

Aus der Klinik für Kardiologie und Pulmologie  
der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin  
Campus Benjamin Franklin

DISSERTATION

Kardioprotektive Effekte von High-density Lipoprotein induziert durch einen  
humanen Apolipoprotein AI Gentransfer bei der diabetischen Kardiopathie  
in einem experimentellen Diabetes mellitus Rattenmodell

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Okan Demir  
aus Berlin

Datum der Promotion: 25.10.2013

**Erlaubnis für die Durchführung von Tierexperimenten:**

Aktenzeichen: TVA-Nr. G0209/04

Datum der behördlichen Genehmigung: 27.04.2004

## Inhaltsverzeichnis

	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>VII</b>
<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1.	Der Diabetes mellitus	1
1.1.1.	Die Definition und Klassifikation des Diabetes mellitus	1
1.1.2.	Die Epidemiologie des Diabetes mellitus	1
1.2.	Die diabetische Kardiopathie	2
1.2.1.	Die Definition der diabetischen Kardiopathie	2
1.2.2.	Die Ätiologie der diabetischen Kardiopathie	2
1.3.	Die diabetische Dyslipidämie	3
1.3.1.	Die Definition der diabetischen Dyslipidämie	3
1.3.2.	Die Lipoproteine	4
1.3.3.	Das High-density Lipoprotein	4
1.3.4.	Die Apolipoproteine	5
1.3.5.	Der reverse Cholesterol Transport	6
1.3.6.	Die pleiotropen Effekte des High-density Lipoproteins	7
1.4.	Der Einfluss des High-density Lipoproteins auf Mortalität und Morbidität	8
1.4.1.	Epidemiologische Studien	8
1.4.2.	Präventions- und Interventionsstudien	9
1.4.3.	Medikamentöse Strategien zur Beeinflussung des High-density Lipoproteins	11
1.4.4.	Der adenovirale Apolipoprotein AI Gentransfer	13
1.4.4.1.	Die Gründe für einen humanen Apolipoprotein AI Gentransfer	13
1.4.4.2.	Die Gründe für die Verwendung eines adenoviralen Gentransfers	14
1.4.4.3.	Die adenovirale Biologie und Entwicklung der adenoviralen Vektoren	14
<b>2.</b>	<b>Fragestellung</b>	<b>18</b>
<b>3.</b>	<b>Materialien und Methoden</b>	<b>19</b>
3.1.	Materialien	19
3.1.1.	Laboraüstung und Instrumente	19

3.1.2.	Chemikalien und Reagenzien	20
3.1.3.	Medien und Lösungen	22
3.1.4.	Kit´s und andere Materialien	24
3.1.5.	Computer und Software	24
3.1.6.	Enzyme	25
3.1.7.	Antikörper	25
3.2.	Die Tierexperimente	26
3.2.1.	Das Tiermodell	26
3.2.2.	Die Induktion des Diabetes mellitus	26
3.2.3.	Der Gentransfer	26
3.2.4.	Die hämodynamische Charakterisierung	28
3.2.5.	Die Organentnahme und Weiterverarbeitung	28
3.3.	Die molekularbiologischen Untersuchungen	29
3.3.1.	Die Immunhistologie	29
3.3.1.1.	Die Histologie	29
3.3.1.2.	Die Immunhistochemie	29
3.3.2.	Die Lipoproteinanalyse	31
3.3.2.1.	Die Bestimmung des humanen Apolipoprotein AI	31
3.3.2.2.	Die Bestimmung der Lipoproteine	32
3.3.3.	Die Proteinanalyse	32
3.3.3.1.	Die Proteinisolierung	32
3.3.3.2.	Die Bestimmung der Proteinkonzentrationen	33
3.3.3.3.	Der Westernblot (Immunoblotting)	33
3.3.4.	Die messenger Ribonukleinsäure-Analyse	35
3.3.4.1.	Die Isolierung der messenger Ribonukleinsäure	35
3.3.4.2.	Die reverse Transkriptase	36
3.3.4.3.	Die Hotstar Polymerase Kettenreaktion	37
3.3.4.4.	Die Trennung der Desoxyribonukleinsäure durch die Gelelektrophorese	37
3.3.4.5.	Die Klonierung der Desoxyribonukleinsäure	37
3.3.4.6.	Die Plasmid Isolierung (Mini-Präparation)	38
3.3.4.7.	Die Restriktion der Desoxyribonukleinsäure-Fragmente	39
3.3.4.8.	Real-time reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion	39
3.3.5.	Die Total radical antioxidant potential Bestimmung	40

---

3.4.	Die statistische Analyse	41
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>42</b>
4.1.	Die Basaldaten	42
4.2.	Der humane Apolipoprotein AI Gentransfer	43
4.3.	Die Effekte des humanen Apolipoprotein AI Gentransfers auf die Lipidfraktionen	43
4.4.	Der Einfluss des humanen Apolipoprotein AI Gentransfers auf die linksventrikuläre Pumpfunktion	44
4.5.	Die Effekte des humanen Apolipoprotein AI Gentransfers auf den myokardialen Kollagengehalt	45
4.6.	Die Effekte des humanen Apolipoprotein AI Gentransfers auf die myokardiale Zytokin-Expression	46
4.7.	Die Effekte des humanen Apolipoprotein AI Gentransfers auf die myokardiale Expression der Adhäsionsmoleküle und immunhistochemischer Nachweis	47
4.8.	Die Effekte des humanen Apolipoprotein AI Gentransfers auf den oxidativen Stress	52
4.9.	Die Effekte des humanen Apolipoprotein AI Gentransfers auf die Phosphorylierung der Proteinkinase B und die endotheliale Nitric oxide synthase	55
4.10.	Analyse zur zellulären Mikrostruktur mittels Elektronenmikroskopie	57
<b>5.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>59</b>
5.1.	Das Streptozotocin induzierte Diabetes mellitus Rattenmodell und der humane Apolipoprotein AI Gentransfer	59
5.2.	Die myokardiale extrazelluläre Matrix unter der diabetischen Kardiopathie und die Effekte des humanen Apolipoprotein AI Gentransfers	63
5.3.	Die myokardiale Inflammation unter der diabetischen Kardiopathie und die Effekte des humanen Apolipoprotein AI Gentransfers	65
5.4.	Der oxidative Stress unter der diabetischen Kardiopathie und die Effekte des humanen Apolipoprotein AI Gentransfers	69

5.5.	Die Charakterisierung der hämodynamischen Parameter unter der diabetischen Kardiopathie und die Effekte des humanen Apolipoprotein AI Gentransfers	75
5.6.	Methodenkritik	78
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>79</b>
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>81</b>
<b>8.</b>	<b>Eidesstattliche Versicherung</b>	<b>106</b>
<b>9.</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>107</b>
<b>10.</b>	<b>Publikation</b>	<b>108</b>
<b>11.</b>	<b>Danksagung</b>	<b>109</b>

---

**Abkürzungsverzeichnis**

ABCA1	Adenosintriphosphat-binding-cassette-transporter A1
Ad	adenoviral
AK	Antikörper
Akt	Proteinkinase B
APS	Ammoniumpersulfat
Apo	Apolipoprotein
ApoAI	Apolipoprotein AI
ATP	Adenosintriphosphat
BM	Basalmembran
BSA	Bovine Serum Albumin
BZ	Blutzucker
C	Cholesterin
CE	Cholesterinester
CETP	Cholesteryl-ester-transfer-protein
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
d	Tag
DM	Diabetes mellitus
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsDNA	doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure
ED	endotheliale Dysfunktion
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
eNOS	endotheliale Nitric oxide Synthase
ec-SOD	extrazelluläre Superoxid Dismutase
FC	freies Cholesterin
FCS	Fetal Calf Serum
h	Stunde
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
hApoAI	humanes Apolipoprotein AI
HDL	High-density Lipoprotein
HG	Herzgewicht
ICAM	interzelluläres Adhäsions Molekül
IDL	Intermediär-density Lipoprotein

IL-1 $\beta$	Interleukin-1 $\beta$
ITR	inverted terminal repeats
KG	Körpergewicht
KHK	koronare Herzerkrankung
KO	Knock out
LDL	Low-density Lipoprotein
LPL	Lipoprotein Lipase
LCAT	Lecithin-cholesterol-acyl-transferase
LTU	late transkription unit
LV	linker Ventrikel
min	Minute
MLP	major late promoter
M-MLV	murine Mäuse-Leukämie-Virus
NaBr	Natriumbromid
NF- $\kappa$ B	Nuklearfaktor- $\kappa$ B
NO	Nitric oxide = Stickstoffmonoxid
ORF	open reading frame
p38 MAPK	p38 Mitogen-activated protein kinase
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PL	Phospholipide
PLTP	Phospholipid-transfer-protein
RCT	reverser Cholesterol Transport
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reactive oxygen species
U/min	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RVT	reverse Transkriptase
s	Sekunde
SD	Sprague Dawley
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate- Polyacrylamidgelelektrophorese



SERCA	sarkoplasmatisches Retikulum Kalzium Adenosintriphosphatase
SOD	Superoxid Dismutase
SRB1	Scavenger receptor typ B1
STZ	Streptozotocin
TBARS	Total radical antioxidant potential
TBS	Tris puffered saline
TBST	Tris puffered saline tween
TAE	Tris acetat Ethylendiamintetraessigsäure
TG	Triglyceride
TNF- $\alpha$	Tumor Nekrose Faktor- $\alpha$
TRIS	Tris-hydroxymethyl-aminometha
VCAM	vaskuläres Adhäsionsmolekül
VLDL	Very low-density Lipoprotein
w	Woche
$\psi$	Verpackungssequenz

## **1. Einleitung**

### **1.1. Der Diabetes mellitus**

#### **1.1.1. Die Definition und Klassifikation des Diabetes mellitus**

Diabetes mellitus (DM) bedeutet „honigsüßer Durchfluss“. Die Bezeichnung geht auf die Antike zurück und beschreibt die beiden Hauptsymptome der Erkrankung: verstärktes Wasserlassen bei verstärkter Ausscheidung von Zucker mit dem Urin nach Überschreiten der Nierenschwelle. Der DM ist definiert als eine, durch chronische Hyperglykämie (in unbehandeltem Zustand) bedingte metabolische Störung. Es liegt eine gestörte Insulinsekretion und/oder Insulinwirkung zugrunde (WHO, 1998). Im Jahre 1999 übernahm die Deutsche Diabetes Gesellschaft (DDG) die neue Klassifikation der Amerikanischen Diabetes Gesellschaft (ADA) von 1997. Hiernach gibt es neben dem DM Typ I, der durch einen absoluten Insulinmangel gekennzeichnet ist, einen DM Typ II der durch eine abnehmende Insulinsensitivität charakterisiert ist. Daneben wird zwischen einem spezifischen DM (DM Typ III) und einem Gestationsdiabetes (DM Typ IV) unterschieden (WHO, 1998).

#### **1.1.2. Die Epidemiologie des Diabetes mellitus**

Der DM hat sich in den Industrienationen zu einer Volkskrankheit entwickelt. Die Zahl der Diabetiker betrug im Jahr 2000 schätzungsweise weltweit 150 Millionen, weitere Schätzungen gehen davon aus, dass sich diese Zahl bis 2025 auf 300 Millionen verdoppeln wird (King H *et al.* 1998). Neuere Zahlen gehen 2007 von 248 Millionen Diabetikern aus, diese sollen sich bis 2025 auf 380 Millionen erhöhen (Diabetes Atlas, 3rd edition, International Diabetes Federation, 2006). Die WHO gab für das Jahr 2006 für Deutschland 8 Millionen Diabetiker an (Deutsche Diabetes-Union: Gesundheitsbericht Diabetes 2007). Aufgrund der Tatsache, dass der DM initial oft asymptomatisch verläuft, muss mit einer hohen Dunkelziffer gerechnet werden. Das belegen auch zahlreiche Studien, die von einer DM Häufigkeit von mindestens 8 % ausgehen (Palitzsch KD *et al.* 1999). Nimmt man noch die Bevölkerung mit einer prädiabetischen Stoffwechsellage mit einer verminderter Glukosetoleranz hinzu, so kommt man für 55-74-jährige auf Werte von 40 % (Rathmann W *et al.* 2003). Der DM Typ I (Insulinabhängiger DM) macht davon etwa 6 % aus (Hauner H 1998).

An DM erkrankte Männer haben ein verdoppeltes Risiko an einer kardiovaskulären Erkrankung zu erleiden, Frauen sogar ein verdreifachtes Risiko (Kannel WB und McGee DL 1979). Kardiovaskuläre Erkrankungen stellen beim DM die Hauptursache für

die Morbidität und Mortalität dar (Assmann G und Schulte H 1988). Sie zeichnen sich durch Neuropathien, Herzrhythmusstörungen, Herzinsuffizienz, Mikroangiopathien, Makroangiopathien und die diabetische Kardiopathie aus (Kannel WB *et al.* 1974). Diabetiker haben ein deutlich erhöhtes Risiko eine Herzinsuffizienz zu entwickeln, dabei haben Männer ein 2-fach und Frauen ein 5-fach erhöhte Risiko (Kannel WB *et al.* 1974, Tuomilehto J *et al.* 1998). Auch das Risiko der koronaren Herzerkrankung (KHK) und seiner Komplikation dem akuten Koronarsyndrom ist bei Diabetikern aufgrund der Entwicklung einer Arteriosklerose um das 2- bis 3-fache erhöht (Singer DE *et al.* 1992).

## **1.2. Die diabetische Kardiopathie**

### **1.2.1 Die Definition der diabetischen Kardiopathie**

Patienten mit einem DM weisen in rund einem Drittel der Fälle eine Einschränkung der Herzfunktion ohne Arteriosklerose auf. Diese spezifische Herzerkrankung wurde erstmals 1972 von Rubler (Rubler S *et al.* 1972) als diabetische Kardiopathie beschrieben. Dabei sind keine angiographischen oder autoptischen Zeichen einer Arteriosklerose nachweisbar (Fein FS und Sonnenblick EH 1994). Die diabetische Kardiopathie ist eine eigenständige Krankheit (Zarich SW und Nesto RW 1989, Raev DC 1994). Gekennzeichnet ist sie durch Störung des intrakardialen Nervensystems (autonome Neuropathie), der Zirkulation (Mikro- und Makroangiopathie) der Ventrikelfunktion (Kardiomyopathie) sowie durch einen veränderten Stoffwechsel (Zarich SW und Nesto RW 1989, Tschoepe D und Roesen P 1998). Diese Veränderungen stehen in enger Wechselwirkung zueinander. Daher wird nachfolgend der Begriff der diabetischen Kardiopathie verwendet.

Hämodynamisch ist sie unter anderem gekennzeichnet durch eine systolische und diastolische Dysfunktion des linken Ventrikels (LV), mit abnehmender LV Druckanstiegsgeschwindigkeit ( $dP/dt_{max}$ ), LV Spitzendruck, LV Ejektionsfraktion und zunehmendem LV enddiastolischen Druck und einer Verminderung der LV Druckabfallsgeschwindigkeit ( $dP/dt_{min}$ ) (Fein FS und Sonnenblick EH 1985, Schannwell CM *et al.* 2002).

### **1.2.2. Die Ätiologie der diabetischen Kardiopathie**

Die Pathogenese der diabetischen Kardiopathie ist multifaktoriell und beinhaltet unter anderem eine Beeinträchtigung des Energiehaushaltes. Die gestörte Glukoseaufnahme in die Zellen ist verbunden mit einer Verminderung der aeroben Glykolyse (Gamble J

und Lopaschuk GD 1994) und der Glukoseoxidation (Chatham JC *et al.* 1988). Im Gegensatz dazu steigt die Energiegewinnung aus Abbau freier Fettsäuren (Paulson DJ und Crass MF 3rd 1982). Die Folge davon ist ein erhöhter Sauerstoffbedarf und eine verminderte Bereitstellung von Adenosintriphosphat (ATP). Daraus resultiert eine herabgesetzte Aktivität des sarkoplasmatisches Retikulum Kalzium Adenosintriphosphatase (SERCA). Dies hat eine verlangsamte frühdiastolische Relaxation mit einer verlängerten isovolumetrischen Relaxationszeit zur Folge (Tschöpe C und Schultheiss HP 2003).

Weiterhin bedingt die chronische Hyperglykämie eine erhöhte Apoptoserate der Kardiomyozyten (Cai L *et al.* 2002, Ho FM *et al.* 2006) und eine pathologische Zunahme von Kollagen (vor allem Typ I und III) und damit eine myokardiale Fibrose (Aragno M *et al.* 2007). Diese Fibrosierung, als Antwort auf die kardiale Dysfunktion (reaktive Fibrose), führt zu Nekrosen der minderversorgten Myozyten. Das nekrotische Material wird wiederum durch Fibrose ersetzt (reperative Fibrose). Diese Umbauprozesse der extrazellulären Matrix verursachen eine Abnahme der LV Compliance (Mizushige K *et al.* 2000).

Zudem werden durch die Hyperglykämie vermehrt reaktive Sauerstoffspezies (ROS) gebildet. Diese und andere Sauerstoffradikale wirken direkt zytotoxisch bzw. über den Nuklearfaktor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) pro-inflammatorisch (Berliner JA *et al.* 1995). Darüber hinaus inhibieren sie die Freisetzung von Nitric oxide (NO) (García-Cardeña G *et al.* 1996, Huang A *et al.* 1999). Die Folge der verminderten Bereitstellung von NO ist eine verminderte diastolische Relaxation sowie eine verminderte Myokardwanddehnungsfähigkeit (Paulus WJ 2001, Tschöpe C *et al.* 2005) und eine vermehrte Infiltration von pro-inflammatorischen Zellen wie Leukozyten und Monozyten (Roesen P *et al.* 2001). Durch diese Entzündungsmediatoren werden andererseits vermehrt Fibroblasten zur Kollagensynthese stimuliert (Brilla CG 1994, Spector KS 1998).

### **1.3. Die diabetische Dyslipidämie**

#### **1.3.1 Die Definition der diabetischen Dyslipidämie**

Der DM ist auch assoziiert mit einer diabetischen Dyslipidämie, welche durch eine Erhöhung der Low-density Lipoproteine (LDL), der Very low-density Lipoproteine (VLDL), der Intermediär-density Lipoproteine (IDL), der Triglyceride (TG), des

Gesamtcholesterins sowie durch eine Erniedrigung der High-density Lipoproteine (HDL) gekennzeichnet ist (Syv anne M und Taskinen MR 1997).

### 1.3.2 Die Lipoproteine

Lipoproteine sind aufgebaut aus Proteinen, Apolipoproteinen (Apo) und Lipiden, hierzu gehören Cholesterine (C), Phospholipide (PL) und TG. Sie sind Für den Transport von Lipiden wie C, PL, TG und Cholesterinester (CE) zuständig. Nach der Dichte unterscheidet man zwischen 5 Lipoprotein Klassen. Chylomikrone, VLDL, IDL, LDL und HDL (Fredrickson DS *et al.* 1967). Des Weiteren ist eine Trennung aufgrund der unterschiedlichen Mobilität in der Elektrophorese möglich (siehe Tabelle 1) (Neubeck W *et al.* 1977).

**Tabelle 1: Übersicht über die Lipoproteinklassen**

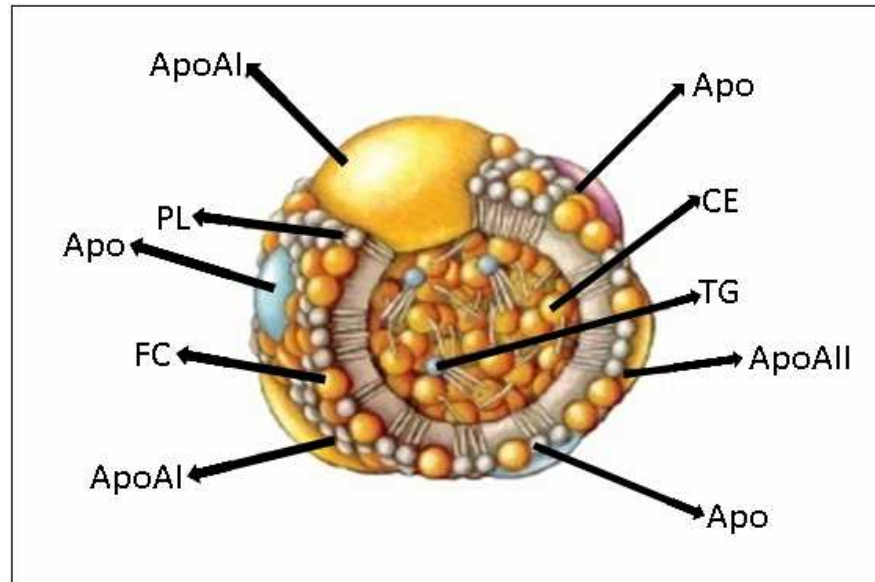
Übersicht über die Lipoproteine: Very low-density Lipoprotein (VLDL), Intermediär-density Lipoprotein (IDL), Low-density Lipoprotein (LDL), High-density Lipoprotein (HDL), Cholesterinester (CE), Triglyceride (TG), Phospholipide (PL), modifiziert nach Kostner und März, 2001.

Lipoproteine	Dichte (g/ml)	Elektrophorese	Durchmesser (nm)	TG (%)	CE (%)	PL (%)
<b>Chylomikrone</b>	0.95	Keine Mobilität	75-1200	80-95	2-7	3-9
<b>VLDL</b>	0.95 -1.006	prä-Beta	30-80	55-80	5-15	10-20
<b>IDL</b>	1.006-1.019	prä-Beta	25-35	20-50	20-40	15-25
<b>LDL</b>	1.019-1.063	Beta	18-25	5-15	40-50	20-25
<b>HDL<sub>2</sub></b>	1.063-1.125	Alpha	9-12	2-5	15-25	25-30
<b>HDL<sub>3</sub></b>	1.125-1.210	Alpha	5-9	5-10	10-20	25-30

### 1.3.3. Das High-density Lipoprotein

Die HDL (Abbildung 1) sind eine heterogene Gruppe von Lipoproteinen mit variabler Zusammensetzung. Sie besitzen eine Dichte von 1.063-1.21 g/ml und eine Größe von etwa 70-100 nm (Nofer JR *et al.* 2002). HDL kann mittels Ultrazentrifugation wiederum in die Subtypen HDL<sub>1</sub>, HDL<sub>2</sub> und HDL<sub>3</sub> unterteilt werden (Havel RJ *et al.* 1955). Die lipidreichen sphärischen HDL-Partikel HDL<sub>2</sub> und HDL<sub>3</sub> sind die zwei Hauptfraktionen des HDL, daneben gibt es noch das lipidarme diskoide HDL-Partikel, das sogenannte prä-HDL. Die Vorstufe von HDL, das prä-HDL sowie HDL<sub>3</sub> werden auf verschiedene Wege bereitgestellt: 1) Hepatozyten aber auch Enterozyten bilden Apolipoprotein AI (ApoAI) und prä-HDL, welches sie als naszierendes HDL in den Blutkreislauf abgeben (Danielsen EM *et al.* 1993). 2) Bei der Lipolyse von VLDL und Chylomikrone durch

Lipoproteinlipase (LPL) entsteht prä-HDL (Musliner TA *et al.* 1991). 3) Cholesteryl-ester-transfer-protein (CETP) (Liang HQ *et al.* 1994) und Phospholipid-transfer-protein (PLTP) (Jiang X *et al.* 1996) wandeln HDL<sub>2</sub> in HDL<sub>3</sub> und prä-HDL um.



**Abbildung 1: Der Aufbau des High-density Lipoprotein**

Darstellung des High-density Lipoprotein (HDL), Phospholipid (PL), freies Cholesterin (FC), Cholesterinester (CE), Triglyceride (TG) und Apolipoprotein (Apo) mit den Untergruppen Apolipoprotein AI (ApoAI) und Apolipoprotein AII (ApoAII), modifiziert nach Forti N *et al.* *Arq Bras Cardiol.* 2006; 87:614–622.

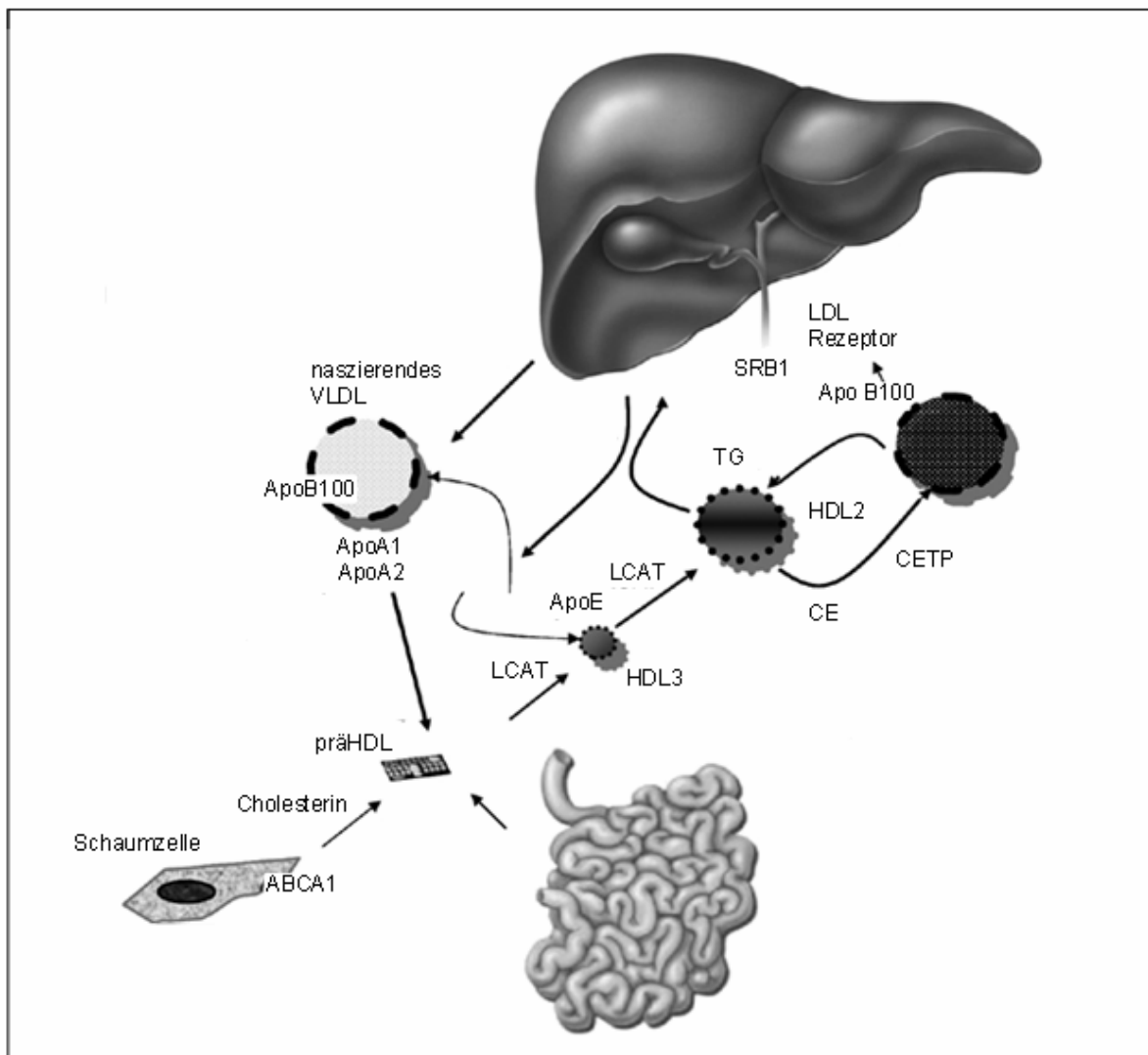
#### 1.3.4. Die Apolipoproteine

Die Apo sind die Proteinanteile der Lipoproteine und sind von großer Bedeutung für die Regulation des Lipoproteinstoffwechsels. So bilden sie unter anderem die hydrophile Oberfläche der Lipoproteine und sorgen so für die Löslichkeit, Stabilisierung und Transport der Lipoproteine. Ferner dienen sie als Ligand für Rezeptoren und als Kofaktor für verschiedene Enzyme (Kostner GM 1977). Die Apo werden in 10 Klassen, die mit A bis J gekennzeichnet werden unterteilt. Die Apo-Klasse A besteht unter anderem aus den Untergruppen ApoAI und II. Für ApoAII zeigten sich kontroverse Effekte wie die Inhibierung von CETP und Lecithin-cholesterol-acyl-transferase (LCAT) und die Stimulation von HL und SRB1 (Wróblewska M 2009). Als wichtigster Bestandteil vom HDL aktiviert das ApoAI die LCAT und dient als Ligand für spezifische HDL Rezeptor Interaktionen (Jonas A 1991). Zudem besitzt ApoAI verschiedene anti-inflammatorische Eigenschaften: 1) es verringert die Oxidation der LDL durch Zellen der Arterienwand (Navab M *et al.* 2000), 2) es hemmt die Bildung von Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) und Tumor Nekrose Faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) durch Hemmung der Kontakt vermittelten Aktivierung von Monozyten durch Lymphozyten (Hyka N *et al.* 2001) und 3) es geht mit

einer gesteigerten Aktivität von Paraoxonase-I und Platelet-activating factor acetylhydrolase einher. Dieses konnte auch an humanen ApoA1 (hApoA1) exprimierenden transgenen Mäusen gezeigt werden (De Geest B *et al.* 2000).

### 1.3.5. Der reverse Cholesterol Transport

Mit Ausnahme der Leber können die übrigen Zellen das C nicht abbauen, nur einige Drüsen sind in der Lage durch Bildung von Hormonen das C zu katabolisieren (Schmitz G *et al.* 1986). Daher muss das C von der Peripherie zurück zur Leber transportiert werden. Diesen Rücktransport bezeichnet man als reversen Cholesterin Transport (RCT) (Abbildung 2). Dieser ist ein komplexer Vorgang bei dem das HDL mit ApoA1 eine bedeutende Rolle spielt. Das HDL<sub>3</sub> bzw. prä-HDL nimmt C aus den peripheren Zellen auf. Der Transport des C und der PL durch die Zellmembran geschieht größtenteils durch aktiven Transport über den Adenosintriphosphat-binding-cassette-transporter A1 (ABCA1) (Schmitz G *et al.* 2000). Nur ein kleiner Teil gelangt passiv durch Diffusion durch die Zellmembran. Danach werden diese vom ApoA1 bzw. prä-HDL aufgenommen, es entstehen HDL-ähnliche Partikel (Asztalos B *et al.* 1997). Die LCAT katalysiert die Veresterung der freien Cholesterine (FC), die CE wandern in den Kern, dies bewirkt die Ausbildung sphärischer Partikel, so dass HDL<sub>3</sub> entsteht (Rye KA *et al.* 1999). Das CETP wiederum tauscht CE gegen TG und PL mit VLDL aus. Dadurch wird der Gradient zwischen Zellinnerem und dem HDL weiter aufrecht gehalten, dadurch kann HDL weiter C aufnehmen, welches wiederum von LCAT verestert wird. Die zunehmende Veresterung und weitere Prozesse wie die PLTP vermittelte Fusion mit weiteren HDL<sub>3</sub> Partikeln sorgen für die Entstehung des HDL<sub>2</sub> (Lusa S *et al.* 1996). Das so entstandene HDL gelangt über die Blutbahn zur Leber. Die Aufnahme des C durch die Hepatozyten geschieht auf verschiedene Arten (Curtiss LK und Boisvert WA 2000). So können die Hepatozyten über ApoE- und ApoA1-Rezeptoren das HDL komplett aufnehmen. Auch eine selektive Aufnahme des C vom HDL über SRB1 ist möglich, dabei entsteht aus dem HDL<sub>2</sub> wieder HDL<sub>3</sub>. Eine weitere Möglichkeit ist die Übertragung von CE vom HDL<sub>2</sub> auf ApoB haltige Lipoproteine (VLDL, IDL und LDL) durch CETP, diese werden dann über den LDL-Rezeptorweg aufgenommen. Auch hierbei entsteht HDL<sub>3</sub> sowie prä-HDL. Das nun in die Leber gelangte C wird teilweise zu Gallensäuren oxidiert und teilweise direkt mit der Galle ausgeschieden (Simons K und Ikonen E 2000). Ein Teil des C gelangt via enterohepatischen Kreislauf wieder in den Körper.



**Abbildung 2: Vereinfachte Darstellung des reversen Cholesterol Transportes**

Dargestellt ist der reverse Cholesterol Transport. Cholesteryl-ester-transfer-protein (CETP), Cholesterinester (CE), Lecithin-cholesterol-acyl-transferase (LCAT), Phospholipid-transfer-protein (PLTP), Scavenger receptor typ B1 (SRB1), Triglyceride (TG), Very low-density Lipoprotein (VLDL), Low-density Lipoprotein (LDL), High-density Lipoprotein (HDL), Apolipoprotein (Apo), modifiziert nach [www.nature.com](http://www.nature.com).

### 1.3.6. Die pleiotropen Effekte des High-density Lipoproteins

Die Regulation der Cholesterinhomöostase, welche durch den bereits dargestellten RCT gekennzeichnet ist, stellt nur einen Aspekt der anti-atherogenen Effekte des HDL dar. Darüber hinaus zeigt HDL eine Reihe weiterer potentiell anti-atherogener Eigenschaften, welche unabhängig vom RCT sind. Sie werden als pleiotrope Effekte bezeichnet. So nimmt HDL unter anderem Einfluss auf inflammatorische Prozesse, indem es in Endothelzellen die Expression von Zytokinen und Adhäsionsmolekülen, wie interzelluläres Adhäsionsmolekül (ICAM) und vaskuläres Adhäsionsmolekül (VCAM), hemmt (Cockerill GW *et al.* 2001). Zudem aktiviert HDL mittels der Proteinkinase B (Akt) über den SRB1 Rezeptor die endotheliale Nitric oxide synthase (eNOS) und führt



so zu einer gesteigerten Expression von NO (Mineo C *et al.* 2003). Dieses wiederum inhibiert die Oxidation von LDL (Yuhanna IS *et al.* 2001) und führt zu einer NO vermittelten Vasodilatation (Nofer JR *et al.* 2004). Zudem verringert HDL die endotheliale Dysfunktion (ED) durch anti-proliferative und anti-apoptische Eigenschaften (Nofer JR *et al.* 2004). Durch diese und weitere Interaktionen auf molekularer Ebene, ist das HDL in der Lage die Inzidenz von kardiovaskulären Erkrankungen zu reduzieren. Diese inverse Beziehung wurde in vielen epidemiologischen Studien nachgewiesen (Birjmohun RS *et al.* 2005).

## **1.4. Der Einfluss des High-density Lipoproteins auf Mortalität und Morbidität**

### **1.4.1. Epidemiologische Studien**

Zahlreiche epidemiologische Studien wurden durchgeführt um Risikofaktoren für die KHK zu evaluieren. In der Framingham Studie, die seit 1948 in der amerikanischen Kleinstadt Framingham, Massachusetts durchgeführt wird, wurden über Jahrzehnte prospektiv mehr als 5.000 Männer und Frauen (von 30 bis 62 Jahren) untersucht. Dabei wurde eine Reihe von Risikofaktoren wie männliches Geschlecht, hohes Lebensalter, KHK in der Familienanamnese, Nikotinabusus, Übergewicht, körperliche Inaktivität, DM, Hypercholesterinämie und niedrige HDL-C Konzentrationen identifiziert (Kannel WB 1971, Castelli WP 1990). Dabei zeigten Männer mit einem HDL von unter 35 mg/dl eine um 1.9-fach erhöhte kardiovaskuläre Mortalität gegenüber der Studienpopulation mit einem HDL von mindestens 54 mg/dl. Frauen mit einem HDL von unter 45 mg/dl hatten ein um 1.5-fach erhöhtes Risiko gegenüber denen mit einem HDL von über 69 mg/dl (Wilson PW *et al.* 1988). Demnach stellt HDL einen protektiven Faktor dar (Gordon DJ *et al.* 1989). Menschen mit einem HDL-C über 60 mg/dl zeigen ein um die Hälfte reduziertes KHK Risiko gegenüber denen mit einem HDL-C unter 40 mg/dl (Castelli WP *et al.* 1986). Ein Anstieg des HDL-C um 1 mg/dl führt zu einem signifikanten Rückgang des KHK Risikos von 2 % (Gordon DJ *et al.* 1989). Weitere Studien wiesen nach, dass diese inverse Korrelation zwischen HDL-C und KHK unabhängig von anderen Risikofaktoren ist (Gordon T *et al.* 1981, Kannel WB und Wilson PW 1992). Eine andere Studie zeigte, dass HDL den höchsten prädiktiven Wert im Vergleich zu anderen Risikofaktoren im Hinblick auf das KHK Risiko hat (Livshits G *et al.* 1989). So zeigte die Prospektive Cardiovasculäre Münster Studie (PROCAM), über einen Zeitraum von 4 Jahren mit über 18.000 teilnehmenden Personen eine Inzidenz des akuten Myokardinfarktes bei Hypertonie von 14/100.000, bei DM von 15/100.000 und bei

Hyperlipidämie von 96/100.000 (Assmann G *et al.* 1997, Assmann G *et al.* 1998). In der MRFIT Studie mit über 350.000 männlichen Amerikanern zwischen 35 und 57 Jahren, die 12 Jahre lang beobachtet wurden, konnte gezeigt werden, dass das relative Risiko an einer Herz-Kreislauf-erkrankung zu versterben, kontinuierlich linear mit dem Gesamtcholesterin zunimmt. (Stamler J *et al.* 1986). Bei der Lipid Research Clinics Prevalence Mortality Follow-up Study (LRCF) war ebenfalls der kardiovaskuläre Tod der Endpunkt der Studie (Gordon DJ *et al.* 1989). Dabei wurden etwa 4.400 Männer und Frauen im Alter von 40 bis 64 Jahren von 1972 bis 1976 untersucht und bis 1995 weiter verfolgt. Ein Anstieg des HDL-C um 1 mg/dl war gleichbedeutend mit einer Risikoreduktion von 3.7 % für Männer und 4.7 % für Frauen (Gordon DJ *et al.* 1989, Cui Y *et al.* 2001). Darüber hinaus konnte die Kuopio Ischaemic Heart Disease Risk Factor Study (KIHD) zeigen, dass nicht nur HDL-C sondern auch der Subtyp HDL<sub>2</sub> mit dem Risiko für einen akuten Myokardinfarkt korreliert. HDL-C unter 42 mg/dl ist assoziiert mit einer 3.3-fachen und HDL<sub>2</sub>-C unter 25 mg/dl mit einer 4-fachen Risikoerhöhung (Lehto S *et al.* 1993). So zeigen alle diese Studien eine inverse Korrelation zwischen HDL und der kardiovaskulären Morbidität und Mortalität.

#### 1.4.2. Präventions- und Interventionsstudien

Nachdem epidemiologische Studien die Bedeutung von HDL bezüglich der Risikostratifizierung unterstrichen haben, konnten Interventionsstudien einen weiteren Zusammenhang zwischen HDL Spiegel und kardiovaskulärem Risiko zeigen. So konnten durch Interventionsstudien mit HDL erhöhenden Medikamenten eine Abnahme der kardiovaskulären Ereignisse nachgewiesen werden. Bereits in der ersten Interventionsstudie, der Coronary Drug Project (CDP) Studie, an 8.341 Patienten mit stattgehabtem Myokardinfarkt wurde gezeigt, dass die Gabe von Niacin vs. Placebo zu einer Reduktion der Mortalität von 11 % führt (Canner PL *et al.* 1986). In der Arterial Biology for the Investigation of the Treatment Effects of Reducing Cholesterol (ARBITER)-2 Studie an 167 Patienten führte die zusätzliche Gabe von Niacin zu einer laufenden Statintherapie zu einer Erhöhung der HDL-C Konzentration um 21 % vs. der Placebo Gruppe, welche nur mit einem Statin behandelt wurden. Im Gegensatz zur Placebo Gruppe, die eine signifikante Progression der Intima Media Dicke der Karotis nach 12 Monaten zeigte, war bei der Niacin Gruppe keine signifikante Zunahme der Progression gesehen worden (Taylor AJ *et al.* 2004). In der Helsinki Heart Study, welche an 4.000 Männern durchgeführt wurde, zeigte die Behandlung mit dem Fibrat

Gemfibrozil eine Reduzierung des LDL-C um 15 % und eine Steigerung des HDL-C um 14 %. Dieses war mit einer 34 %-igen Abnahme von tödlichen und nicht tödlichen Herzinfarkten assoziiert (Mänttari M *et al.* 1990). In der Veterans Affairs High-density Lipoprotein Intervention Trial Studie (VA-HIT) wurden Patienten mit normaler LDL-C Konzentration aber erniedrigtem HDL-C ebenfalls mit Gemfibrozil behandelt. Auch hierbei wurde eine signifikante Abnahme von kardiovaskulären Ereignissen gesehen (Backes JM *et al.* 2007). Die Bezafibrate Infarction Prevention (BIP) Studie zeigte eine 12 %-ige Erhöhung des HDL-C und eine Senkung des LDL-C um 5 % durch Bezafibrate, jedoch keine signifikante Senkung von Myokardinfarkten und Tod in einem Zeitraum von 6.25 Jahren (The Bezafibrate Infarction Prevention study, 2000). Die Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S Studie) wurde an 4.444 Patienten mit abgelaufenem akutem Myokardinfarkt oder Angina pectoris Beschwerden durchgeführt die Cholesterinwerte zwischen 210-310 mg/dl aufwiesen. Nach durchschnittlich 5.4 Jahren der Behandlung mit Simvastatin 20-40 mg/Tag vs. Placebo sah man eine Senkung der KHK Mortalität um 42 % und der Gesamtmortalität um 30 % (Pedersen TR *et al.* 2000). Zu ähnlichen Ergebnissen kam auch die Long Term Intervention with Pravastatin in Ischaemic Disease Studie (LIPID). Hier bekamen über 9.000 Patienten mit abgelaufenem akutem Myokardinfarkt oder Angina pectoris Beschwerden und einem mittleren Gesamtcholesterinwert von 218 mg/dl, 40 mg Pravastatin bzw. Placebo. Dies führte zu einer Senkung der Herzinfarktrate um 28 % (Tonkin AM *et al.* 2000). In der Air Force Texas Coronary Atherosclerosis Prevention Study (AFCAPS) wurden über 6.000 Männer und Frauen mit normalen Gesamtcholesterinwerten aber mit niedrigen HDL-C Werten (<45 mg/dl für Männer bzw. <47 mg/dl für Frauen), mit 20-40 mg Lovastatin bzw. Placebo behandelt. Die Verumgruppe zeigte eine signifikante Verringerung von kardiovaskulären Ereignissen (instabile AP, akuter Myokardinfarkt oder plötzlicher Tod) (Downs JR *et al.* 2001). In einer Metaanalyse an 32.258 Patienten mit einer Dyslipidämie konnten Barter *et al.* (Barter PJ *et al.* 2009) zeigen, dass durch die Statine gezeigten Senkungen der kardiovaskulären Ereignisse auf die Steigerung des HDL zurückzuführen sind.

Die Investigation of Lipid Level Management to Understand its IMPact IN Atherosclerotic Events (ILLUMINATE) Studie konnte nachweisen, dass der CETP Inhibitor, Torcetrapib plus Atorvastatin das LDL-C um 25 % senkt sowie das HDL-C um 72 % steigert. Dieses war jedoch verbunden mit einer signifikanten Steigerung kardiovaskulärer Ereignisse und der Mortalität (Barter PJ *et al.* 2007). Eine mögliche Erklärung könnte die

Steigerung des Aldosteron Spiegels und damit des Blutdruckes sein (Nissen SE *et al.* 2007). Für die anderen CETP Inhibitoren, Dalcetrapib und Anacetrapib konnte kein Einfluss auf den Blutdruck oder Mortalität festgestellt werden. Weitere Untersuchungen zu dieser Substanzgruppe laufen noch (Schwartz GG *et al.* 2009).

### **1.4.3. Medikamentöse Strategien zur Beeinflussung des High-density Lipoproteins**

Seitdem die epidemiologischen Studien, die Korrelation zwischen den Lipoproteinen und kardiovaskulären Erkrankungen aufgezeigt haben, wurden zahlreiche Medikamente entwickelt, um die Morbidität und Mortalität zu senken. Als eines der ersten Medikamente standen Nikotinsäurederivate zur Verfügung. Diese hemmen die periphere Lipolyse und reduzieren somit die freien Fettsäuren, dadurch werden weniger TG, VLDL und LDL synthetisiert (Kamanna VS und Kashyap ML 2007). Über eine Verminderung des HDL Katabolismus (Chapman MJ *et al.* 2004) und gesteigerte Verfügbarkeit von ApoAI (Jin FY *et al.* 1996), wird die Konzentration des HDL-C erhöht. Als Nebenwirkung können diese Medikamente eine Flush-Symptomatik auslösen (Gotto AM Jr 2001). Als nächstes kamen die Fibrinsäurederivate (Fibrate) auf den Markt. Diese aktivieren als Liganden den Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptor- $\alpha$  (Fruchart JC 2001) und darüber die Lipolyse von VLDL und die Transkription von ApoAI. Zudem induzieren Fibrate die Expression von ABCA1. Dieser transportiert C an die Zelloberfläche, welcher zusammen mit ApoAI prä-HDL, den Vorläufer von HDL, bildet (Asztalos B *et al.* 1997, Birjmohun RS *et al.* 2005). Die Vertreter sind unter anderem Gemfibrozil, Clofibrat, Bezafibrat und Fenofibrat. Als Nebenwirkung kann bei dieser Medikamentengruppe unter anderem ein Anstieg der Transaminasen beobachtet werden. Später kamen HMG-CoA-Reduktasehemmer (CSE-Hemmer, Statine) hinzu. Sie sind in der Lage, dass HDL-C moderat um 5-15 % zu erhöhen (Stokic E und Marinkov J 2007). Die zugrunde liegenden Mechanismen sind bisher nicht vollkommen aufgeklärt. Von Statinen weiß man, dass sie CETP inhibieren und dadurch den Transport vom CE vom HDL zu VLDL, IDL und LDL vermindern (Kassai A *et al.* 2007). Zudem induzieren sie ebenfalls die Expression von ABCA1 (Tamehiro N *et al.* 2007). Auch konnte eine Erhöhung der ApoAI Konzentration durch Statine gezeigt werden (Barter PJ *et al.* 2009). Die gängigsten Präparate sind Simvastatin, Fluvastatin, Lovastatin, Atorvastatin und Pravastatin. Als schwerwiegende Komplikation sind

Myopathien zu nennen. Eine Übersicht über die Effekte der genannten Medikamentengruppen zeigt die Tabelle 2.

**Tabelle 2: Effekte einzelner ausgesuchter Medikamente auf die Lipidfraktionen**

Dargestellt sind die prozentuale Veränderungen von High-density Lipoprotein Cholesterin (HDL-C), Low-density Lipoprotein Cholesterin (LDL-C) und Triglyceride (TG) unter medikamentöser Therapie bei Menschen (Quelle: Karow/Lang: Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, 2002, Köln, 2.24:251-259).

	HDL-C Erhöhung	LDL-C Reduzierung	TG Reduzierung
Nikotinsäure	10-20 %	20-30 %	20-40 %
Fibrate	5-20 %	10-20 %	20-40 %
Statine	2-10 %	20-30 %	10-20 %

Eine weitere Möglichkeit ist das Eingreifen in die Cholesterinbiosynthese mittels CETP-Inhibitoren wie z.B. mit Torcetrapib. Diese verhindern den CETP vermittelten Transfer von C vom HDL zum VLDL und LDL und damit den HDL Katabolismus (Rashid S *et al.* 2002). Die Liver-X-Rezeptor Agonisten T0901317 und GW3965 wirken als synthetische Liganden. Nach der Aktivierung vom Liver-X-Rezeptor bildet dieser mit dem Retinoid-X-Rezeptor einen heterodimeren Komplex. Dieser ist als Transkriptionsfaktor in der Lage Promotorregionen von Zielgenen zu aktivieren, die für den Cholesterintransport wichtig sind, so wie z.B. vom ABCA1 aber auch vom Sterol regulatory element binding protein 1. Dadurch wird vermindert C aus dem Darm resorbiert und die HDL Konzentration erhöht. Jedoch steigt auch die Konzentration von TG (Miao B *et al.* 2004). Rekonstituiertes HDL (CSL-111) besteht aus ApoAI, welches aus gereinigtem HDL-Plasma gewonnen wird. Anschließend wird es derart rekonstituiert, dass es dem humanen HDL gleicht. Durch die intravenöse Applikation kann der HDL Spiegel um 50-85 mg/dl erhöht werden (Cockerill GW *et al.* 2001, Spieker LE *et al.* 2002). Eine weitere Möglichkeit ist die Erhöhung der Effizienz des HDL durch den Einsatz von synthetischem HDL mit rekombinanten ApoAI-Milano (ETC-216) (Marchesi M und Sirtosi CR 2006). Rekombinante Proteine werden mit Hilfe von Vektoren hergestellt, die meist in Bakterien transformiert werden, um dann durch Klonierung vermehrt zu werden. Dazu wird rekombinantes ApoAI-Milano benutzt. Benannt nach dem Dorf dessen Bewohner niedrige HDL Spiegel von 10–30 mg/dl aufweisen, jedoch ein relativ niedriges Arteriosklerose Risiko haben (Sirtori CR *et al.* 2001). Verantwortlich dafür ist eine Mutation des ApoAI Gens, welches das HDL besonders effektiv macht (Weisgraber KH *et al.* 1983). Für die Therapie wird intravenös rekombinantes HDL

verabreicht. Phase II Versuche an Patienten mit akutem Koronarsyndrom zeigten einen signifikanten Rückgang von Atheromen (Calabresi L *et al.* 2006).

Jedoch ist die Steigerung der HDL-C Konzentration mit den pharmakologischen Mitteln begrenzt (Aldridge MA und Ito MK 2001). Es werden neue Methoden zur Erhöhung des HDL-C Spiegels untersucht. In der aktuellen Forschung zeigt sich der Gentransfer als probates Mittel zur Steigerung der Synthese vom Genprodukt. Hierbei können höhere Konzentrationen als mit pharmakologischen Mitteln erreicht werden. In der vorliegenden Arbeit wurde zur Erhöhung des HDL-C ein Gentransfer mit einem E<sub>1</sub>E<sub>3</sub>E<sub>4</sub>-deletiertem adenoviralen (Ad) Vektor durchgeführt, welcher das humane Apolipoprotein AI (hApoAI) beinhaltet. Van Linthout *et al.* (Van Linthout S *et al.* 2002) konnten zeigen, dass der Gentransfer mit diesem Ad Vektor zu einer persistierenden Expression vom hApoAI für 6 Monate im Streptozotocin (STZ) Mausmodell führt.

#### **1.4.4. Der adenovirale Apolipoprotein AI Gentransfer**

##### **1.4.4.1. Die Gründe für einen humanen Apolipoprotein AI Gentransfer**

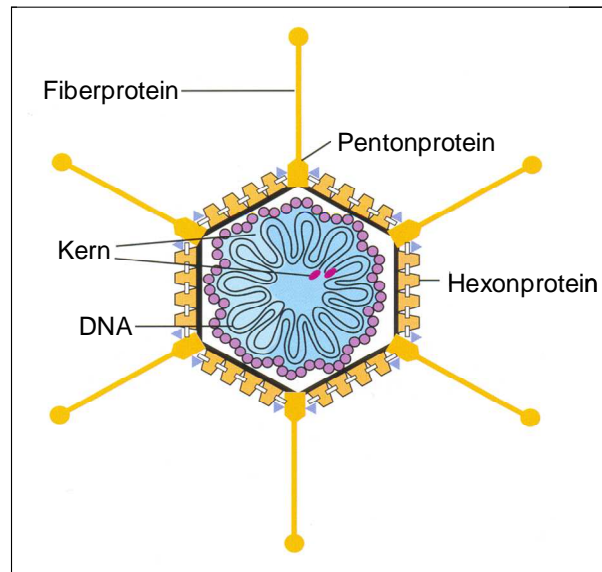
ApoAI ist der Hauptbestandteil von HDL und stellt ca. 70 % der Gesamtproteinmenge des HDL dar. Es existiert eine direkte Korrelation zwischen dem ApoAI Plasma Level und der HDL Plasmakonzentration. ApoAI ist in den RCT involviert, durch seine Fähigkeit 1) nach Interaktion mit einem HDL Rezeptor, über eine Signalkaskade mit Hilfe des ABCA1-Transporters C aus der Zelle zu fördern (Asztalos B *et al.* 1997). 2) LCAT zu aktivieren (Goyal J *et al.* 1997) und 3) durch Unterstützung der Bindung von HDL zum SRB1 Rezeptor und die anschließende selektive Aufnahme von CE in Leber und endokrine Organe (Thuahnai ST *et al.* 2001). Weiterhin ist die Benutzung von hApoAI beim Gentransfer begründet durch 1) die inverse Korrelation zwischen HDL-C und ischämischer koronarer Herzerkrankung in epidemiologischen Studien (Castelli WP *et al.* 1986, Gordon DJ *et al.* 1989, Livshits G *et al.* 1989) 2) dem Benefit von erhöhtem HDL-C in Interventionsstudien (Tonkin AM *et al.* 2000, Backes JM *et al.* 2007) und 3) die protektiven Eigenschaften von HDL-C bei der Arteriosklerose, in Diät-induzierter und genetisch determinierter Arteriosklerose im Tiermodell (Plump AS *et al.* 1994, Benoit P *et al.* 1999).

#### **1.4.4.2. Die Gründe für die Verwendung eines adenoviralen Gentransfers**

Der Gentransfer beruht auf dem Einschleusen von genetischem Material in Zellen. Zum Einschleusen der fremden Desoxyribonukleinsäure (DNA) bedient man sich nicht-viraler oder viraler Vektoren. Die nicht-viralen Vektoren beinhalten physikalische (Mikroinjektion, Partikelbombardierung, Elektroporation) oder chemische (kationische Lipide, Liposomen, Bakteriophage, Rezeptor-vermittelt) Methoden. (Wagner E *et al.* 1990, Williams RS *et al.* 1991, Potter H 1993). Der Vorteil dieser Methoden ist ihre Sicherheit. Da keine unerwünschten viralen Gene mittransferiert werden, muss nicht mit einer immunologischen Antwort oder Entartung gerechnet werden. Der fehlende Einbau der transferierten Gene ins Wirtsgenom führt zu deren Abbau, auch werden sie nicht an die Tochterzellen weitergegeben. Die Nachteile sind die zeitliche Limitierung der Genexpression und die nur sehr geringe Effizienz (Morgan RA und Anderson WF 1993). Es gibt verschiedene virale Vektoren die zum Gentransfer benutzt werden, jedoch haben sich vor allem die retroviralen, lentiviralen, adenoviralen und adeno-assoziierten viralen Vektoren durchgesetzt (Ritter T *et al.* 2002, Mohr L und Geissler M 2002, Carter BJ 2005). Die Auswahl des richtigen Vektors richtet sich nach unterschiedlichen Kriterien, wie z.B. der Effizienz, der Transgenstabilität, der Aufnahmefähigkeit fremder DNA, der Pathogenität und dem Zielzelltropismus.

#### **1.4.4.3. Die adenovirale Biologie und Entwicklung der adenoviralen Vektoren**

Adenoviren (Abbildung 3) sind doppelsträngige DNA-Viren von etwa 100 nm im Durchmesser. Sie sind hüllenlos und besitzen ein ikosaedrisches Kapsid. Adenoviren wurden zuerst im adenoiden Gewebe gefunden (Rowe WP *et al.* 1953). Neben Infektionen des Respirationstraktes, verursachen sie unter anderem Magen-Darm-Infektionen, Konjunktividen und Hepatitiden, wobei die Erkrankungen meist mild verlaufen (Galbreath EJ *et al.* 1994, Chirmule N *et al.* 1999, Chuang YY *et al.* 2003). Insgesamt sind von den humanpathogenen Adenoviren 6 Subgruppen (A-F) und 51 Subtypen identifiziert. Vor allem werden die Subtypen 2 und 5 der Subgruppe C als adenovirale Vektoren verwendet, da sie am besten molekularbiologisch charakterisiert sind (Ragot T *et al.* 1998). Die Adenoviren 2 und 5 rufen keine Mutationen hervor und sind daher nicht onkogen (Douglas JT und Curiel DT 1997). Sie infizieren sich teilende, sowie sich nicht teilende Zellen (Ragot T *et al.* 1998) und replizieren sich im Zellkern der Wirtszellen (Akli S *et al.* 1993). Weitere Vorteile sind eine hohe Transduktionseffizienz und einfache Anzucht (Crystal RG 1995).



**Abbildung 3: Basaler Aufbau eines Adenovirus**

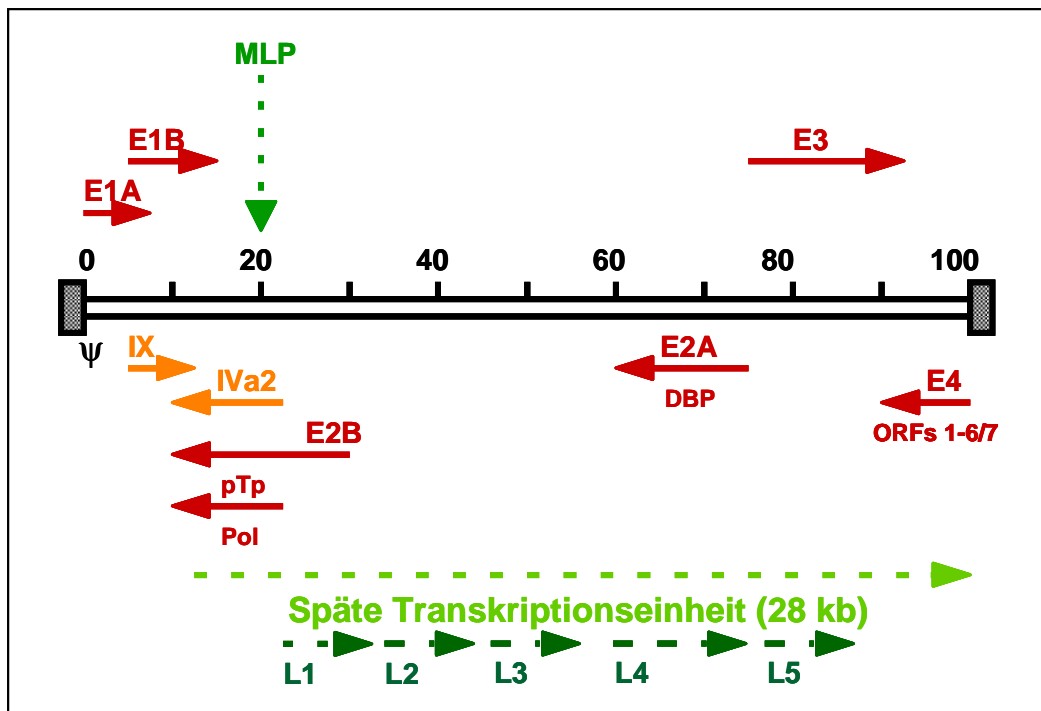
Die Darstellung ist modifiziert nach Deshka Foster - Winter 2008, Department of Human Biology, Stanford University, Desoxyribonucleic acid (DNA).

Der virale Zyklus beginnt mit der Bindung der Fiberproteine der Pentonen an den Coxsackievirus und Adenovirus Rezeptor (Bergelson JM 1999). Durch rezeptorvermittelte Endozytose gelangt der Adenovirus in die Zelle (Wickham TJ *et al.* 1993) und dringt mit Hilfe seines Kapsids in den Zellkern ein (Trotman LC *et al.* 2001). Anschließend bindet das sogenannte terminale Protein des Adenovirus, kovalent an das 5'-Ende des adenoviralen Genoms und vermittelt die Verbindung zum Zellkern (Schaack J *et al.* 1990), wo die virale Transkription und Replikation startet. Das virale Genom ist eine lineare, doppelsträngige DNA von ca. 36 kb. Das 5'-Ende enthält repetitive Sequenzen, die so genannten inverted terminal repeats (ITR's), sie dienen als Ursprung der Replikation. Zudem enthalten sie die Verpackungssequenz ( $\psi$ ), sie ist für die Verpackung der nachkommenden Genome erforderlich (Yeh P und Perricaudet M 1997). Die Expression der adenoviralen Gene lässt sich in eine frühe, eine mittlere und eine späte Phase, abhängig vom Beginn der DNA-Replikation, einteilen (Abbildung 4). Die frühen Gene sind in vier Regionen des adenoviralen Genoms unterteilt ( $E_1$  bis  $E_4$ ). Sie kodieren essentielle regulatorische Proteine, die die Replikation der viralen DNA induzieren und die Funktionen der Zelle modulieren. Dadurch ermöglichen sie die Replikation der adenoviralen DNA und die Transkription und Translation der späten Gene.  $E_{1A}$  und  $E_{1B}$  kodieren Transkriptionsfaktoren, die Transkription der anderen frühen Gene in der Wirtszelle aktivieren (Berk AJ *et al.* 1979, Nevins JR 1981). Die Abhängigkeit der viralen Genexpression und letztlich die Replikation des viralen



Genoms der E<sub>1</sub>-Genprodukte ist die Grundlage für den Bau von Vektoren, in denen die endogene E<sub>1</sub>-Region, durch ein fremdes Gen ersetzt wird (E<sub>1</sub>-deletierter adenoviraler Vektor) (Yeh P und Perricaudet M 1997, Russell WC 2000). Durch die Deletion der für die Replikation essentiellen E<sub>1</sub> Region entstehen Vektoren, die zur einmaligen Infektion in der Lage sind, ohne die Fähigkeit der Vermehrung (Argyle DJ 1999, Somia NS und Verma IM 2000). E<sub>2A</sub> und E<sub>2B</sub> kodieren Proteine, die für die Replikation der viralen DNA benötigt werden und für die anschließende Transkription der späten Gene. Die E<sub>3</sub>-Gene sind an der Modulation der Immunantwort des Wirtes beteiligt. Die Genprodukte der E<sub>4</sub>-Kassette, die sogenannten open reading frame (ORF) 1-6/7, regulieren die Synthese der viralen Proteine (Goodrum FD und Ornelles DA 1999, Russel WC 2000, Weigel S und Dobbstein M 2000) und unterstützen Funktionen um die virale DNS zu replizieren und die Proteinsynthese der Wirtszelle auszuschalten (Yew NS *et al.* 1999). Darüber hinaus ist die E<sub>4</sub>-Region an der Auslösung der CD4 T-Zell und B-Zell-Antwort gegen den Adenovirus beteiligt (Chirmule N *et al.* 1998).

Bei den E<sub>1</sub>E<sub>3</sub>E<sub>4</sub>-deletierten adenoviralen Vektoren werden, zusätzlich zu der E<sub>1</sub> Region, die Regionen E<sub>3</sub> und E<sub>4</sub> gelöscht. Die E<sub>3</sub> Region ist für die Replikation nicht notwendig. Durch die Deletion der E<sub>4</sub> Region wird die späte Proteinbiosynthese gestört, die Replikation bleibt aber unverändert (Hitt M *et al.* 1995, Russell WC 2000). Van Linthout *et al.* (Van Linthout S *et al.* 2002) konnten zeigen, dass der hApoAI Gentransfer mit einem E<sub>1</sub>E<sub>3</sub>E<sub>4</sub>-deletierten adenoviralen Vektor assoziiert ist mit einer persistierenden hApoAI Expression für 6 w. Im Gegensatz dazu ist der Gentransfer mit einem E<sub>1</sub> deletierten adenoviralen Vektor nur mit einer transienten Expression assoziiert. Die frühen verzögerten Gene IVa2 und IX werden nach dem Beginn der Virus Replikation in hohem Maße exprimiert und vermitteln die Aktivierung des major late promoter (MLP), der zur Induktion der späten Gene führt. Die späten Gene (L<sub>1</sub> bis L<sub>5</sub>) kodieren die Strukturproteine des Kapsids und des Kerns. Sie werden von einem MLP transkribiert und bilden eine late transcription unit (LTU). Dieses prä-mRNA wird durch Capping (Anhängen einer »Cap«-Struktur am 5´-Ende), Spleißen (Ausschneiden der Introns) und Polyadenylierung (Prozessierung am 3´-Ende) zum mRNA umgewandelt (Chow LT und Broker TR 1978, Akusjärvi G *et al.* 1986).



**Abbildung 4: Vereinfachte Darstellung des adenoviralen Genoms mit den Transkriptionseinheiten**

Das virale Genom ist durchschnittlich 36 kb groß und normalerweise in 100 Einheiten geteilt. Die grauen Boxen repräsentieren die viralen Inverted terminal repeats (ITR), welche für die Replikation notwendig sind. Die Pfeile markieren die Richtung der Transkription. Die frühen Regionen sind mit roten, die verzögert, frühen Regionen sind mit orangen und die späten Regionen sind mit grünen, gestrichelten Pfeilen dargestellt. Die späte Region wird vom Major Late Promoter (MLP) transkribiert. Die nachfolgende posttranskriptionale Reifung führt zu 5 späten Transkriptionskassetten. Verpackungssequenz ( $\psi$ ), Desoxyribonukleinsäure-Bindungs-Protein (DBP), präterminales Protein (pTp), Polymerase (Pol), Open Reading Frame (ORF).

## 2. Fragestellung

Die diabetische Kardiopathie ist gekennzeichnet durch gesteigerten oxidativen Stress, Inflammation, Apoptose, Fibrose und ED, welche zu Funktionseinschränkung des Herzens führt. Das HDL wirkt durch seine pleiotropen Effekte anti-oxidativ, anti-inflammatorisch, anti-apoptotisch, anti-fibrinogen und endothelprotektiv. Folgende Fragen wurden anhand der Experimente überprüft:

- 1) Ist der hApoAI Gentransfer in der Lage den HDL-C Spiegel kontinuierlich zu erhöhen und hat dieser Gentransfer auch einen Einfluss auf die anderen Lipoproteine?
  
- 2) A: Haben die durch den hApoAI Gentransfer erhöhten HDL Spiegel einen pleiotropen Effekt auf die diabetische Kardiopathie?  
B: Sind diese Effekte assoziiert mit einer Funktionsverbesserung der diabetischen Kardiopathie?
  
- 3) Durch welche Signaltransduktionswege und untergeordneten molekularbiologischen Mechanismen kommen diese Effekte zustande?

### 3. Materialien und Methoden

#### 3.1. Materialien

##### 3.1.1. Laborausüstung und Instrumente

Laborausüstung und Instrumente	Hersteller
Acutrend sensor glucometer	Roche, Mannheim, Deutschland
Bio Doc Analyzer	Biometra, Goettingen, Deutschland
Centrifuge, 5415D, 5403	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Computerized densitometry	Biometra, Goettingen, Deutschland
Digital-Camera, Colour Vision Module XC-00P	Donpisha, Japan
DMRD Lichtmikroskop	Leica, Bensheim, Deutschland
Filmkassette	A. Hartenstein, Würzburg, Deutschland
Gefrierer, -80 ° C	Thermo Forma, Marlotta, USA
Inkubator	Heraeus, Osterode, Deutschland
Kanüle Microlance 3	Becton Dickinson, Spanien
Klingen 10050-00	Fine Science Tools, Deutschland
Kodak 5000 RA film processor	Eastman Kodak, New York, USA
Kryostaten Jung CM 3000	Leica, Bensheim, Deutschland
Leitz G20 Mikroskop mit kalibriertem Raster-Okular	Wild Heerburg Instruments, Geneva, Schweiz
Mikroschere 15000-08	Fine Science Tools, Deutschland
Mini Trans-Blot transfer Cell	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Mini-Protean 3 Cell	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Nager-Beatmungsmaschine	Ugo Basile, Comerio, Italien
Pinzette, chirurgisch11028-15	Fine Science Tools, Deutschland
Pipetten	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Plate sealer	Genetix, Christchurch, Dorset, UK
Polypropylene tubes (15 ml and 50 ml)	Greiner Labortechnik GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Power supply	Biometra, Goettingen, Deutschland
Rotations-Mikrotom HM 330	Microm, Heidelberg, Deutschland
Rotor-stator homogenizer (Ultra Turrax)	IKA Analysetechnik, Deutschland
Schere 14074-11	Fine Science Tools, Deutschland

Spektralphotometer	Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland
Thermocycler	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Thermomixer	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Tip-Katheter (2.0 F) system	Millar Instruments, Texas, USA
Ultra-Clear centrifugation tubes	Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland
Vortexer	Beyer GmbH, Düsseldorf, Deutschland
Waage, Sartorius TE 64	Sartorius, Goettingen, Deutschland

### 3.1.2. Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien und Reagenzien	Hersteller
1,1,3,3-Tetraethoxypropan	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
3-Amino-9-Ethylcarbazol	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Aceton 0.2M	Merck, Darmstadt, Deutschland
Acrylamide-Bis solution (29:1)	Serva, Heidelberg, Deutschland
Agarose Elektrophoresis Grade	Gibco, Karlsruhe, Deutschland
Ammoniumpersulfat (APS)	Serva, Heidelberg, Deutschland
Ampicillin (100 mg/ml)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Azocamine G	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
$\beta$ -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Blotting paper, 3 mm	Whatman, Goettingen, Deutschland
Bromophenol blue	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Chloralhydrate	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Chloroformaldehyd	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Complete protease inhibitor cocktail	Roche, Mannheim, Deutschland
Dimethylformamid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Enhanced chemiluminescence films	Amersham, Buckinghamshire, UK
Enhanced chemiluminescence plus Western blotting detection system	Amersham, Buckinghamshire, UK
EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Essigsäure 0.2M	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Ethidium Bromide Solution, 10 mg/ml	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Flüssigstickstoff	Messer-Griesheim, Deutschland

Formalin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Gelatine	Merck, Darmstadt, Deutschland
Glycerol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Glycin	Merck, Darmstadt, Deutschland
Hematoxylin	Merck, Darmstadt, Deutschland
Isopropanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Laminin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Loading Dye x6	Fermentas Inc., MD, USA
Methanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Methylbutan	Merck, Darmstadt, Deutschland
Methyl blue	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Milchpulver	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Natriumbromid	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Ortho-phenylene-diamine	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Peroxidase	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Poly-L-Lysin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Ponceau S red	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Proteinaseinhibitos	Roche, Mannheim, Deutschland
Polyvinylidenfluorid Membran	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Rainbow markers	Amersham, Buckinghamshire, UK
Rotiphorese	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Sodium nitroprusside (SNP)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Streptozotocin (STZ)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Tetramethylethylene diamine (TEMED)	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Tissue-tek O.C.T compound	Tissue Tek, Nussloch, Deutschland
Tris-hydroxymethyl-aminometha (TRIS)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Trizma hydrochloride (Tris·Cl)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Trizol	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Tween 20	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Wasserstoffperoxid 30 %	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

## 3.1.3. Medien und Lösungen

Medien und Lösungen	Zusammensetzung
Agarmedium	12.5 g Luria Broth Base, 500 ml Aqua dest., Autoklavierung, 7.5 g Agarpulver
Ammoniumpersulfat (APS) 10 %	100 mg APS 1 ml Aqua dest., gelagert bei -20 ° C in 100 µl aliquots
Carbazol-Färbelösung	50 mg 3-amino-9-ethylcarbazole gelöst in 10 ml N-N-Dimethylformamid, 150 ml Aqua dest. + 35 ml Na-Acetat 0.2 mol + 15 ml Essigsäure 0.2 mol
Citratpuffer	0.1 M Na-Citrat in 1000 ml H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> dest., pH 4.5
Krebs-Henseleit-puffer	NaCl 118.4 mM, KCl 4.7 mM, CaCl <sub>2</sub> 2.5 mM, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1.2 mM, MgSO <sub>4</sub> 1.2 mM, NaHCO <sub>3</sub> 25.0 mM, Glucose 11 mM
Laufpuffer für Western Blot	100 ml Runnigpuffer 10x, 10 ml 10 % SDS, 1000 ml Aqua dest.
Luria Broth Medium	12.5 g Luria Broth Base, 500 ml Aqua dest., Autoklavierung
Lyse Puffer	1 × PBS, 100 µg/ml PMSF, 1 % Nondidet P - 40, 0.1 % SDS, 1 mM Sodium orhovanadate und 1 µg/ ml Aprotinine
Mallory-Färbelösung	0.5 g Methyl blue und 2 g Orange G gelöst in 100 ml Aqua dest., aufkochen, 8 ml Essigsäure hinzufügen, filtern
Phosphate buffered saline (PBS) 10x, pH 7.4	80 g NaCl, 2 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 11.1 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 2 g KCl, auffüllen mit Aqua dest. auf 1000 ml, pH 7.4 Autoklavierung
Phosphate buffered saline (PBS) + Fetal Calf Serum (FCS)	90 ml PBS + 10 ml Fetal Calf Serum

Protein loading Puffer	3.55 ml Aqua dest., 1.25 ml 0.5 M Tris-Cl pH 6.8, 2.5 ml glycerol, 2.0 ml 10 % (w/v) SDS, 0.2 ml 0.5 % (w/v) bromophenol blue, RT. zu 950 µl sample Puffer, 50 µl β-Mercaptoethanol hinzufügen.
Running Puffer 10x	30.3 g Tris-Base, 144 g Glycine, 1000 ml Aqua dest.
Sammelgel	4.1 ml Aqua dest., 1 ml RotiphoreseGel 30, 750 µl Sammelgelpuffer (pH6.8), 60 µl 10 % SDS, 60 µl 10 % APS, 6 µl TEMED
Sammelgel Puffer	6.1 g Tris-Base mit HCl auf pH 6.8 einstellen, 100 ml Aqua dest.
Transfer Puffer 1x	100 ml Runnigpuffer 10x, 200 ml Methanol, 4 ml 10 % SDS, 1000 ml Aqua dest.
Trenngel 10 %	5.9 ml Aqua dest., 5 ml RotiphoreseGel 30, 3.8 ml Trenngelpuffer (pH8.8), 150 µl 10 % SDS, 150 µl 10 % APS, 6 µl TEMED
Trenngel Puffer	18.2 g Tris-Base, mit HCl auf pH 8.8 einstellen, 1000 ml Aqua dest.
Tris acetat Ethylendiamintetraessigsäure (TAE) Elektrophoresepuffer 1x	40 mM Tris, 20 mM acetic acid, 1mM EDTA
1.5 M Tris-Cl, pH 8.8	27.23 g Tris base gelöst in 80 ml Aqua dest., pH 8.8 mit 6 N HCl. mit Aqua dest. Auf 150 ml aufgefüllt, 4 ° C
0.5 M Tris hydroxymethyl aminomethan (Tris)-Cl, pH 6.8	6 g Tris base gelöst in 60 ml Aqua dest., eingestellt auf pH 6.8 mit 6 N HCl, mit Aqua dest. Auf 100 ml aufgefüllt, 4 ° C
Tris puffered saline (TBS) 10x, pH 7.5	10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 100 mM NaCl
TBST (Tris puffered saline tween) 1x	100 ml TBST 10x, 1 ml Tween 20, 1000 ml Aqua dest.



**3.1.4. Kit´s und andere Materialien**

<b>Kit´s und andere Materialien</b>	<b>Hersteller</b>
ABC-Kit	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Avidin/Biotin Blocking Kit	Vector Laboratories, Burlingame, USA
BCA protein assay	Pierce/KMF, St. Augustin, Deutschland
DH5α <i>Escherichia coli</i> Zellen	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
MicroAmp optical 96-well reaction plates	PE Applied Biosystems, Foster city, USA
Mikrotiterplatten	Elscolap, Kruisbeke, Belgien
M-MLV reverse Transkriptase Kit	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Oligo dT	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Pap Pen (Fettstift)	G. Kisker, Steinfurt, Deutschland
pGEM Teasy System	Promega, Madison, WI, USA
Plasmid Mini-kit	Roche, Mannheim, Deutschland
Precipath L	Roche, Mannheim, Deutschland
QIAquick Gel Extraction Kit	QIAGEN, Hilden, Deutschland
QPCR Mastermix Plus for SYBR Green	Eurogentec, Seraing, Belgien
RNeasy Kit	QIAGEN, Hilden, Deutschland

**3.1.5. Computer und Software**

<b>Computer und Software</b>	<b>Hersteller</b>
ABI primer express software	PE Applied Biosystems, Foster city, USA
ABI PRISM 7900 HT Sequence Detection System software Version 2.2.2	Perkin Elmer, California, USA
Computer image analyzer Lucia G Version 3.52b	Nikon Deutschland GmbH, Düsseldorf, Deutschland
Instat 3.0.a	GraphPad Software, Inc., La Jolla, USA
ML 780 PowerLab/8s	Wiss Tech, Speebach, Deutschland
NIH Image 1.63 Software	National Institutes of Health, USA
7900 HT Fast Real-time PCR System	PE Applied Biosystems, Foster city, USA

**3.1.6. Enzyme**

Enzyme	Hersteller
<i>EcoRI</i>	Fermentas Inc., MD, USA
Hotstar Taq Polymerase	QIAGEN, Hilden, Deutschland
RNase (DNase free)	QIAGEN, Hilden, Deutschland

**3.1.7. Antikörper**

Antikörper	Quelle	Hersteller
Akt	Hase	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
Anti-human ApoA1 IgG	Hase	CMVB, De Geest, Leuven, Belgien
Anti-Ziege IgG horseradish peroxidase konjugierten secondary antibody	Affe	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
Anti-Maus IgG horseradish peroxidase konjugierten secondary antibody	Ziege	DAKO, Carpinteria, USA
Anti-Hase IgG horseradish peroxidase konjugierten secondary antibody	Ziege	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
eNOS	Maus	BD Biosciences, Kalifornien, USA
ICAM-1 (Klon1A29)	Maus	Serotec, Oxford, UK
Monoclonal antibody A4H4A7	Maus	CMVB, De Geest, Leuven, Belgien
p-Akt (Ser 473)	Hase	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
p-eNOS (Ser 1177)	Ziege	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
p-p38 MAPK (Thr180/Tyr182)	Hase	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
p38 MAPK	Hase	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
VCAM-1 (Klon 5F10)	Maus	Babco, Richmond, USA

## 3.2. Die Tierexperimente

### 3.2.1. Das Tiermodell

Die Tierexperimente folgten den Leitlinien der „Guide for the Care and Use of Laboratory Animals“, herausgegeben vom “National Institutes of Health” (NIH Publication No. 85-23, revised 1996). Die Tierversuche wurden vom Berliner Landesamt für Gesundheit und Soziales (LAGeSo) genehmigt (TVA-Nr. G0209/04). Der Versuch wurde mit 8 Wochen (w) alten, männlichen Sprague Dawley (SD) Ratten durchgeführt (Charles River, Sulzfeld, Germany). Die Ratten wurden in Paarhaltung unter Standardbedingungen (20 °C, 12 Stunden (h) Tag (d)/Nacht Rhythmus) gehalten. Sie hatten freien Zugang zu Wasser und standardisierter Nahrung.

### 3.2.2. Die Induktion des Diabetes mellitus

Die Ratten wurden nach ihrer Ankunft eine w adaptiert und dann randomisiert einer DM-Gruppe bzw. nicht DM-Gruppe zugeordnet. Den Ratten der DM-Gruppen (SD/STZ) wurden jeweils 70 mg/kg/Körpergewicht (KG) STZ, gelöst in 100 nM Citratpuffer (pH 4.5), intraperitoneal injiziert. Die Ratten der nicht DM-Gruppe (SD) bekamen die gleiche Menge Citrat Puffer, jedoch ohne STZ intraperitoneal appliziert. Am 4. Tag post STZ Injektion erfolgte die Messung der Blutzucker (BZ)-Werte aus dem Rattenschwanzkapillarblut mit einem handelsüblichen BZ-Messgerät (Acutrend Sensor, Roche, Mannheim, Deutschland). Dabei wurden die Ratten mit BZ über 300 mg/dl als erfolgreich mit DM induziert angesehen und in die Studie aufgenommen.

### 3.2.3. Der Gentransfer

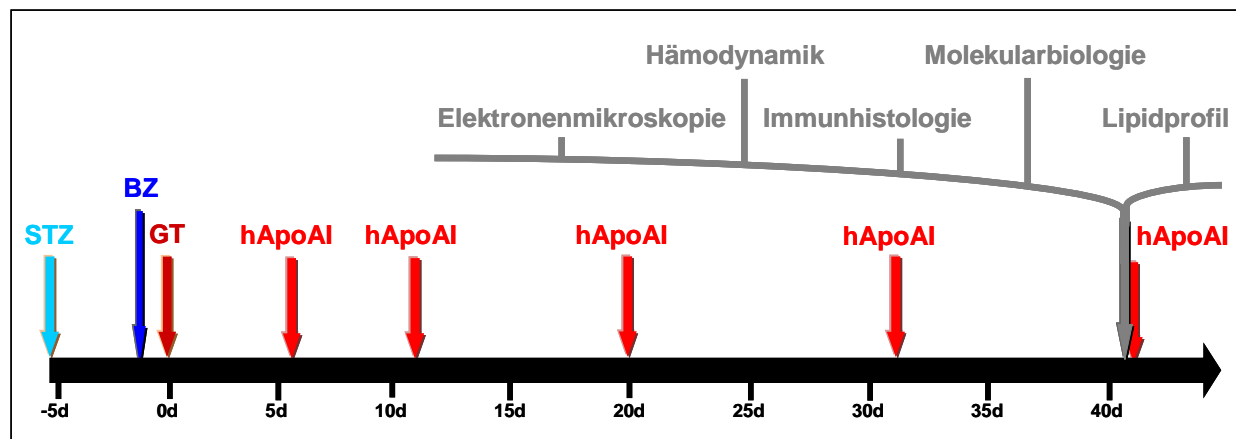
Für den Gentransfer wurde ein E<sub>1</sub>E<sub>3</sub>E<sub>4</sub>-deletierter, adenoviraler Vektor verwendet, weil dieser bei guter Effektivität eine verminderte Expression viraler Gene und eine verminderte Lebertoxizität aufweist (Van Linthout S *et al.* 2002). Das Adenovirus mit dem Konstrukt (mit dem humanen *ApoA1* Gen, 4 Kopien vom *ApoE Enhancer* und dem  $\alpha$ 1-Antitrypsin Promoter) und der „nackte“ *Ad.Null* Vektor (welcher keine Expressionskassette enthält), wurden mir durch meine Arbeitsgruppenleiterin, Fr. Dr. Van Linthout zur Verfügung gestellt. Die Herstellung erfolgte nach bereits etablierten Methoden, wie in vorherigen Studien bereits beschrieben wurde (Van Linthout S *et al.* 2002). Die Funktionsweise des adenoviralen Gentransfer konnte bereits in verschiedenen Studien nachgewiesen werden (De Geest B *et al.* 2001, Van Linthout S *et al.* 2002). Fünf d nach der STZ Injektion wurde bei der SD/STZ/*Ad.hApoA1* Gruppe

ein adenoviraler Gentransfer durchgeführt, mittels eines E<sub>1</sub>E<sub>3</sub>E<sub>4</sub>-deletierten *Ad.hApoA1* Vektors. Die Kontrollgruppen SD/*Ad.Null* und SD/STZ/*Ad.Null* bekamen einen nackten adenoviralen Vektor (*Ad.Null*). Die Vektoren wurden, intravenös, mit einer Konzentration von  $3 \times 10^{12}$  Partikel/kg/KG injiziert. Die Tabelle 3 und Abbildung 5 zeigen die Gruppenaufteilung und das Studiendesign.

**Tabelle 3: Auflistung der Versuchstiergruppen**

Dargestellt sind die drei verschiedenen Versuchstiergruppen mit der jeweiligen Abkürzung und Behandlung. Die Diabetes mellitus (DM) Induktion erfolgte bei den Sprague Dawley (SD) Ratten durch Applikation von Streptozotocin (STZ). Die Tiergruppen erhielten entweder den nackten adenoviralen Vektor (*Ad.Null*) oder den adenoviralen Vektor mit dem humanem Apolipoprotein AI (*Ad.hApoA1*) in der Expressionskassette.

Versuchsgruppen	Definition
SD/ <i>Ad.Null</i>	Nicht diabetische Sprague Dawley Ratten mit dem adenoviralem Gentransfer mittels nackten <i>Ad.Null</i> Vektor
SD/STZ/ <i>Ad.Null</i>	Diabetische Sprague Dawley Ratten mit dem adenoviralem Gentransfer mittels nackten <i>Ad.Null</i> Vektor
SD/STZ/ <i>Ad.hApoA1</i>	Diabetische Sprague Dawley Ratten mit dem adenoviralem Gentransfer mittels der Expressionskassette <i>Ad.hApoA1</i>



**Abbildung 5: Darstellung des Studiendesigns**

Zu sehen sind die unterschiedlichen Zeitpunkte in Tagen (d) für die Induktion des Diabetes mellitus (DM) mittels Streptozotocin (STZ) Applikation, der Applikation des Gentransfers (GT) und der Bestimmung des Blutzuckerspiegels (BZ), des humanen ApoAI (hApoAI) Spiegels und des Lipidprofils. Sowie die hämodynamische Charakterisierung, Immunhistologie, Elektronenmikroskopie und Molekularbiologie mit mRNA und Protein Bestimmung.

### 3.2.4. Die hämodynamische Charakterisierung

Die hämodynamische Charakterisierung erfolgte mit Hilfe der Tip-Kathetermessung, diese Methode wird schon seit Jahren erfolgreich in Tierexperimenten eingesetzt (Zimmer HG und Millar HD 1998). Dazu erfolgte 42 d post Gentransfer eine Thiopentalnarkose (intraperitoneale Injektion von 60 mg/Kg/KG Trapanal<sup>®</sup>) sowie Intubation und Beatmung mittels einer Nager-Beatmungsmaschine (Ugo Basile, Typ7025, Comerio, Italien). Anschließend wurde der Brustkorb eröffnet, die Herzspitze punktiert und ein Millar 2.0F Tip-Katheter (Millar Instruments, Texas, USA) in den LV vorgeschoben. Nach Erreichen eines steady state erfolgte die Messung des LV  $dP/dt_{max}$  und LV  $dP/dt_{min}$  über 30 s. Alle Messungen wurden fortlaufend mit einem digitalen Messwerterfassungssystem (ML780 PowerLab/8s, Wiss Tech, Speebach, Deutschland) durchgeführt und aufgezeichnet.

### 3.2.5. Die Organentnahme und Weiterverarbeitung

Nach erfolgter hämodynamischer Charakterisierung erfolgte die Entnahme der Herzen und Leber. Die Herzen wurden in den linken und rechten Ventrikel separiert, um anschließend das Herzgewicht (HG) sowie das Gewicht des isolierten LV zu bestimmen. Der LV wurde in drei Transversalschnitte unterteilt. Der erste Transversalschnitt des LV wurde nach Einbettung in Tissue Teck (Tissue Tek, Nussloch, Deutschland), in flüssigem Stickstoff gekühltem Methylbutan schock gefroren und abschließend bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert. Der zweite Transversalschnitt wurde in Einbettkassetten zur Verhinderung von Autolyse für 24 h in 4 %-ige Formalinlösung verbracht. Der dritte Transversalschnitt wurde für die molekularen Untersuchungen in flüssigem Stickstoff schock gefroren.

### **3.3. Die molekularbiologischen Untersuchungen**

#### **3.3.1. Die Immunhistologie**

##### **3.3.1.1. Die Histologie**

Die Transversalschnitte in den Einbettkassetten in der 4 %-igen Formalinlösung wurden über Nacht in der Pathologie unseres Hauses, durch eine aufsteigende Reihe von Alkohollösungen (80 % Ethanol, 100 % Ethanol, 100 % Isopropanol) entwässert. Am nächsten Tag erfolgte manuell das Gießen der Präparate in Paraffinblöcke. Anschließend wurden von den Präparaten am Rotations-Mikrotom HM 330 (Microm, Heidelberg, Deutschland) 5 µm dicke Serienschnitte angefertigt. Diese wurden zunächst in 40 ° C Wasser zwischengelagert und danach durch Objektträger aufgenommen, um sie dann in einem Ofen zu trocknen.

Die Präparate wurden mit Azan Mallory gefärbt, um den Kollagenfaseranteil und somit abgelaufene reaktive Umbauvorgänge der extrazellulären Matrix zu beurteilen. Hierbei erscheinen die Kollagenfasern blau. Ein polarisierendes Licht führt zum Aufleuchten der Färbung. Die Auswertung erfolgte mittels eines Leitz G20 Mikroskops mit einem Okular, das mit einem kalibrierten Raster versehen ist (Wild Heerburg Instruments, Geneva, Schweiz). Die Präparate wurden bezüglich ihres Gesamtkollagenanteils untersucht, indem die gefärbte Fläche in Relation zur Gesamtfläche des Präparats gesetzt wurde.

##### **3.3.1.2. Die Immunhistochemie**

Die Tissue Tek Proben wurden, um das Zuschneiden zu erleichtern, 24 h vor dem Schneiden aus -80 °C in -20 °C verbracht. Die Proben wurden mittels des Kryostaten Jung CM 3000 (Leica, Bensheim, Deutschland) bei -30 °C in 5 µm dicke Schnitte geschnitten und mit Objektträgern aufgenommen, welche zuvor für 5 Minuten (min) in 10 %-iges Poly-L-Lysin eingetaucht waren, um die Haftung der Präparate zu erhöhen. Als nächstes wurden die Objektträger mit den Schnitten für 10 min in 4 °C Aceton (99.5 %) getaucht, dann bei Raumtemperatur (RT) an der Luft getrocknet und so fixiert. Vor der Weiterverarbeitung wurden die Schnitte mittels eines Fettstift´s (Pap Pen, G.Kisker, Steinfurt, Deutschland) umrandet, um so die Inkubation mit den verschiedenen Reagenzien zu erleichtern und eine Austrocknung zu vermeiden. Die immunhistochemische Färbung erfolgte durch ein indirektes Verfahren nach der Avidin-Biotin-Enzym (ABC)-Färbemethode, welches von Hsu (Hsu SM *et al.* 1981) etabliert wurde. Zunächst wurde die endogene Peroxidase durch Waschen in 0.25 %-iger

Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ )/Phosphate buffered saline (PBS) geblockt und 2x für 5 min in PBS gewaschen (nach jedem Arbeitsschritt erfolgte das Waschen). Zur Blockierung der endogenen Avidin-Bindungsaktivität erfolgte die Inkubation der Schnitte für 20 min mit jeweils 70  $\mu$ l Avidin (4 Tropfen Avidin-Blocking-Kit/ml PBS + Fetal Calf Serum (FCS)). Durch die Verwendung von 10 %-igem FCS wurden unspezifische Eiweißbindungsstellen saturiert. Um eine Austrocknung zu vermeiden, erfolgten die Inkubationen immer in einer Feuchtkammer. Im nächsten Schritt erfolgte die Inkubation mit jeweils 70  $\mu$ l Biotin (4 Tropfen Biotin-Blocking-Kit/ml PBS + FCS). Danach erfolgte die Inkubation mit den jeweiligen Antikörpern (AK), dazu wurden die Präparate mit den Primären-AK, mouse-anti-rat ICAM-1 (Verdünnung: 1:100 mit PBS+FCS) bzw. mouse-anti-rat VCAM-1 (Verdünnung: 1:50 mit PBS+FCS), für 45 min bei RT inkubiert. Als nächstes folgte die Inkubation der Präparate für 30 min bei RT mit dem Sekundären-AK, goat-anti-mouse IgG (Verdünnung 1:400), später die Inkubation mit dem ABC-Komplex (jeweils ein Tropfen der Substanz A und B aus dem ABC-Komplex-Kit in 5 ml PBS) bei vorausgegangener Reaktionszeit von 30 min bei RT. Die Färbung der Antigen-AK-Komplexe erfolgte durch 12 minütige Inkubation mit einer Carbazol-Färbelösung, welche mit  $H_2O_2$  (Endkonzentration 0.3 %) versetzt war. Die Gegenfärbung, zur Darstellung der Zellkerne, wurde durch ein 30 minütiges Hämatoxylin-Bad erreicht. Im letzten Schritt wurden die Objektträger mit Gelatine (Merck, Darmstadt, Deutschland) gedeckelt. Das Arbeitsprotokoll der ABC-Färbung ist in Tabelle 4 wiedergegeben. Die Analyse der Präparate erfolgte am LEICA DMRD-Mikroskop (Leica, Bensheim, Deutschland), mittels farbkodierter digitaler Bildanalyse mit einer auf der Plattform von Lucia G (V 3.52ab, Nikon, Düsseldorf, Deutschland) konzipierten Software. Dieses ermöglicht eine vom Beurteiler unabhängige und damit zuverlässige Quantifizierung der Expression der untersuchten Antigene (Noutsias M *et al.* 2002). Die Auswertung der Antigene (ICAM und VCAM) erfolgte bei einer 200-fachen Vergrößerung. Hierbei wurden die angefärbten Areale (Area Fraction) als Mittel der gemessenen Infiltrate/ $mm^2$ , in Bezug auf die Herzfläche (Heart Area) gesetzt und so die Quantifizierung ermöglicht. Am Ende wurden digitale Bilder mit einer Vergrößerung von 1:400 angefertigt.

**Tabelle 4: Protokoll der ABC-Färbung**

Das verwendete Protokoll mit den einzelnen Arbeitsschritten und der jeweiligen Inkubationszeit.

Arbeitsschritte	Inkubationszeit
0.25 %-ige H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /PBS	5 min
2x waschen in PBS	Je 5 min
70 µl Avidin (4 Tropfen Avidin-Blocking-Kit/ml PBS + FCS).	20 min
2x waschen in PBS	Je 5 min
70 µl Biotin (4 Tropfen Biotin-Blocking-Kit/ml PBS + FCS)	20 min
2x waschen in PBS	Je 5 min
Primärer-AK: mouse-anti-rat ICAM-1 (Verdünnung: 1:100) bzw. mouse-anti-rat VCAM-1 (Verdünnung: 1:50)	45 min
2x waschen in PBS	Je 5 min
Sekundärer-AK: goat-anti-mouse IgG (Verdünnung: 1:400)	30 min
2x waschen in PBS	Je 5 min
ABC-Komplex (jeweils ein Tropfen der Substanz A und B aus dem ABC-Komplex-Kit in 5 ml PBS)	30 min
2x waschen in PBS	Je 5 min
Carbazol-Färbelösung + Peroxidase (Konzentration: 0.3 %)	12 min
2x waschen in PBS	Je 5 min
Hämatoxylin-Bad	30 min
2x waschen in Aqua dest.	Je 5 min
Eindeckelung der Objektträger mit Gelatine	

### 3.3.2. Die Lipoproteinanalyse

#### 3.3.2.1. Die Bestimmung des humanen Apolipoprotein AI

Die Messung der hApoAI Konzentration erfolgte mittels eines Enzyme-linked immunosorbent assay. Hierfür wurden die Vertiefungen der Mikrotiterplatten (Elscolab, Kruisbeke, Belgien) mit dem primären AK (rabbit antihuman ApoAI polyclonal antibody) beschichtet. Anschließend wurde jeweils 100 µl einer Verdünnungsreihe der Plasmaproben (1:25.000, 1:50.000, 1:100.000, 1:200.000) hinzugegeben und für 2 h inkubiert. Nach einem Waschschrift erfolgte eine weitere Inkubation für 2 h mit dem sekundären AK (murine monoclonal antibody A4H4A7), welcher vorher 1:15.000 verdünnt wurde. Das Enzym (Peroxidase), welches am sekundären AK konjugiert ist, katalysiert nach Substratgabe (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und ortho-phenylene-diamine) und reagiert mit



einem Farbumschlag, welcher in einem Photometer bei einer Wellenlänge von 492 nm quantifiziert wurde (De Geest B *et al.* 2001).

### **3.3.2.2. Die Bestimmung der Lipoproteine**

Die Messung der Lipoproteine erfolgte durch Dichtegradientenultrazentrifugation des Plasmas, welches am Ende der Experimente den Ratten entnommen wurde, nach Chapman (Chapman MJ *et al.* 1981). Dazu wurde das Plasma mit Hilfe von Natriumbromid (NaBr) auf eine Konzentration von 1.23 g/ml gebracht, danach mit NaBr 1.23 g/ml auf ein Gesamtvolumen von 500 µl aufgefüllt und in spezielle „Ultra-Clear“-Gefäße (Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland) verbracht. Daraufhin wurde durch vorsichtiges Hinzupipettieren von 500 µl NaBr 1.21 g/ml, 750 µl NaBr 1.063 g/ml, 750 µl NaBr 1.019 g/ml, 1000 µl NaBr 1.006 g/ml und 1500 µl isotonische Kochsalzlösung eine Säule mit Schichten unterschiedlicher Konzentrationen geschaffen. Zur Verhinderung einer Oxidation der Lipoproteine enthielten die NaBr-Lösungen 0.05 % Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (Merck, Darmstadt, Deutschland). Die Auftrennung der Lipoproteine in die einzelnen Fraktionen geschah durch Ultrazentrifugation für 22 h bei 30.500 U/min bei 20 ° C. Im Anschluss daran wurden die verschiedenen Schichten (mit den unterschiedlichen Konzentrationen) durch vorsichtiges Abpipettieren voneinander getrennt. Die C Konzentrationsbestimmung erfolgte nach einer Inkubation für 1 h bei RT, enzymatisch durch eine optische Dichtemessung bei einer Wellenlänge von 490 nm, Precipath L (Roche, Mannheim, Deutschland) diente dabei als Standard.

### **3.3.3. Die Proteinanalyse**

#### **3.3.3.1. Die Proteinisolierung**

Die Proteinisolierung für die molekularbiologischen Untersuchungen erfolgte aus den LV, welche in flüssigem Stickstoff schockgefroren waren. Hierfür wurden sie mit 300 µl PBS + Proteinaseinhibitor (Roche, Mannheim, Deutschland) versetzt und mit einem Rotor (Ultra Turrax, IKA Analysetechnik GmbH, Deutschland) für 30 Sekunden (s) homogenisiert. Das so gewonnene Proteinlysate wurde für 30 min auf Eis inkubiert und darauf folgend bei 10.000 g für 10 min bei 4 ° C zentrifugiert. Der Überstand wurde gesammelt und in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Proben bei -80 ° C eingefroren.

### 3.3.3.2. Die Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinbestimmung wurde nach einer Modifikation der Methode von Bradford (Bradford MM 1976) durchgeführt, unter Verwendung des Bicinchoninic acid Protein Assay Kits (Pierce/KMF, St. Augustin, Deutschland). Dabei reduzieren die Proteine in alkalischer Umgebung  $\text{Cu}^{2+}$  zu  $\text{Cu}^{1+}$  (Biuret-Reaktion), dieser bildet mit dem BCA Reagenz einen lilafarbenen Komplex. Dieser weist bei Licht einer Wellenlänge von 562 nm eine messbare Absorption auf. Um eine messbare Konzentration zu erreichen, wurden die Proben 1:6 verdünnt und eine Standardreihe, mit Bovine Serum Albumin (BSA), hergestellt.

Standard:	2.0	150 $\mu\text{l}$ BSA
	1.5	50 $\mu\text{l}$ PBS + 150 $\mu\text{l}$ BSA
	1.0	150 $\mu\text{l}$ PBS + 150 $\mu\text{l}$ BSA
	0.5	150 $\mu\text{l}$ PBS + 150 $\mu\text{l}$ von 1.0
	0.25	150 $\mu\text{l}$ PBS + 150 $\mu\text{l}$ von 0.5

Die Proteinkonzentrationen wurden mit Hilfe des BCA Protein Assay Kits nach Angaben des Herstellers ermittelt. Dazu wurde in jede Küvette pro 50  $\mu\text{l}$  Probe bzw. Standard 1 ml BCA Reagenz A + 20  $\mu\text{l}$  BCA Reagenz B hinzugefügt und für 2 h inkubiert. Anschließend erfolgte die Messung im Spektralphotometer (Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland) bei einer Wellenlänge von 562 nm. Die Konzentrationsbestimmung der Proben erfolgt durch den Spektralphotometer anhand der ermittelten Standardkurve.

### 3.3.3.3. Der Westernblot (Immunoblotting)

Die Trennung der Proteine erfolgte nach einer Modifikation der Methode von Laemmli (Laemmli UK 1970), durch die Sodium dodecyl sulfate-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE). Hierbei erfolgt die Trennung der Proteine aufgrund ihrer Größe und Ladung in Abhängigkeit der Porengröße der Gele. Für die Trennung von p38 Mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK) (43 kDa), Akt (60 kDa) und eNOS (140 kDa) wurde ein 5 %-iges Sammelgel und ein 10 %-iges Trenngel verwendet. Diese wurden nach ihrer Herstellung nacheinander in eine Sandwich-Kammer gegossen und zur Polymerisation gebracht. Der Gel-Mix wurde in eine vertikale Elektrophorese-Kammer eingesetzt und mit Laufpuffer aufgefüllt. Im Anschluss daran wurden die Proteine zusammen mit dem Marker in die entsprechenden Vertiefungen pipettiert und eine Spannung von 35 V angelegt, nach 30 min wurde die Spannung auf 100 V erhöht. Hiernach wurde der Gel-Mix aus der Elektrophorese-Kammer entnommen und das

Sammelgel vom Trenngel getrennt. Das Sammelgel wurde dann zusammen mit jeweils zwei Schwämmen und Filterpapieren und einer Polyvinylidenfluorid Membran (Bio-Rad, Kalifornien, USA), welches vorher kurz in einem Methanol-Bad eingeweicht wurde, in eine Blot-box verbracht. Dieses Transfer-Sandwich wurde in eine Kammer mit Transferbuffer verbracht. Das Ganze wurde in einen Behälter mit Eis gelegt und eine Spannung von 200 mA für 60 min angelegt. Um unspezifische Proteinbindungen zu blockieren, wurden die Membrane mit 5 %-igem fettarmen Milchpulver in Tween-Tris-gepufferter Kochsalzlösung (TBST, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) inkubiert. Später wurden die Membranen über Nacht bei 4 ° C mit den jeweiligen primären AK gegen p38 MAPK, Akt und eNOS inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Membrane mit TBST folgte die Inkubation mit dem entsprechenden sekundären AK für 60 min bei RT. Die Membran wurde viermal mit TBST gewaschen. Alle benutzten AK wurden vorher mit 5 %-igem fettarmen Milchpulver in TBST verdünnt (siehe Tabelle 5). Anschließend wurden auf die Membrane 3 ml einer Entwickler-Lösung, mit dem lumineszierenden Stoff Enhanced chemiluminescence (Amersham, Buckinghamshire, England) hinzugegeben und für 1 min inkubiert. Die Membrane wurden in eine Filmkassette (A. Hartenstein, Würzburg, Deutschland) gelegt und für 0,5 bis 5 min belichtet. Die Belichtungszeit richtete sich nach der Qualität der entwickelten Filme. Die optische Dichte der entwickelten Enhanced chemiluminescence Banden wurde mit Hilfe der NIH Image Software (Image macro, version 1.63) quantifiziert.

**Tabelle 5: Auflistung der verwendeten Antikörper**

Für das Immunoblotting verwendete Antikörper mit entsprechender Verdünnung und Quelle. Proteinkinase B (Akt), phosphorylierte Proteinkinase B (p-Akt), endotheliale Nitric oxide synthase (eNOS), phosphorylierte endotheliale Nitric oxide synthase (p-eNOS), p38 Mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK), phosphorylierte p38 Mitogen-activated protein kinase (p-p38 MAPK).

<b>Primäre Antikörper</b>	<b>Sekundäre Antikörper (Horseradish peroxidase-konjugiert)</b>
Akt (rabbit) 1:2000 CellSignaling Technology, Danvers, USA	Anti-rabbit 1:3000 CellSignaling Technology, Danvers, USA
p-Akt (rabbit) 1:1000 CellSignaling Technology, Danvers, USA	Anti-rabbit 1:2000 CellSignaling Technology, Danvers, USA
eNOS (mouse) 1:2000 BD Biosciences, Kalifornien, USA	Anti-mouse 1:3000 DAKO, Carpinteria, USA
p-eNOS (goat) 1:200 Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA	Anti-goat 1:2000 Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
p38 MAPK (rabbit) 1:1000 CellSignaling Technology, Danvers, USA	Anti-rabbit 1:2000 CellSignaling Technology, Danvers, USA
p-p38 MAPK (rabbit) 1:1000 CellSignaling Technology, Danvers, USA	Anti-rabbit 1:2000 CellSignaling Technology, Danvers, USA

### 3.3.4. Die messenger Ribonukleinsäure-Analyse

#### 3.3.4.1. Die Isolierung der messenger Ribonukleinsäure

Um die Ribonukleinsäure (RNA) zu gewinnen, wurden die zuvor in flüssigem Stickstoff schockgefrorenen LV zusammen mit 1 ml Trizol (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) mit einem Homogenisator (Ultra Turrax, Staufen, Deutschland) homogenisiert. Danach wurde pro ml Trizol 0.2 ml Chloroform hinzugefügt, gründlich vermischt und für 2 min bei RT und für 15 min bei 4 ° C mit 10.000x g zentrifugiert. Der Überstand wurde in sterile Tuben überführt, mit 0.5 ml Isopropanol (100 %) angereichert, und bei RT für 10 min inkubiert. Durch erneutes zentrifugieren für 10 min bei 4 ° C mit 12.000x g wurde die RNA gefällt, der Überstand verworfen und das Pellet mit 0.5 ml 4 ° C kaltem Ethanol (70 %) gewaschen und für 10 min bei 4 ° C mit 7.500x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und abschließend wurde das Pellet mit 50 µl H<sub>2</sub>O resuspendiert. Um die RNA-Lösung vollständig von der DNA zu befreien, wurden die Proben mit dem RNeasy Minikit (QIAGEN, Hilden, Deutschland) aufgereinigt. Dazu wurde vor der Anwendung pro 1 ml RLT-Puffer, 10 µl β-Mercaptoethanol zugefügt. Pro RNA Probe

wurde je 350 µl β-Mercaptoethanol-angereicherte RLT-Puffer, 250 µl Ethanol (100 %) und 50 µl H<sub>2</sub>O hinzugegeben und vorsichtig durch Auf- und Abpipettieren durchmischt. Die Proben wurden in RNeasy Minisäulen verbracht und für 10 min mit 10.000x g zentrifugiert. Dann wurde jeweils der Durchfluss entfernt und die RNeasy Minisäulen mit je 350 µl RW1 angereicht und erneut für 10 min mit 10.000x g zentrifugiert. Nach Entfernung des Durchflusses wurde anschließend je 80 µl DNase-Mix (bestehend aus 70 µl RDD-Puffer + 10 µl DNase) auf die Minisäulen hinzugegeben und für 15 min bei RT inkubiert. Je Minisäule wurde 350 µl RW1 pipettiert und für 30 s bei 10.000x g zentrifugiert. Nach Entfernung des Durchflusses wurde je 500 µl RPE auf die Säulen gegeben und für 30 s bei 10.000x g zentrifugiert. Daraufhin erneut je 500 µl RPE hinzugegeben und für 2 min bei 10.000x g zentrifugiert. Um die Restflüssigkeit zu entfernen wurde noch mal für 1 min bei 14.000x g zentrifugiert. Im Anschluss daran wurden die Minisäulen in frische Eppendorfgefäße gesetzt und mit je 50 µl RNase freiem Wasser versetzt, für 1 min bei RT inkubiert und für 30 s bei 10.000x g zentrifugiert. Dann wurde erneut je 40 µl RNase freies Wasser auf die Säulen hinzugegeben, für 5 min auf Eis inkubiert und für 1 min bei 10.000x g zentrifugiert. Am Ende wurde die Konzentration der RNA nach einer 1:100 Verdünnung mit H<sub>2</sub>O mittels Spektralphotometrie (Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland) bestimmt. Die Konzentration der Nukleinsäuren errechnete sich aus der Extinktion bei  $\lambda=260$  nm (OD<sub>260</sub>). Eine OD<sub>260</sub> von 1.0 entspricht dabei einer Konzentration von 40 µg/ml RNA. Die Reinheit wurde durch die Messung der Verhältnisse der Absorptionswerte bei 260 nm und 280 nm (OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>) bestimmt. Für reine RNA liegt dieser Quotient zwischen 1.8 und 2.0, Werte außerhalb zeigen eine Verunreinigung an. Abschließend wurden die RNA-Proben bei -80 ° C aufbewahrt.

#### **3.3.4.2. Die reverse Transkriptase**

In der Polymerase Kettenreaktion (PCR) kann nur DNA amplifiziert werden, daher wurde die RNA erst einmal mit Hilfe einer reversen Transkriptase (RVT) aus dem murinen Mäuse-Leukämie-Virus (M-MLV) in eine komplementäre Desoxyribonukleinsäure (cDNA) umgeschrieben. Dazu wurde ein Mix angesetzt aus 4 µl RNA (0.25 µg/µl), 10 µl Buffer 5x, 4 µl dNTPs 10 mM, 2 µl DTT, 2 µl Oligo dT (0.1 µg/µl), 2 µl M-MLV und 26 µl H<sub>2</sub>O. Als Negativkontrolle lief zusätzlich eine Probe ohne RVT. Die Amplifizierung erfolgte bei 25 ° C für 10 min, gefolgt von 37 ° C für 50 min.

Nach der Reaktion wurden die Tuben zur Inaktivierung des Enzyms für 15 min auf 70 ° C erwärmt, um so die Reaktion zu stoppen.

#### **3.3.4.3. Die Hotstar Polymerase Kettenreaktion**

Für die Quantifizierung der mRNA Expression in den LV Proben mittels real-time PCR wurden Plasmid Standards hergestellt. Dabei diente die cDNA der LV als template. Dazu wurde mit Hilfe der Hotstar Taq Polymerase (QIAGEN, Hilden, Deutschland) ein PCR Mix hergestellt mit 5 µl 10x Buffer, 10 µl 5x Q, 1 µl dNTP 10 mM, je 1 µl forward und reverse Primer (mit einer Konzentration von 7.5 µM), 0.25 µl Taq, 26 µl dest. Wasser und 5 µl der entsprechenden DNA bzw. Wasser als Negativkontrolle. Des Weiteren erfolgte für 15 min eine Inkubation bei 95 ° C, gefolgt von 35 Zyklen mit 95 ° C für 30 s, nachfolgend 1 min für 60 ° C und 1 min für 72 ° C, am Ende schloss sich ein Schritt mit 10 min bei 72 ° C an.

#### **3.3.4.4. Die Trennung der Desoxyribonukleinsäure durch die Gelelektrophorese**

Durch die Gelelektrophorese lässt sich die DNA mittels Wanderung geladener Teilchen im elektrischen Feld auftrennen. Durch die negativen Ladungen der Phosphatgruppen der DNA wandern diese von der Kathode (-) zur Anode (+). Zur Herstellung des Agarosegels wurde zu 100 ml Tris acetat Ethylendiamintetraessigsäure (TAE) Buffer, 1 g Agarose (Gibco, Karlsruhe, Deutschland) hinzugegeben, durch Kochen aufgelöst und mit 7 µl Ethidiumbromid (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) versetzt, diese lagern sich an doppelsträngige Desoxyribonuklein Säure (dsDNA) an und fluoreszieren unter Ultraviolettem Licht ( $\lambda=366$  nm). Die Gele wurden in einen Elektrophoresetank gestellt, die Proben wurden in die entsprechenden Vertiefungen vorsichtig hineinpipettiert. Zur Sichtbarmachung der Banden wurde Loading Dye x6 (Fermentas Inc., MD, USA) zugegeben. Als Molekulargewichtsmarker wurde 100 bp ladder (Fermentas Inc., MD, USA) verwendet, dieses ermöglicht eine Schätzung der Größe der DNA Basenpaare. Die Elektrophorese lief bei 100 V. Nach ca. 25 min wurden die Banden ausgeschnitten und mittels des QIAquick Gel Extraction Kit's (QIAGEN, Hilden, Deutschland) nach Angaben des Herstellers aus dem Gel isoliert.

#### **3.3.4.5. Die Klonierung der Desoxyribonukleinsäure**

Die DNA-Fragmente wurden mittels Ligation in Plasmide eingeschleust, als Vektor diente das pGEM-Teasy System (Promega, Madison, WI, USA). Die Ligation erfolgte

nach den Protokollen des Herstellers, dazu wurde ein Mix hergestellt aus 5 µl Ligationspuffer 2x, 1 µl pGEM-T Vektor, 1 µl Ligase, 3 µl des entsprechenden PCR Fragmentes und 1h bei RT inkubiert. Anschließend folgte die Transformation der Plasmide in kompetente DH5α *Escherichia coli* (*E. coli*) Zellen (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) durch Hitzeschock. Hierzu wurden 10 µl des Ligationsproduktes in 100 µl Bakterien-Lösung pipettiert, für 15 min auf Eis gestellt, dann für 5 min in ein Wasserbad mit 37 ° C und hiernach erneut für 15 min auf Eis gestellt. Am Ende wurde 890 µl Luria broth hinzugegeben und bei 37 ° C für 60 min und 850 U/min in den Inkubator (Heraeus, Osterode, Deutschland) gestellt und für 30 s bei 10.000x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet durch Auf- und Abpipettieren wieder aufgelöst und auf Agarplatten aufgebracht, diese waren vorher zur Selektion mit Ampicillin versetzt worden. Die Agarplatten wurden über Nacht in einem Inkubator bei 37 ° C bebrütet.

#### **3.3.4.6. Die Plasmidisolierung (Mini-Präparation)**

Die Isolierung der rekombinierten DNA-Plasmide erfolgte mittels Mini-Präparation, nach Birnboim und Doly (Brun YV *et al.* 1991) mit Hilfe des Plasmid Mini-Kits (Roche, Mannheim, Deutschland). Dabei wurden unter keimarmen Bedingungen Röhrchen mit 3 ml Luria broth Medium (versetzt mit 0.1 % Ampicillin) mit einer weißen Kolonie aus der Agarplatte beimpft und für 18 h bei 37 ° C und 250 U/min inkubiert. Jeweils 1.5 ml der Bakterienlösung aus den Röhrchen wurden in eine Tube pipettiert und für 30 s bei 10.000x g zentrifugiert. Nach dem Abgießen des Überstandes wurde das Pellet mit 250 µl gekühltem Suspensions-/RNasepuffer resuspendiert, 250 µl Lysepuffer zugefügt und 5 min bei RT inkubiert. Danach wurde 350 µl gekühlter Bindungspuffer hinzugegeben, bei 5 min auf Eis inkubiert und für 10 min bei 14.000x g zentrifugiert. Der Überstand wurde in Filter-Mikrozentrifugationsröhrchen, welche auf Eppendorfgefäße gesetzt wurden, pipettiert und für 10 min bei 14.000x g zentrifugiert. Als nächstes wurde 700 µl Waschpuffer hinzupipettiert und zweimal für 30 s bei 14.000x g zentrifugiert. Am Ende wurden die Filter-Mikrozentrifugationsröhrchen in neue Eppendorfgefäße überführt und die DNA mit 40 µl Elutionbuffer durch zentrifugieren bei 14.000x g für 60 s aus dem Filter gelöst. Die Sequenzierung der DNA wurde durch eine externe Firma übernommen (AGOWA, Berlin, Deutschland).

### 3.3.4.7. Die Restriktion der Desoxyribonukleinsäure-Fragmente

Die Restriktion des pGEM-Teasy Vektors erfolgte durch den Einsatz des entsprechenden Restriktionsenzym *EcoRI* (Fermentas Inc., MD, USA). Dazu wurde pro Probe ein Mix angesetzt aus 14 µl dest. Wasser, 1 µl *EcoR* I, 2 µl Restriktionsenzym puffer und bei 10.000x g 30 s zentrifugiert. Im Anschluss wurden jeder Probe 3 µl die entsprechenden cDNA hinzugegeben und für 60 min bei 37 ° C inkubiert. Die Analyse der DNA-Restriktionen erfolgte durch eine Gelelektrophorese, bei Nachweis der PCR Fragmente erfolgte die Sequenzierung. Bei positivem Nachweis wurden die PCR Fragmente zur Standardherstellung benutzt. Dazu wurden aus den PCR Fragmenten Verdünnungsreihen, in 5 Stufen mit Konzentrationen von 10 bis 0.001 pg/µl hergestellt. Als letztes wurden die einzelnen Verdünnungsstufen aliquotiert und bei -20 ° C gelagert, dadurch war gewährleistet, dass bei jeder Messung die gleiche Standardkurve als Vergleich zur Verfügung stand.

### 3.3.4.8. Real-time reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion

Mit Hilfe der real-time PCR ist es möglich eine quantitative Analyse von Genexpressionen durchzuführen. Dies geschieht während der Amplifikation in Realzeit, eine anschließende PCR Gelelektrophorese zur Quantifizierung entfällt. Die Quantifizierung erfolgt mit Hilfe von Fluoreszenz-Messungen während eines PCR-Zyklus. Als Fluoreszenzfarbstoff diente SYBR Green. Zur Quantifizierung wurde das Referenz-Gen (Housekeeping gen) L32 verwendet. Dieses gehört zu einer Familie von Genen, die die 60S Untereinheit von Ribosomen kodieren (Zhang X *et al.* 2005, Ishii T *et al.* 2006). Als Referenz-Gen wird dieses nahezu immer gleichmäßig exprimiert. Dadurch können Variationen in der Ausgangsmenge der eingesetzten RNA ausgeglichen werden. Zur Quantifizierung wurden die angefertigten Standardreihen verwendet. Für die real-time PCR wurde ein PCR Mix angefertigt, mit 2.5 µl PCR Sybergreen buffer 10x, 10.125 µl dest. Wasser, 3 µl MgCl<sub>2</sub>, 2 µl dNTP (2.5 mM), 0.125 µl Taq, 0.25 µl Amp Erase und je 1 µl des entsprechenden forward und reverse Primers (mit einer Konzentration von 7.5 µM). Die Primer wurden mit der ABI Primer Express Software (PE Applied Biosystems, Foster City, USA) designt und von TIB MolBio (Berlin, Deutschland) synthetisiert (siehe Tabelle 6). Zu dem PCR Mix kamen zusätzlich je 5 µl dest. Wasser (Negativkontrollen), Plasmide (aus den Standards) oder Proben (aus den LV), so dass jeweils ein Endvolumen von 30 µl vorlag. Die Ansätze wurden in die Vertiefungen der 96-well plates hineinpipettiert, zentrifugiert und in das 7900HT Fast



Real-time PCR System eingelegt. Die Ansätze wurden für 2 min bei 50 ° C und für die HotGoldstar Aktivierung für 10 min bei 95 ° C inkubiert. Daran schloss sich ein PCR Zyklus (40 mal) mit 15 s Denaturierung bei 95 ° C und 60 s abkühlen bei 60 ° C, an. Am Ende erfolgte wieder eine Inkubation für 15 s bei 95 ° C und 15 s bei 55 ° C. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mittels der ABI PRISM 7900 Sequence Detection System Software Version 2.2.2 (Perkin Elmer, Kalifornien, USA).

**Tabelle 6: Auflistung der verwendeten Primer**

Zu sehen sind die verwendeten Primer mit den entsprechenden forward (For) und reverse (Rev) Sequenzen für Superoxid Dismutase (SOD), extrazelluläre Superoxid Dismutase (ec-SOD), interzelluläres Adhäsionsmolekül (ICAM), vaskuläres Adhäsionsmolekül (VCAM), Tumor Nekrose Faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ).

cDNA	Sequenz
SOD-1	For-primer 5'-CCAGGCTGCCTGTGAAACTT-3' Rev-primer 5'-CTGCGCTTGGGACTGAAGATA-3'
SOD-2	For-primer 5'-CTTCGAGATGAACAACAAAATGC-3' Rev-primer 5'-GGAGAATACCACTTGTGGCTTATG-3'
ec-SOD	For-primer 5'-GGAGATCTGG ATGGAGCTAGGA-3' Rev-primer 5'-CCTGCAGACTGCGTG CAT-3'
ICAM-1	For-primer 5'-GTCTCATGCCCGTGAAATTATG-3' Rev-primer 5'-CATTTTCTCCCAGGCATTCTCT-3'
VCAM-1	For-primer 5'-GGAGGTCTACTCATTCCCTGAAGA-3' Rev-primer 5'-ACCGTGCAGTTGACAGTGACA-3'
TNF- $\alpha$	For-primer 5'-AGACCCTCACACTCAGATCATCTTC-3' Rev-primer 5'-CTCCGCTTGGTGGTTTGC-3'
L32	For-primer 5'-AACCGAAAAGCCATCGTAGAAA-3' Rev-primer 5'-CCTGGCGTTGGGATTGG-3'

### 3.3.5. Die Total radical antioxidant potential Bestimmung

Bei der Lipidperoxidation entsteht Malondialdehyd, welcher mit Thiobarbitursäure einen roten Polymethinfarbstoff bildet, der fluorimetrisch gemessen werden kann. Zur Messung wurde 25  $\mu$ l Plasma und der Standard (1:3 verdünnt in NaCl 0.9 %) mit 1.6 ml Schwefelsäure und 0.4 ml Thiobarbitursäure in 50 %-iger Essigsäure inkubiert. Die Testansätze wurden für 60 min bei 90 ° C inkubiert und nachfolgend im Eisbad abgekühlt. Danach wurde 2 ml n-Butanol zugegeben, gemixt und für 10 min bei 3.000 U/min zentrifugiert. Die Messung der TBARS (Total radical antioxidant potential)

Fluoreszenz erfolgte in der überstehenden Butanol-Phase, bei einer Exzitationswellenlänge von 515 nm und einer Emissionswellenlänge von 533 nm. Die Berechnung der TBARS Konzentrationen erfolgte nach Subtraktion des Leerwertes anhand einer Eichkurve mit Standardkonzentrationen an Malondialdehyd, gebildet aus in Essigsäure gelöstem 1,1,3,3-Tetraethoxypropan.

#### **3.4. Die statistische Analyse**

Die statistische Auswertung erfolgte mittels des Student T Test. Beim Vergleich von mehreren Gruppen wurde der 1-way ANOVA Test benutzt. Bei einem  $p < 0.05$  wurden die Ergebnisse als signifikant angesehen. Es wurde jeweils der Mittelwert mit dem Standardfehler des Mittelwertes angegeben.

## 4. Ergebnisse

Die graphischen Darstellungen der Tabellen und Abbildungen zeigen jeweils Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung vom Mittelwert der entsprechenden Tiergruppen.

### 4.1. Die Basaldaten

Am Ende der Experimente erfolgte die Bestimmung der Basaldaten. Die diabetische Gruppe SD/STZ/*Ad.Null* hatte, 42 d nach STZ Injektion, signifikant ( $p < 0.005$ ) höhere BZ-Werte als die nicht-diabetische SD/*Ad.Null* Gruppe. Zwischen den Diabetesgruppen, SD/STZ/*Ad.Null* und SD/STZ/*Ad.hApoAI* zeigte sich kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der BZ-Werte. Die SD/STZ/*Ad.Null* Gruppe zeigte ein 2.0- bzw. 1.4-fach signifikant ( $p < 0.005$ ) verringertes KG und HG vs. der SD/*Ad.Null* Kontrollgruppe. Zwischen den diabetischen Gruppen SD/STZ/*Ad.Null* und SD/STZ/*Ad.hApoAI* gab es keinen signifikanten Unterschied bezüglich KG und HG. Der Quotient LV/HG, als Maß zur Beurteilung einer linksventrikulären Hypertrophie, war in der SD/STZ/*Ad.ApoAI* Gruppe signifikant ( $p < 0.05$ ) größer vs. der SD/STZ/*Ad.Null* Gruppe (Tabelle 7).

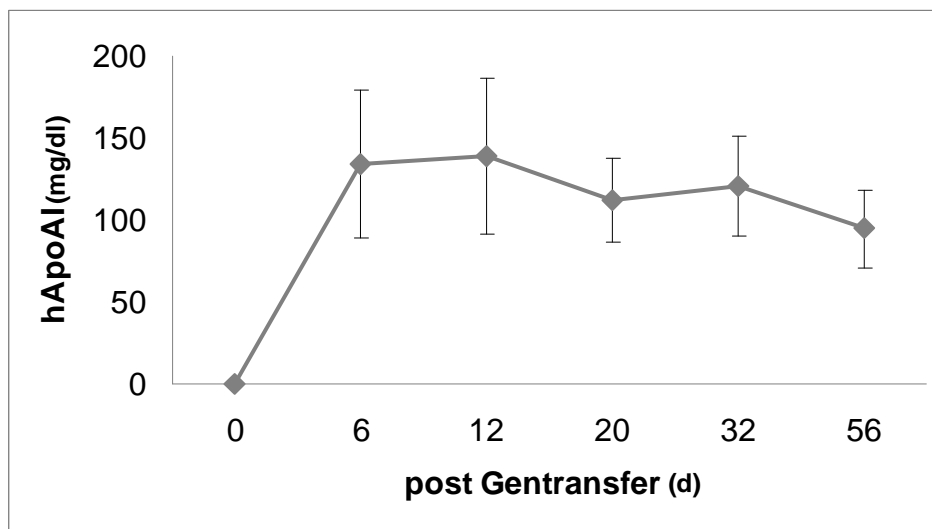
#### Tabelle 7: Die Basaldaten am Ende der Experimente

Dargestellt sind die Blutzuckerwerte (BZ), das Körpergewicht (KG) und das Herzgewicht (HG) sowie das Gewicht des linken Ventrikels (LV). Ebenso die Quotienten HG/KG und LV/HG. Normoglykämische Sprague Dawley (SD)-Ratte injiziert mit dem nackten adenoviralen Vektor (*Ad.Null*) (SD/*Ad.Null*), Streptozotocin (STZ)-induzierte diabetische Ratten injiziert mit dem *Ad.Null* (SD/STZ/*Ad.Null*) und injiziert mit dem humanem ApolipoproteinAI (hApoAI) exprimierenden adenoviralen Vektor (*Ad.hApoAI*) (SD/STZ/*Ad.hApoAI*); (n=8 pro Gruppe für die Blutzuckerwerte, n=13-17 für die Gewichte) § $P < 0.05$ , §§ $P < 0.005$  vs. SD/*Ad.Null* und \* $P < 0.05$  vs. SD/STZ/*Ad.hApoAI*.

	<b>SD/<i>Ad.Null</i></b>	<b>SD/STZ/<i>Ad.Null</i></b>	<b>SD/STZ/<i>Ad.hApoAI</i></b>
<b>BZ (mg/dl)</b>	183 $\pm$ 12	957 $\pm$ 41§§	1031 $\pm$ 32§§
<b>KG (g)</b>	489 $\pm$ 12	246 $\pm$ 6.8§§	250 $\pm$ 5.2§§
<b>HG (mg)</b>	1205 $\pm$ 29.5	847 $\pm$ 17.7§§	831 $\pm$ 19.3§§
<b>LV (mg)</b>	874 $\pm$ 19.0	580 $\pm$ 16.9§§	595 $\pm$ 16.7§§
<b>HG/KG</b>	2.48 $\pm$ 0.05	3.46 $\pm$ 0.09§§	3.32 $\pm$ 0.07§§
<b>LV/HG</b>	0.724 $\pm$ 0.01	0.683 $\pm$ 0.01*,§	0.716 $\pm$ 0.01

#### 4.2. Der humane Apolipoprotein AI Gentransfer

Die Anhebung des *hApoAI*-Spiegels und damit der HDL-C Konzentration erfolgte mittels eines *hApoAI* Gentransfers (Van Linthout S *et al.* 2002), welcher 5 d nach der Induktion des DM injiziert wurde. Die *SD/STZ/Ad.hApoAI* Ratten zeigten über die gesamte Versuchsdauer stabile *hApoAI*-Spiegel im Plasma, 6 w nach dem Gentransfer betrug die Konzentration über  $95 \text{ mg/dl} \pm 24 \text{ mg/dl}$  (Abbildung 6).



**Abbildung 6: Humaner Apolipoprotein AI-Spiegel.**

Zeitlicher Verlauf des humanen Apolipoprotein AI (*hApoAI*) Spiegel post Gentransfer. (n=5 pro Zeitpunkt).

#### 4.3. Die Effekte des humanen Apolipoprotein AI Gentransfers auf die Lipidfraktionen.

Am Ende der Experimente, 49 d nach STZ-Injektion, erfolgte die Bestimmung der Lipid-Fractionen im Plasma. Die diabetischen *SD/STZ/Ad.Null* Ratten wiesen vs. der nicht-diabetischen Gruppe einen signifikanten 1,5 fachen Anstieg ( $p < 0.005$ ) der HDL-C Spiegel, einen signifikanten 3,8-fachen Anstieg ( $p < 0.005$ ) der Gesamtcholesterin Konzentration, einen signifikanten 8,6-fachen Anstieg ( $p < 0.005$ ) der VLDL-C Konzentration, einen signifikanten 27-fachen Anstieg ( $p < 0.005$ ) der IDL-C Konzentration, einen signifikanten 15-fachen Anstieg ( $p < 0.005$ ) der LDL-C Konzentration und einen signifikanten 13-fachen Anstieg ( $p < 0.005$ ) der TG-Konzentration, auf. Die diabetische *hApoAI* exprimierende Gruppe zeigte 1,6-fach ( $p < 0.001$ ) höhere HDL-C Werte als die diabetische Kontrollgruppe *SD/STZ/Ad.Null*. Die *SD/STZ/Ad.hApoAI* Ratten wiesen vs. den *SD/STZ/Ad.Null* Ratten eine Verringerung der VLDL-C Konzentration um das 1,8-fache ( $p < 0.0005$ ), der IDL-C Konzentration um das 1,9-fache ( $p < 0.01$ ) und der TG Konzentration um das 2,8-fache ( $p < 0.01$ ) auf. In der

Gesamtcholesterin und LDL-C Konzentration gab es zwischen den beiden diabetischen Gruppen keine signifikanten Unterschiede (Tabelle 8).

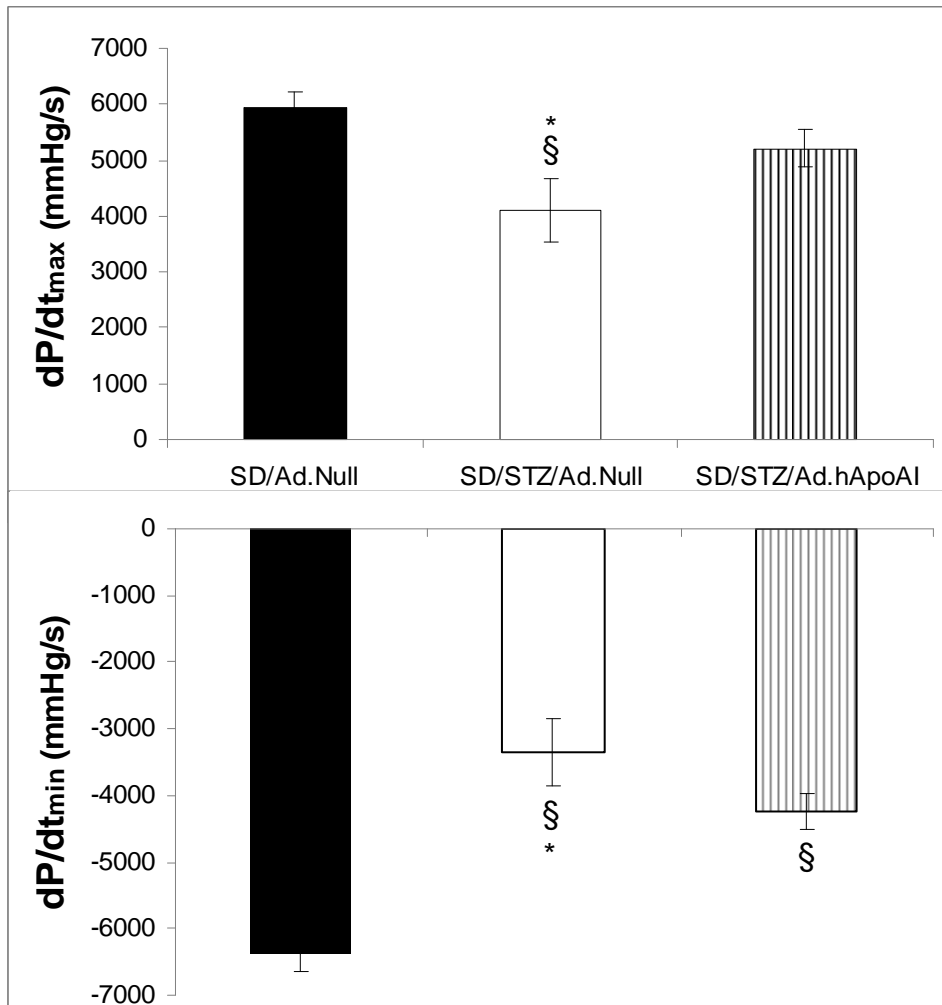
**Tabelle 8: Die Konzentration der einzelnen Lipidfraktionen**

Darstellung der Konzentrationen der einzelnen Lipidfraktionen: Gesamt-Cholesterin (Total-C), Very low-density Lipoprotein Cholesterin (VLDL-C), Intermediär-density Lipoprotein Cholesterin (IDL-C), Low-density Lipoprotein Cholesterin (LDL-C), High-density Lipoprotein Cholesterin (HDL-C) und Triglyceride (TG). Erläuterung zu den Gruppen: Normoglykämische Sprague Dawley Ratten mit nackten adenoviralen Vektor (*SD/Ad.Null*), Streptozotocin induzierte diabetische Ratten mit nackten adenoviralen Vektor (*SD/STZ/Ad.Null*) und mit humanem Apolipoprotein A1 exprimierenden adenoviralen Vektor (*SD/STZ/Ad.hApoA1*); § $P \leq 0.0005$  vs. *SD/STZ/Ad.Null*, §§ $P < 0.01$  vs. *SD/STZ/Ad.Null* und \* $P < 0.005$  vs. *SD/Ad.Null* (n=8 pro Tiergruppe).

	<i>SD/Ad.Null</i>	<i>SD/STZ/Ad.Null</i>	<i>SD/STZ/Ad.hApoA1</i>
<b>Total-C</b> (mg/dl)	35 ± 2.8	140 ± 8.1*	130 ± 7.6*
<b>VLDL-C</b> (mg/dl)	3.1 ± 0.53	27 ± 1.9*	15 ± 1.7*,§
<b>IDL-C</b> (mg/dl)	1.1 ± 0.07	30 ± 4.4*	16 ± 1.7*,§§
<b>LDL-C</b> (mg/dl)	2.7 ± 0.3	40 ± 4.4*	31 ± 4.1*
<b>HDL-C</b> (mg/dl)	28 ± 2.5	42 ± 2.4*	68 ± 5.1*,§
<b>Non-HDL-C/HDL-C</b>	0.26 ± 0.021	2.44 ± 0.28*	0.97 ± 0.11*,§
<b>TG</b> (mg/dl)	77 ± 11	990 ± 170*	360 ± 65*,§§

#### 4.4. Der Einfluss des humanen Apolipoprotein A1 Gentransfers auf die linksventrikuläre Pumpfunktion

Zur Charakterisierung des Einflusses des hApoA1 Gentransfers auf die LV Pumpfunktion, konzentrierte ich mich auf die Parameter  $dP/dt_{max}$ , als Maß der maximalen LV Kontraktion sowie  $dP/dt_{min}$ , als Maß der Relaxation des LV. Dabei war  $dP/dt_{max}$  bei der diabetischen *SD/STZ/Ad.Null* Gruppe um das 1.4-fache ( $p < 0.005$ ) vs. der nicht-diabetischen Kontrollgruppe reduziert. Im Vergleich zu der diabetischen *SD/STZ/Ad.Null* Gruppe, zeigten die mit dem *hApoA1* Gentransfer behandelten Ratten eine um das 1.3-fache ( $p < 0.005$ ) verbesserte LV  $dP/dt_{max}$ . Die LV  $dP/dt_{min}$ , als Maß für die Relaxation des LV, war bei der diabetischen Gruppe *SD/STZ/Ad.Null* signifikant um das 1.9-fache ( $p < 0.005$ ) vs. der nicht-diabetischen Kontrolle vermindert. Die mit *hApoA1* Gentransfer behandelte diabetische Gruppe *SD/STZ/Ad.hApoA1* zeigte eine 1.3-fache ( $p < 0.05$ ) Verbesserung der LV  $dP/dt_{min}$  vs. der *SD/STZ/Ad.Null* Gruppe (Abbildung 7).

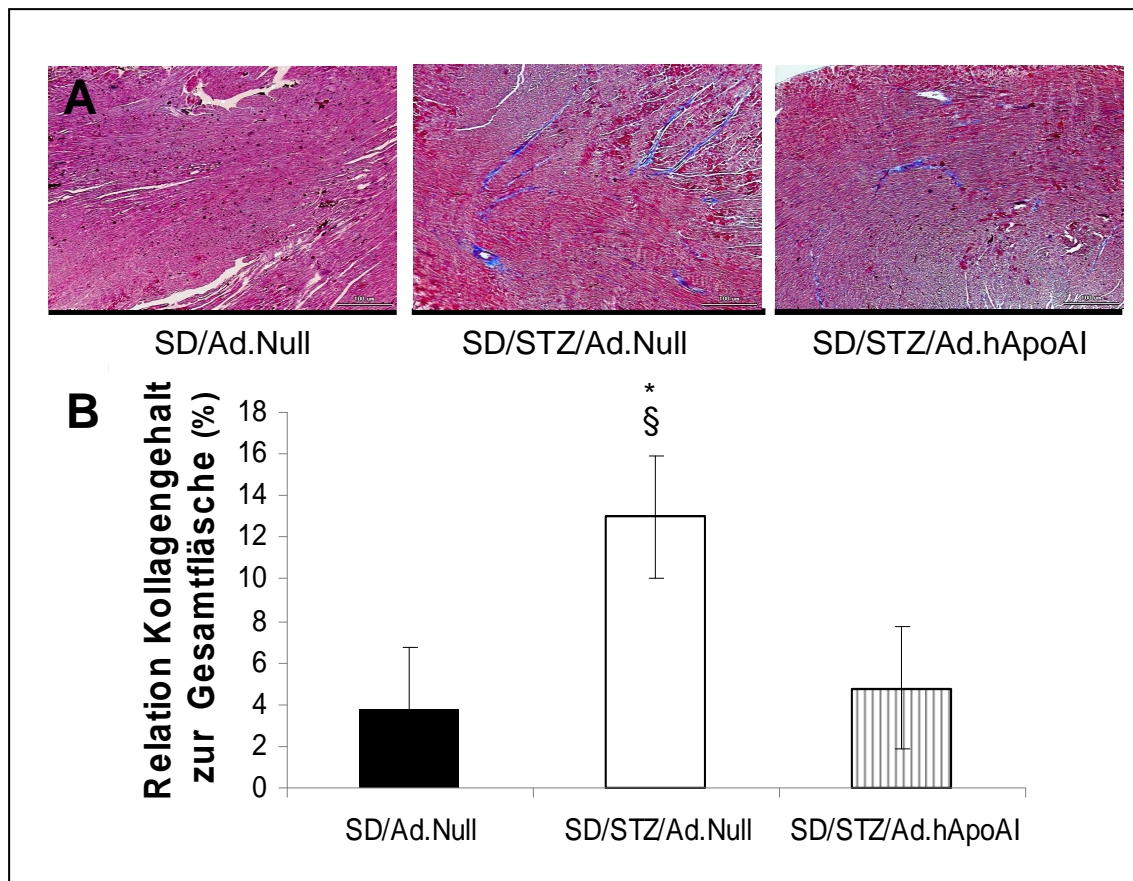


**Abbildung 7: Die linksventrikulären Kontraktionsparameter**

Dargestellt ist die linksventrikuläre Druckanstiegsgeschwindigkeit (LV  $dP/dt_{max}$ ) und die linksventrikuläre Druckabfallsgeschwindigkeit (LV  $dP/dt_{min}$ ), der verschiedenen Gruppen: Normoglykämische Sprague Dawley Ratten mit nackten adenoviralen Vektor (SD/Ad.Null), Streptozotocin induzierte diabetische Ratten mit nackten adenoviralen Vektor (SD/STZ/Ad.Null) und mit humanem Apolipoprotein AI exprimierenden adenoviralen Vektor (SD/STZ/Ad.hApoAI); § $P < 0.005$  vs. SD/Ad.Null und \* $P < 0.05$  vs. SD/STZ/Ad.hApoAI (n=13 pro Tiergruppe).

#### 4.5. Die Effekte des humanen Apolipoprotein AI Gentransfers auf den myokardialen Kollagengehalt

Bei nachgewiesener Verbesserung der Hämodynamik durch den *hApoAI* Gentransfer, analysierte ich die extrazelluläre Matrix. Mit Hilfe der Azan Mallory Färbung erfolgte die Quantifizierung des kardialen Kollagenanteils. Die SD/STZ/Ad.Null Gruppe wies eine Zunahme des Kollagengehalts um das 2.1-fache ( $p < 0.05$ ) vs. der SD/Ad.Null Kontrolle auf. Die SD/STZ/Ad.hApoAI Herzen zeigten eine 1.7-fache ( $p < 0.05$ ) Abnahme des Kollagengehalts vs. der SD/STZ/Ad.Null und wiesen keinen signifikanten Unterschied des Kollagengehalts vs. den nicht-diabetischen SD/Ad.Null Kontrollen (Abbildung 8).



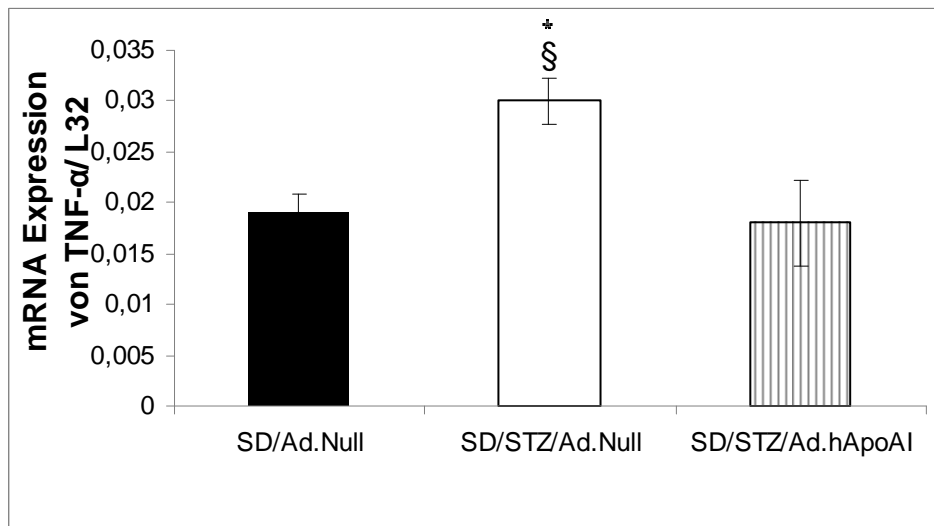
**Abbildung 8: Die Effekte von Apolipoprotein AI Gentransfer auf den kardialen Kollagengehalt beim Streptozotocin-induzierten Diabetes mellitus**

A: Repräsentative Bilder der Azan Mallory-Färbung von SD/Ad.Null, SD/STZ/Ad.Null und SD/STZ/Ad.hApoAI Herzen, bei einer Vergrößerung von x50, Kollagen ist blau dargestellt.

B: Das Diagramm zeigt den Kollagengehalt in Prozent (%) der Gesamtfläche. Erläuterung zu den Gruppen: Normoglykämische Sprague Dawley Ratten mit nackten adenoviralen Vektor (SD/Ad.Null), Streptozotocin induzierte diabetische Ratten mit nackten adenoviralen Vektor (SD/STZ/Ad.Null) und mit humanem Apolipoprotein AI exprimierenden adenoviralen Vektor (SD/STZ/Ad.hApoAI); §P<0.05 vs. SD/Ad.Null und \*P<0.05 vs. SD/STZ/Ad.hApoAI (n=7 pro Tiergruppe).

#### 4.6. Die Effekte des humanen Apolipoprotein AI Gentransfers auf die myokardiale Zytokin-Expression

Als Marker für die myokardiale Entzündung diene unter anderem die Bestimmung der Expression des pro-inflammatorischen Zytokins  $TNF-\alpha$ . Die diabetischen SD/STZ/Ad.Null Ratten zeigten hierbei eine signifikante Erhöhung um das 1.6-fache ( $p<0.05$ ) vs. den SD/Ad.Null Ratten auf. Im Vergleich zu den diabetischen Kontrollen, zeigten die hApoAI exprimierenden Ratten eine signifikant verringerte  $TNF-\alpha$  mRNA-Expression um das 1.7-fache ( $p<0.05$ ). Damit gab es keine signifikanten Unterschiede der  $TNF-\alpha$  mRNA-Expression der SD/STZ/Ad.hApoAI Ratten vs. der nicht-diabetischen Ratten (Abbildung 9).



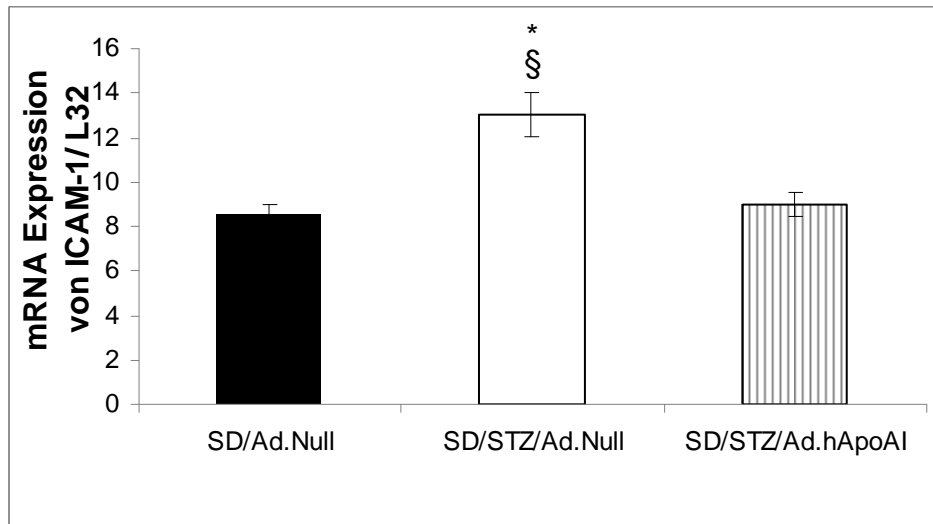
#### Abbildung 9: Die myokardiale Tumor Nekrose Faktor- $\alpha$ Expression

Dargestellt ist die *Tumor Nekrose Faktor- $\alpha$*  (TNF- $\alpha$ ) messenger Ribonukleinsäure (mRNA) Expression in Bezug auf das Referenzgen L32. Erläuterung zu den Gruppen: Normoglykämische Sprague Dawley Ratten mit nackten adenoviralen Vektor (SD/Ad.Null), Streptozotocin induzierte diabetische Ratten mit nackten adenoviralen Vektor (SD/STZ/Ad.Null) und mit humanem Apolipoprotein AI exprimierenden adenoviralen Vektor (SD/STZ/Ad.hApoAI); §P<0.05 vs. SD/Ad.Null und \*P<0.05 vs. SD/STZ/Ad.hApoAI (n=6 pro Tiergruppe).

#### 4.7. Die Effekte des humanen Apolipoprotein AI Gentransfers auf die myokardiale Expression der Adhäsionsmoleküle und immunhistochemischer Nachweis

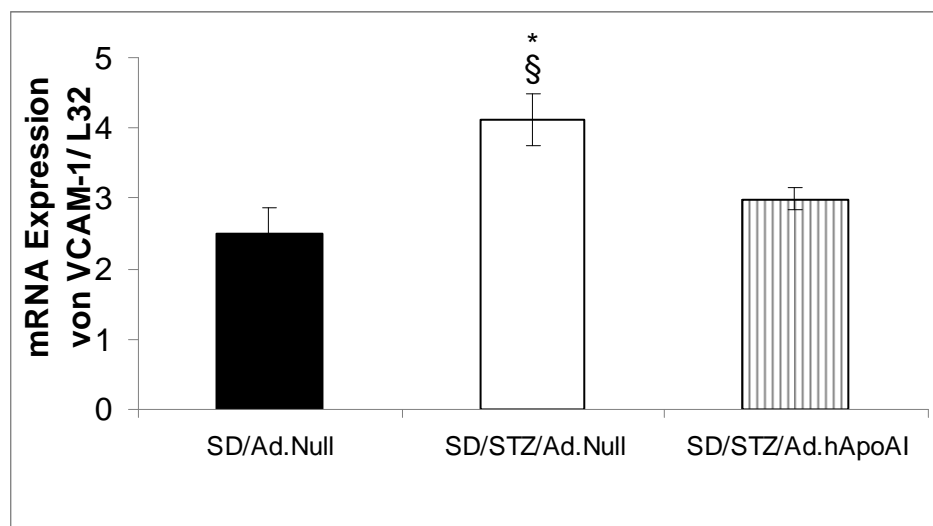
Um die Gefäßintegrität nachzuweisen wurden die mRNA Konzentrationen der Adhäsionsmoleküle *ICAM-1* und *VCAM-1* untersucht. Dabei wiesen die SD/STZ/Ad.Null Herzen eine signifikant erhöhte mRNA-Expression von *ICAM-1* und *VCAM-1* um das 1.5-fache ( $p<0.05$ ) bzw. 1.6-fache ( $p<0.05$ ) vs. der SD/Ad.Null Gruppe auf. Der Gentransfer mit *hApoAI* führte zu einer signifikanten Reduzierung der mRNA-Expression der Adhäsionsmoleküle *ICAM-1* und *VCAM-1* um das 1.4-fache ( $p<0.05$ ) vs. der SD/STZ/Ad.Null Gruppe. Zwischen der SD/STZ/hApoAI Gruppe und der normoglykämischen Kontrolle gab es keine signifikanten Unterschiede der *ICAM-1* und *VCAM-1* mRNA-Expression (Abbildung 10 und 11).





#### Abbildung 10: Die interzelluläre Adhäsionsmolekül-1 Expression

Dargestellt ist die interzelluläre Adhäsionsmolekül-1 (ICAM-1) messenger Ribonukleinsäure (mRNA) Expression in Bezug auf das Referenzgen L32. Erläuterung zu den Gruppen: Normoglykämische Sprague Dawley Ratten mit nackten adenoviralen Vektor (SD/Ad.Null), Streptozotocin induzierte diabetische Ratten mit nackten adenoviralen Vektor (SD/STZ/Ad.Null) und mit humanem Apolipoprotein AI exprimierenden adenoviralen Vektor (SD/STZ/Ad.hApoAI); §P<0.05 vs. SD/Ad.Null und \*P<0.05 vs. SD/STZ/Ad.hApoAI (n=5 pro Tiergruppe).

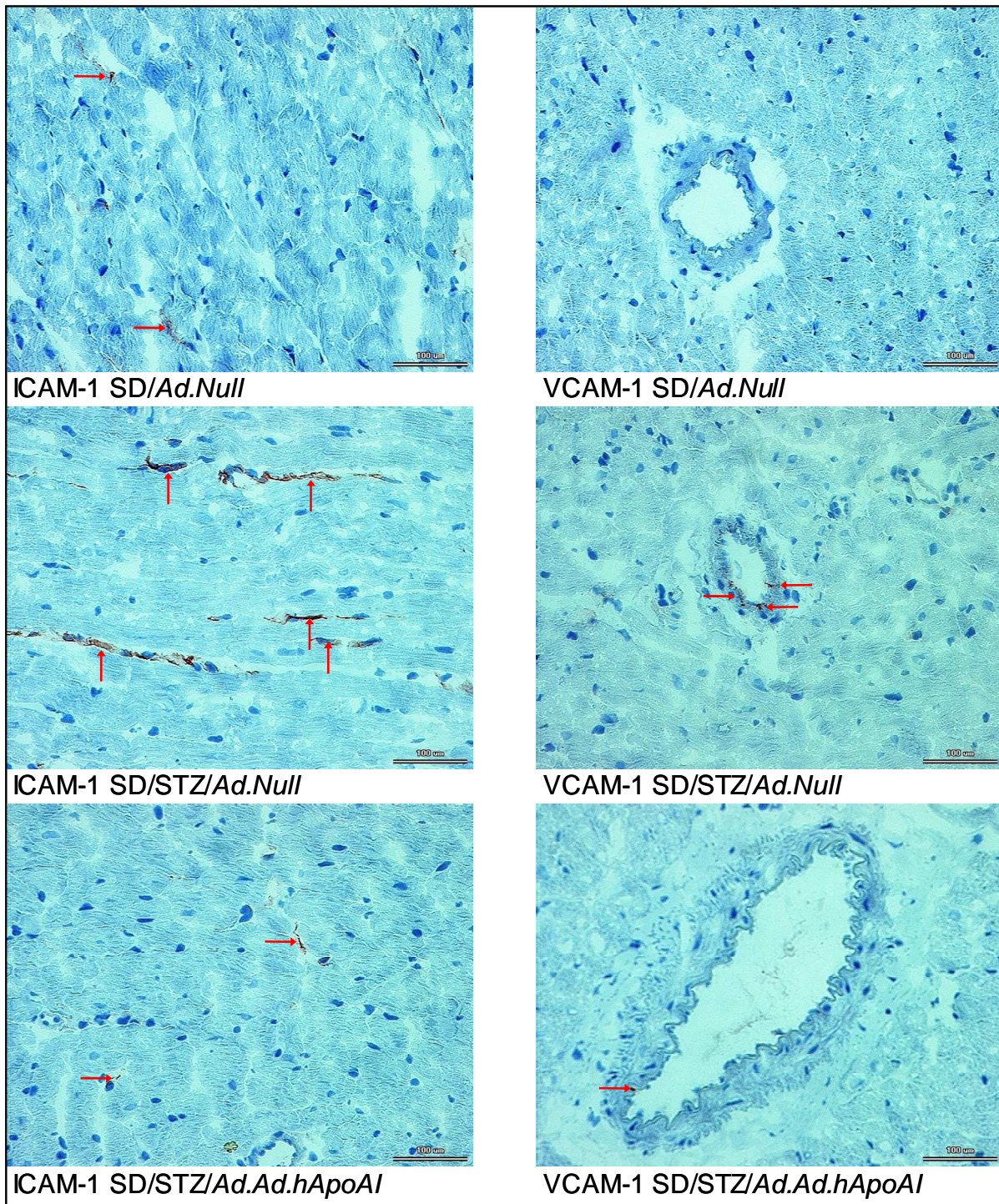


#### Abbildung 11: Die vaskuläre Adhäsionsmolekül-1 Expression

Dargestellt ist die vaskuläre Adhäsionsmolekül-1 (VCAM-1) messenger Ribonukleinsäure (mRNA) Expression in Bezug auf das Referenzgen L32. Erläuterung zu den Gruppen: Normoglykämische Sprague Dawley Ratten mit nackten adenoviralen Vektor (SD/Ad.Null), Streptozotocin induzierte diabetische Ratten mit nackten adenoviralen Vektor (SD/STZ/Ad.Null) und mit humanem Apolipoprotein AI exprimierenden adenoviralen Vektor (SD/STZ/Ad.hApoAI); §P<0.05 vs. SD/Ad.Null und \*P<0.05 vs. SD/STZ/Ad.hApoAI (n=5 pro Tiergruppe).

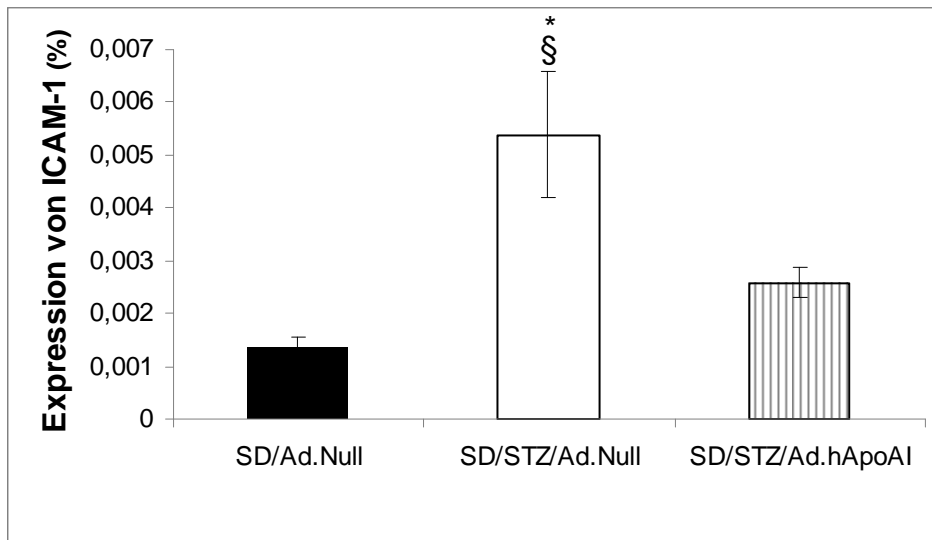
Korrelierend zu den Daten der mRNA-Expression von *ICAM-1* und *VCAM-1*, fand ich auch auf Proteinebene eine erhöhte Expression der Adhäsionsmoleküle, welche mittels Immunhistologie untersucht wurden. Dabei zeigten die diabetischen *SD/STZ/Ad.Null* Herzen vs. den normoglykämischen *SD/Ad.Null* Herzen, eine vermehrte Expression von *ICAM-1* und *VCAM-1*. Die *SD/STZ/Ad.hApoAI* Gruppe hingegen, wies vs. der diabetischen Kontrolle eine deutlich verminderte Expression beider Adhäsionsmoleküle (Abbildung 12 a) auf.

Zudem erfolgte die Quantifizierung der immunohistochemischen Färbungen mittels eines digitalen Bildanalyse-Verfahrens. Dazu wurde bei einer Vergrößerung von 1:400 die ermittelte Fläche der immunhistochemisch angefärbten Areale in prozentuale Relation zur reinen Myokardfläche gesetzt. Die diabetische *SD/STZ/Ad.Null* Gruppe wies eine signifikante Erhöhung der *ICAM-1* und *VCAM-1* um das 3.9-fache ( $p < 0.05$ ) bzw. 1.9-fache ( $p < 0.05$ ) vs. der *SD/Ad.Null* Kontrollgruppe auf. Die mit dem hApoAI Gentransfer behandelten diabetischen Ratten, *SD/STZ/Ad.hApoAI*, zeigten eine signifikante Abnahme der Expression von *ICAM-1* und *VCAM-1* um das 2.1-fache ( $p < 0.05$ ) bzw. 1.7-fache ( $p < 0.05$ ) vs. den diabetischen *SD/STZ/Ad.Null* Ratten (sowie Abbildung 12 b und 12 c).



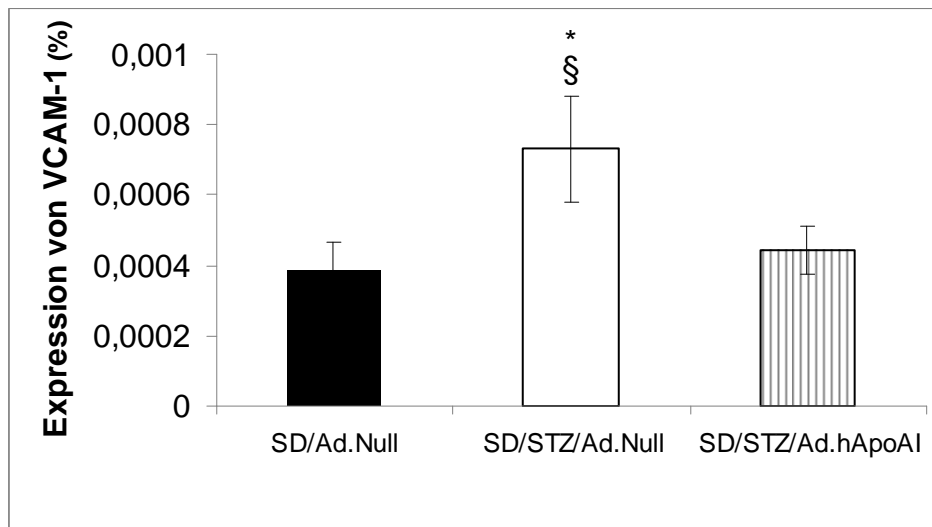
### Abbildung 12 a: Immunhistochemischer Nachweis der Adhäsionsmoleküle

Repräsentative Bilder der immunhistochemischen Färbung. Die nachgewiesenen Adhäsionsmoleküle sind rot dargestellt (mit roten Pfeilen markiert) und lassen sich gut vom blau gefärbten Gewebe und den dunkelblau gefärbten Zellkernen abgrenzen. Vergrößerung jeweils 1:400. Interzelluläres Adhäsionsmolekül-1 (ICAM-1), vaskuläres Adhäsionsmolekül-1 (VCAM-1). Erläuterung zu den Gruppen: Normoglykämische Sprague Dawley Ratten mit nackten adenoviralen Vektor (SD/Ad.Null), Streptozotocin induzierte diabetische Ratten mit nackten adenoviralen Vektor (SD/STZ/Ad.Null) und mit humanem Apolipoprotein AI exprimierenden adenoviralen Vektor (SD/STZ/Ad.hApoAI).



**Abbildung 12 b: Quantifizierung der interzellulären Adhäsionsmolekül-1 Expression auf Proteinebene**

Quantifizierung der immunhistologischen Auswertung vom interzellulärem Adhäsionsmolekül-1 (ICAM-1), als prozentuale Relation (%) der ICAM-1 gefärbten Fläche zur reinen Myokardfläche. Erläuterung zu den Gruppen: Normoglykämische Sprague Dawley Ratten mit nackten adenoviralen Vektor (SD/Ad.Null), Streptozotocin induzierte diabetische Ratten mit nackten adenoviralen Vektor (SD/STZ/Ad.Null) und mit humanem Apolipoprotein AI exprimierenden adenoviralen Vektor (SD/STZ/Ad.hApoAI); §P<0.05 vs. SD/Ad.Null und \*P<0.05 vs. SD/STZ/Ad.hApoAI (n=12 pro Tiergruppe).

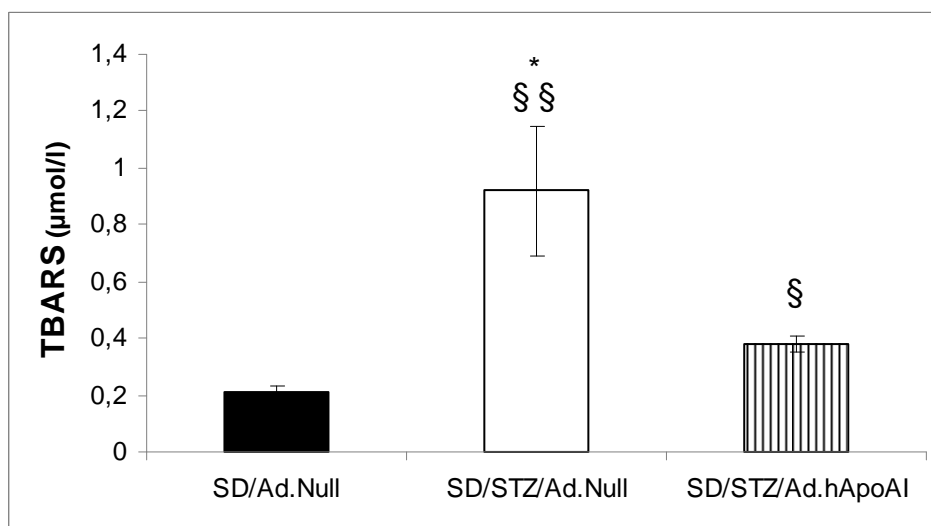


**Abbildung 12 c: Quantifizierung der vaskulären Adhäsionsmolekül-1 Expression auf Proteinebene**

Quantifizierung der immunhistologischen Auswertung vom vaskulärem Adhäsionsmolekül-1 (VCAM-1), als prozentuale Relation (%) der VCAM-1 gefärbten Fläche zur reinen Myokardfläche. Die Gruppen: Normoglykämische Sprague Dawley Ratten mit nackten adenoviralen Vektor (SD/Ad.Null), Streptozotocin induzierte diabetische Ratten mit nackten adenoviralen Vektor (SD/STZ/Ad.Null) und mit humanem Apolipoprotein AI exprimierenden adenoviralen Vektor (SD/STZ/Ad.hApoAI); §P<0.05 vs. SD/Ad.Null und \*P<0.05 vs. SD/STZ/Ad.hApoAI (n=12 pro Tiergruppe).

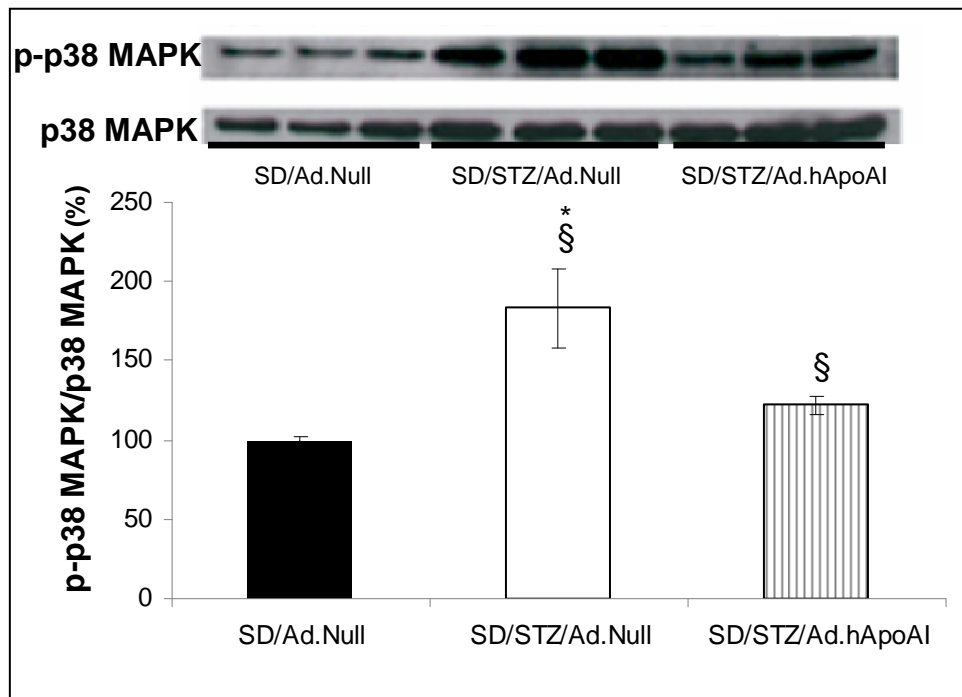
#### 4.8. Die Effekte des humanen Apolipoprotein AI Gentransfers auf den oxidativen Stress

Als Maß für die Lipidoxidation und damit Ausdruck für den oxidativen Stress, wurden die TBARS Konzentrationen im Plasma quantifiziert. Diese war bei den *SD/STZ/Ad.Null* Ratten um das 4.3-fache ( $p < 0.005$ ) vs. der *SD/Ad.Null* Kontrollgruppe erhöht. Der hApoAI Gentransfer führte zu einer 2.4-fachen ( $p < 0.05$ ) Verringerung der TBARS-Konzentration vs. den *SD/Ad.Null* Ratten (Abbildung 13). Ebenfalls als Marker für den oxidativen Stress wurde der Grad der Phosphorylierung der myokardialen p38 MAPK bestimmt. Die diabetische *SD/STZ/Ad.Null* Gruppe wies vs. der *SD/Ad.Null* Gruppe, eine 1.9-fache ( $p < 0.05$ ) Erhöhung des Verhältnisses vom phosphoryliertem zum unphosphoryliertem p38 MAPK. Dieser Wert war bei den hApoAI exprimierenden Ratten um das 1.5-fache ( $p < 0.05$ ) vs. den *SD/STZ/Ad.Null* Kontrollen reduziert (Abbildung 14).



**Abbildung 13: Quantifizierung des Total radical antioxidant potential**

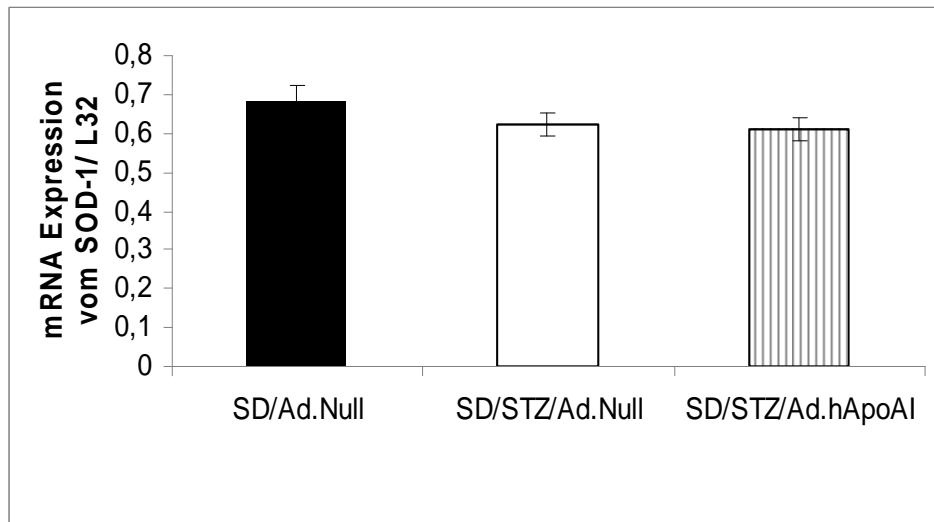
Plasmaspiegel des total radical antioxidant potential (TBARS) in Relation zu 1,1,3,3-Tetraethoxypropan. Erläuterung zu den Gruppen: Normoglykämische Sprague Dawley Ratten mit nackten adenoviralen Vektor (*SD/Ad.Null*), Streptozotocin induzierte diabetische Ratten mit nackten adenoviralen Vektor (*SD/STZ/Ad.Null*) und mit humanem Apolipoprotein AI exprimierenden adenoviralen Vektor (*SD/STZ/Ad.hApoAI*); § $P < 0.05$  *SD/Ad.Null*, §§ $P < 0.005$  vs. *SD/Ad.Null* und \* $P < 0.05$  vs. *SD/STZ/Ad.hApoAI* ( $n=4$  pro Tiergruppe).



**Abbildung 14: Quantifizierung des Phosphorylierungsgrades der p38 Mitogen activating protein kinase**

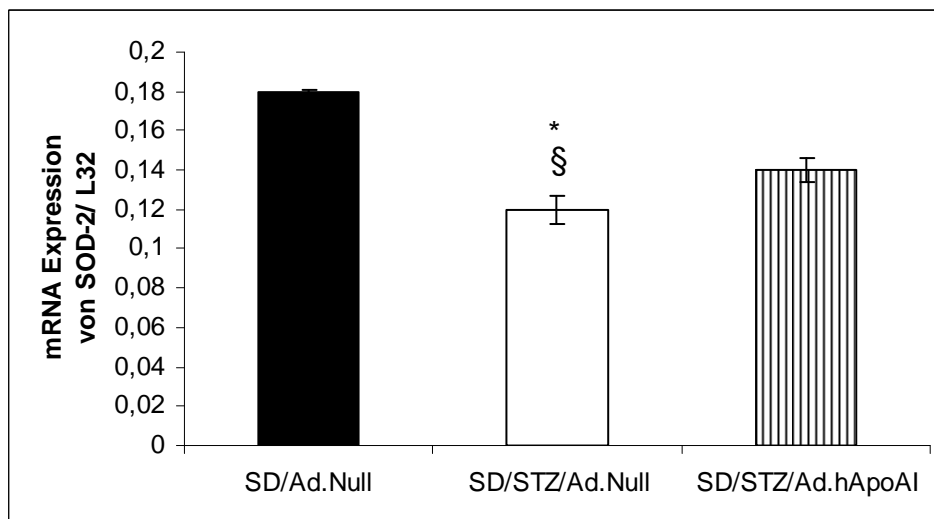
Verhältnis vom phosphoryliertem zu unphosphoryliertem p38 Mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK) der unterschiedlichen Gruppen. Die Messung erfolgte mittels Western Blot (jeweils 3 repräsentative Banden pro Gruppe) und als Diagramm in prozentueller Abweichung von der nicht-diabetischen Kontrollgruppe *SD/Ad.Null* veranschaulicht. Erläuterung zu den Gruppen: Normoglykämische Sprague Dawley Ratten mit nackten adenoviralen Vektor (*SD/Ad.Null*), Streptozotocin induzierte diabetische Ratten mit nackten adenoviralen Vektor (*SD/STZ/Ad.Null*) und mit humanem Apolipoprotein AI exprimierenden adenoviralen Vektor (*SD/STZ/Ad.hApoAI*); § $P < 0.05$  vs. *SD/Ad.Null* und \* $P < 0.05$  vs. *SD/STZ/Ad.hApoAI* ( $n=4$  pro Tiergruppe).

Beim oxidativen Stress besteht unter anderem ein Missverhältnis zwischen oxidativen und anti-oxidativen Metaboliten. Dabei gehören die Superoxid Dismutasen (SOD) zu den wichtigsten anti-oxidativ wirkenden Enzymen. Ich untersuchte die mRNA Expression im LV von der zytoplasmatischen *SOD-1*, der mitochondrialen *SOD-2* und der endothelial lokalisierten *ec-SOD*. So zeigten die diabetischen *SD/STZ/Ad.Null* Herzen eine Abnahme von *SOD-2* und *ec-SOD* mRNA-Konzentration um das 1.6-fache ( $p < 0.05$ ) bzw. 1.8-fache ( $p < 0.05$ ) vs. der *SD/Ad.Null* Kontrolle. Die *hApoAI* exprimierenden Ratten zeigten eine signifikante Steigerung der mRNA-Expression von *SOD-2* und *ec-SOD* Expression um das 1.2-fache ( $p < 0.05$ ) bzw. 1.5-fache ( $p < 0.005$ ) vs. der *SD/STZ/Ad.Null* Gruppe. Keine signifikanten Unterschiede zeigten sich in der *SOD-1*-mRNA-Expression in allen drei Gruppen (Abbildung 15 a-c).



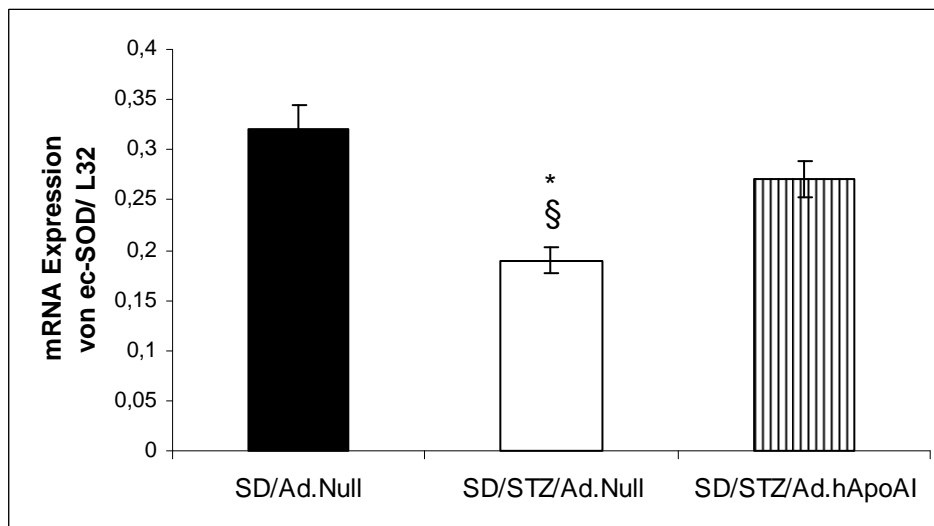
#### Abbildung 15 a: Expression der Superoxid Dismutase-1

Das Diagramm zeigt die Superoxid Dismutase-1 (SOD-1) messenger Ribonukleinsäure (mRNA) in Bezug auf das Referenzgen L32. Erläuterung zu den Gruppen: Normoglykämische Sprague Dawley Ratten mit nackten adenoviralen Vektor (*SD/Ad.Null*), Streptozotocin induzierte diabetische Ratten mit nackten adenoviralen Vektor (*SD/STZ/Ad.Null*) und mit humanem Apolipoprotein AI exprimierenden adenoviralen Vektor (*SD/STZ/Ad.hApoAI*). (n=6 pro Tiergruppe).



#### Abbildung 15 b: Expression der Superoxid Dismutase-2

Das Diagramm zeigt die Superoxid Dismutase-2 (SOD-2) messenger Ribonukleinsäure (mRNA) in Bezug auf das Referenzgen L32. Erläuterung zu den Gruppen: Normoglykämische Sprague Dawley Ratten mit nackten adenoviralen Vektor (*SD/Ad.Null*), Streptozotocin induzierte diabetische Ratten mit nackten adenoviralen Vektor (*SD/STZ/Ad.Null*) und mit humanem Apolipoprotein AI exprimierenden adenoviralen Vektor (*SD/STZ/Ad.hApoAI*); §P<0.005 vs. *SD/Ad.Null* und \*P<0.05 vs. *SD/STZ/Ad.hApoAI* (n=4 pro Tiergruppe).



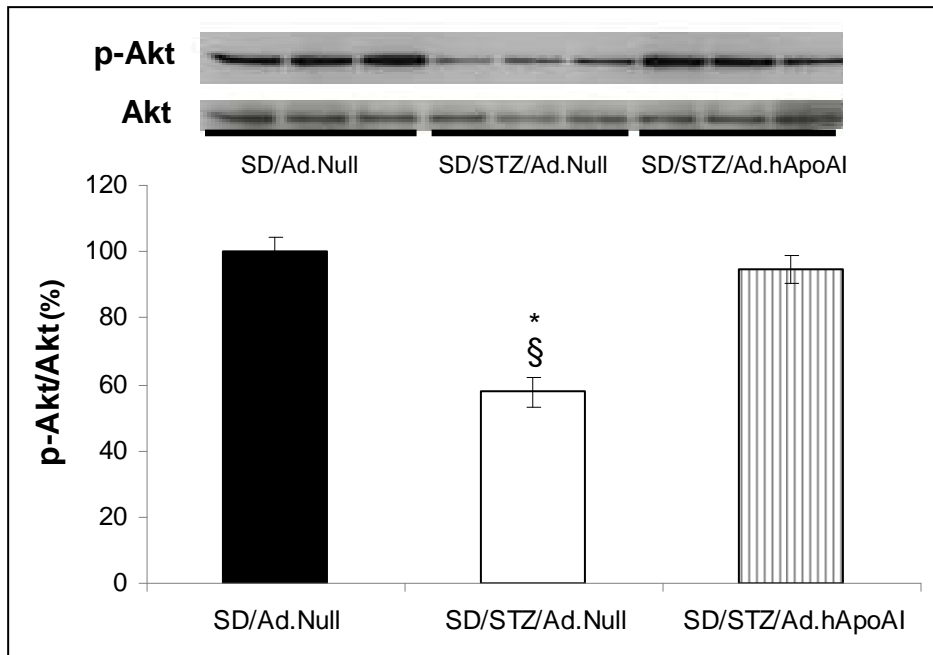
**Abbildung 15 c: Expression der extrazellulären Superoxid Dismutase**

Das Diagramm zeigt die extrazelluläre Superoxid Dismutase (ec-SOD) messenger Ribonukleinsäure (mRNA) in Bezug auf das Referenzgen L32. Erläuterung zu den Gruppen: Normoglykämische Sprague Dawley Ratten mit nackten adenoviralen Vektor (SD/Ad.Null), Streptozotocin induzierte diabetische Ratten mit nackten adenoviralen Vektor (SD/STZ/Ad.Null) und mit humanem Apolipoprotein AI exprimierenden adenoviralen Vektor (SD/STZ/Ad.hApoAI); § $P < 0.005$  vs. SD/Ad.Null und \* $P < 0.005$  vs. SD/STZ/Ad.hApoAI (n=5 pro Tiergruppe).

#### 4.9. Die Effekte des humanen Apolipoprotein AI Gentransfers auf die Phosphorylierung der Proteinkinase B und die endotheliale Nitric oxide synthase

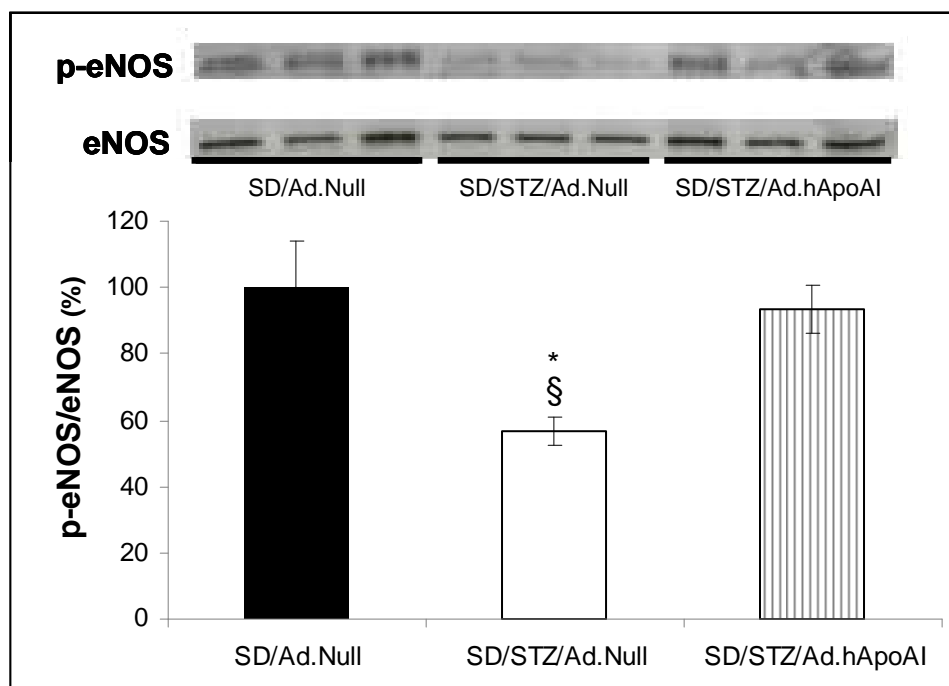
Die Akt ist ein Schlüsselenzym bei der Aktivierung zahlreicher Enzyme, so phosphoryliert sie über die Phosphatidylinositol-3-Kinasen (PI3K) die eNOS und wandelt sie somit in die aktive Form um, welche wiederum über die Bildung von NO anti-inflammatorisch wirken kann. Der Aktivierungsgrad von Akt und eNOS wurde mittels Westernblot durch die Quantifizierung des Verhältnisses von phosphoryliertem (p) zu unphosphoryliertem Akt bzw. eNOS bestimmt. Die diabetische SD/STZ/Ad.Null Gruppe wies eine Abnahme des p-Akt/Akt-Verhältnisses um das 1.7-fache ( $p < 0.0005$ ) vs. der normoglykämischen Kontrollgruppe auf. Die SD/STZ/Ad.hApoAI Gruppe zeigte eine 1.6-fache ( $p < 0.0005$ ) Erhöhung des Quotienten p-Akt/Akt vs. der SD/STZ/Ad.Null Gruppe (Abbildung 16). Die SD/STZ/Ad.Null Herzen hatten ein um 1.8-fach ( $p < 0.05$ ) reduziertes Verhältnis von phosphoryliertem zu unphosphoryliertem eNOS vs. der SD/Ad.Null. Die SD/STZ/Ad.hApoAI Herzen wiesen eine Steigerung des Verhältnisses von p-eNOS zu eNOS um das 1.6-fache ( $p < 0.005$ ) vs. den SD/STZ/Ad.Null Herzen auf (Abbildung 17). Darüber hinaus normalisiert der hApoAI Gentransfer die durch den DM verminderte Expression der eNOS (Abbildung 17).





**Abbildung 16: Quantifizierung des Phosphorylierungsgrades der Proteinkinase B**

Dargestellt ist das Verhältnis von p-Proteinkinase B (p-Akt) zu Proteinkinase B (Akt) der unterschiedlichen Gruppen. Die Messung erfolgte mittels Western Blot (jeweils 3 repräsentative Banden pro Gruppe) und als Diagramm in prozentualer Abweichung von der nicht-diabetischen Kontrollgruppe *SD/Ad.Null* veranschaulicht. Erläuterung zu den Gruppen: Normoglykämische Sprague Dawley Ratten mit nackten adenoviralen Vektor (*SD/Ad.Null*), Streptozotocin induzierte diabetische Ratten mit nackten adenoviralen Vektor (*SD/STZ/Ad.Null*) und mit humanem Apolipoprotein AI exprimierenden adenoviralen Vektor (*SD/STZ/Ad.hApoAI*); § $P < 0.0005$  vs. *SD/Ad.Null* und \* $P < 0.0005$  vs. *SD/STZ/Ad.hApoAI* ( $n=4$  pro Tiergruppe).



**Abbildung 17: Quantifizierung des Phosphorylierungsgrades der endothelialen Nitric oxide Synthase**

Dargestellt ist das Verhältnis von p-endotheliale Nitric oxide synthase (p-eNOS) zu endotheliale Nitric oxide synthase (eNOS), gemessen mittels Western Blot (jeweils 3 repräsentative Banden pro Gruppe) und dargestellt als Diagramm in prozentueller Abweichung von der nicht-diabetischen Kontrollgruppe *SD/Ad.Null*. Erläuterung zu den Gruppen: Normoglykämische Sprague Dawley Ratten mit nackten adenoviralen Vektor (*SD/Ad.Null*), Streptozotocin induzierte diabetische Ratten mit nackten adenoviralen Vektor (*SD/STZ/Ad.Null*) und mit humanem Apolipoprotein AI exprimierenden adenoviralen Vektor (*SD/STZ/Ad.hApoAI*); § $P < 0.05$  vs. *SD/Ad.Null* und \* $P < 0.005$  vs. *SD/STZ/Ad.hApoAI* ( $n=4$  pro Tiergruppe).

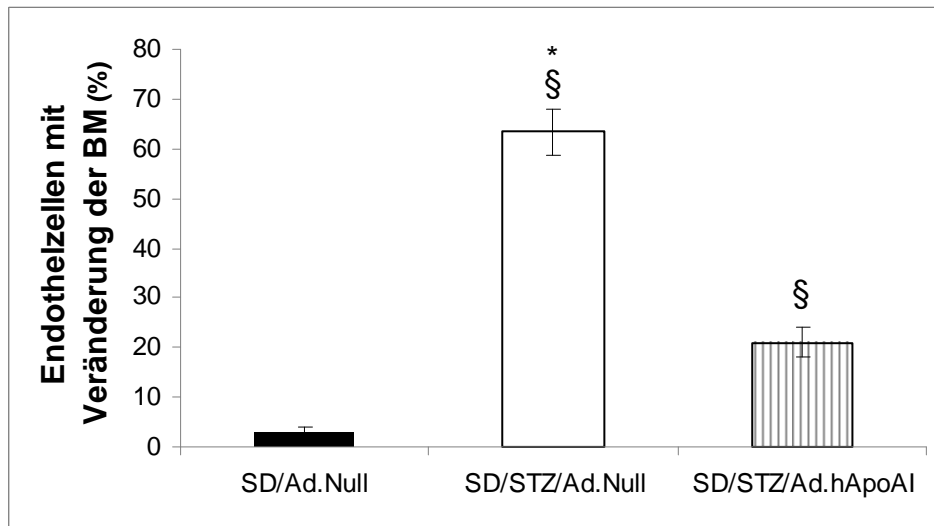
#### 4.10. Analyse zur zellulären Mikrostruktur mittels Elektronenmikroskopie

Um die Auswirkungen der diabetischen Kardiopathie auf mikrozellulärer Ebene zu untersuchen, führte ich in Kooperation mit Prof. Shakibaey, Institut für Anatomie der Charité – Universitätsmedizin Berlin, elektronenmikroskopische Untersuchungen der Endothelzellen und Kardiomyozyten durch. Zur Quantifizierung der am Endothel und Basalmembran (BM) hervorgerufenen Veränderungen, im Sinne von Destruktion und Auflösung, erfolgte die Auszählung geschädigter Endothelzellen. Dabei wurden pro untersuchtem Herz 100 Zellen von 20 verschiedenen mikroskopischen Feldern bei einer 200.000-fachen Vergrößerung ausgewertet. Hier zeigte sich bei den diabetischen SD/STZ/*Ad.Null* Herzen eine 21-fache ( $p < 0.0005$ ) Zunahme veränderter Endothelzellen vs. den SD/*Ad.Null* Kontrollen. Während die SD/STZ/*Ad.hApoA1* Herzen vs. den SD/STZ/*Ad.Null* Herzen 3.0-fach ( $p < 0.05$ ) weniger destruiertes Endothel und BM zeigten (Abbildung 18).

Die Integrität und Funktionalität des Endothels wird auch unter anderem durch den Nachweis von Endozytose charakterisiert. Bei den diabetischen Herzen ist vs. den nicht diabetischen Kontrollen die BM aufgedunsen, es ist weniger intakte BM zu sehen. Zudem ist kaum Endozytose nachweisbar. Dagegen sieht man bei den mit hApoA1 Gentransfer behandelten Herzen deutlich weniger destruierte BM. Auch ist eine deutliche Zunahme der Endozytose zu verzeichnen, welche sich kaum merklich zu den nicht diabetischen Herzen unterscheidet (Abbildung 19 D – F, mit den jeweils vergrößerten Bildausschnitten).

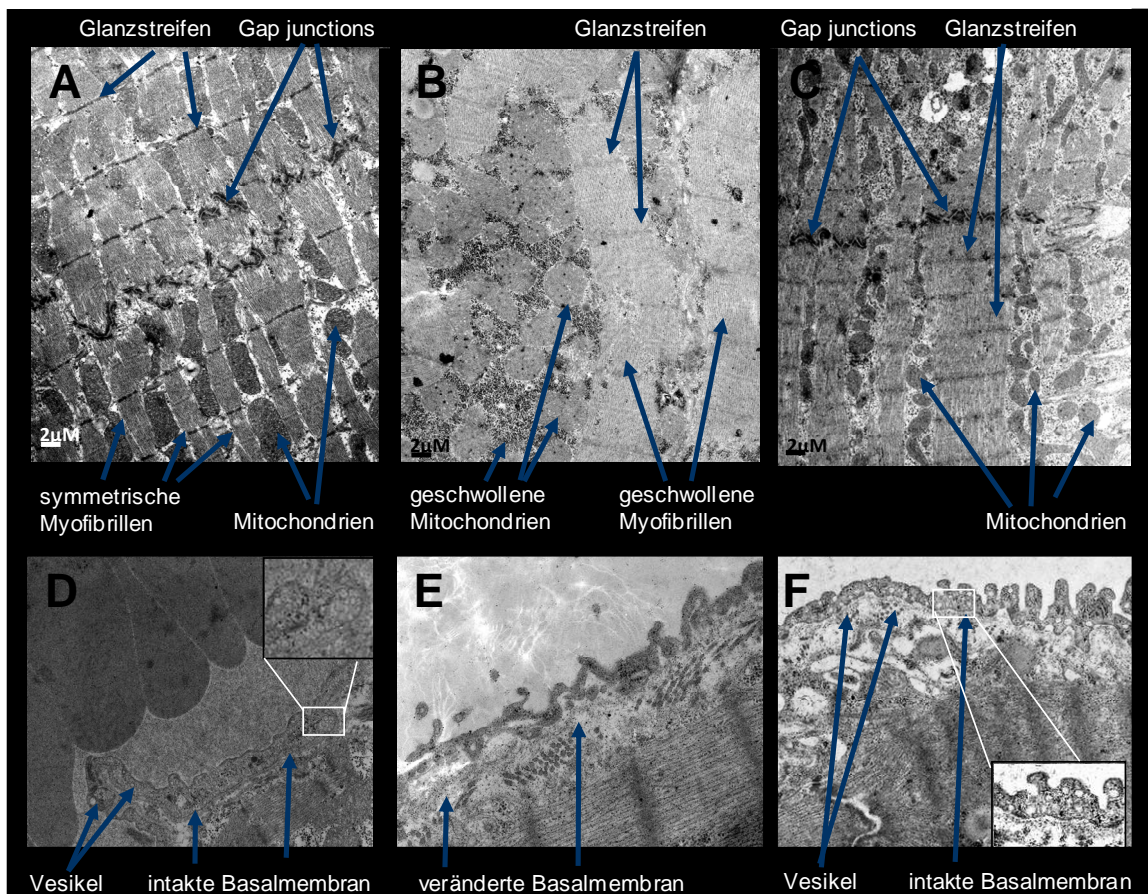
Darüber hinaus zeigte sich bei den diabetischen Ratten bezüglich des kontraktiven zellulären Ultrastrukturaufbaus der Kardiomyozyten eine nahezu komplette Auflösung der Aktin-Myosin-Filamentstruktur mit aufgedunsenem Aktin-Myosin-Grundgerüst und verstrichenem Glanzstreifen. Unter dem hApoA1 Gentransfer war die Ultrastruktur besser erhalten. So sind die einzelnen Aktin-Myosin-Filamente mit den Glanzstreifen deutlicher voneinander abgrenzbar und wirken intakt (Abbildung 19 A – C).

Weiteres Charakteristikum für die Schädigung der zellulären Ultrastruktur ist die Anordnung und Struktur der Mitochondrien. Bei den diabetischen Herzen zeigten sich ausgeprägt geschwollene, ödematöse, aufgedunsene Mitochondrien mit verstrichener Ultrastruktur der Mitochondrien. Deutlich besser erhaltene Ultrastruktur der Mitochondrien sah man bei den mit dem hApoA1 Gentransfer behandelten Tieren, ohne Anschwellen der einzelnen Mitochondrien (Abbildung 19 A – C).



**Abbildung 18: Quantifizierung der Endothelveränderungen**

Dargestellt ist die prozentuelle Anzahl der Endothelzellen mit veränderter Basalmembran (BM). Dabei wurden pro untersuchtem Herz 100 Zellen von 20 verschiedenen mikroskopischen Feldern bei einer Vergrößerung von 20.000x ausgewertet. Erläuterung zu den Gruppen: Normoglykämische Sprague Dawley Ratten mit nackten adenoviralen Vektor (SD/Ad.Null), Streptozotocin induzierte diabetische Ratten mit nackten adenoviralen Vektor (SD/STZ/Ad.Null) und mit humanem Apolipoprotein AI exprimierenden adenoviralen Vektor (SD/STZ/Ad.hApoAI); § $P < 0.05$  vs. SD/Ad.Null und \* $P < 0.05$  vs. SD/STZ/Ad.hApoAI (n=3 unabhängige Experimente).



**Abbildung 19: Elektronenmikroskopische Bilder der zellulären Ultrastruktur von Kardiomyozyten und kardialem Endothel**

Mikrozelluläre Ultrastruktur von Kardiomyozyten und kardialem Endothel. Repräsentative Transmissions-Elektronenmikroskopie, exemplarisch von SD/Ad.Null (A,D), SD/STZ/Ad.Null (B, E) und SD/STZ/Ad.hApoAI (C,F) Herzen. Erklärung siehe Text.

## 5. Diskussion

### 5.1. Das Streptozotocin induzierte Diabetes mellitus Rattenmodell und der humane Apolipoprotein AI Gentransfer

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung des Einflusses eines hApoAI Gentransfers auf die diabetische Kardiopathie. Zur Induktion der diabetischen Kardiopathie wurde das STZ Tiermodell verwendet. Dieses Tiermodell ahmt die Stoffwechselstörung eines unbehandelten DM Typ I mit seinen Symptomen wie Glykosurie, Polyurie und Polyphagie nach (Like AA und Rossini AA 1976, Schmitz FJ *et al.* 1995). Ein entscheidender Vorteil ist dabei das Fehlen von myokardtoxischen und arteriosklerotischen Komplikationen (Tomlinson KC *et al.* 1992). Die Entwicklung einer diabetischen Kardiopathie nach der STZ Gabe, wurde in zahlreichen *in vivo* und *ex vivo* Studien gezeigt (Tschöpe C *et al.* 2004, Van Linthout S *et al.* 2008, Westermann D *et al.* 2009). Als Kontrolle einer erfolgreichen Induktion eines DM diente die Zunahme der BZ-Werte und die KG Abnahme. Dabei zeigten beide diabetischen Gruppen wie erwartet einen signifikanten Anstieg der BZ-Spiegel vs. der nicht diabetischen Gruppe. Der hApoAI Gentransfer führte zu keiner signifikanten Veränderung der BZ-Konzentration vs. den diabetischen Kontrollen. Damit war ein Einfluss durch den hApoAI Gentransfer auf die BZ-Spiegel ausgeschlossen. Dieses konnte auch in einer anderen Studie für dieses Vektorkonstrukt belegt werden (Van Linthout S *et al.* 2009). Im Gegensatz dazu zeigte eine Studie von Drew *et al.* (Drew BG *et al.* 2009) an Patienten mit DM Typ II eine Reduzierung des BZ-Spiegels nach intravenöser Gabe von rekonstituiertem HDL. Die Erklärung hierfür ist die Tatsache, dass das HDL die Insulinsekretion steigert (Drew BG *et al.* 2009). So konnte in einem *ex vivo* Experiment für ApoAI ebenfalls eine Steigerung der Insulinsekretion der Betazellen gezeigt werden. Diese ging mit einer ABCA1 abhängigen Induktion der *Insulin* mRNA Expression einher (Brunham *et al.* 2007, Fryirs MA *et al.* 2010). Die fehlende Wirkung auf den BZ durch den hApoAI Gentransfer in der vorliegenden Arbeit ist durch die Verwendung des STZ Tiermodells, mit Nachahmung einer DM Typ I Stoffwechsellage bedingt. Hierbei zeigt sich, im Gegensatz zum DM Typ II, eine ausgeprägtere Hyperglykämie von über 900 mg/dl mit einer zu vernachlässigenden Restinsulinproduktion von unter 1 % (Hughes SJ *et al.* 2001).

Neben einer Erhöhung des BZ-Spiegels zeigten die beiden diabetischen Gruppen in der vorliegenden Arbeit eine signifikante Verminderung des KG und des HG. Diese Veränderungen in dem von mir verwendeten Versuchsmodell mittels Induktion des DM

an SD Ratten durch STZ wurden bereits in anderen Studien dokumentiert (Tschöpe C *et al.* 2004, Tschöpe C *et al.* 2005, Westermann D *et al.* 2007). Dabei ist die Reduzierung des KG und HG durch einen gesteigerten Katabolismus bedingt, hervorgerufen durch einen intrazellulären Glukosemangel aufgrund eines absoluten Insulinmangels. Weiterhin zeigte sich eine Zunahme des relativen HG (Quotient aus HG/KG) der diabetischen vs. den normoglykämischen Herzen. Dieses ist der stärkeren Abnahme des KG im Vergleich zum HG geschuldet und konnte ebenfalls in vorhergehenden Studien belegt werden (Garvey WT *et al.* 1993, Schmitz FJ *et al.* 1995). Innerhalb der diabetischen Gruppen gab es im Hinblick auf das KG und HG keine signifikanten Unterschiede. Dies deutet darauf hin, dass beide diabetischen Gruppen dem Katabolismus gleichermaßen stark ausgesetzt waren. Dadurch ist auch gewährleistet, dass die in der vorliegenden Arbeit gesehene Effekte des hApoAI Gentransfers nicht auf eine Beeinflussung des DM, im Sinne einer „anti-diabetogenen“ Wirkung, zurückzuführen sind. Die fehlenden Unterschiede im HG trotz vermehrter Kollagenexpression der diabetischen Kontrollratten liegen vermutlich an der Tatsache, dass das Kollagen bei der Bildung des HG eine untergeordnete Rolle spielt und sich deshalb nicht signifikant auswirkt. So konnten Graiani *et al.* (Graiani G *et al.* 2005) zeigen, dass die Kardiomyozyten den Hauptteil des HG ausmachen, wohingegen die extrazelluläre Matrix am Gesamtgewicht des Herzens relativ wenig ausschlaggebend ist.

Wie erwartet führte die diabetische Stoffwechsellage im STZ-Modell vs. den normoglykämischen Kontrollen zu einer Dyslipidämie mit einem signifikanten Anstieg von TG, Gesamtcholesterin, VLDL-C, IDL-C, LDL-C und HDL-C (Bang MA *et al.* 2009, Kim HK *et al.* 2009). Dieses wird hauptsächlich durch die vermehrte Bildung freier Fettsäuren durch den Insulinmangel verursacht. Das führt wiederum zu einer gesteigerten Synthese von VLDL-C, IDL-C, LDL-C und HDL-C. Andere Studien zeigten jedoch neben einem Anstieg von TG, Gesamtcholesterin und LDL-C keine signifikante Veränderung oder sogar eine Abnahme der HDL-C Konzentration (Ali MM und Agha FG 2009, Movahedian A *et al.* 2010, Rai PK *et al.* 2010). Die Unterschiede könnten in der Verwendung verschiedener Studienpopulationen liegen. So wurden in den oben genannten Studien, die eine Abnahme der HDL-C Konzentration zeigten, Wistar Ratten verwendet. Des Weiteren wurden bei diesen Studien mit einer max. Dosierung von 65 mg/kg eine geringere STZ Dosis gewählt als die in der vorliegenden Studie mit 70 mg/kg (Ali MM und Agha FG 2009, Movahedian A *et al.* 2010, Rai PK *et al.* 2010).

Festzuhalten ist die besondere Bedeutung, dass in unseren Versuchen keine Erniedrigung des HDL-C bei den diabetischen Kontrollen zu beobachten war. Dadurch ist ein Einfluss auf die diabetische Kardiopathie durch eine verminderte HDL-C Konzentration auch auszuschließen. Das bedeutet, dass die nachgewiesenen Effekte eindeutig der HDL-C Erhöhung mittels des hApoAI Gentransfers zuzurechnen sind.

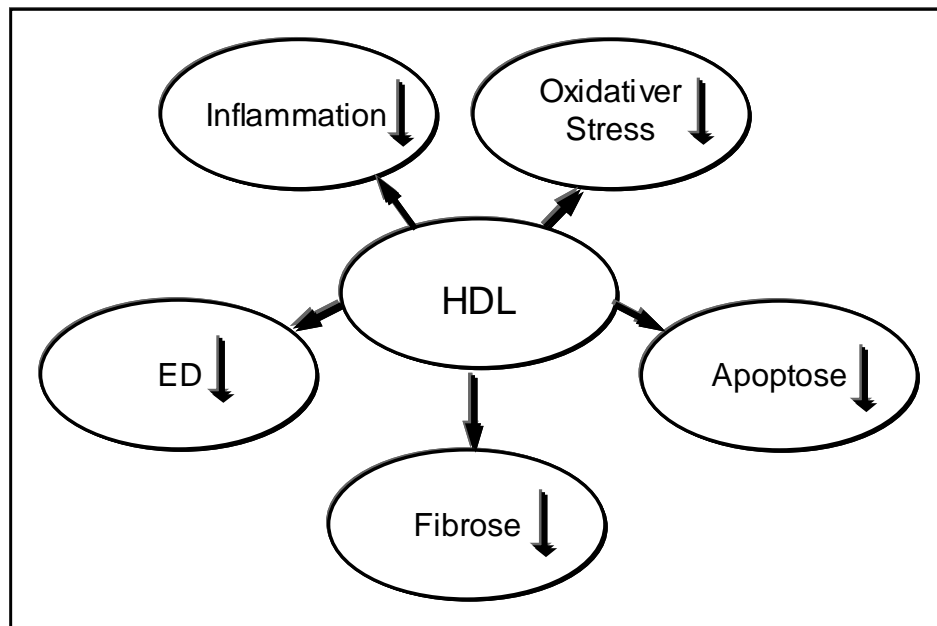
Wieso wurde zur Erhöhung der HDL-C Konzentration ein hApoAI Gentransfers verwendet? Die zurzeit zur Verfügung stehenden Pharmaka sowie HDL Mimetika erhöhen das HDL-C nur moderat und sind zeitlich stark limitiert. Zudem ist durch Verwendung von Pharmaka keine isolierte HDL-C Erhöhung möglich. Daher werden zunehmend transgene Tiermodelle verwendet, welche als Target das ApoAI haben. Die Verwendung eines ApoAI Gentransfers zur Erhöhung der HDL-C Konzentration ist dadurch begründet, dass das ApoAI den Hauptbestandteil vom HDL ausmacht und eng mit dem RCT verbunden ist. Zudem besteht eine enge Korrelation in der Konzentration zwischen beiden Molekülen (Asztalos B *et al.* 1997, Thuahnai ST *et al.* 2001). So wiesen Tangirala *et al.* (Tangirala RK *et al.* 1999) an LDL-Rezeptor defizienten Mäusen nach, dass ein hApoAI Gentransfer mit Hilfe eines rekombinanten Adenovirus nach einer w die Konzentration von hApoAI um 102 mg/dl und von HDL-C um 53 % erhöht. In einer anderen Untersuchung zeigten Belalcazar *et al.* (Belalcazar LM *et al.* 2003) 4 w nach einem hApoAI Gentransfer mittels einem Helfer-abhängigem Ad, an LDL-Rezeptor defizienten Mäusen eine Expressierung von hApoAI von 200 mg/dl verbunden mit einer Steigerung der HDL-C Konzentration um 27 %.

In der vorliegenden Arbeit wurde gewissermaßen ein zeitlich limitiertes transgenes Tiermodell verwendet, welches durch einen Gentransfer mittels eines E<sub>1</sub>E<sub>3</sub>E<sub>4</sub>-deletierten Ad Vektors induziert wurde. Das Besondere an diesem Vektor ist die Expressionsdauer und die Expressionshöhe vom hApoAI. So zeigten sich über den gesamten Versuchszeitraum von 6 w stabile hApoAI Spiegel im Mittel von 95 mg/dl mit einer Steigerung der HDL-C Konzentration von 60 % vs. den diabetischen Kontrollen. Damit waren Steigerungen der HDL-C Konzentration über einen langen Zeitraum möglich die mittels pharmakologischer bzw. anderer Methoden nicht so in der Konzentration und Kontinuität möglich gewesen wäre. Die Unterschiede in der Höhe der Expression des hApoAI und damit der HDL-C Konzentration in den genannten Studien, lässt sich durch die verschiedenen Bestimmungszeitpunkte und durch Verwendung

unterschiedlicher Vektoren/Konstrukte zur Durchführung des hApoAI Gentransfers erklären (Van Linthout S *et al.* 2002).

Als Nebeneffekt war nach dem hApoAI Gentransfer eine signifikante Abnahme der Konzentrationen von TG, VLDL-C, IDL-C und des nicht-HDL-C/HDL-C vs. der diabetischen Gruppe zu verzeichnen. Dieses deckt sich mit einer Studie an ApoE-defizienten Mäusen, die nach Gabe von rekombinantem HDL eine signifikante Abnahme von Total-C und nicht-HDL-C aufwies (Zhang X *et al.* 2010). Als Ursache für die Abnahme der nicht-HDL-C Lipidfraktionen ist der RCT zu vermuten. Dieser sorgt für den Transport des C von der Peripherie zur Leber mit einer Erhöhung des C Efflux und dadurch gesteigerter fäkal-biliärer Ausscheidung (Reichl D und Miller NE 1989, Tall AR 1990). Eriksson *et al.* (Eriksson M *et al.* 1999) konnten am Menschen einen Anstieg des C Efflux, 9 d nach intravenöser Injektion von pro-ApoAI nachweisen. Zu vergleichbaren Ergebnissen kam auch eine weitere Studie an Menschen, welche zeigte, dass 24 h nach intravenöser Gabe von rekonstituiertem HDL ein erhöhter C Efflux nachweisbar war (Nanjee MN *et al.* 2001). Als Grund des gesteigerten C Efflux werden erhöhte Aktivitäten von LCAT, PLTP, CETP, ABCA-1 und SRB1 diskutiert (Ohashi R *et al.* 2005, Amar MJ *et al.* 2010).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass durch den in der vorliegenden Studie verwendeten hApoAI Gentransfer über den gesamten Zeitverlauf des Versuchs stabil erhöhte HDL-C Konzentrationen vorlagen. Als Nebeneffekt zeigte sich eine Verminderung der Konzentrationen von TG, VLDL-C, IDL-C und des nicht-HDL-C/HDL-C vs. der diabetischen Kontrollgruppe. Dabei konnte eine Beeinflussung des BZ, KG und HG durch den hApoAI Gentransfer, im Vergleich zu den diabetischen Kontrollen, ausgeschlossen werden. Die Induktion des DM erfolgte mittels STZ, welches keinen Einfluss auf die HDL-C Konzentration hatte. Dieses erlaubte mir den isolierten Einfluss einer HDL-C Erhöhung auf die diabetische Kardiopathie im STZ Rattenmodell zu untersuchen. Im Nachfolgenden werden die von mir untersuchten, dafür zugrunde liegenden Transduktionswege dargestellt. Einen Überblick hierüber gibt die Abbildung 20.



**Abbildung 20: Schematisch-hypothetische Darstellung des Einflusses des High-density Lipoproteins auf ausgewählte Pathways der diabetischen Kardiopathie**

Dargestellt sind die unterschiedlichen Pfade die bei der diabetischen Kardiopathie eine Rolle spielen und die durch das High-density Lipoprotein (HDL) beeinflusst werden. Die einzelnen Pfade stehen, wie weiter unten in der Diskussion beschrieben wird, in einer komplexen Wechselwirkung zueinander. Endotheliale Dysfunktion (ED).

## 5.2. Die myokardiale extrazelluläre Matrix unter der diabetischen Kardiopathie und die Effekte des humanen Apolipoprotein AI Gentransfers

Bei der diabetischen Kardiopathie spielt die diabetische Kardiomyopathie eine wesentliche Rolle. Diese ist unter anderem durch eine erhöhte interstitielle und perivaskuläre Glykogeneinlagerung (Van Linthout S *et al.* 2008) sowie Kollagenexpression (Tschöpe C *et al.* 2004) charakterisiert. Dabei ist die Ätiologie der Kollagenakkumulation bei der diabetischen Kardiomyopathie multifaktoriell und unter anderem durch oxidativen Stress, Inflammation, Hypertonie und Hyperglykämie induziert (Weber KT *et al.* 1995, Kania G *et al.* 2009). Bei der Kollagenakkumulation spielen zwei Prozesse eine wesentliche Rolle: Zum einen werden Fibroblasten durch erhöhte BZ-Spiegel, Wachstumsfaktoren wie transforming growth factor- $\beta$  sowie durch die p38 MAPK stimuliert (Mizushige K *et al.* 2000, Muslin AJ 2008). Zum anderen liegt ein Ungleichgewicht von Matrix Metalloproteinasen und deren endogenen Inhibitoren vor (Spinale FG und Peterson JT 2004). Bereits 1980 beschrieb Modrak (Modrak J 1980) histologisch eine Zunahme des Gesamtkollagens an STZ induzierten diabetischen Rattenherzen. Auch in einer klinischen Studie von Shimizu und Isogai (Shimizu M und Isogai Y 1993), welche Herzen von Patienten mit DM Typ II bei Autopsien analysierten, wurde eine ausgeprägte interstitielle und perivaskuläre Fibrose belegt.



In der hier vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die unter den diabetischen Konditionen signifikant erhöhten Kollageneinlagerungen durch den hApoAI Gentransfer ebenfalls signifikant reduziert wurden. So konnten Kim *et al.* (Kim Th *et al.* 2010), nach Gabe von ApoAI in unterschiedlichen Konzentrationen, sogar eine von ApoAI dosisabhängige Reduzierung der pulmonalen Kollagenexpression an mit Bleiomyein behandelten Mäusen zeigen. Dabei führt eine Reduzierung der Kollagenakkumulation zur Hemmung des negativen Remodelings. Beim Remodeling nimmt minderwertiges Bindegewebe zu und bedingt dadurch das kontraktile Parenchym relativ gesehen ab. Das führt, über eine Erhöhung der Steifigkeit und Abnahme der Kontraktilität des Myokards, zu einer diastolischen und systolischen Dysfunktion (Villari B *et al.* 1993). Dabei ist für die Funktionalität des Myokards neben der Gesamtkollagenkonzentration auch die Qualität des Kollagens entscheidend. So konnten Westermann *et al.* (Westermann D *et al.* 2009) im STZ-Modell zeigen, dass bei der diabetischen Kardiomyopathie die Zunahme der kardialen Fibrose vor allem durch eine Zunahme von Kollagen Typ I und III verursacht wird. Die Abhängigkeit des Kollagengehaltes und der kardialen Funktion wird in einer Arbeit von Tschöpe *et al.* (Tschöpe C *et al.* 2004) beschrieben. Diese belegte im STZ Rattenmodell, dass die unter den diabetischen Konditionen zu beobachtende Kollagenakkumulation mit einer Verschlechterung der LV Funktion einhergeht. Im Vergleich dazu zeigten in dieser Arbeit Kallekrein-1 überexprimierende transgene Ratten eine Reduzierung der Kollagenansammlung und damit eine Verbesserung der LV Hämodynamik. In der Studie von Westermann *et al.* (Westermann D *et al.* 2009) konnte nachgewiesen werden, dass die unter diabetischen Konditionen zu beobachtende Zunahme von Kollagen Typ I und III durch Reduzierung des inflammatorischen Stresses mittels eines TNF- $\alpha$  Antagonisten rückgängig war. Auch bei dieser Arbeit ging die Abnahme des Kollagens mit einer Verbesserung der LV Pumpfunktion einher. Dass diese Verbesserung der Hämodynamik nicht nur auf die Hemmung der Inflammation zurückzuführen ist, sondern auch auf eine Reduzierung der Fibrose wird durch die Studie von Fielitz *et al.* (Fielitz J *et al.* 2007) verdeutlicht. Fielitz und Mitarbeiter konnten anhand von Ratten mit „aortic banding“ zeigen, dass die Inhibierung der Prolyl 4-Hydroxylase, einem Schlüsselenzym in der Kollagensynthese, zu einer kardialen Funktionsverbesserung führt. Unterstützt wird diese These durch eine Studie von Kiya *et al.* (Kiya Y *et al.* 2009) die bei Wistar Ratten im Myokardinfarkt-Modell nach 4 wöchiger Infusion von rekonstituiertem HDL eine signifikante Abnahme der Fibrose verbunden mit einer verminderten kardialen Dysfunktion nachwies.

Was sind die unterliegenden molekularbiologischen Mechanismen die zu einer Verbesserung des interstitiellen Remodelings bei der diabetischen Kardiopathie durch den hApoAI Gentransfer führen? Hier sind in erster Linie die Beeinflussung der Inflammation und auch des oxidativen Stresses zu nennen.

### **5.3. Die myokardiale Inflammation unter der diabetischen Kardiopathie und die Effekte des humanen Apolipoprotein AI Gentransfers**

Die diabetische Kardiopathie ist ebenfalls durch vermehrte Inflammation charakterisiert, verbunden mit einer verstärkten Infiltration des Herzens mit Entzündungszellen, wie Monozyten und Leukozyten. Dabei ermöglichen Adhäsionsmoleküle, wie ICAM und VCAM über die lokale Regulation von Gefäßwandinteraktionen die Adhäsion und Transmigration der infiltrierenden Zellen in die Intima (Ishikawa T *et al.* 1993, Collins T und Cybulsky MI 2001, Daxecker H *et al.* 2002). Bei der Regulierung von ICAM und VCAM nimmt TNF- $\alpha$ , als eines der führenden Zytokine welches die Entzündung triggert, eine zentrale Rolle ein. Die Adhäsionsmoleküle induzieren ihrerseits wiederum über einen positiven Feedback im Sinne eines circulus vitiosus die Expression von TNF- $\alpha$  (Westermann D *et al.* 2007). Die Bedeutung der Inflammation bei der diabetischen Kardiopathie wird an einer Arbeit von Tschöpe *et al.* (Tschöpe C *et al.* 2005) deutlich, die im STZ Rattenmodell eine inverse Korrelation zwischen ICAM-1, VCAM-1 sowie TNF- $\alpha$  und der LV Funktion herausarbeiten konnten. Dabei zeigen Kallekrein-1 überexprimierende transgene Ratten eine Abnahme der ICAM-1, VCAM-1 sowie TNF- $\alpha$  Expression mit konsekutiver Verbesserung der Hämodynamik.

Die in der vorliegenden Studie gesehene erhöhte Expression von ICAM-1, VCAM-1 und TNF- $\alpha$  bei den diabetischen STZ Kontrollen wurde auch in vorangegangenen Studien nachgewiesen (Tschöpe C *et al.* 2005, Westermann D *et al.* 2007, Van Linthout S *et al.* 2007). Auch *in vitro* Studien an humanen Endothelzellen, stimuliert mit hoher Glukosekonzentration zeigten erhöhte Expressionsspiegel von *ICAM* mRNA und Protein (Kado S *et al.* 2001). Nach dem hApoAI Gentransfer war die Expression von *ICAM-1*, *VCAM-1* und *TNF- $\alpha$*  mRNA vs. den diabetischen Kontrollen signifikant reduziert. Für die Adhäsionsmoleküle zeigte sich dieses neben der mRNA-Ebene, mittels Immunhistologie auch auf der Protein-Ebene. Vergleichend dazu konnten eine Reihe von Studien zeigen, dass HDL in der Lage ist über die Hemmung von ICAM, VCAM und TNF- $\alpha$  die Inflammation zu reduzieren (Calabresi L *et al.* 1997, Barter PJ *et*

*al.* 2002). So konnten Cockerill *et al.* (Cockerill GW *et al.* 1999) zeigen, dass die Inkubation von umbilicalen Venenendothelzellen mit rekonstituiertem HDL zu einer Hemmung von ICAM, VCAM und TNF- $\alpha$  führt. Ebenfalls wiesen Puranik *et al.* (Puranik R *et al.* 2007) nach, dass die Infusion von ApoAI zu einer signifikanten Hemmung der ICAM-1 und VCAM-1 Expression in den Arterienwänden von Kaninchen führt. Eine weitere Studie mit dem ApoAI Mimetikum 5A zeigte an humanen Endothelzellen welche mit TNF- $\alpha$  inkubiert wurden, eine signifikante Reduzierung von ICAM-1 und VCAM-1 (Tabet F *et al.* 2010). Jedoch gibt es widersprüchliche Ergebnisse über die anti-inflammatorischen Eigenschaften von HDL. So wies Stannard *et al.* (Stannard AK *et al.* 2001) eine fehlende Hemmung des nativen HDL auf die Expression von VCAM-1 an umbilicalen Venenendothelzellen und aortalen Endothelzellen nach. Zhang *et al.* (Zhang WJ *et al.* 2002) konnte für das native HDL ebenfalls keine Hemmung der VCAM-1 Expression nachweisen, jedoch für das rekonstituierte HDL. Dieses deckt sich mit anderen Studien die ebenfalls eine Hemmung der VCAM-1 Expression durch rekonstituiertes HDL zeigen konnten (Calabresi L *et al.* 1997, Baker PW *et al.* 2000). Eine Ursache für die widersprüchlichen Daten könnte von der Tatsache herrühren, dass für die Wirkung des HDL nicht nur die Quantität entscheidend ist, sondern auch die Qualität. So zeigten Untersuchungen an umbilicalen Venenendothelzellen eine stärkere Hemmung der durch TNF- $\alpha$  induzierten VCAM-1 Expression durch HDL<sub>3</sub> als durch HDL<sub>2</sub> (Ashby DT *et al.* 1998). Neben der Subpopulation ist auch der Funktionszustand des HDL von Bedeutung. Unterstützt wird diese These durch Untersuchungen die eine Hemmung von VCAM-1 in Abhängigkeit der Phospholipid-Zusammensetzung des rekonstituierten HDL nachwiesen (Calabresi L *et al.* 2003, Nofer JR *et al.* 2003). In anderen Studien konnte festgestellt werden, dass HDL wenn es in einer oxidierten Form vorliegt nicht nur nicht seine protektiven Eigenschaften entfalten kann sondern auch pro-inflammatorisch wirken kann (Morgan J *et al.* 2004, Kontush A *et al.* 2004). So zeigte eine *ex vivo* Studie an mesengialen Rattenzellen, dass oxidiertes HDL zu einer Erhöhung von p38 MAPK sowie NF- $\kappa$ B führt und hierdurch pro-inflammatorische Eigenschaften vermittelt (Zhang M *et al.* 2010).

Wie ist HDL in der Lage die Expression von ICAM, VCAM und TNF- $\alpha$  zu hemmen? Eine zentrale Rolle im Rahmen der Entzündungsentstehung spielen die MAPK wie z.B. die p38 MAPK. Diese zu den Serin/Threonin-Kinasen gehörende Gruppe ist vor allem an der Regulation der Transkription, Zytokinproduktion, Apoptose und des Zytoskelettes beteiligt (Zarubin T und Han J 2005). Die Aktivierung der p38 MAPK erfolgt unter

anderem Stress assoziiert. Unter hyperglykämischen Bedingungen zeigt sich eine vermehrte Phosphorylierung der p38 MAPK, wie in einer Arbeit von Van Linthout *et al.* (Van Linthout S *et al.* 2007) im STZ Rattenmodell gezeigt wurde. Darüber hinaus konnte ich in der vorliegenden Arbeit nachweisen, dass der verstärkte Phosphorylierungsgrad der p38 MAPK unter den diabetischen Konditionen durch den hApoAI Gentransfer signifikant reduziert war. Eine Abnahme der Aktivierung von p38 MAPK fanden auch Tölle *et al.* (Tölle M *et al.* 2008) an glatten Muskelzellen der Aorta von Wistar-Kyoto Ratten nach Vorinkubation mit HDL, welche einem vermehrten oxidativen Stress ausgesetzt waren. Auch in einem Myokardinfarkt-Modell bei Wistar Ratten konnte eine Abnahme der p38 MAPK Phosphorylierung nach 4 wöchiger Infusion von rekonstituiertem HDL dokumentiert werden (Kiya Y *et al.* 2009). Die genauen Mechanismen wie HDL zu einer Hemmung der p38 MAPK führt, sind nicht in allen Einzelheiten bekannt. Eine bedeutende Rolle hierbei scheint HDL bei der Aktivierung der PI3K/Akt Signalkaskade bezüglich der inhibitorischen Eigenschaft von Akt auf die p38 MAPK zu haben (Norata GD *et al.* 2005, Schmidt A *et al.* 2006, Peng XQ *et al.* 2010). Die p38 MAPK selbst wiederum induziert über NF- $\kappa$ B die Expression des Zytokins TNF- $\alpha$  sowie die Adhäsionsmoleküle ICAM und VCAM (Zarubin T und Han J 2005, Westermann D *et al.* 2006, Schieven GL 2009). Umgekehrt sind aber auch pro-inflammatorische Zytokine, wie TNF- $\alpha$  in der Lage p38 MAPK zu aktivieren (Dhingra S *et al.* 2007, Saito Y *et al.* 2007). Passend dazu konnte Parasrampurria *et al.* (Parasrampurria DA *et al.* 2003) an Probanden zeigen, dass die Hemmung der p38 MAPK mittels eines spezifischen Inhibitors zu einer Verminderung der TNF- $\alpha$  Expression führt. Über seine pro-inflammatorischen Eigenschaften hinaus führt p38 MAPK zu einer vermehrten Hypertrophie im Herzen mit einer gegebenenfalls Verschlechterung der LV Pumpfunktion (Bogoyevitch MA 2000, Wang M *et al.* 2005). So wiesen Behr *et al.* (Behr TM *et al.* 2001) zusätzlich zu der verminderten Expression von TNF- $\alpha$  eine Reduzierung der Hypertrophie durch den Einsatz eines p38 MAPK Inhibitors in einem Hypertrophie-Modell der Ratten mittels Hypertonussteigerung nach. Die Interaktion von TNF- $\alpha$  und der kardialen Hypertrophie verdeutlicht eine Studie, die eine Reduzierung des Kollagengehaltes nach Hemmung von TNF- $\alpha$  mittels eines Antagonisten im STZ-Modell nachwies (Westermann D *et al.* 2007). In zwei weiteren Studien im STZ induzierten Mausmodell konnte gezeigt werden, dass die Gabe eines spezifischen p38 MAPK Inhibitors, über eine Reduzierung der Inflammation und Fibrose zu einer Verbesserung der LV Dysfunktion führt (Westermann D *et al.* 2006, Riad A *et*

al. 2007). Diesen Link zwischen der p38 MAPK und der LV Pumpfunktion verdeutlicht auch eine Studie von Van Linthout *et al.* (Van Linthout S *et al.* 2007) die zeigt, dass die Statin vermittelte Verbesserung der LV Funktion und Reduzierung der Inflammation und Fibrose im diabetischen Tiermodell mit einer reduzierten Phosphorylierung der p38 MAPK assoziiert ist. So konnten Liao *et al.* (Liao P *et al.* 2002) an Kulturen mit Kardiomyozyten beobachten, dass die Aktivierung von p38 MAPK zu einer Verschlechterung der Myozytenkontraktilität führt. Die genauen zugrunde liegenden Mechanismen der Beeinflussung der Kontraktilität der Herzmuskeln durch die p38 MAPK sind nicht bekannt (Szokodi I *et al.* 2008). Zum Teil soll dieses durch eine Störung des Kalzium-Stoffwechsels bedingt sein. Von p38 MAPK ist bekannt, dass dieses Phospholam dephosphoryliert, wodurch die Wiederaufnahme von Kalzium in das sarkoplasmatische Retikulum gehemmt wird, was zu einer Verminderung der Kontraktilität führt (Szokodi I *et al.* 2008). Denkbar wäre auch eine zusätzliche Beeinflussung des Kalzium-Stoffwechsels durch die Induktion einer Inflammation. So weiß man, dass TNF- $\alpha$  zu einer Hemmung der Kalzium Freisetzung aus dem sarkoplasmatischem Retikulum führt und dadurch weniger Myofilamente aktiviert werden können (Sivasubramanian N *et al.* 2001, Liao P *et al.* 2002). Passend dazu konnten Yang *et al.* (Yang YY *et al.* 2010) an TNF- $\alpha$  KO-Mäusen nachweisen, dass die Reduzierung des TNF- $\alpha$  mit einer Verbesserung der Kontraktilität einhergeht. Eine zusätzliche Ursache für die Verschlechterung der kardialen Pumpfunktion bei der diabetischen Kardiopathie scheint die vermehrte Apoptose zu sein, welche durch die p38 MAPK über NF- $\kappa$ B verursacht wird (Cai L *et al.* 2002, Ho FM *et al.* 2006, Schieven GL 2009). Die Verknüpfung der p38 MAPK mit der Apoptose wird unter anderem durch zwei Studien deutlich die eine Reduzierung der Apoptose durch Inhibierung von p38 MAPK nachwiesen (Baines CP und Molkentin JD 2005, Kerkela R und Force T 2006). De Souza *et al.* (de Souza JA *et al.* 2009) konnten an humanen endothelialen Zellen die oxidiertem LDL ausgesetzt waren zeigen, dass HDL die Apoptose reduziert. Dieses lässt vermuten, dass die anti-apoptotische Wirkung des hApoAI Gentransfers in der vorliegenden Arbeit zum Teil über diesen Pfad der verminderten Phosphorylierung der p38 MAPK vermittelt wurde. Ferner ist zu vermuten, dass durch die Verminderung der Apoptose mehr kontraktiles Parenchym erhalten bleibt, was mit einem Erhalt der Kontraktilität und damit verbesserter kardialer Funktion einhergehen würde.

Was begünstigt noch die Inflammation? In dem komplexen Wechselspiel der Inflammation muss auch die Rolle der Proteinkinase Akt und PI3K diskutiert werden. In der vorliegenden Studie wurde gezeigt, dass Akt die Phosphorylierung von eNOS induziert. Von Akt und eNOS weiß man, dass sie durch Hemmung der p38 MAPK anti-entzündlich und anti-apoptotisch wirken. Die p38 MAPK induziert wiederum über NF- $\kappa$ B die Expression von TNF- $\alpha$  sowie ICAM und VCAM (Westermann D *et al.* 2006, Schieven GL 2009). So konnten Schmidt *et al.* (Schmidt A *et al.* 2006) an humanen Endothelzellen zeigen, dass HDL in der Lage ist Akt zu aktivieren. Dieses ging mit einer reduzierten Expression von ICAM-1 und VCAM-1 einher und war assoziiert mit einer verminderten Translokation von NF- $\kappa$ B in den Zellkern. Diese Effekte waren durch Hemmung des PI3K/Akt Signalweges komplett reversibel (Schmidt A *et al.* 2006). Das gegenseitige Wechselspiel von Akt und p38 MAPK wird anhand der Arbeit von Peng *et al.* (Peng XQ *et al.* 2010) deutlich, die an Mäusen mittels entsprechenden Inhibitoren zeigen, dass eine Hemmung von PI3K/Akt zu einer Aktivierung von p38 MAPK und umgekehrt eine Hemmung von p38 MAPK zu einer Hochregulation von Akt führt. In einem anderen *ex vivo* Experiment wurde nachgewiesen, dass die Hemmung von PI3K/Akt mit Wortmannin oder LY294002 zu einer verstärkten NF- $\kappa$ B Aktivität führt (Sun L *et al.* 2011). Dass die Interaktion zwischen p38 MAPK und Akt vom eNOS vermittelt ist, zeigen Untersuchungen von Wenzel *et al.* (Wenzel S *et al.* 2007) die eine verstärkte Expression von p38 MAPK in Kardiomyozyten von eNOS KO-Mäusen nachwiesen. In einem anderen Arm der gleichen Studie konnten sie in einem *ex vivo* Experiment an Wistar Ratten zeigen, dass die Hemmung der eNOS durch einen Inhibitor zu einer vermehrten Expression von p38 MAPK und TNF- $\alpha$  führt. Passend dazu fanden Xing *et al.* (Xing F *et al.* 2006) eine Hochregulation von eNOS durch Hemmung der p38 MAPK. Dieses verdeutlicht die enge Wechselbeziehung zwischen der Inflammation und dem oxidativen Stress und legt zu gleich nahe, dass auch der oxidative Stress in diesem Zusammenhang untersucht werden sollte.

#### **5.4. Der oxidative Stress unter der diabetischen Kardiopathie und die Effekte des humanen Apolipoprotein AI Gentransfers**

Neben der Inflammation spielt auch der oxidative Stress bei der diabetischen Kardiopathie eine zentrale Rolle (Tschöpe C *et al.* 2005, Cai L 2007). Dabei werden durch die Hyperglykämie vermehrt Sauerstoffradikale und ROS gebildet (Farkas K *et al.* 2000, Dorenkamp M *et al.* 2005). Als Index für den systemischen oxidativen Stress

dient unter anderem die Bestimmung von TBARS im Serum, diese gilt als Maß für die durch den oxidativen Stress entstandene Lipidperoxidation. In der vorliegenden Studie war die erhöhte TBARS Konzentration unter der diabetischen Stoffwechsellage bei den mit dem hApoAI Gentransfer behandelten Ratten signifikant gesenkt. Das korreliert mit den Daten von Adisa *et al.* (Adisa RA *et al.* 2010) die eine erhöhte TBARS Konzentration bei STZ induziertem DM im Rattenmodell zeigten. Mackness *et al.* (Mackness MI *et al.* 1991) konnten zudem nachweisen, dass die Inkubation von HDL zu einer Verringerung der TBARS Konzentration führt.

Neben der vermehrten Bildung von Sauerstoffradikalen und ROS entsteht oxidativer Stress auch durch eine Reduzierung anti-oxidativer Substanzen (Nishikawa T *et al.* 2000). Als eines der führenden anti-oxidativen Targets habe ich SOD mit seinen drei Unterfraktionen SOD-1 (intrazellulär), SOD-2 (mitochondrial) und ec-SOD (extrazellulär) analysiert. Hier zeigte sich nach dem hApoAI Gentransfer eine Steigerung der Expression von SOD-2 und ec-SOD mRNA, welche unter den diabetischen Bedingungen herunterreguliert waren. Eine Einflussnahme auf die SOD-1 mRNA Expression war weder bei den diabetischen Kontrollen noch durch den hApoAI Gentransfer zu verzeichnen. Zu gleichen Ergebnissen kam auch eine Studie von Turkseven *et al.* (Turkseven S *et al.* 2005), die auf mRNA- und Proteinebene eine Reduzierung der ec-SOD Expression ohne Veränderungen der SOD-1 Expression in Aorten von SD Ratten im STZ-Modell fanden. In einer anderen Studie zeigten Kruger *et al.* (Kruger AL *et al.* 2005), dass die Gabe eines ApoAI Mimetikums zu einer Steigerung der ec-SOD mRNA Expression in der Aorta von STZ-diabetischen SD Ratten führt, jedoch ohne einen Einfluss auf die anderen SOD Fraktionen zu haben. Die fehlende Wirkung auf die SOD-2 bei Kruger könnte, im Gegensatz zu meinen Ergebnissen, in dem unterschiedlichen experimentellen Ansatz mit Verwendung des ApoAI Mimetikums D-4F liegen.

Welche molekularbiologischen Mechanismen sind für die Verbesserung des interstitiellen Remodelings bei der gesteigerten Expression von ec-SOD und SOD-2 verantwortlich? Zum einen sind die SOD in der Lage eine Hyperglykämie bedingte Induzierung von ROS in den Endothelzellen zu reduzieren (Nishikawa T *et al.* 2000). Dieses zeigte auch eine Studie von Suzuki *et al.* (Suzuki K *et al.* 2002) die eine Reduzierung der Entstehung von Radikalen durch die Isoform SOD-2 an perfundierten Rattenherzen im Ischämie-Modell nachwies. Neben der Verringerung des oxidativen Stresses ist SOD in der Lage die Inflammation zu reduzieren. So konnten Manna *et al.*

(Manna SK *et al.* 1998) an menschlichen Brustkrebszellen anhand von *ex vivo* Experimenten mit einer Überexpression von SOD-2 eine verminderte TNF- $\alpha$  assoziierte MAPK und NF- $\kappa$ B Aktivierung sowie Apoptose nachweisen. In einer anderen Studie konnten Hohmeier *et al.* (Hohmeier HE *et al.* 1998) an Insulinomzellen welche IL-1 $\beta$  ausgesetzt wurden, ebenfalls eine verminderte NF- $\kappa$ B Aktivierung durch Überexpression von SOD-2 nachweisen. Wie bereits erläutert induzieren die MAPK sowie NF- $\kappa$ B die Expression des Zytokins TNF- $\alpha$  sowie der Adhäsionsmoleküle ICAM und VCAM (Westermann D *et al.* 2006, Schieven GL 2009). So ist die SOD in der Lage über diese Signalwege die Entzündung zu hemmen. Diese These wird auch durch Experimente von Dewald *et al.* (Dewald O *et al.* 2003) unterstützt. Diese konnten im Ischämie-Modell mittels Verschluss des Ramus interventrikularis anterior zeigen, dass transgene Mäuse welche vermehrt *ec*-SOD exprimieren, eine verminderte Infiltration mit Makrophagen vs. den Kontrollen aufwiesen. Diese Reduzierung der Inflammation war mit einer verminderten Fibrose und einer verbesserten LV-Funktion verbunden. Die Bedeutung der SOD bei der diabetischen Kardiopathie wird durch die folgenden zwei Studien deutlich. So wiesen Zelko *et al.* (Zelko IN *et al.* 2002) eine Entwicklung einer Kardiomyopathie bei SOD-2 KO-Mäusen nach. Andererseits konnten Shen *et al.* (Shen X *et al.* 2006) anhand von transgenen Mäusen mit erhöhter SOD-2 Expression eine Normalisierung der Kardiomyozytenfunktion im diabetischen Mausmodell aufzeigen. Diese Resultate legen die Vermutung nahe, dass der hApoA1 Gentransfer unter anderem über *ec*-SOD und SOD-2 zu einer Verringerung des oxidativen Stresses, der Inflammation sowie der Fibrose führt und so zu einer Reduzierung der diabetischen Kardiopathie mit verbesserter LV Funktion beiträgt.

Welche molekularbiologischen Mechanismen könnten beim oxidativen Stress der diabetischen Kardiopathie noch eine Rolle spielen? Dazu muss man sich eines der führenden und bis dato am besten beschriebenen Signalkaskaden, den PI3K/Akt-Signalweg anschauen. So zeigt die vorliegende Arbeit nach dem hApoA1 Gentransfer eine signifikante Zunahme des Phosphorylierungsgrades von Akt vs. den diabetischen Kontrollen. Dabei aktiviert HDL über ein G-Protein die PI3K und phosphoryliert somit die Akt (Norata GD *et al.* 2005). Über diesen PI3K/Akt Signalweg hemmt HDL die Translokation von NF- $\kappa$ B in den Zellkern und supprimiert so die Expression von TNF- $\alpha$ , ICAM und VCAM (Robbesyn F *et al.* 2003, Schmidt A *et al.* 2006, Dong J *et al.* 2010). Durch die Unterdrückung der Inflammation nimmt wie bereits beschrieben die Kollagensynthese ab, dieses führt wiederum zu einem Erhalt der Elastizität und der



Kontraktilität des Myokards (Brilla CG 1994, Spector KS 1998). Die Verbesserung der Kontraktilität des Herzens unter HDL scheint Akt abhängig zu sein. So konnten Van Linthout *et al.* (Van Linthout S *et al.* 2008) an isolierten Kardiomyozyten im hyperglykämischen Stress zeigen, dass die Verbesserung der Kontraktilität durch HDL, nach Gabe von Wortmannin einem Akt Inhibitor, aufgehoben war (Van Linthout S *et al.* 2008). Eine besondere Bedeutung bei der Interaktion von HDL und der PI3K/Akt Signalkaskade besteht in der Fähigkeit eNOS zu aktivieren und damit die Bioverfügbarkeit von NO zu erhöhen (Mineo C *et al.* 2003, Nofer JR *et al.* 2004). Dieses verdeutlicht eine Studie die zeigt, dass die Aktivierung von eNOS durch HDL nach der Gabe von Ly294002, einem Inhibitor der PI3K, aufgehoben ist (Viswambharan H *et al.* 2004). In der vorliegenden Studie konnte ich ebenfalls zeigen, dass die Phosphorylierung von eNOS welche durch die diabetische Stoffwechsellage reduziert war, durch den hApoAI Gentransfer wieder signifikant erhöht war. Jedoch gibt es bei der Auswirkung einer hyperglykämischen Stoffwechsellage auf die eNOS Expression konträre Studien (Förstermann U und Münzel T 2006, Komers R *et al.* 2006). Eine *in vitro* Untersuchung an humanen Endothelzellen der Aorta hat gezeigt, dass eine akute Glukoseexposition zu einer erhöhten und eine chronisch hohe Glukoseexposition zu einer reduzierten Expression von eNOS mRNA in Endothelzellen und damit NO-Produktion führt (Srinivasan S *et al.* 2004). Zu ähnlichen Ergebnissen kommen auch andere Studien, die für eine akute Exposition von Glukose eine Hochregulation und für eine chronische Exposition eine Verminderung der eNOS Aktivität zeigen (Ho FM *et al.* 1999, Ozaki M *et al.* 2002, Salt IP *et al.* 2003). Cosentino F *et al.* (Cosentino F *et al.* 1997) beschrieben jedoch eine Hochregulation der eNOS Expression nach Glukosegabe auf humane aortale Endothelzellen für eine Dauer von 5 Tagen. Die pathophysiologischen Mechanismen hierfür sind nicht vollständig bekannt. Dieses könnte neben der Dauer der Exposition auch an den Unterschieden im Studienkollektiv, der Beobachtungszeiträume oder der untersuchten Gewebearten liegen (Ho FM *et al.* 1999, Srinivasan S *et al.* 2004). Bekannt ist hingegen, dass die Hyperglykämie durch die vermehrte Bildung von ROS und anderen Sauerstoffradikalen zu einer Zunahme von oxidiertem LDL führt und dass dieses in der Lage ist die Freisetzung von NO zu inhibieren (García-Cardena G *et al.* 1996, Huang A *et al.* 1999). So konnten Uittenbogaard *et al.* (Uittenbogaard A *et al.* 2000) in einem *ex vivo* Experiment an humanen Endothelzellen zeigen, dass die Inaktivierung der eNOS durch oxidiertes LDL mittels HDL Gabe aufgehoben wurde. Das NO ist seinerseits in der Lage den oxidativen

Stress zu reduzieren. So führt eine vermehrte Bereitstellung von NO zu einer Reduzierung von Superoxid Radikalen, ROS und oxidiertem LDL (Schwarz MA *et al.* 1995, Kuo PC *et al.* 1996, Landmesser U *et al.* 2003).

Genau wie bei den Auswirkungen einer Glukoseexposition auf die NO Bildung, gibt es auch bei der Wirkung des NO konträre Studien. So zeigten in einer Studie von Sasaki *et al.* (Sasaki M *et al.* 2003) eNOS KO-Mäuse vs. den Wildtypen eine reduzierte Infiltration von neutrophilen Granulozyten und Monozyten des Darmes bei einer experimentell ausgelösten Kolitiserkrankung. Im Gegensatz dazu steht die Studie von Iwata *et al.* (Iwata A *et al.* 2001) die in einem Ischämie-Modell an Kaninchenherzen nachwies, dass die Steigerung der NO Produktion mittels einem eNOS Gentransfer zu einer Verminderung der Expression von NF- $\kappa$ B, ICAM-1 und VCAM-1 führt. Und darüber hinaus dieses mit einer reduzierten Infiltration von Leukozyten sowie Apoptose einhergeht. In einer anderen Studie an humanen umbilicalen Venenendothelzellen führte die Gabe von L-Arginin, mit Hilfe dessen durch eNOS NO gebildet wird, zu einer Reduzierung von ICAM-1 und VCAM-1. Und dadurch zu einer Hemmung der Monozyteninfiltration in die Endothelzellen (Adams MR *et al.* 1997). Dabei scheint bei der Hemmung der Inflammation durch NO, das Monozyten-chemotaktische Protein-1 eine wesentliche Rolle zu spielen. So konnten verschiedene Studien eine inverse Korrelation zwischen dem NO und dem Monozyten-chemotaktische Protein-1 nachweisen (Bath PM *et al.* 1991, Zeiher AM *et al.* 1995). Neuere Studien weisen daraufhin, dass die Wirkung von NO konzentrationsabhängig ist und dass physiologische Konzentrationen dabei kardioprotektiv und unphysiologisch hohe Spiegel dagegen kardiotoxisch wirken (Massion PB und Balligand JL 2007, Shimokawa H und Tsutsui M 2010). So ist zu vermuten das HDL unter anderem über den PI3K/Akt – NO Signalweg durch Verminderung von ICAM-1 und VCAM-1 anti-entzündlich wirkt (Mineo C *et al.* 2003, Nofer JR *et al.* 2004, Norata GD *et al.* 2005).

Eine zentrale Rolle wird NO in der Regulierung des Vasotonus zugesprochen. Dabei wandelt NO Guanosin-Mono-Phosphat zu zyklischem Guanosin-Mono-Phosphat um und führt so über eine Verminderung des zytosolischen Kalzium Spiegels zu einer Relaxation der Gefäßmuskulatur und damit zur Vasodilatation (Stamler JS 1994, van der Veen RC 2001, Nofer JR *et al.* 2004). So konnten Bath *et al.* (Bath PM *et al.* 1991) eine dosisabhängige Steigerung des zyklischen Guanosin-Mono-Phosphats nach Gabe von NO nachweisen. Die vasodilatatorische Wirkung von NO zeigten auch Studien an

Probanden mit einer Hypercholesterinämie, die nach der Gabe von HDL eine signifikante Verbesserung der Unterarmdurchblutung aufwiesen. Dieser Effekt war nach Gabe von L-Nitro-Arginin-N-Methyl-Arginin, dem Inhibitor der NOS, aufgehoben (Spieker S *et al.* 2002, Van der Giet M *et al.* 2002). Huang *et al.* (Huang PL *et al.* 1995) konnten anhand von eNOS KO-Mäusen durch die Gabe von L-Nitro-Arginin-N-Methyl-Arginin nachweisen, dass die in den verschiedenen Studien nachgewiesene Hypertonie (welche nach Hemmung der NOS zu beobachten ist) eNOS abhängig ist. In einer *in vivo Studie* an männlichen Probanden wiesen Rassaf *et al.* (Rassaf T *et al.* 2006) nach, dass die Hemmung der endogenen NO zu einer Verschlechterung und die Gabe von exogenem NO zu einer Verbesserung der LV Funktion beitrug. Neben der Verbesserung der myokardialen Kontraktilität konnte in Studien auch dokumentiert werden, dass die vermehrte Bereitstellung von NO die Myokardwanddehnungsfähigkeit verbessert (Paulus WJ 2001, Tschöpe C *et al.* 2005). Unklar bleibt jedoch in wieweit neben einer direkten kardioprotektiven Wirkung des NO auch eine systemische Komponente zur Verbesserung der kardialen Pumpfunktion beiträgt (Rassaf T *et al.* 2006). So ist es denkbar, dass HDL über den PI3K/Akt – NO Signalweg durch eine Vasodilatation die Nachlast des Herzens senkt und so das negative Remodeling hemmt (Mineo C *et al.* 2003, Nofer JR *et al.* 2004, Norata GD *et al.* 2005).

Über den PI3K/Akt Signalweg ist eNOS ebenfalls in der Lage die NF- $\kappa$ B vermittelte Apoptose zu hemmen (Ho FM *et al.* 2000, Matsui T *et al.* 2003, Ho FM *et al.* 2006). So zeigt eine Studie an Kardiomyozyten von Mäusen im Ischämie-Modell von Das *et al.* (Das A *et al.* 2005), dass die Steigerung der eNOS Aktivität mittels eines Phosphodiesterasehemmers zu Reduzierung der Apoptose führt. Zudem wurde in dieser Studie gezeigt, dass dieser Effekt bei eNOS KO-Mäusen abgeschwächt war, was für die Beteiligung von eNOS an der Reduzierung der Apoptose spricht. In einem anderen Experiment konnte eine Reduzierung der Apoptose sowie der kardialen Dysfunktion nach Gabe von einem Phosphodiesterasehemmer in einer Doxorubicin induzierten Kardiomyopathie gezeigt werden (Fisher PW *et al.* 2005). Es ist zu vermuten, dass die Fähigkeit vom HDL Apoptose zu reduzieren zum Teil über eine verstärkte Bereitstellung von NO bedingt ist. Diese These wird unterstützt durch die Arbeit von Nofer *et al.* (Nofer JR *et al.* 2001), welche an humanen umbilicalen Venenendothelzellen nachweisen konnten, dass HDL über den Akt/eNOS Pathway die Apoptose reduziert. Darüber hinaus scheint HDL die Apoptose auch durch die Hemmung der NF- $\kappa$ B vermittelten Phosphorylierung von p38 MAPK zu reduzieren

(Vanden Berghe W *et al.* 1998, Liang Q und Molkentin JD 2003, Dash R *et al.* 2003, Ho FM *et al.* 2006). Dieses untermauern Untersuchungen an Kardiomyozyten die zeigen, dass eine Inhibierung von p38 MAPK zu einer Reduzierung der Apoptose führt (Kerkela R und Force T 2006, Baines CP und Molkentin JD 2005). So konnte in der vorliegenden Studie eine Reduzierung der Anzahl geschädigter Endothelzellen sowie der BM nach dem hApoAI Gentransfer vs. den diabetischen Kontrollen gezeigt werden. Eine mögliche Erklärung könnte an der HDL vermittelter Steigerung der Phosphorylierung von eNOS und der verbesserten NO Bioverfügbarkeit liegen. Es ist zu vermuten, dass diese Effekte mit einer Verbesserung der ED assoziiert sind. So zeigte die Arbeit von Van Linthout *et al.* (Van Linthout S *et al.* 2009) an der Aorta im STZ Rattenmodell, dass der hApoAI Gentransfer zu einer Verringerung der NO Entkopplung sowie zu einer gesteigerten NO Bioverfügbarkeit führt und dadurch die ED vermindert wird.

Aus den gewonnenen Daten lässt sich schlussfolgern, dass der hApoAI Gentransfer über eine Steigerung der SOD-2 und ec-SOD sowie über eine Aktivierung des PI3K/Akt Signalweges und der eNOS den oxidativen Stress, die Inflammation sowie die Apoptose reduziert und dadurch die Infiltration von Entzündungszellen sowie die kardiale Fibrose hemmt. Was wiederum zu einer Verbesserung der extrazellulären Matrix mit Zunahme der kardialen Pumpfunktion führt.

### **5.5. Die Charakterisierung der hämodynamischen Parameter unter der diabetischen Kardiopathie und die Effekte des Apolipoprotein AI Gentransfers**

Die diabetische Kardiopathie ist neben einer Neuropathie und Angiopathie auch durch eine Kardiomyopathie gekennzeichnet (Tschoepe D und Roesen P 1998). Die Kardiomyopathie äußert sich hämodynamisch unter anderem durch eine systolische und diastolische Dysfunktion (Schannwell CM *et al.* 2002). So zeigten in der vorliegenden Arbeit die diabetischen Kontrollen nach einem Beobachtungszeitraum von 6 w, eine signifikante Abnahme des LV  $dP/dt_{max}$  (als Maß für die systolische Kontraktilität) und des LV  $dP/dt_{min}$  (als Maß für die diastolische Relaxation). Korrelierend zu meinen Ergebnissen zeigten Tschöpe *et al.* (Tschöpe C *et al.* 2004) die Abnahme der LV  $dP/dt_{max}$  und  $dP/dt_{min}$  an SD Ratten im diabetischen STZ-Modell. Auch andere Arbeiten konnten eine Abnahme der LV Pumpfunktion im STZ-Modell nachweisen (Westermann D *et al.* 2007, Van Linthout S *et al.* 2008). Nach dem hApoAI Gentransfer

konnte ich eine signifikante Verbesserung der hämodynamischen Parameter LV  $dP/dt_{max}$  und  $dP/dt_{min}$  dokumentieren. Unterstützt werden die Daten der vorliegenden Studie durch Untersuchungen von Kiyama *et al.* (Kiyama Y *et al.* 2009), die eine Verbesserung der LV Pumpfunktion durch Infusion von rekonstituiertem HDL für 4 w in einem Myokardinfarkt-Modell an Wistar-Ratten nachwies. Auch in *ex vivo* Experimenten zeigte sich der positive inotrope Effekt von HDL auf isolierte Kardiomyozyten. So konnten Van Linthout *et al.* (Van Linthout S *et al.* 2008) eine Verbesserung der Kontraktilität von isolierten Kardiomyozyten unter hyperglykämischen Konditionen nach Inkubation mit HDL nachweisen. Dabei zeigten sich Kontraktilitätswerte vergleichbar wie bei den normoglykämischen Kontrollen. Eine Verbesserung der kardialen Pumpfunktion nach Vorinkubation mit ApoA1-Milano fand sich auch bei einer *ex vivo* Studie an Kaninchenherzen bei Marchesi *et al.* (Marchesi *et al.* 2008).

Die Verbesserung der Herzfunktionalität, welche sich in der Verbesserung der hämodynamischen Parameter widerspiegelt, lässt sich unter anderem auf eine Reduzierung des extrazellulären Remodelings zurückführen. Dieses besteht neben der bereits beschriebenen Abnahme der Fibrose auch in einer Verbesserung der Verbindungsstrukturen der Sarkomere (Aktin-Myosin Filamente), wie in der vorliegenden Arbeit mit elektronenmikroskopischen Bildern dargestellt (siehe Abbildung 19). Zu gleichen Ergebnissen kam auch die *ex vivo* Arbeit von Marchesi *et al.* (Marchesi *et al.* 2008), die an Kaninchenherzen eine Verbesserung der Sarkomer-Strukturen mit besserem strukturellem Erhalt der Aktin-Myosin Filamente nach Inkubation mit ApoA1-Milano zeigten.

Neben dem strukturellen Zustand wird die Funktionalität der Kardiomyozyten auch durch die Beeinflussung des Kalzium-Haushaltes bestimmt. So konnte eine Studie im STZ Tiermodell zeigen, dass homozygot Kallekrein-1 exprimierenden Ratten vs. diabetischen Kontrollen eine vermehrte Wiederaufnahme von Kalzium in das SERCA aufwies und dass dieses mit einer Verbesserung der systolischen und diastolischen Funktion einherging (Tschöpe C *et al.* 2005). Verantwortlich dafür sind unter anderem Entzündungsmediatoren wie p38 MAPK sowie TNF- $\alpha$ , sie sind in der Lage die Wiederaufnahme bzw. die Freisetzung von Kalzium in das SERCA zu hemmen und so die Kontraktilitätsfähigkeit zu vermindern (Liao P *et al.* 2002, Szokodi I *et al.* 2008, Yang YY *et al.* 2010). In einer Studie von Drew *et al.* (Drew BG *et al.* 2009) konnte an Patienten mit DM Typ II nachgewiesen werden, dass die Gabe von rekonstituiertem

HDL zu einer Erhöhung der intrazellulären Kalzium-Konzentration in der Skelettmuskulatur führt. So ist anzunehmen, dass die Verbesserung der kardialen Pumpfunktion durch den hApoAI Gentransfer zum Teil über die Verbesserung des Kalzium-Haushalts ausgeübt wird. Darüber hinaus war in der vorliegenden Arbeit eine elektronenmikroskopisch nachgewiesene Verbesserung des strukturellen Aufbaus der Mitochondrien zu sehen. Auch die Arbeit von Marchesi *et al.* (Marchesi *et al.* 2008) konnte nach Gabe von ApoAI-Milano an Kaninchen-Kardiomyozyten vergleichbare Ergebnisse zeigen. Auch eine mitochondriale Dysfunktion führt zu einer Abnahme der Kontraktilität, die genauen Mechanismen hierfür sind nicht in allen Einzelheiten bekannt (Karamanlidis G *et al.* 2010). Eine mögliche Ursache ist die verminderte Bereitstellung von ATP durch die Mitochondrien, dies führt wegen der schlechteren Energiebilanz zu einer Abnahme der myokardialen Kontraktilität. Ferner werden durch die verminderte Bereitstellung von ATP vermehrt Sauerstoffradikale und ROS gebildet, was wiederum zu einem vermehrtem oxidativen Stress führt (Vassort G und Turan B 2010). So konnten Lu *et al.* (Lu Z *et al.* 2010) an Mäusen mit „aortic banding“ zeigen, dass durch diesen mechanischen Stress vermindert SOD-2 produziert wird, was mit einer verminderten Kontraktilität mit kardialer Dysfunktion einherging. In einer anderen Studie konnte bei Miniaturschweinen mit einem „aortic banding“ gezeigt werden, dass die Verbesserung der LV Funktion durch ein moderates Training zu einer Abnahme der mitochondrialen Dysfunktion führte (Emter CA und Baines CP 2010). Ferner führt die mitochondriale Dysfunktion über die reduzierte Bereitstellung von ATP und damit verbunden die Zunahme des oxidativen Stresses zur Apoptose mit Bildung von „Apoptosekörperchen“ (Vassort G und Turan B 2010, Chen L und Knowlton AA 2010). So konnten Frias *et al.* (Frias MA *et al.* 2010) an Kulturen mit Kardiomyozyten von Ratten, welche mit dem kardiotoxischen Zytostatikum Doxorubicin behandelt wurden zeigen, dass die Inkubation mit rekonstituiertem HDL zu einer Verringerung der „Apoptosekörperchen“ führt. Es ist zu vermuten, dass der hApoAI Gentransfer ferner über eine Reduzierung der Apoptose zu einer Verbesserung der Kontraktilität beiträgt.

In der vorliegenden Studie wurde gezeigt, dass der hApoAI Gentransfer zu einer Verbesserung der kardialen Pumpfunktion bei der diabetischen Kardiomyopathie führt. Dieses ist unter anderem durch eine Verbesserung der extrazellulären Matrix und des Kalzium-Haushaltes sowie eine Abnahme der mitochondrialen Dysfunktion bedingt.

## 5.6. Methodenkritik

Eine direkte Übertragung der Ergebnisse vom STZ Rattenmodell auf den Menschen ist nicht möglich, da die Ätiologie nicht exakt die Gleiche ist. Das STZ Tiermodell ähnelt jedoch dem DM Typ I des Menschen stark und lässt so Rückschlüsse auf die Pathogenese der diabetischen Stoffwechsellage zu. Ein entscheidender Vorteil des gut untersuchten und weit verbreitetem STZ Tiermodells ist die schnelle Progression der kardiovaskulären Komplikationen/Ereignisse. Daher eignet es sich aus den genannten Gründen gut, die anfangs gestellten Fragen der Studie zu beantworten. Im Gegensatz zum DM Typ I hat der DM Typ II eine viel höhere Prävalenz und Inzidenz. Auch die Pathophysiologie vom DM Typ II ist eine andere. Daher wäre es interessant, die Wirkung des hApoAI Gentransfers auf die diabetische Kardiopathie, ebenfalls beim DM Typ II zu untersuchen.

Durch den hApoAI Gentransfer wurde das HDL-C um das 1.6 fache erhöht, Aussagen über eine dosisabhängige Wirkung vom HDL-C auf die diabetische Kardiopathie sind daher nicht möglich. So wäre es interessant zu untersuchen ob die Injektion unterschiedlicher Konzentrationen der E<sub>1</sub>E<sub>3</sub>E<sub>4</sub>-deletierten adenoviralen Vektoren zu unterschiedlichen HDL-C Spiegel führen würde und ob es einen konzentrationsabhängigen Einfluss auf die diabetische Kardiopathie hätte.

Die phänotypische Charakterisierung erfolgte in dem hiesigen Studiendesign nach 6 w, daher sind auch keine Aussagen zu Verläufen der untersuchten Daten möglich. Jedoch ist die sechswöchige Behandlungsdauer wie in unserer Forschungsarbeit gewählt, ausreichend für die Untersuchung der Langzeitfolgen eines chronischen DM, wie aus anderen Arbeiten bekannt ist.

Zudem wurde in der vorliegenden Studie die präventive Wirkung des hApoAI Gentransfers auf die Entwicklung einer diabetischen Kardiopathie untersucht. Daher ist eine Aussage der Wirkung eines hApoAI Gentransfers auf eine bereits bestehende diabetische Kardiopathie nicht möglich. Ob ein hApoAI Gentransfer in der Lage ist, die diabetische Kardiopathie zu reduzieren und damit die LV Funktion zu verbessern, müssten zukünftige Untersuchungen zeigen.

## 6. Zusammenfassung

Der DM hat sich mit steigender Prävalenz in den Industrieländern zu einer Volkskrankheit entwickelt und geht mit einer erhöhten Morbidität und Mortalität einher. Eine besondere Bedeutung der durch DM verursachten Erkrankungen kommt der diabetischen Kardiopathie zu. Von Rubler 1972 beschrieben, gilt sie als eigenständige Krankheit und ist durch eine autonome Neuro-, Myo-, Mikro- und Makroangiopathie charakterisiert. Dabei spielt die diabetische Dyslipoproteinämie mit der Lipidtrias, erhöhte TG und LDL-C Spiegel sowie erniedrigte HDL-C Spiegel, eine entscheidende Rolle.

Von zahlreichen epidemiologischen und interventionellen Studien ist der inverse Zusammenhang zwischen der HDL-C Konzentration im Serum und der Inzidenz kardiovaskulärer Erkrankungen bekannt. Dieses ist neben dem RCT auch auf pleiotrope Effekte, wie die anti-inflammatorischen, anti-oxidativen, anti-apoptotischen, anti-proliferativen und anti-vasokonstriktiven Eigenschaften des HDL-C zurückzuführen. Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der Auswirkungen einer HDL-C Erhöhung auf die diabetische Kardiopathie. Zur Induktion der diabetischen Kardiopathie diente das gut untersuchte und weit verbreitete STZ Ratten-Tierversuchsmodell, welches die Stoffwechselstörungen eines DM Typ I nachahmt. Zur Erhöhung der HDL-C Konzentration stehen verschiedene Pharmaka, wie Nikotinsäure-Derivate, Fibrate, Statine und neuerdings auch CETP-Inhibitoren und Liver-X-Rezeptor Agonisten zur Verfügung. Diese erhöhen die HDL-C Konzentration jedoch nur moderat und sind zeitlich stark limitiert. In der vorliegenden Arbeit wurde zur Erhöhung des HDL-C Spiegels ein neu entwickelter E<sub>1</sub>E<sub>3</sub>E<sub>4</sub>-deletierter adenoviraler Vektor verwendet, welcher das humane ApoA1-Gen in der Expressionskassette trägt. Damit wurde eine Möglichkeit geschaffen selektiv die Konzentration des ApoA1, dem Hauptbestandteil des HDL-C, zu steigern und so die HDL-C Konzentration über einen Zeitraum von 6 w auf das 1.6-fache zu erhöhen. Von besonderer Bedeutung ist auch die Tatsache, dass die diabetischen Kontrollen im STZ-Modell keine Abnahme der HDL-C Spiegel aufwiesen. Dadurch war eine Beeinflussung der diabetischen Kardiopathie durch eine verminderte HDL-C Konzentration ausgeschlossen.

Die in der vorliegenden Studie erhöhten HDL-C Konzentrationen führten zu einer Reduzierung der diabetischen Kardiopathie. Dieses zeigte sich in einer Verbesserung der LV Hämodynamik, mit Zunahme der Kontraktions- und Relaxationsfähigkeit. Die Ursachen hierfür sind multifaktoriell bedingt, wobei die verschiedenen Pfade in einem



komplexen Wechselspiel zueinander stehen. Ein Grund für die Verbesserung der kardialen Pumpfunktion war die Reduzierung des Gesamtkollagengehaltes nach dem hApoAI Gentransfer. Weitere Pfade im komplexen Wechselspiel stellen die Inflammation, der oxidative Stress sowie die Apoptose dar.

Die Reduktion der kardialen Inflammation nach dem hApoAI Gentransfer zeigte sich durch eine Abnahme des Phosphorylierungsgrades der p38 MAPK und der Konzentrationen von *TNF- $\alpha$* , *ICAM-1* und *VCAM-1*. Für *ICAM-1* und *VCAM-1* war eine Abnahme der Konzentration neben der mRNA Ebene anhand immunhistochemischer Färbungen auch auf Proteinebene nachweisbar. Die Abnahme des oxidativen Stresses zeigte sich durch eine verminderte TBARS Konzentration, als Marker für den oxidativen Stress, sowie eine vermehrte Expression anti-oxidativer Enzyme wie *SOD-2* und *ec-SOD*. Weiterhin zeigte sich eine erhöhte Aktivität von Akt und eNOS. Molekularbiologisch konnte durch eine Aktivierung des PI3K/Akt – NO Signalweges ein zentraler HDL-downstream nachgewiesen werden. Dieser Signalweg hat auf die verschiedenen Pfade einen zentralen Einfluss, indem die Inflammation, oxidativer Stress, Apoptose, ED und das kardiovaskuläre Remodeling positiv beeinflusst wurden. Neben der LV-Funktionsverbesserung spiegelte sich die Verbesserung der diabetischen Kardiopathie auch in der zellulären Ultrastruktur wieder. Das konnte anhand elektronenmikroskopischer Untersuchungen durch eine verminderte Endothel-, Kardiomyozyten- sowie Mitochondrienschädigung nach dem hApoAI Gentransfer nachgewiesen werden. Imponierend war hier eine deutlich besser erhaltene zelluläre Struktur der Aktin-Myosin-Filamente, der Mitochondrienmorphologie (deutlich weniger „aufgedunsen“ wirkende Mitochondrien) sowie eine deutlich besser intakte Endothelbarriere (siehe Abbildung 19).

Somit konnte in der vorliegenden Arbeit anhand eines STZ Ratten-Tierversuchsmodells nachgewiesen werden, dass der hApoAI Gentransfer über eine HDL-C Erhöhung die diabetische Kardiopathie vermindert. Welches durch eine Verbesserung der kardialen Pumpfunktion nachgewiesen wurde. Es ist zu vermuten, dass diese Verbesserung der Hämodynamik auf der Kombination der oben genannten Effekte auf die verschiedenen Kompartimente des Herzens (Kardiomyozyten, extrazelluläre Matrix und Endothel) beruht. Zukünftige Studien müssen die Relevanz der HDL-C Erhöhung bei der Behandlung einer bereits vorliegenden diabetischen Kardiopathie zeigen. Auch sogenannte harte Endpunkte wie eine Mortalitätsstudie sollten die Wirksamkeit einer HDL-C Erhöhung zur Behandlung einer diabetischen Kardiopathie untersuchen.

## 7. Literaturverzeichnis

- Adams MR, Jessup W, Hailstones D, Celermajer DS. L-arginine reduces human monocyte adhesion to vascular endothelium and endothelial expression of cell adhesion molecules. *Circulation*. 1997 Feb 4;95(3):662-8.
- Adisa RA, Choudhary MI, Olorunsogo OO. Hypoglycemic activity of *Buchholzia coriacea* (Capparaceae) seeds in streptozotocin-induced diabetic rats and mice. *Exp Toxicol Pathol*. 2010 Jun 5.
- Akli S, Caillaud C, Vigne E *et al*. Transfer of a foreign gene into the brain using adenovirus vectors. *Nat Genet*. 1993;3:224-8.
- Akusjärvi, G., Pettersson, U., Roberts, R.J. Structure and function of the adenovirus 2 genome. In: Doerfler, W. (ed.). *Adenovirus DNA*. Martinus Nijhoff Publishing, Boston. 1986;53–95.
- Aldridge MA und Ito MK. Colesevelam hydrochloride: a novel bile acid-binding resin. *Ann Pharmacother*. 2001;35:898-907.
- Ali MM, Agha FG. Amelioration of streptozotocin-induced diabetes mellitus, oxidative stress and dyslipidemia in rats by tomato extract lycopene. *Scand J Clin Lab Invest*. 2009;69(3):371-9.
- Amar MJ, D'Souza W, Turner S. 5A apolipoprotein mimetic peptide promotes cholesterol efflux and reduces atherosclerosis in mice. *J Pharmacol Exp Ther*. 2010 Aug;334(2):634-41. Epub 2010 May 19.
- Aragno M, Mastrocola R, Alloatti G *et al*. Oxidative Stress Triggers Cardiac Fibrosis in the Heart of Diabetic Rats. *Endocrinology*. 2007 Sep 27
- Argyle, D. J. Gene therapy in veterinary medicine. *Vet. Rec*. 1999;144:369-376.
- Ashby DT, Rye KA, Clay MA, Vadas MA, Gamble JR, Barter PJ. Factors influencing the ability of HDL to inhibit expression of vascular cell adhesion molecule-1 in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1998;18:1450-5.
- Assmann G und Schulte H. The Prospective Cardiovascular Munster (PROCAM) study: prevalence of hyperlipidemia in persons with hypertension and/or diabetes mellitus and the relationship to coronary heart disease. *Am Heart J*. 1988;116:1713-24.
- Assmann G, Cullen P, Schulte H. The Munster Heart Study (PROCAM). Results of follow-up at 8 years. *Eur Heart J*. 1998;19 Suppl A:A2-11.

- Assmann G, Schulte H, Cullen P. New and classical risk factors--the Munster heart study (PROCAM). *Eur J Med Res.* 1997;16;2:237-42.
- Asztalos B, Zhang W, Roheim PS and Wong L. Role of free apolipoprotein A-I in cholesterol efflux. Formation of pre- alpha-migrating high-density lipoprotein particles. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997;17:1630-1636.
- Backes JM, Gibson CA, Ruisinger JF, Moriarty PM. Fibrates: what have we learned in the past 40 years? *Pharmacotherapy.* 2007;27(3):412-24.
- Baines CP, Molkentin JD. Stress signaling pathways that modulate cardiac myocyte apoptosis. *J Mol Cell Cardiol.* 2005;38:47-62.
- Baker PW, Rye KA, Gamble JR, Vadas MA, Barter PJ. Phospholipid composition of reconstituted high density lipoproteins influences their ability to inhibit endothelial cell adhesion molecule expression. *J Lipid Res.* 2000;41:1261-7.
- Bang MA, Kim HA, Cho YJ. Alterations in the blood glucose, serum lipids and renal oxidative stress in diabetic rats by supplementation of onion (*Allium cepa*. Linn). *Nutr Res Pract.* 2009 Fall;3(3):242-6. Epub 2009 Sep 30.
- Barter PJ, Baker PW, Rye KA. Effect of high-density lipoproteins on the expression of adhesion molecules in endothelial cells. *Curr Opin Lipidol.* 2002;13:285-8.
- Barter PJ, Brandrup-Wognsen G, Palmer MK, Nicholls SJ. Effect of statins on HDL: a complex process unrelated to changes in LDL: Analysis of the VOYAGER Database. *J Lipid Res* 2009.
- Barter PJ, Caulfield M, Eriksson M *et al.* Effects of torcetrapib in patients at high risk for coronary events. *N Engl J Med* 2007;357:2109-22.
- Bath PM, Hassall DG, Gladwin A-M, Palmer RMJ, Martin JF. Nitric oxide and prostacyclin: divergence of inhibitory effects on monocyte chemotaxis and adhesion to endothelium in vitro. *Arterioscler Thromb.* 1991;11:254-260.
- Behr TM, Nerurkar SS, Nelson AH *et al.* Hypertensive end-organ damage and premature mortality are p38 mitogen-activated protein kinase-dependent in a rat model of cardiac hypertrophy and dysfunction. *Circulation.* 2001 Sep 11;104(11):1292-8.
- Belalcazar LM, Merched A, Carr B *et al.* Long-term stable expression of human apolipoprotein A-I mediated by helper-dependent adenovirus gene transfer inhibits atherosclerosis progression and remodels atherosclerotic plaques in a mouse model

- of familial hypercholesterolemia. *Circulation*. 2003 Jun 3;107(21):2726-32. Epub 2003 May 12.
- Benoit P, Emmanuel F, Caillaud JM *et al*. Somatic gene transfer of human ApoA-I inhibits atherosclerosis progression in mouse models. *Circulation*. 1999;99:105-110.
  - Bergelson JM. Receptors mediating adenovirus attachment and internalization. *Biochem Pharmacol*. 1999;57:975-979.
  - Berk A. J., Lee, F., Harrison, T., Williams, J., Sharp, P. Pre-early adenovirus 5 gene product regulates synthesis of early viral messenger RNAs. *Cell*. 1979;17,935-944.
  - Berliner JA, Navab M, Fogelman AM *et al*. Atherosclerosis: basic mechanisms. Oxidation, inflammation, and genetics. *Circulation*. 1995;1;91:2488-96.
  - Birjmohun RS, Hutten BA, Kastelein JJ, Stroes ES. Efficacy and safety of high-density lipoprotein cholesterol-increasing compounds: a meta-analysis of randomized controlled trials. *J Am Coll Cardiol*. 2005;18;45:185-97.
  - Bogoyevitch MA. Signalling via stress-activated mitogen-activated protein kinases in the cardiovascular system. *Cardiovasc Res*. 2000 Mar;45(4):826-42
  - Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;7;72:248-54.
  - Brilla CG, Rupp H. Myocardial collagen matrix remodeling and congestive heart failure. *Cardiologia*. 1994;39:389-93.
  - Brun YV, Breton R, Lapointe J, Large scale sequencing projects using rapidly prepared double-stranded plasmid DNA. *DNA Seq*. 1991;1:285-9.
  - Brunham LR, Kruit JK, Pape TD *et al*. Beta-cell ABCA1 influences insulin secretion, glucose homeostasis and response to thiazolidinedione treatment. *Nat Med*. 2007 Mar;13(3):340-7. Epub 2007 Feb 18.
  - Cai L, Li W, Wang G, Guo L, Jiang Y, Kang YJ. Hyperglycemia-induced apoptosis in mouse myocardium: mitochondrial cytochrome C-mediated caspase-3 activation pathway. *Diabetes*. 2002;51:1938-48.
  - Cai L. Diabetic cardiomyopathy and its prevention by metallothionein: experimental evidence, possible mechanisms and clinical implications. *Curr Med Chem*. 2007;14(20):2193-203.

- Calabresi L, Franceschini G, Sirtori CR *et al.* Inhibition of VCAM-1 expression in endothelial cells by reconstituted high density lipoproteins. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997;8;238:61-5.
- Calabresi L, Gomaraschi M, Franceschini G. Endothelial protection by high-density lipoproteins: from bench to bedside. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003 Oct 1;23(10):1724-31. Epub 2003 Sep 11.
- Calabresi L, Sirtori CR, Paoletti R, Franceschini G. Recombinant apolipoprotein A-IMilano for the treatment of cardiovascular diseases. *Curr Atheroscler Rep.* 2006;8:163-7.
- Canner PL, Berge KG, Wenger NK *et al.* Fifteen year mortality in Coronary Drug Project patients: long-term benefit with niacin. *J Am Coll Cardiol* 1986;8:1245-55.
- Carter BJ. Adeno-associated virus vectors in clinical trials. *Hum Gene Ther.* 2005 May;16(5):541-50.
- Castelli WP, Anderson K. A population at risk. Prevalence of high cholesterol levels in hypertensive patients in the Framingham Study. *Am J Med.* 1986;14;80:23-32.
- Castelli WP, Garrison RJ, Wilson PW, Abbott RD, Kalousdian S, Kannel WB. Incidence of coronary heart disease and lipoprotein cholesterol levels. The Framingham Study. *JAMA.* 1986;256:2835-8.
- Castelli WP. Diet, smoking, and alcohol: influence on coronary heart disease risk. *Am J Kidney Dis.* 1990;16:41-6.
- Chapman MJ, Assmann G, Fruchart JC, Shepherd J, Sirtori C; European Consensus Panel on HDL-C. Raising high-density lipoprotein cholesterol with reduction of cardiovascular risk: the role of nicotinic acid--a position paper developed by the European Consensus Panel on HDL-C. *Curr Med Res Opin.* 2004;20:1253-68.
- Chapman MJ, Goldstein S, Lagrange D, Laplaud PM. A density gradient ultracentrifugal procedure for the isolation of the major lipoprotein classes from human serum. *J Lipid Res.* 1981;22:339-58.
- Chatham JC, Seymour AL, Harmsen E, Radda GK. Depletion of myocardial glutathione: its effects on heart function and metabolism during ischaemia and reperfusion. *Cardiovasc Res.* 1988;22:833-9.
- Chen L, Knowlton AA. Mitochondria and heart failure: new insights into an energetic problem. *Minerva Cardioangiol.* 2010 Apr;58(2):213-29.

- Chirmule N, Hughes JV, Gao GP, Raper SE and Wilson JM. Role of E<sub>4</sub> in eliciting CD4 T-cell and B-cell responses to adenovirus vectors delivered to murine and nonhuman primate lungs. *J Virol*. 1998;72:6138-6145.
- Chirmule N, Propert K, Magosin S, Qian Y, Qian R and Wilson J. Immune responses to adenovirus and adeno-associated virus in humans. *Gene Ther*. 1999;6:1574-1583.
- Chow L.T., Broker, T.R. The spliced structures of adenovirus 2 fiber message and the other late mRNAs. *Cell*. 1978;15:497– 510.
- Chuang YY, Chiu CH, Wong KS *et al*. Severe adenovirus infection in children. *J Microbiol Immunol Infect*. 2003;36:37-40.
- Cockerill GW, Huehns TY, Weerasinghe A *et al*. Elevation of plasma high-density lipoprotein concentration reduces interleukin-1-induced expression of E-selectin in an in vivo model of acute inflammation. *Circulation*. 2001;2;103:108-12.
- Cockerill GW, Saklatvala J, Ridley SH *et al*. High-density lipoproteins differentially modulate cytokine-induced expression of E-selectin and cyclooxygenase-2. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999;19:910-7.
- Collins T, Cybulsky MI. NF-kappaB: pivotal mediator or innocent bystander in atherogenesis? *J Clin Invest*. 2001;107:255-64.
- Cosentino F, Hishikawa K, Katusic ZS, Lüscher TF. High glucose increases nitric oxide synthase expression and superoxide anion generation in human aortic endothelial cells. *Circulation*. 1997;1;96:25-8.
- Crystal RG. Transfer of genes to humans: early lessons and obstacles to success. *Science*. 1995 Oct 20;270(5235):404-10.
- Cui Y, Blumenthal RS, Flaws JA *et al*. Non-high-density lipoprotein cholesterol level as a predictor of cardiovascular disease mortality. *Arch Intern Med*. 2001;11;161:1413-9.
- Curtiss LK, Boisvert WA. Apolipoprotein E and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol*. 2000;11:243-51.
- Danielsen EM, Hansen GH, Poulsen MD. Apical secretion of apolipoproteins from enterocytes. *J Cell Biol*. 1993;120:1347-56.
- Das A, Xi L, Kukreja RC. Phosphodiesterase-5 inhibitor, sildenafil preconditions adult cardiac myocytes against necrosis and apoptosis: essential role of NO signaling. *J Biol Chem*. 2005;280:12944–12955.

- Dash R, Schmidt AG, Pathak A *et al.* Differential regulation of p38 mitogen-activated protein kinase mediates gender-dependent catecholamine-induced hypertrophy. *Cardiovasc Res.* 2003;57:704-14.
- Daxecker H, Raab M, Markovic S, Karimi A, Griesmacher A, Mueller MM. Endothelial adhesion molecule expression in an in vitro model of inflammation. *Clin Chim Acta.* 2002;325:171-5.
- De Geest B, Stengel D, Landeloos M *et al.* Effect of overexpression of human apo A-I in C57BL/6 and C57BL/6 apo E- deficient mice on 2 lipoprotein-associated enzymes, platelet-activating factor acetylhydrolase and paraoxonase. Comparison of adenovirus- mediated human apo A-I gene transfer and human apo A-I transgenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20:68-75.
- De Geest B, Van Linthout S, Collen D. Sustained expression of human apo A-I following adenoviral gene transfer in mice. *Gene Ther.* 2001 Jan;8(2):121-7.
- De Geest B, Van Linthout S, Lox M, Collen D, Holvoet P. Sustained expression of human Apolipoprotein A-I after adenoviral gene transfer in C57BL/6 mice: role of apolipoprotein A-I promoter, apolipoprotein A-I introns, and human apolipoprotein E enhancer. *Hum Gene Ther.* 2000;11:101-12.
- De Souza JA, Vindis C, Nègre-Salvayre A. Small, dense HDL 3 particles attenuate apoptosis in endothelial cells: pivotal role of apolipoprotein A-I. *J Cell Mol Med.* 2010 Mar;14(3):608-20. Epub 2009 Feb 20.
- Dewald O, Frangogiannis NG, Zoerlein M *et al.* Development of murine ischemic cardiomyopathy is associated with a transient inflammatory reaction and depends on reactive oxygen species. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100:2700-5.
- Dhingra S, Sharma AK, Singla DK, Singal PK. p38 and ERK1/2 MAPKs mediate the interplay of TNF-alpha and IL-10 in regulating oxidative stress and cardiac myocyte apoptosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007;293:3524-31.
- Dong J, Jimi E, Zeiss C, Hayden MS, Ghosh S. Constitutively active NF-kappaB triggers systemic TNFalpha-dependent inflammation and localized TNFalpha-independent inflammatory disease. *Genes Dev.* 2010 Aug 15;24(16):1709-17.
- Dorenkamp M, Riad A, Stiehl S *et al.* Protection against oxidative stress in diabetic rats: role of angiotensin AT(1) receptor and beta 1-adrenoceptor antagonism. *Eur J Pharmacol.* 2005;27;520:179-87.

- Douglas JT and Curiel DT. Adenoviruses as vectors for gene therapy. *Science and medicine*. 1997;1:44-53.
- Downs JR, Clearfield M, Tyroler HA *et al.* Air Force/Texas Coronary Atherosclerosis Prevention Study (AFCAPS/TEXCAPS): additional perspectives on tolerability of long-term treatment with lovastatin. *Am J Cardiol*. 2001;1;87:1074-9.
- Drew BG Bitar MS, Duffy SJ, Formosa MF *et al.* High-density lipoprotein modulates glucose metabolism in patients with type 2 diabetes mellitus. *Circulation*. 2009; 21;119:2103-11.
- Emter CA, Baines CP. Low-Intensity Aerobic Interval Training Attenuates Pathological Left Ventricular Remodeling and Mitochondrial Dysfunction in Aortic-Banded Miniature Swine. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2010 Sep 3.
- Eriksson M, Carlson LA, Miettinen TA, Angelin B. *Circulation*. 1999 Aug 10;100(6):594-8. Stimulation of fecal steroid excretion after infusion of recombinant proapolipoprotein A-I. Potential reverse cholesterol transport in humans.
- Farkas K, Sárman B, Jermendy G, Somogyi A. Endothelial nitric oxide in diabetes mellitus: too much or not enough? *Diabetes Nutr Metab*. 2000;13:287-97.
- Fein FS, Kornstein LB, Strobeck JE, Capasso JM, Sonnenblick EH. Altered myocardial mechanics in diabetic rats. *Circ Res*. 1980;47:922-33.
- Fein FS, Sonnenblick EH. Diabetic cardiomyopathy. *Cardiovasc Drugs Ther*. 1994;8:65-73.
- Fein FS, Sonnenblick EH. Diabetic cardiomyopathy. *Prog Cardiovasc Dis*. 1985;27:255-70.
- Fielitz J, Philipp S, Herda LR. Inhibition of prolyl 4-hydroxylase prevents left ventricular remodelling in rats with thoracic aortic banding. *Eur J Heart Fail*. 2007 Apr;9(4):336-42. Epub 2006 Dec 4.
- Fisher PW, Salloum F, Das A, Hyder H, Kukreja RC. Phosphodiesterase-5 inhibition with sildenafil attenuates cardiomyocyte apoptosis and left ventricular dysfunction in a chronic model of doxorubicin cardiotoxicity. *Circulation*. 2005 Apr 5;111(13):1601-10.
- Förstermann U, Münzel T. Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. *Circulation*. 2006;4;113:1708-14.
- Fredrickson DS, Levy RI, Lees RS. Fat transport in lipoproteins--an integrated approach to mechanisms and disorders. *N Engl J Med*. 1967;5;276:34-42



- Frias MA, Lang U, Gerber-Wicht C, James RW. Native and reconstituted HDL protect cardiomyocytes from doxorubicin-induced apoptosis. *Cardiovasc Res*. 2010 Jan 1;85(1):118-26.
- Fruchart JC. Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha activation and high-density lipoprotein metabolism. *Am J Cardiol*. 2001 Dec 20;88(12A):24N-29N.
- Fryirs MA, Barter PJ, Appavoo M et al. Effects of high-density lipoproteins on pancreatic beta-cell insulin secretion. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010 Aug;30(8):1642-8. Epub 2010 May 13.
- Galbreath EJ, Holland RE, Trapp AL *et al*. Adenovirus-associated pneumonia and hepatitis in four llamas. *J Am Vet Med Assoc*. 1994 Feb 1;204(3):424-6.
- Gamble J, Lopaschuk GD. Glycolysis and glucose oxidation during reperfusion of ischemic hearts from diabetic rats. *Biochim Biophys Acta*. 1994;11;1225:191-9
- García-Cardeña G, Fan R, Stern DF, Liu J, Sessa WC. Endothelial nitric oxide synthase is regulated by tyrosine phosphorylation and interacts with caveolin-1. *J Biol Chem*. 1996;1;271:27237-40.
- Garvey WT, Hardin D, Juhaszova M, Dominguez JH. Effects of diabetes on myocardial glucose transport system in rats: implications for diabetic cardiomyopathy. *Am J Physiol*. 1993;264:H837-44.
- Goodrum FD and Ornelles DA. Roles for the E<sub>4</sub> orf6, orf3, and E<sub>1B</sub> 55-kilodalton proteins in cell cycle-independent adenovirus replication. *J Virol*. 1999;73:7474-7488.
- Gordon DJ, Probstfield JL, Garrison RJ *et al*. High-density lipoprotein cholesterol and cardiovascular disease. Four prospective American studies. *Circulation*. 1989;79:8-15.
- Gordon DJ, Rifkind BM. High-density lipoprotein--the clinical implications of recent studies. *N Engl J Med*. 1989;9;321:1311-6.
- Gordon T, Kannel WB, Castelli WP, Dawber TR. Lipoproteins, cardiovascular disease, and death. The Framingham study. *Arch Intern Med*. 1981;141:1128-31.
- Gotto AM Jr. High-density lipoprotein cholesterol: an updated view. *Curr Opin Pharmacol*. 2001;1:109-12.
- Goyal J, Wang K, Liu M and Subbaiah PV. Novel function of lecithin-cholesterol acyltransferase. Hydrolysis of oxidized polar phospholipids generated during lipoprotein oxidation. *J Biol Chem*. 1997;272:16231-16239.

- Graiani G, Lagrasta C, Migliaccio E. Genetic deletion of the p66Shc adaptor protein protects from angiotensin II-induced myocardial damage. *Hypertension*. 2005 Aug;46(2):433-40. Epub 2005 Jul 5.
- Hauner H. Occurrence of diabetes mellitus in Germany. *Dtsch Med Wochenschr*. 1998;12;123:777-82.
- Havel RJ, Eder HA, Bragdon JH. The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J Clin Invest*. 1955;34:1345-53.
- Hitt M., Bett, A. J., Addison, C. L., Prevec, L., Graham, F. Techniques for human adenovirus vector construction and characterization. In: Adolph, K. W. (Ed.), *viral gene techniques*. Academic Press, San Diego. 1995;1:13-30.
- Ho FM, Lin WW, Chen BC *et al*. High glucose-induced apoptosis in human vascular endothelial cells is mediated through NF-kappaB and c-Jun NH2-terminal kinase pathway and prevented by PI3K/Akt/eNOS pathway. *Cell Signal*. 2006;18:391-9.
- Ho FM, Liu SH, Liao CS, Huang PJ, Lin-Shiau SY: High glucose-induced apoptosis in human endothelial cells is mediated by sequential activations of c-Jun NH2-terminal kinase and caspase-3. *Circulation*. 2000;101:2618–2624.
- Ho FM, Liu SH, Liao CS, Huang PJ, Shiah SG, Lin-Shiau SY. Nitric oxide prevents apoptosis of human endothelial cells from high glucose exposure during early stage. *J Cell Biochem*. 1999;1;75:258-63.
- Hohmeier HE, Thigpen A, Tran VV, Davis R, Newgard CB. Stable expression of manganese superoxide dismutase (MnSOD) in insulinoma cells prevents IL-1beta-induced cytotoxicity and reduces nitric oxide production. *J Clin Invest*. 1998 May 1;101(9):1811-20.
- Hsu SM, Raine L, Fanger H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem*. 1981;29:577-80.
- Huang A, Li C, Kao RL, Stone WL. Lipid hydroperoxides inhibit nitric oxide production in RAW264.7 macrophages. *Free Radic Biol Med*. 1999;26:526-37.
- Huang PL, Huang Z, Mashimo H *et al* (1995). Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. *Nature* 377, 239-242.
- Hughes SJ, Powis SH, Press M. Surviving native beta-cells determine outcome of syngeneic intraportal islet transplantation. *Cell Transplant*. 2001;10:145-51.

- Hyka N, Dayer JM, Modoux C *et al.* Apolipoprotein A-I inhibits the production of interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha by blocking contact-mediated activation of monocytes by T lymphocytes. *Blood*. 2001;97:2381-2389.
- Ishii T, Wallace AM, Zhang X *et al.* Stability of housekeeping genes in alveolar macrophages from COPD patients. *Eur Respir J*. 2006;27:300-6.
- Ishikawa T, Imura A, Tanaka K, Shirane H, Okuma M, Uchiyama T. E-selectin and vascular cell adhesion molecule-1 mediate adult T-cell leukemia cell adhesion to endothelial cells. *Blood*. 1993;1;82:1590-8.
- Iwata A, Sai S, Nitta Y. Liposome-mediated gene transfection of endothelial nitric oxide synthase reduces endothelial activation and leukocyte infiltration in transplanted hearts. *Circulation*. 2001 Jun 5;103(22):2753-9.
- Jiang X, Francone OL, Bruce C *et al.* Increased prebeta-high density lipoprotein, apolipoprotein AI, and phospholipid in mice expressing the human phospholipid transfer protein and human apolipoprotein AI transgenes. *J Clin Invest*. 1996;15;98:2373-80.
- Jin FY, Kamanna VS, Chuang MY, Morgan K, Kashyap ML. Gemfibrozil stimulates apolipoprotein A-I synthesis and secretion by stabilization of mRNA transcripts in human hepatoblastoma cell line (Hep G2). *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1996;16:1052-62.
- Jonas A. Lecithin-cholesterol acyltransferase in the metabolism of high-density lipoproteins. *Biochim Biophys Acta*. 1991;1084:205-20.
- Kado S, Wakatsuki T, Yamamoto M, Nagata N. Expression of intercellular adhesion molecule-1 induced by high glucose concentrations in human aortic endothelial cells. *Life Sci*. 2001;68:727-37.
- Kamanna VS, Kashyap ML. Nicotinic acid (niacin) receptor agonists: will they be useful therapeutic agents? *Am J Cardiol*. 2007;3;100:S53-61.
- Kania G, Blyszczuk P, Eriksson U. Mechanisms of cardiac fibrosis in inflammatory heart disease. *Trends Cardiovasc Med*. 2009 Nov;19(8):247-52
- Kannel WB und McGee DL. Diabetes and cardiovascular risk factors: the Framingham study. *Circulation*. 1979;59:8-13.
- Kannel WB, Hjortland M, Castelli WP. Role of diabetes in congestive heart failure: the Framingham study. *Am J Cardiol*. 1974;34:29-34.

- Kannel WB, Wilson PW. Efficacy of lipid profiles in prediction of coronary disease. *Am Heart J.* 1992;124:768-74.
- Kannel WB. Lipid profile and the potential coronary victim. *Am J Clin Nutr.* 1971;24:1074-81.
- Karamanlidis G, Nascimben L, Couper GS, Shekar PS, del Monte F, Tian R. Defective DNA replication impairs mitochondrial biogenesis in human failing hearts. *Circ Res.* 2010 May 14;106(9):1541-8. Epub 2010 Mar 25.
- Kassai A, Illyes L, Mirdamadi HZ *et al.* The effect of atorvastatin therapy on lecithin: cholesterol acyltransferase, cholesteryl ester transfer protein and the antioxidant paraoxonase. *Clin Biochem.* 2007;40:1-5.
- Kerkela R, Force T. p38 mitogen-activated protein kinase: a future target for heart failure therapy? *J Am Coll Cardiol.* 2006;48:556-8.
- Kim HK, Kim MJ, Lyu ES, Shin DH. Improvement of diabetic complication by *hydrangea dulcis folium* in streptozotocin-induced diabetic rats. *Biol Pharm Bull.* 2009 Jan;32(1):153-6.
- Kim TH, Lee YH, Kim KH. Role of lung apolipoprotein A-I in idiopathic pulmonary fibrosis: antiinflammatory and antifibrotic effect on experimental lung injury and fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2010 Sep 1;182(5):633-42. Epub 2010 May 12.
- King H., R.E. Aubert, and W.H. Herman, Global burden of diabetes, 1995-2025: prevalence, numerical estimates, and projections. *Diabetes Care.* 1998;21:1414-31.
- Kiya Y, Miura S, Imaizumi S. Reconstituted high-density lipoprotein attenuates postinfarction left ventricular remodeling in rats. *Atherosclerosis.* 2009 Mar;203(1):137-44. Epub 2008 Jun 6.
- Komers R, Schutzer WE, Reed JF *et al.* Altered endothelial nitric oxide synthase targeting and conformation and caveolin-1 expression in the diabetic kidney. *Diabetes.* 2006;55:1651-9.
- Kontush A, de Faria EC, Chantepie S, Chapman MJ. Antioxidative activity of HDL particle subspecies is impaired in hyperalphalipoproteinemia: relevance of enzymatic and physicochemical properties. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24:526-33.
- Kostner GM. Apolipoprotein analysis. *Med Lab (Stuttg).* 1977;30:302-12.
- Kruger AL, Peterson S, Turkseven S *et al.* D-4F induces heme oxygenase-1 and extracellular superoxide dismutase, decreases endothelial cell sloughing, and

- improves vascular reactivity in rat model of diabetes. *Circulation*. 2005;14;111:3126-34.
- Kuo PC, Abe KY, Schroeder RA. Interleukin-1-induced nitric oxide production modulates glutathione synthesis in cultured rat hepatocytes. *Am J Physiol*. 1996;271:C851-62.
  - Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;15;227:680-5.
  - Landmesser U, Dikalov S, Price SR *et al*. Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension. *J Clin Invest*. 2003;111:1201-9.
  - Lehto S, Palomaki P, Miettinen H *et al*. Serum cholesterol and high density lipoprotein cholesterol distributions in patients with acute myocardial infarction and in the general population of Kuopio province, eastern Finland. *J Intern Med*. 1993;233:179-85.
  - Liang HQ, Rye KA, Barter PJ. Dissociation of lipid-free apolipoprotein A-I from high density lipoproteins. *J Lipid Res*. 1994;35:1187-99.
  - Liang Q, Molkentin JD. Redefining the roles of p38 and JNK signaling in cardiac hypertrophy: dichotomy between cultured myocytes and animal models. *J Mol Cell Cardiol*. 2003;35:1385-94.
  - Liao P, Wang SQ, Wang S *et al*. p38 Mitogen-activated protein kinase mediates a negative inotropic effect in cardiac myocytes. *Circ Res*. 2002;90:190-6.
  - Like AA and Rossini AA. Streptozotocin-induced pancreatic insulinitis: new model of diabetes mellitus. *Science*, 193: 415-417. 1976.
  - Livshits G, Weisbort J, Meshulam N, Brunner D. Multivariate analysis of the twenty-year follow-up of the Donolo-Tel Aviv Prospective Coronary Artery Disease Study and the usefulness of high density lipoprotein cholesterol percentage. *Am J Cardiol*. 1989;63:676-81.
  - Lu Z, Xu X, Hu X. PGC-1 alpha regulates expression of myocardial mitochondrial antioxidants and myocardial oxidative stress after chronic systolic overload. *Antioxid Redox Signal*. 2010 Oct 1;13(7):1011-22.
  - Lusa S, Jauhiainen M, Metso J, Somerharju P, Ehnholm C. The mechanism of human plasma phospholipid transfer protein-induced enlargement of high-density lipoprotein particles: evidence for particle fusion. *Biochem J*. 1996;313:275-82.

- Mackness MI, Arrol S, Durrington PN. Paraoxonase prevents accumulation of lipoperoxides in low-density lipoprotein. *FEBS Lett.* 1991 Jul 29;286(1-2):152-4. Erratum in: *FEBS Lett.* 1991;292:307.
- Manna SK, Zhang HJ, Yan T, Oberley LW, Aggarwal BB. Overexpression of manganese superoxide dismutase suppresses tumor necrosis factor-induced apoptosis and activation of nuclear transcription factor-kappaB and activated protein-1. *J Biol Chem.* 1998 May 22;273(21):13245-54.
- Mänttari M, Huttunen JK, Koskinen P *et al.* Lipoproteins and coronary heart disease in the Helsinki Heart Study. *Eur Heart J.* 1990;11:26-31.
- Marchesi M, Booth EA, Rossoni G. Apolipoprotein A-IMilano/POPC complex attenuates post-ischemic ventricular dysfunction in the isolated rabbit heart. *Atherosclerosis.* 2008 Apr;197(2):572-8. Epub 2007 Oct 22.
- Marchesi M, Sirtori CR. Therapeutic use of the high-density lipoprotein protein and peptides. *Expert Opin Investig Drugs.* 2006;15:227-41.
- Massion PB, Balligand JL. Relevance of nitric oxide for myocardial remodeling. *Curr Heart Fail Rep.* 2007 Mar;4(1):18-25.
- Matsui T, Nagoshi T, Rosenzweig A. Akt and PI 3-kinase signaling in cardiomyocyte hypertrophy and survival. *Cell Cycle.* 2003;2:220-3.
- Miao B, Zondlo S, Gibbs S *et al.* Raising HDL cholesterol without inducing hepatic steatosis and hypertriglyceridemia by a selective LXR modulator. *J Lipid Res.* 2004;45:1410-7.
- Mineo C, Yuhanna IS, Quon MJ, Shaul PW. High density lipoprotein-induced endothelial nitric-oxide synthase activation is mediated by Akt and MAP kinases. *J Biol Chem.* 2003;278:9142-9.
- Mizushige K, Yao L, Noma T *et al.* Alteration in left ventricular diastolic filling and accumulation of myocardial collagen at insulin-resistant prediabetic stage of a type II diabetic rat model. *Circulation.* 2000;101:899-907.
- Modrak J. Collagen metabolism in the myocardium from streptozotocin-diabetic rats. *Diabetes.* 1980;29:547-50.
- Mohr L, Geissler M. Gene therapy: new developments. *Praxis (Bern 1994).* 2002 Dec 18;91(51-52):2227-35.
- Morgan J, Carey C, Lincoff A, Capuzzi D. High-density lipoprotein subfractions and risk of coronary artery disease. *Curr Atheroscler Rep.* 2004;6:359-65.

- Morgan RA, Anderson WF. Human gene therapy. *Annu Rev Biochem.* 1993;62:191-217.
- Movahedian A, Zolfaghari B, Sajjadi SE, Moknatjou R. Antihyperlipidemic effect of peucedanum pastinacifolium extract in streptozotocin-induced diabetic rats. *Clinics (Sao Paulo).* 2010 Jun;65(6):629-33.
- Muslin AJ. MAPK signalling in cardiovascular health and disease: molecular mechanisms and therapeutic targets. *Clin Sci (Lond).* 2008 Oct;115(7):203-18.
- Musliner TA, Long MD, Forte TM *et al.* Dissociation of high density lipoprotein precursors from apolipoprotein B-containing lipoproteins in the presence of unesterified fatty acids and a source of apolipoprotein A-I. *J Lipid Res.* 1991;32:917-33.
- Nanjee MN, Cooke CJ, Garvin R *et al.* Intravenous apoA-I/lecithin discs increase pre-beta-HDL concentration in tissue fluid and stimulate reverse cholesterol transport in humans. *J Lipid Res.* 2001 Oct;42(10):1586-93.
- Navab M, Hama SY, Cooke CJ *et al.* Normal high density lipoprotein inhibits three steps in the formation of mildly oxidized low density lipoprotein: step 1. *J Lipid Res.* 2000;41:1481-1494.
- Neubeck W, Wieland H, Habenicht A, Muller P, Baggio G, Seidel D. Improved assessment of plasma lipoprotein patterns. III. Direct measurement of lipoproteins after gel-electrophoresis. *Clin Chem.* 1977;23:1296-300.
- Nevins JR, (1981). Mechanism of activation of early viral transcription by the adenovirus E<sub>1</sub> gene products. *Cell.* 1981;26,213-220.
- Nishikawa T, Edelstein D, Brownlee M. The missing link: a single unifying mechanism for diabetic complications. *Kidney Int Suppl.* 2000;77:S26-30.
- Nissen SE, Tardif JC, Nicholls SJ *et al.* Effect of torcetrapib on the progression of coronary atherosclerosis. *N Engl J Med* 2007;356:1304-16.
- Nofer JR, Geigenmüller S, Göpfert C, Assmann G, Buddecke E, Schmidt A. High density lipoprotein-associated lysosphingolipids reduce E-selectin expression in human endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003 Oct 10;310(1):98-103.
- Nofer JR, Kehrel B, Fobker M, Levkau B, Assmann G, von Eckardstein A. HDL and arteriosclerosis: beyond reverse cholesterol transport. *Atherosclerosis.* 2002;161:1-16.

- Nofer JR, Levkau B, Wolinska I. Suppression of endothelial cell apoptosis by high density lipoproteins (HDL) and HDL-associated lysosphingolipids. *J Biol Chem*. 2001 Sep 14;276(37):34480-5. Epub 2001 Jun 29.
- Nofer JR, van der Giet M, Tölle M *et al*. HDL induces NO-dependent vasorelaxation via the lysophospholipid receptor S1P3. *J Clin Invest*. 2004;113:569-81.
- Norata GD, Callegari E, Marchesi M, *et al*. High-density lipoproteins induce transforming growth factor beta 2 expression in human endothelial cells. *Circulation*. 2005
- Noutsias M., Pauschinger M., Ostermann K *et al*. Digital image analysis system for the quantification of infiltrates and cell adhesion molecules in inflammatory cardiomyopathy. *Proinfla. Med. Sci. Monit*. 2002;8:59-71.
- Ohashi R, Mu H, Wang X, Yao Q, Chen C. Reverse cholesterol transport and cholesterol efflux in atherosclerosis. *QJM*. 2005 Dec;98(12):845-56. Epub 2005 Oct 28.
- Ozaki M, Kawashima S, Yamashita T *et al*. Overexpression of endothelial nitric oxide synthase attenuates cardiac hypertrophy induced by chronic isoproterenol infusion. *Circ J*. 2002;66:851-6.
- Palitzsch KD, Nusser J, Arndt H, Enger I, Zietz B, Cuk A. Die Prävalenz des Diabetes mellitus wird in Deutschland deutlich unterschätzt – eine bundesweite epidemiologische Studie auf der Basis einer HbA1c-Analyse. *Diabetes und Stoffwechsel*. 1999;8:189-200.
- Parasrampur DA, de Boer P, Desai-Krieger D, Chow AT, Jones CR. Single-dose pharmacokinetics and pharmacodynamics of RWJ 67657, a specific p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor: a first-in-human study. *J Clin Pharmacol*. 2003 Apr;43(4):406-13.
- Paulson DJ, Crass MF 3rd. Endogenous triacylglycerol metabolism in diabetic heart. *Am J Physiol*. 1982;242:1084-94.
- Paulus WJ. The role of nitric oxide in the failing heart. *Heart Fail Rev*. 2001;6:105-18.
- Pedersen TR, Wilhelmsen L, Faergeman O *et al*. Follow-up study of patients randomized in the Scandinavian simvastatin survival study (4S) of cholesterol lowering. *Am J Cardiol*. 2000;86:257-62.



- Peng XQ, Damarla M, Skirball J. Protective role of PI3-kinase/Akt/eNOS signaling in mechanical stress through inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase in mouse lung. *Acta Pharmacol Sin.* 2010 Feb;31(2):175-83.
- Plump AS, Scott CJ, Breslow JL. Human apolipoprotein A-I gene expression increases high density lipoprotein and suppresses atherosclerosis in the apolipoprotein E- deficient mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 9607-11.
- Potter H. Application of electroporation in recombinant DNA technology. *Methods Enzymol.* 1993;217:461-78.
- Puranik R, Bao S, Nobecourt E *et al.* Low dose apolipoprotein A-I rescues carotid arteries from inflammation in vivo. *Atherosclerosis.* 2008;196:240-7.
- Raev DC. Which left ventricular function is impaired earlier in the evolution of diabetic cardiomyopathy? An echocardiographic study of young type I diabetic patients. *Diabetes Care.* 1994;17:633-9.
- Ragot T, Opolon, P., Perricaudet, M. Adenoviral gene delivery. In: *Methods in cell biology.* Academic press, New York. 1998;229-269.
- Rai PK, Mehta S, Watal G. Hypolipidaemic & hepatoprotective effects of Psidium guajava raw fruit peel in experimental diabetes. *Indian J Med Res.* 2010 Jun;131:820-4.
- Rashid S, Barrett PH, Uffelman KD, Watanabe T, Adeli K, Lewis GF. Lipolytically modified triglyceride-enriched HDLs are rapidly cleared from the circulation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:483-7.
- Rassaf T, Poll LW, Brouzos P. Positive effects of nitric oxide on left ventricular function in humans. *Eur Heart J.* 2006 Jul;27(14):1699-705. Epub 2006 Jun 16.
- Rathmann W, Haastert B, Icks A *et al.* High prevalence of undiagnosed diabetes mellitus in Southern Germany: target populations for efficient screening. The KORA survey 2000. *Diabetologia.* 2003;46:182-9.
- Reichl D, Miller NE. Pathophysiology of reverse cholesterol transport: insights from inherited disorders of lipoprotein metabolism. *Arteriosclerosis.* 1989;9:785–797
- Riad A, Unger D, Du J *et al.* Chronic inhibition of p38MAPK improves cardiac and endothelial function in experimental diabetes mellitus. *Eur J Pharmacol.* 2007 Jan 5;554(1):40-5. Epub 2006 Sep 14.
- Ritter T, Lehmann M, Volk HD. Improvements in gene therapy: averting the immune response to adenoviral vectors. *BioDrugs.* 2002;16(1):3-10.

- Robbesyn F, Garcia V, Auge N *et al.* HDL counterbalance the proinflammatory effect of oxidized LDL by inhibiting intracellular reactive oxygen species rise, proteasome activation, and subsequent NF-kappaB activation in smooth muscle cells. *FASEB J.* 2003;17:743-5.
- Roesen P, Du X, Sui GZ. Molecular mechanisms of endothelial dysfunction in the diabetic heart. *Adv Exp Med Biol.* 2001;498:75-86.
- Rowe WP, Huebner RJ, Gilmore LK, Parrott RH, Ward TG. Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1953;84:570-3.
- Rubler S, Dlugash J, Yuceoglu YZ, Kumral T, Branwood AW, Grishman A. New type of cardiomyopathy associated with diabetic glomerulosclerosis. *Am J Cardiol.* 1972;8;30:595-602.
- Russell WC. Update on adenovirus and its vectors. *J Gen Virol.* 2000;81:2573-604.
- Rye KA, Clay MA, Barter PJ. Remodelling of high density lipoproteins by plasma factors. *Atherosclerosis.* 1999;145:227-38.
- Saito Y, Fujioka D, Kawabata K *et al.* Statin reverses reduction of adiponectin receptor expression in infarcted heart and in TNF-alpha-treated cardiomyocytes in association with improved glucose uptake. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007;293:3490-7.
- Salt IP, Morrow VA, Brandie FM, Connell JM, Petrie JR. High glucose inhibits insulin-stimulated nitric oxide production without reducing endothelial nitric-oxide synthase Ser1177 phosphorylation in human aortic endothelial cells. *J Biol Chem.* 2003;278:18791-7.
- Sasaki M, Bharwani S, Jordan P. Increased disease activity in eNOS-deficient mice in experimental colitis. *Free Radic Biol Med.* 2003 Dec 15;35(12):1679-87.
- Schaack J, Ho WY, Freimuth P and Shenk T. Adenovirus terminal protein mediates both nuclear matrix association and efficient transcription of adenovirus DNA. *Genes Dev.* 1990;4:1197-1208.
- Schannwell CM, Schneppenheim M, Perings S, Plehn G, Strauer BE. Left ventricular diastolic dysfunction as an early manifestation of diabetic cardiomyopathy. *Cardiology.* 2002;98:33-9.
- Schieven GL. The p38alpha kinase plays a central role in inflammation. *Curr Top Med Chem.* 2009;9(11):1038-48.

- Schmidt A, Geigenmüller S, Völker W, Buddecke E. The antiatherogenic and antiinflammatory effect of HDL-associated lysosphingolipids operates via Akt -->NF-kappaB signalling pathways in human vascular endothelial cells. *Basic Res Cardiol.* 2006;101:109-16.
- Schmitz FJ, Rösen P, Reinauer H. Improvement of myocardial function and metabolism in diabetic rats by the carnitine palmitoyl transferase inhibitor Etomoxir. *Horm Metab Res.* 1995;27:515-22.
- Schmitz G, Kaminski WE, Orso E. ABC transporters in cellular lipid trafficking. *Curr Opin Lipidol.* 2000;11:493-501.
- Schmitz G, Robenek H, Assmann G. Role of the high density lipoprotein-receptor cycle in macrophage-cholesterol metabolism. *Klin Wochenschr.* 1986;64:979-85.
- Schwartz GG, Olsson AG, Ballantyne CM *et al.* dal-OUTCOMES Committees and Investigators. Rationale and design of the dal-OUTCOMES trial: efficacy and safety of dalcetrapib in patients with recent acute coronary syndrome. *Am Heart J.* 2009;158:896-901.
- Schwarz MA, Lazo JS, Yalowich JC *et al.* Metallothionein protects against the cytotoxic and DNA-damaging effects of nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92:4452-6.
- Shen X, Zheng S, Metreveli NS, Epstein PN. Protection of cardiac mitochondria by overexpression of MnSOD reduces diabetic cardiomyopathy. *Diabetes.* 2006;55:798-805
- Shimizu M, Isogai Y. Heart failure due to metabolic heart disorders. *Nippon Rinsho.* 1993;51:1362-6.
- Shimokawa H, Tsutsui M. Nitric oxide synthases in the pathogenesis of cardiovascular disease: lessons from genetically modified mice. *Pflugers Arch.* 2010 May;459(6):959-67. Epub 2010 Feb 24.
- Simons K, Ikonen E. How cells handle cholesterol. *Science.* 2000;1;290:1721-6.
- Singer DE, Nathan DM, Anderson KM, Wilson PW, Evans JC. Association of HbA1c with prevalent cardiovascular disease in the original cohort of the Framingham Heart Study. *Diabetes.* 1992;41:202-8.
- Sirtori CR, Calabresi L, Franceschini G *et al.* Cardiovascular status of carriers of the apolipoprotein A-I(Milano) mutant: the Limone sul Garda study. *Circulation.* 2001;103:1949-54.

- Sivasubramanian N, Coker ML, Kurrelmeyer KM *et al.* Left ventricular remodeling in transgenic mice with cardiac restricted overexpression of tumor necrosis factor. *Circulation*. 2001;104:826-31.
- Somia NS, Verma IM. Gene therapy: trials and tribulations. *Nature Rev/Genetics*. 2000;1:91-99.
- Spector KS. Diabetic cardiomyopathy. *Clin Cardiol*. 1998;21:885-7.
- Spieker LE, Sudano I, Hurlimann D *et al.* High-density lipoprotein restores endothelial function in hypercholesterolemic men. *Circulation*. 2002;26;105:1399-402.
- Spinale FG, Peterson JT. Introduction to special issue on the matrix metalloproteinases: New insights into myocardial remodeling. 2004;9:5-6.
- Srinivasan S, Hatley ME, Bolick DT *et al.* Hyperglycaemia-induced superoxide production decreases eNOS expression via AP-1 activation in aortic endothelial cells. *Diabetologia*. 2004;47:1727-34.
- Stamler J, Wentworth D, Neaton JD. Is relationship between serum cholesterol and risk of premature death from coronary heart disease continuous and graded? Findings in 356,222 primary screenees of the Multiple Risk Factor Intervention Trial (MRFIT). *JAMA*. 1986;28;256:2823-8.
- Stamler JS. Redox signaling: nitrosylation and related target interactions of nitric oxide. *Cell*. 1994;78:931-6.
- Stannard AK, Khan S, Graham A, Owen JS, Allen SP. Inability of plasma high-density lipoproteins to inhibit cell adhesion molecule expression in human coronary artery endothelial cells. *Atherosclerosis*. 2001;154:31-8.
- Stokic E, Marinkov J. [Treatment of low HDL-cholesterol levels in the reduction of cardiovascular risk]. *Med Pregl*. 2007;60:145-50.
- Sun L, Wang S, Hu C, Zhang X. Down-regulation of PKHD1 induces cell apoptosis through PI3K and NF- $\kappa$ B pathways. *Exp Cell Res*. 2011 Feb 11.
- Suzuki K, Murtuza B, Sammut IA, *et al.* Heat shock protein 72 enhances manganese superoxide dismutase activity during myocardial ischemia-reperfusion injury, associated with mitochondrial protection and apoptosis reduction. *Circulation*. 2002;106:1270-6.
- Syväne M, Taskinen MR. Lipids and lipoproteins as coronary risk factors in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Lancet*. 1997;350;1:S120-3.

- Szokodi I, Kerkelä R, Kubin AM. Functionally opposing roles of extracellular signal-regulated kinase 1/2 and p38 mitogen-activated protein kinase in the regulation of cardiac contractility. *Circulation*. 2008 Oct 14;118(16):1651-8. Epub 2008 Sep 29.
- Tabet F, Remaley AT, Segaliny AI et al. The 5A apolipoprotein A-I mimetic peptide displays antiinflammatory and antioxidant properties in vivo and in vitro. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010 Feb;30(2):246-52. Epub 2009 Dec 3.
- Tall AR. Plasma high density lipoproteins. Metabolism and relationship to atherogenesis. *J Clin Invest*. 1990 Aug;86(2):379-84.
- Tamehiro N, Shigemoto-Mogami Y, Kakeya T *et al*. Sterol regulatory element-binding protein-2- and liver X receptor-driven dual promoter regulation of hepatic ABC transporter A1 gene expression: mechanism underlying the unique response to cellular cholesterol status. *J Biol Chem* 2007;282:21090-9.
- Tangirala RK, Tsukamoto K, Chun SH, Usher D, Pure E, Rader DJ. Regression of atherosclerosis induced by liver-directed gene transfer of apolipoprotein A-I in mice. *Circulation* 1999; 100: 1816-22.
- Taylor AJ, Sullenberger LE, Lee HJ, Lee JK, Grace KA. Arterial Biology for the Investigation of the Treatment Effects of Reducing Cholesterol (ARBITER) 2: a double-blind, placebo-controlled study of extended-release niacin on atherosclerosis progression in secondary prevention patients treated with statins. *Circulation* 2004; 110: 3512-7.
- The Bezafibrate Infarction Prevention (BIP) study. Secondary prevention by raising HDL cholesterol and reducing triglycerides in patients with coronary artery disease. *Circulation* 2000;102:21-7.
- Thuahnai ST, Lund-Katz S, Williams DL and Phillips MC. Scavenger receptor class B, type I-mediated uptake of various lipids into cells. Influence of the nature of the donor particle interaction with the receptor. *J Biol Chem*. 2001;276:43801-43808.
- Tölle M, Pawlak A, Schuchardt M. HDL-associated lysosphingolipids inhibit NAD(P)H oxidase-dependent monocyte chemoattractant protein-1 production. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008 Aug;28(8):1542-8. Epub 2008 May 15.
- Tomlinson KC, Gardiner SM, Hebden RA, Bennett T. Functional consequences of streptozotocin-induced diabetes mellitus, with particular reference to the cardiovascular system. *Pharmacol Rev*. 1992;44:103-150.

- Tonkin AM, Colquhoun D, Emberson J *et al.* White HD, Hunt D. Effects of pravastatin in 3260 patients with unstable angina: results from the LIPID study. *Lancet*. 2000;356:1871-5.
- Trotman LC, Mosberger N, Fornerod M, Stidwill RP and Greber UF. Import of adenovirus DNA involves the nuclear pore complex receptor CAN/Nup214 and histone H1. *Nat Cell Biol*. 2001;3:1092-1100.
- Tschoepe D, Roesen P. Heart disease in diabetes mellitus: a challenge for early diagnosis and intervention. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 1998;106:16-24.
- Tschöpe C, Schultheiss HP. Diabetic cardiopathy: pathogenesis, diagnosis and therapy. *Internist (Berl)*. 2003;44:806-12.
- Tschöpe C, Spillmann F, Rehfeld U. Improvement of defective sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> transport in diabetic heart of transgenic rats expressing the human kallikrein-1 gene. *FASEB J*. 2004 Dec;18(15):1967-9. Epub 2004 Sep 24.
- Tschöpe C, Walther T, Escher F *et al.* Transgenic activation of the kallikrein-kinin system inhibits intramyocardial inflammation, endothelial dysfunction and oxidative stress in experimental diabetic cardiomyopathy. *Faseb J*. 2005;19:2057-9.
- Tschöpe C, Walther T, Koniger J *et al.* Prevention of cardiac fibrosis and left ventricular dysfunction in diabetic cardiomyopathy in rats by transgenic expression of the human tissue kallikrein gene. *Faseb J*. 2004;18:828-35.
- Tuomilehto J, Borch-Johnsen K, Molarius A *et al.* Incidence of cardiovascular disease in Type 1 (insulin-dependent) diabetic subjects with and without diabetic nephropathy in Finland. *Diabetologia*. 1998;41:784-90.
- Turkseven S, Kruger A, Mingone CJ *et al.* Antioxidant mechanism of heme oxygenase-1 involves an increase in superoxide dismutase and catalase in experimental diabetes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005;289:701-7.
- Uittenbogaard A, Shaul PW, Yuhanna IS, Blair A, Smart EJ. High density lipoprotein prevents oxidized low density lipoprotein-induced inhibition of endothelial nitric-oxide synthase localization and activation in caveolae. *J Biol Chem*. 2000;275:11278-83.
- Van der Giet M, Schmidt S, Tölle M *et al.* Effects of dinucleoside polyphosphates on regulation of coronary vascular tone. *Eur J Pharmacol*. 2002;448:207-13.
- Van der Veen RC. Nitric oxide and T helper cell immunity. *Int Immunopharmacol*. 2001;1:1491-500.

- Van Linthout S, Collen D, De Geest B. Effect of promoters and enhancers on expression, transgene DNA persistence, and hepatotoxicity after adenoviral gene transfer of human apolipoprotein A-I. *Hum Gene Ther.* 2002;13:829-40.
- Van Linthout S, Lusky M, Collen D, De Geest B. Persistent hepatic expression of human apo A-I after transfer with a helper-virus independent adenoviral vector. *Gene Ther.* 2002;9:1520-8.
- Van Linthout S, Riad A, Dhayat N *et al.* Anti-inflammatory effects of atorvastatin improve left ventricular function in experimental diabetic cardiomyopathy. *Diabetologia.* 2007;50:1977-86.
- Van Linthout S, Seeland U, Riad A *et al.* Reduced MMP-2 activity contributes to cardiac fibrosis in experimental diabetic cardiomyopathy. *Basic Res Cardiol.* 2008 Jul;103(4):319-27. Epub 2008 Mar 17.
- Van Linthout S, Spillmann F, Lorenz M *et al.* Vascular-protective effects of high-density lipoprotein include the downregulation of the angiotensin II type 1 receptor. *Hypertension.* 2009 Apr;53(4):682-7. Epub 2009 Mar 9
- Vanden Berghe W, Plaisance S, Boone E *et al.* p38 and extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase pathways are required for nuclear factor-kappaB p65 transactivation mediated by tumor necrosis factor. *J Biol Chem.* 1998;273:3285-90.
- Vassort G, Turan B. Protective role of antioxidants in diabetes-induced cardiac dysfunction. *Cardiovasc Toxicol.* 2010 Jun;10(2):73-86.
- Villari B, Campbell SE, Hess OM. Influence of collagen network on left ventricular systolic and diastolic function in aortic valve disease. *J Am Coll Cardiol.* 1993 Nov 1;22(5):1477-84.
- Viswambharan H, Ming XF, Zhu S *et al.* Reconstituted high-density lipoprotein inhibits thrombin-induced endothelial tissue factor expression through inhibition of RhoA and stimulation of phosphatidylinositol 3-kinase but not Akt/endothelial nitric oxide synthase. *Circ Res.* 2004;94:918-25.
- Wagner E, Zenke M, Cotten M, Beug H, Birnstiel ML. Transferrin-polycation conjugates as carriers for DNA uptake into cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990;87:3410-4.

- Wang M, Tsai BM, Turrentine MW, Mahomed Y, Brown JW, Meldrum DR. p38 mitogen activated protein kinase mediates both death signaling and functional depression in the heart. *Ann Thorac Surg.* 2005 Dec;80(6):2235-41.
- Weber KT, Sun Y, Guarda E *et al.* Myocardial fibrosis in hypertensive heart disease: an overview of potential regulatory mechanisms. *Eur Heart J.* 1995;16:24-8.
- Weigel S and Dobbelstein M. The nuclear export signal within the E<sub>4</sub>orf6 protein of adenovirus type 5 supports virus replication and cytoplasmic accumulation of viral mRNA. *J Virol.* 2000;74:764-772.
- Weisgraber KH, Rall SC Jr, Bersot TP, Mahley RW, Franceschini G, Sirtori CR. Apolipoprotein A-IMilano. Detection of normal A-I in affected subjects and evidence for a cysteine for arginine substitution in the variant A-I. *J Biol Chem.* 1983;258:2508-13.
- Wenzel S, Rohde C, Wingerning S, Roth J, Kojda G, Schlüter KD. Lack of endothelial nitric oxide synthase-derived nitric oxide formation favors hypertrophy in adult ventricular cardiomyocytes. *Hypertension.* 2007 Jan;49(1):193-200. Epub 2006 Oct 30.
- Westermann D, Rutschow S, Van Linthout S *et al.* Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase attenuates left ventricular dysfunction by mediating pro-inflammatory cardiac cytokine levels in a mouse model of diabetes mellitus. *Diabetologia.* 2006;49:2507-13.
- Westermann D, Van Linthout S, Dhayat S *et al.* Cardioprotective and anti-inflammatory effects of interleukin converting enzyme inhibition in experimental diabetic cardiomyopathy. *Diabetes.* 2007;56:1834-41.
- Westermann D, Walther T, Savvatis K *et al.* Gene deletion of the kinin receptor B1 attenuates cardiac inflammation and fibrosis during the development of experimental diabetic cardiomyopathy. *Diabetes.* 2009 Jun;58(6):1373-81. Epub 2009 Mar 10.
- Wickham TJ, Mathias P, Cheresh DA and Nemerow GR. Integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 promote adenovirus internalization but not virus attachment. *Cell.* 1993;73:309-319.
- Williams RS, Johnston SA, Riedy M, DeVit MJ, McElligott SG, Sanford JC. Introduction of foreign genes into tissues of living mice by DNA-coated microprojectiles. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991;88:2726-30.



- Wilson PW, Abbott RD, Castelli WP. High density lipoprotein cholesterol and mortality. The Framingham Heart Study. *Arteriosclerosis*. 1988;8:737-41.
- Wróblewska M. The role of apolipoproteins A-I and A-II in plasma HDL remodeling. *Postepy Biochem*. 2009;55(3):315-22.
- Xing F, Jiang Y, Liu J, Zhao K, Mo Y, Liu Z, Zeng Y. Downregulation of human endothelial nitric oxide synthase promoter activity by p38 mitogen-activated protein kinase activation. *Biochem Cell Biol*. 2006 Oct;84(5):780-8.
- Yang YY, Liu H, Nam SW, Kunos G, Lee SS. Mechanisms of TNFalpha-induced cardiac dysfunction in cholestatic bile duct-ligated mice: Interaction between TNFalpha and endocannabinoids. *J Hepatol*. 2010 May 6.
- Yeh P and Perricaudet M. Advances in adenoviral vectors: from genetic engineering to their biology. *Faseb J*. 1997;11:615-623
- Yew NS, Marshall J, Przybylska M *et al*. Increased duration of transgene expression in the lung with plasmid DNA vectors harboring adenovirus E<sub>4</sub> open reading frame 3. *Hum Gene Ther*. 1999;10:1833-1843.
- Yuhanna IS, Zhu Y, Cox BE *et al*. High-density lipoprotein binding to scavenger receptor-BI activates endothelial nitric oxide synthase. *Nat Med*. 2001;7:853-7.
- Zarich SW, Nesto RW. Diabetic cardiomyopathy. *Am Heart J*. 1989;118:1000-12.
- Zarubin T, Han J. Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. *Cell Res*. 2005;15:11-8.
- Zeiher AM, Fisslhalter B, Schray-Utz B, Busse R. Nitric oxide modulates the expression of monocyte chemoattractant protein-1 in cultured human endothelial cells. *Circ Res*. 1995;76:980-986.
- Zelko IN, Mariani TJ, Folz RJ. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic Biol Med*. 2002;33:337-49.
- Zhang M, Gao X, Wu J, Liu D, Cai H, Fu L, Mei C. Oxidized high-density lipoprotein enhances inflammatory activity in rat mesangial cells. *Diabetes Metab Res Rev*. 2010 Sep;26(6):455-63.
- Zhang WJ, Stocker R, McCall MR, Forte TM, Frei B. Lack of inhibitory effect of HDL on TNFalpha-induced adhesion molecule expression in human aortic endothelial cells. *Atherosclerosis*. 2002;165:241-9.

- Zhang X, Ding L, Sandford AJ. Selection of reference genes for gene expression studies in human neutrophils by real-time PCR. *BMC Mol Biol.* 2005;6:4
- Zhang X, Zhu X, Chen B. Recombinant apolipoprotein A-I cysteine mutant (N74C) inhibits periarterial collar induced vascular remodeling and carotid atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *J Lipid Res.* 2010 Sep 3.
- Zimmer HG, Millar HD. Technology and application of ultraminiature catheter pressure transducers. *Can J Cardiol.* 1998;14:1259-66.

## **Eidesstattliche Versicherung**

Ich, Okan Demir, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Kardioprotektive Effekte von High-density Lipoprotein induziert durch einen humanen Apolipoprotein AI Gentransfer bei der diabetischen Kardiopathie in einem experimentellen Diabetes mellitus Rattenmodell“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -[www.icmje.org](http://www.icmje.org)) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt

Berlin, den 03.01.2013

Okan Demir

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

**Publikation**

Van Linthout S, Spillmann F, Riad A et al. Human apolipoprotein A-I gene transfer reduces the development of experimental diabetic cardiomyopathy. *Circulation*. 2008 Mar 25;117(12):1563-73.

## **Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, Ibrahim Yüksel und Ayşe Demir, für ihre uneingeschränkte Unterstützung.