC. 2017.
- [88] Byrne RA, Joner M, Kastrati A. Stent thrombosis and restenosis: what have we learned and where are we going? The Andreas Gruntzig Lecture ESC 2014. *European heart journal*. 2015;36:3320-31.
- [89] Zalewski J, Undas A. Antithrombotic management in patients with percutaneous coronary intervention requiring oral anticoagulation. *Postępy Kardiologii Interwencyjnej*. 2016;12:290-302.
- [90] Roffi M, Patrono C, Collet JP, Mueller C, Valgimigli M, Andreotti F, et al. 2015 ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation: Task Force for the Management of Acute Coronary Syndromes in Patients Presenting without Persistent ST-Segment Elevation of the European Society of Cardiology (ESC). *European heart journal*. 2016;37:267-315.
- [91] Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*. 1997;275:964-7.
- [92] Yoder MC. Human endothelial progenitor cells. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012;2:a006692.
- [93] Gehling UM, Ergun S, Schumacher U, Wagener C, Pantel K, Otte M, et al. In vitro differentiation of endothelial cells from AC133-positive progenitor cells. *Blood*. 2000;95:3106-12.
- [94] Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D, Zhu Z, Lane WJ, Williams M, et al. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood*. 2000;95:952-8.
- [95] Nervi B, Link DC, DiPersio JF. Cytokines and hematopoietic stem cell mobilization. *J Cell Biochem*. 2006;99:690-705.
- [96] Anversa P, Kajstura J, Leri A. Circulating progenitor cells: search for an identity. *Circulation*. 2004;110:3158-60.
- [97] Weihofen WA, Liu J, Reutter W, Saenger W, Fan H. Crystal structure of CD26/dipeptidyl-peptidase IV in complex with adenosine deaminase reveals a highly amphiphilic interface. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279:43330-5.
- [98] Crump MP, Gong JH, Loetscher P, Rajarathnam K, Amara A, Arenzana-Seisdedos F, et al. Solution structure and basis for functional activity of stromal cell-derived factor-1; dissociation of CXCR4 activation from binding and inhibition of HIV-1. *EMBO J*. 1997;16:6996-7007.
- [99] Christopherson KW, 2nd, Hancoc G, Broxmeyer HE. Cell surface peptidase CD26/dipeptidylpeptidase IV regulates CXCL12/stromal cell-derived factor-1  $\alpha$ -mediated chemotaxis of human cord blood CD34+ progenitor cells. *Journal of immunology*. 2002;169:7000-8.
- [100] Zaruba MM, Theiss HD, Vallaster M, Mehl U, Brunner S, David R, et al. Synergy between CD26/DPP-IV inhibition and G-CSF improves cardiac function after acute myocardial infarction. *Cell Stem Cell*. 2009;4:313-23.
- [101] Theiss HD, Vallaster M, Rischpler C, Krieg L, Zaruba MM, Brunner S, et al. Dual stem cell therapy after myocardial infarction acts specifically by enhanced homing via the SDF-1/CXCR4 axis. *Stem Cell Res*. 2011;7:244-55.

- [102] Doring Y, Pawig L, Weber C, Noels H. The CXCL12/CXCR4 chemokine ligand/receptor axis in cardiovascular disease. *Frontiers in physiology*. 2014;5:212.
- [103] Ma Q, Jones D, Borghesani PR, Segal RA, Nagasawa T, Kishimoto T, et al. Impaired B-lymphopoiesis, myelopoiesis, and derailed cerebellar neuron migration in CXCR4- and SDF-1-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998;95:9448-53.
- [104] Levesque JP, Hendy J, Takamatsu Y, Simmons PJ, Bendall LJ. Disruption of the CXCR4/CXCL12 chemotactic interaction during hematopoietic stem cell mobilization induced by G-CSF or cyclophosphamide. *The Journal of clinical investigation*. 2003;111:187-96.
- [105] Sweeney EA, Lortat-Jacob H, Priestley GV, Nakamoto B, Papayannopoulou T. Sulfated polysaccharides increase plasma levels of SDF-1 in monkeys and mice: involvement in mobilization of stem/progenitor cells. *Blood*. 2002;99:44-51.
- [106] Zheng H, Fu G, Dai T, Huang H. Migration of endothelial progenitor cells mediated by stromal cell-derived factor-1 $\alpha$ /CXCR4 via PI3K/Akt/eNOS signal transduction pathway. *Journal of cardiovascular pharmacology*. 2007;50:274-80.
- [107] Yin Y, Zhao X, Fang Y, Yu S, Zhao J, Song M, et al. SDF-1 $\alpha$  involved in mobilization and recruitment of endothelial progenitor cells after arterial injury in mice. *Cardiovasc Pathol*. 2010;19:218-27.
- [108] Yamaguchi J, Kusano KF, Masuo O, Kawamoto A, Silver M, Murasawa S, et al. Stromal cell-derived factor-1 effects on ex vivo expanded endothelial progenitor cell recruitment for ischemic neovascularization. *Circulation*. 2003;107:1322-8.
- [109] Hristov M, Zernecke A, Liehn EA, Weber C. Regulation of endothelial progenitor cell homing after arterial injury. *Thrombosis and haemostasis*. 2007;98:274-7.
- [110] Chen L, Wu F, Xia WH, Zhang YY, Xu SY, Cheng F, et al. CXCR4 gene transfer contributes to in vivo reendothelialization capacity of endothelial progenitor cells. *Cardiovascular research*. 2010;88:462-70.
- [111] Abi-Younes S, Sauty A, Mach F, Sukhova GK, Libby P, Luster AD. The stromal cell-derived factor-1 chemokine is a potent platelet agonist highly expressed in atherosclerotic plaques. *Circulation research*. 2000;86:131-8.
- [112] Shantsila E, Tapp LD, Wrigley BJ, Pamukcu B, Apostolakis S, Montoro-Garcia S, et al. Monocyte subsets in coronary artery disease and their associations with markers of inflammation and fibrinolysis. *Atherosclerosis*. 2014;234:4-10.
- [113] Ma W, Liu Y, Wang C, Zhang L, Crocker L, Shen J. Atorvastatin inhibits CXCR7 induction to reduce macrophage migration. *Biochemical pharmacology*. 2014;89:99-108.
- [114] Wei D, Wang G, Tang C, Qiu J, Zhao J, Gregersen H, et al. Upregulation of SDF-1 is associated with atherosclerosis lesions induced by LDL concentration polarization. *Ann Biomed Eng*. 2012;40:1018-27.
- [115] Shah Z, Kampfrath T, Deiuliis JA, Zhong J, Pineda C, Ying Z, et al. Long-term dipeptidyl-peptidase 4 inhibition reduces atherosclerosis and inflammation via effects on monocyte recruitment and chemotaxis. *Circulation*. 2011;124:2338-49.
- [116] Ta NN, Schuyler CA, Li Y, Lopes-Virella MF, Huang Y. DPP-4 (CD26) inhibitor alogliptin inhibits atherosclerosis in diabetic apolipoprotein E-deficient mice. *Journal of cardiovascular pharmacology*. 2011;58:157-66.
- [117] Zeng Y, Li C, Guan M, Zheng Z, Li J, Xu W, et al. The DPP-4 inhibitor sitagliptin attenuates the progress of atherosclerosis in apolipoprotein-E-knockout mice via AMPK- and MAPK-dependent mechanisms. *Cardiovascular diabetology*. 2014;13:32.
- [118] Virmani R, Kolodgie FD, Burke AP, Finn AV, Gold HK, Tulenko TN, et al. Atherosclerotic plaque progression and vulnerability to rupture: angiogenesis as a source of intraplaque hemorrhage. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2005;25:2054-61.
- [119] Fischli S, Spinass GA, Berneis K, Imthurn B, Kraenzlin ME. *Endokrinologie und Stoffwechsel kompakt*: Thieme; 2011.
- [120] Terasaki M, Nagashima M, Nohtomi K, Kohashi K, Tomoyasu M, Sinmura K, et al. Preventive effect of dipeptidyl peptidase-4 inhibitor on atherosclerosis is mainly attributable to incretin's actions in nondiabetic and diabetic apolipoprotein E-null mice. *PLoS one*. 2013;8:e70933.
- [121] Mehnert H, Althoff PH. *Diabetologie in Klinik und Praxis*: Thieme; 2003.

- [122] Herdegen T. Pharmakologisch - Diabetes mellitus Typ 2. Deutsche Apotheker Zeitung. 2009;424 ff.
- [123] Wei Y, Mojsov S. 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;358:219-24.
- [124] Bullock BP, Heller RS, Habener JF. Tissue distribution of messenger ribonucleic acid encoding the rat glucagon-like peptide-1 receptor. Endocrinology. 1996;137:2968-78.
- [125] Yu M, Moreno C, Hoagland KM, Dahly A, Ditter K, Mistry M, et al. Antihypertensive effect of glucagon-like peptide 1 in Dahl salt-sensitive rats. J Hypertens. 2003;21:1125-35.
- [126] Basu A, Charkoudian N, Schrage W, Rizza RA, Basu R, Joyner MJ. Beneficial effects of GLP-1 on endothelial function in humans: dampening by glyburide but not by glimepiride. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2007;293:E1289-95.
- [127] Nystrom T, Gutniak MK, Zhang Q, Zhang F, Holst JJ, Ahren B, et al. Effects of glucagon-like peptide-1 on endothelial function in type 2 diabetes patients with stable coronary artery disease. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2004;287:E1209-15.
- [128] Nikolaidis LA, Mankad S, Sokos GG, Miske G, Shah A, Elahi D, et al. Effects of glucagon-like peptide-1 in patients with acute myocardial infarction and left ventricular dysfunction after successful reperfusion. Circulation. 2004;109:962-5.
- [129] Nikolaidis LA, Doverspike A, Hentosz T, Zourelis L, Shen YT, Elahi D, et al. Glucagon-like peptide-1 limits myocardial stunning following brief coronary occlusion and reperfusion in conscious canines. J Pharmacol Exp Ther. 2005;312:303-8.
- [130] Nikolaidis LA, Elahi D, Shen YT, Shannon RP. 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:H2401-8.
- [131] FDA. U.S. Food and Drug Administration.
- [132] EMA. EMA - European Medicines Agency.
- [133] Fisman EZ, Tenenbaum A. Antidiabetic treatment with gliptins: focus on cardiovascular effects and outcomes. Cardiovascular diabetology. 2015;14:129.
- [134] Authors/Task Force M, Ryden L, Grant PJ, Anker SD, Berne C, Cosentino F, et al. ESC Guidelines on diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases developed in collaboration with the EASD: the Task Force on diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases of the European Society of Cardiology (ESC) and developed in collaboration with the European Association for the Study of Diabetes (EASD). European heart journal. 2013;34:3035-87.
- [135] Matsubara J, Sugiyama S, Akiyama E, Iwashita S, Kurokawa H, Ohba K, et al. Dipeptidyl peptidase-4 inhibitor, sitagliptin, improves endothelial dysfunction in association with its anti-inflammatory effects in patients with coronary artery disease and uncontrolled diabetes. Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society. 2013;77:1337-44.
- [136] Noda Y, Miyoshi T, Oe H, Ohno Y, Nakamura K, Toh N, et al. Alogliptin ameliorates postprandial lipemia and postprandial endothelial dysfunction in non-diabetic subjects: a preliminary report. Cardiovascular diabetology. 2013;12:8.
- [137] Hirano T, Yamashita S, Takahashi M, Hashimoto H, Mori Y, Goto M. Anagliptin, a dipeptidyl peptidase-4 inhibitor, decreases macrophage infiltration and suppresses atherosclerosis in aortic and coronary arteries in cholesterol-fed rabbits. Metabolism: clinical and experimental. 2016;65:893-903.
- [138] Green JB, Bethel MA, Armstrong PW, Buse JB, Engel SS, Garg J, et al. Effect of Sitagliptin on Cardiovascular Outcomes in Type 2 Diabetes. The New England journal of medicine. 2015.
- [139] Mita T, Katakami N, Shiraiwa T, Yoshii H, Onuma T, Kuribayashi N, et al. Rationale, design, and baseline characteristics of a clinical trial for prevention of atherosclerosis in patients with insulin-treated type 2 diabetes mellitus using DPP-4 inhibitor: the Sitagliptin Preventive study of Intima-media thickness Evaluation (SPIKE). Diabetology & metabolic syndrome. 2014;6:35.
- [140] White WB, Cannon CP, Heller SR, Nissen SE, Bergenstal RM, Bakris GL, et al. Alogliptin after acute coronary syndrome in patients with type 2 diabetes. The New England journal of medicine. 2013;369:1327-35.

## Anhang

- [141] Shah Z, Pineda C, Kampfrath T, Maiseyeu A, Ying Z, Racoma I, et al. Acute DPP-4 inhibition modulates vascular tone through GLP-1 independent pathways. *Vascular pharmacology*. 2011;55:2-9.
- [142] Salim HM, Fukuda D, Higashikuni Y, Tanaka K, Hirata Y, Yagi S, et al. Dipeptidyl peptidase-4 inhibitor, linagliptin, ameliorates endothelial dysfunction and atherogenesis in normoglycemic apolipoprotein-E deficient mice. *Vascular pharmacology*. 2016;79:16-23.
- [143] Esposito G, Cappetta D, Russo R, Rivellino A, Ciuffreda LP, Roviezzo F, et al. Dipeptidyl peptidase 4 inhibitor sitagliptin reduces inflammation, fibrosis and preserves diastolic function in a rat model of heart failure with preserved ejection fraction. *British journal of pharmacology*. 2016.
- [144] Noels H, Zhou B, Tilstam PV, Theelen W, Li X, Pawig L, et al. Deficiency of endothelial CXCR4 reduces reendothelialization and enhances neointimal hyperplasia after vascular injury in atherosclerosis-prone mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2014;34:1209-20.
- [145] Torimoto K, Okada Y, Mori H, Otsuka T, Kawaguchi M, Matsuda M, et al. Effects of exenatide on postprandial vascular endothelial dysfunction in type 2 diabetes mellitus. *Cardiovascular diabetology*. 2015;14:25.
- [146] Monami M, Vitale V, Ambrosio ML, Bartoli N, Toffanello G, Raghianti B, et al. Effects on lipid profile of dipeptidyl peptidase 4 inhibitors, pioglitazone, acarbose, and sulfonylureas: meta-analysis of placebo-controlled trials. *Advances in therapy*. 2012;29:736-46.
- [147] Vittone F, Liberman A, Vasic D, Ostertag R, Esser M, Walcher D, et al. Sitagliptin reduces plaque macrophage content and stabilises arteriosclerotic lesions in Apoe (-/-) mice. *Diabetologia*. 2012;55:2267-75.
- [148] Oyama J, Murohara T, Kitakaze M, Ishizu T, Sato Y, Kitagawa K, et al. The Effect of Sitagliptin on Carotid Artery Atherosclerosis in Type 2 Diabetes: The PROLOGUE Randomized Controlled Trial. *PLoS medicine*. 2016;13:e1002051.
- [149] Nozue T, Fukui K, Koyama Y, Fujii H, Kunishima T, Hikita H, et al. Effects of sitagliptin on coronary atherosclerosis evaluated using integrated backscatter intravascular ultrasound in patients with type 2 diabetes: rationale and design of the TRUST study. *Heart and vessels*. 2015.
- [150] Cullen P, Baetta R, Bellosa S, Bernini F, Chinetti G, Cignarella A, et al. Rupture of the atherosclerotic plaque: does a good animal model exist? *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2003;23:535-42.
- [151] Getz GS, Reardon CA. Animal models of atherosclerosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2012;32:1104-15.
- [152] Kapourchali FR, Surendiran G, Chen L, Uitz E, Bahadori B, Moghadasian MH. Animal models of atherosclerosis. *World J Clin Cases*. 2014;2:126-32.
- [153] Emini Veseli B, Perrotta P, De Meyer GRA, Roth L, Van der Donckt C, Martinet W, et al. Animal models of atherosclerosis. *European journal of pharmacology*. 2017.
- [154] Nakashima Y, Plump AS, Raines EW, Breslow JL, Ross R. ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. *Arterioscler Thromb*. 1994;14:133-40.
- [155] Kolovou G, Anagnostopoulou K, Mikhailidis DP, Cokkinos DV. Apolipoprotein E knockout models. *Current pharmaceutical design*. 2008;14:338-51.
- [156] Pendse AA, Arbones-Mainar JM, Johnson LA, Altenburg MK, Maeda N. Apolipoprotein E knock-out and knock-in mice: atherosclerosis, metabolic syndrome, and beyond. *J Lipid Res*. 2009;50 Suppl:S178-82.
- [157] Ishibashi S, Brown MS, Goldstein JL, Gerard RD, Hammer RE, Herz J. Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery. *The Journal of clinical investigation*. 1993;92:883-93.
- [158] Bjorklund MM, Hollensen AK, Hagensen MK, Dagnaes-Hansen F, Christoffersen C, Mikkelsen JG, et al. Induction of atherosclerosis in mice and hamsters without germline genetic engineering. *Circulation research*. 2014;114:1684-9.
- [159] Roche-Molina M, Sanz-Rosa D, Cruz FM, Garcia-Prieto J, Lopez S, Abia R, et al. Induction of sustained hypercholesterolemia by single adeno-associated virus-mediated gene transfer of mutant hPCSK9. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2015;35:50-9.

## Anhang

- [160] Van Herck JL, De Meyer GR, Martinet W, Van Hove CE, Foubert K, Theunis MH, et al. Impaired fibrillin-1 function promotes features of plaque instability in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation*. 2009;120:2478-87.
- [161] Van der Donckt C, Van Herck JL, Schrijvers DM, Vanhoutte G, Verhoye M, Blockx I, et al. Elastin fragmentation in atherosclerotic mice leads to intraplaque neovascularization, plaque rupture, myocardial infarction, stroke, and sudden death. *European heart journal*. 2015;36:1049-58.
- [162] Tall AR. Functions of cholesterol ester transfer protein and relationship to coronary artery disease risk. *J Clin Lipidol*. 2010;4:389-93.
- [163] Ji D, Zhao G, Songstad A, Cui X, Weinstein EJ. Efficient creation of an APOE knockout rabbit. *Transgenic Res*. 2015;24:227-35.
- [164] Prescott MF, McBride CH, Hasler-Rapacz J, Von Linden J, Rapacz J. Development of complex atherosclerotic lesions in pigs with inherited hyper-LDL cholesterolemia bearing mutant alleles for apolipoprotein B. *The American journal of pathology*. 1991;139:139-47.
- [165] Rapacz J, Hasler-Rapacz J, Taylor KM, Checovich WJ, Attie AD. Lipoprotein mutations in pigs are associated with elevated plasma cholesterol and atherosclerosis. *Science*. 1986;234:1573-7.
- [166] Al-Mashhadi RH, Sorensen CB, Kragh PM, Christoffersen C, Mortensen MB, Tolbod LP, et al. Familial hypercholesterolemia and atherosclerosis in cloned minipigs created by DNA transposition of a human PCSK9 gain-of-function mutant. *Science translational medicine*. 2013;5:166ra1.
- [167] Verbraucherschutz BdJuf. Verordnung zum Schutz von zu Versuchszwecken oder zu anderen wissenschaftlichen Zwecken verwendeten Tieren (Tierschutz-Versuchstierverordnung - TierSchVersV). 2013.
- [168] Schlimpert VO, P. Neuer Wirkstoff profiliert sich als starker Cholesterinsenker. *Ärzte Zeitung*. 2014.
- [169] Costa MA, Simon DI. Molecular basis of restenosis and drug-eluting stents. *Circulation*. 2005;111:2257-73.
- [170] Reejhsinghani R, Lotfi AS. Prevention of stent thrombosis: challenges and solutions. *Vascular health and risk management*. 2015;11:93-106.
- [171] Liu MW, Roubin GS, King SB, 3rd. Restenosis after coronary angioplasty. Potential biologic determinants and role of intimal hyperplasia. *Circulation*. 1989;79:1374-87.
- [172] Ban K, Noyan-Ashraf MH, Hoefer J, Bolz SS, Drucker DJ, Husain M. 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;117:2340-50.
- [173] Charles River Laboratories International I. C57BL/6N Mice. 2011.
- [174] Scrocchi LA, Brown TJ, MaClusky N, Brubaker PL, Auerbach AB, Joyner AL, et al. Glucose intolerance but normal satiety in mice with a null mutation in the glucagon-like peptide 1 receptor gene. *Nat Med*. 1996;2:1254-8.
- [175] Lamont BJ, Li Y, Kwan E, Brown TJ, Gaisano H, Drucker DJ. Pancreatic GLP-1 receptor activation is sufficient for incretin control of glucose metabolism in mice. *The Journal of clinical investigation*. 2012;122:388-402.
- [176] Neumann E, Schaefer-Ridder M, Wang Y, Hofschneider PH. Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields. *EMBO J*. 1982;1:841-5.
- [177] Schenkel J. *Transgene Tiere*. Springer-Lehrbuch. 2006;2. Auflage.
- [178] H. Böhme M, J. Dimigen H, S. Gerold T, A. Haemisch HV, R. Lübke U, S. Ott U, et al. *Tiergerechte Haltung: Labormäuse*. GV-Solas. März 2007.
- [179] FELASA working group on revision of guidelines for health monitoring of rodents and rabbits: Maehler MCB, M.; Feinstein, R.; Gallagher, A.; Illgen-Wilcke, B.; Pritchett-Corning, K. and Raspa, M. FELASA recommendations for the health monitoring of mouse, rat, hamster, guinea pig and rabbit colonies in breeding and experimental units. 2014.
- [180] Löffler G. *Basiswissen Biochemie*. Springer-Lehrbuch. 7. Auflage.
- [181] Gey MH. *Instrumentelle Analytik und Bioanalytik*. Springer-Lehrbuch. 2008;2. Auflage.
- [182] Horn F. *Biochemie des Menschen*. Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart. 2009.
- [183] Weiss Jürgen BK, Bernsmann Emanuela, Chourbaji, Dietrich Hermann. *Versuchstierkunde - Tierpflege in Forschung und Klinik*. 2014.

## Anhang

- [184] Kraft W. Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin. 2005.
- [185] Barone GW, Farley PC, Conerly JM, Flanagan TL, Kron IL. Morphological and functional techniques for assessing endothelial integrity: the use of Evans blue dye, silver stains, and endothelial derived relaxing factor. *J Card Surg.* 1989;4:140-8.
- [186] Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature methods.* 2012;9:671-5.
- [187] Macey MGE. *Flow Cytometry: Principles and Applications.* Humana Press. 2007.
- [188] al. LWe. *Der Experimentator: Immunologie.* Springer Verlag - Berlin. 2014.
- [189] Liang CC, Park AY, Guan JL. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nat Protoc.* 2007;2:329-33.
- [190] Dupont WD, Plummer WD, Jr. Power and sample size calculations. A review and computer program. *Controlled clinical trials.* 1990;11:116-28.
- [191] Wei R, Ma S, Wang C, Ke J, Yang J, Li W, et al. Exenatide exerts direct protective effects on endothelial cells through the AMPK/Akt/eNOS pathway in a GLP-1 receptor-dependent manner. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2016;310:E947-57.
- [192] Ohnishi H, Mizuno S, Mizuno-Horikawa Y, Kato T. Stromal cell-derived factor-1 (SDF1)-dependent recruitment of bone marrow-derived renal endothelium-like cells in a mouse model of acute kidney injury. *The Journal of veterinary medical science.* 2015;77:313-9.
- [193] Jungraithmayr W, De Meester I, Matheeußen V, Baerts L, Arni S, Weder W. CD26/DPP-4 inhibition recruits regenerative stem cells via stromal cell-derived factor-1 and beneficially influences ischaemia-reperfusion injury in mouse lung transplantation. *European journal of cardio-thoracic surgery : official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery.* 2012;41:1166-73.
- [194] Krankel N, Kuschnerus K, Müller M, Speer T, Mocharla P, Madeddu P, et al. Novel insights into the critical role of bradykinin and the kinin B2 receptor for vascular recruitment of circulating endothelial repair-promoting mononuclear cell subsets: alterations in patients with coronary disease. *Circulation.* 2013;127:594-603.
- [195] Eriksson L, Saxelin R, Rohl S, Roy J, Caidahl K, Nystrom T, et al. Glucagon-Like Peptide-1 Receptor Activation Does not Affect Re-Endothelialization but Reduces Intimal Hyperplasia via Direct Effects on Smooth Muscle Cells in a Nondiabetic Model of Arterial Injury. *Journal of vascular research.* 2015;52:41-52.
- [196] Drucker D, Easley C, Kirkpatrick P. Sitagliptin. *Nature reviews Drug discovery.* 2007;6:109-10.
- [197] Blasius H. *Arzneimittelentwicklung - präklinische und klinische Prüfung, 1. Teil.* Deutsche Apotheker Zeitung. 2014;22/2017:56.
- [198] Use ICoHoTRfRoPfH. *Safety Guidelines.*
- [199] Use ICoHoTRfRoPfH. *Guidance on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals intended for Human Use S2(R1).* 2011.
- [200] Agency EM. *Note for Guidance on non-clinical Safety Studies for the Conduct of Human Clinical Trials and Marketing Authorization for Pharmaceuticals (CPMP/ICH/286/95).* 2008.
- [201] Russell WMSB, R. L. *The Principles of Humane Experimental Technique.* Methuen, London. 1959.
- [202] Forschung DF-Sft. *Tierversuche in der Forschung* 2004.
- [203] Yuhua S, Baoping W. From vulnerable plaque to blood healthy therapy. *Perfusion.* 2017:267659117728113.
- [204] Mokadam NA, Melford RE, Jr., Maynard C, Goss JR, Stewart D, Reisman M, et al. Prevalence and procedural outcomes of percutaneous coronary intervention and coronary artery bypass grafting in patients with diabetes and multivessel coronary artery disease. *J Card Surg.* 2011;26:1-8.
- [205] Chow CC. *Metabolism of Mice and Men.* Scientific Clearing House. 2010.
- [206] Oyama J, Ishizu T, Sato Y, Kodama K, Bando YK, Murohara T, et al. Rationale and design of a study to evaluate the effects of sitagliptin on atherosclerosis in patients with diabetes mellitus: PROLOGUE study. *International journal of cardiology.* 2014;174:383-4.

Anhang

## Danksagung

Mein besonders herzlicher Dank gilt PD Dr. Christoph Brenner, der mich beim Anfertigen dieser Arbeit stets unterstützt und betreut hat. Insbesondere bei kleinen Hürden zu Beginn der Versuche für diese Arbeit hat er mich immer motiviert, angetrieben und immer in meine Fähigkeiten vertraut.

Selbstverständlich gilt mein Dank auch meinem Doktorvater Univ.-Prof. Dr. Eckhard Wolf, der mir die Promotion an der tierärztlichen Fakultät der LMU in dieser Form ermöglicht hat.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Kollegen bedanken, die mich bei den Versuchen tatkräftig unterstützt haben. Mein besonderer Dank gilt Daniela Lener, für die stets hervorragende Beratung und Hilfe bei der Histologie und in der Zellkultur und PD Dr. Sieghart Sopper für seine unermüdliche und kompetente Unterstützung bei den FACS-Analysen. Weiterhin möchte ich auch Dr. Santosh Ghadge danken, von dem ich fachlich und technisch im Labor sehr viel lernen konnte und der immer äußerst hilfsbereit war.

Außerdem möchte ich meiner Familie für die außerordentliche Unterstützung während der gesamten Zeit danken. Meine Eltern haben immer an mich geglaubt und mich motiviert, dafür bin ich ihnen sehr dankbar. Meinem Freund Thomas, dafür dass er einfach zu jeder Zeit und an jedem Ort für mich da war und meinem Bruder Leonhard für seine feste Überzeugung, dass die Promotion nur eine meiner wissenschaftlichen Leistungen sein wird.

Zuletzt möchte ich auch meinen Freundinnen Annabelle, Tina und Christine danken, die mich in jeder Lebenslage unterstützt haben und immer ein offenes Ohr für mich hatten. Danke für Eure Freundschaft.