

Diplomarbeit

**GLP-1 vermittelte Inotropie &
Signaltransduktionsmechanismen**

eingereicht von

Ewald Kolesnik

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der gesamten Heilkunde

(Dr. med. univ.)

an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt an der

Klinischen Abteilung für Kardiologie

unter der Anleitung von

Assoz. Prof. PD Dr. Dirk von Lewinski

und

DDr. Markus Wallner

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Graz, am 25. Februar 2015

Ewald Kolesnik

Danksagung

Für die Erstellung dieser Diplomarbeit war es nicht nur notwendig ausreichend Zeit, Energie, Freude an der Forschung und Motivation aufzubringen, ich war auch auf Hilfestellungen von bereits in dieser Materie tätigen Personen angewiesen, die mich Schritt für Schritt zum Thema hinführten und mit guten Ratschlägen unterstützten. Besonderen Dank möchte ich hierfür meinem Erstbetreuer Assoz. Prof. PD Dr. Dirk von Lewinski aussprechen, der mich nicht nur fachlich unterstützte, sondern mich auch mit seiner positiven Einstellung dazu bewegen konnte mich intensiv mit der Thematik auseinander zu setzen und mir auch genügend Freiraum einräumte um mich dabei entfalten zu können. Ebenfalls ein großes Dankeschön gilt meinem Zweitbetreuer DDr. Markus Wallner, der sich so oft die Zeit nahm um Probleme zu besprechen und das weitere Vorgehen zu planen, aber auch dafür, dass er für ein sehr entspanntes und lustiges Arbeitsklima im Labor sorgte. In diesem Zusammenhang gilt mein Dank auch Dr. Mounir Khafaga, der mir in dieser Zeit auch oft mit seiner Erfahrung helfen konnte. Auch bei der gesamten klinischen Abteilung für Herzchirurgie möchte ich mich für die großartige und reibungslose Zusammenarbeit bedanken, ohne diese wäre es mir nicht möglich gewesen das Thema so ausführlich in dieser Zeit zu behandeln. Große Hilfestellung beim strukturierten Schreiben dieser Arbeit bekam ich von meinem Bruder Dr. Bernd Kolesnik, dafür schulde ich ihm großen Dank.

Schließlich möchte ich mich noch bei all meinen Freunden und meiner Familie für die verständnisvolle Begleitung in dieser langen und arbeitsintensiven Zeit bedanken!

Inhaltsverzeichnis

Eidesstattliche Erklärung	II
Danksagung	III
Inhaltsverzeichnis.....	IV
Abkürzungsverzeichnis.....	VII
Abbildungsverzeichnis.....	X
Tabellenverzeichnis.....	XII
Zusammenfassung.....	XIII
Abstract.....	XIV
1 Einleitung.....	15
1.1 Glucosestoffwechsel und Diabetes mellitus	15
1.1.1 Biosynthese von Insulin	15
1.1.2 Sekretion von Insulin	15
1.1.3 Wirkung von Insulin	16
1.1.4 Einteilung von Diabetes mellitus.....	18
1.1.4.1 Typ-1-Diabetes mellitus	18
1.1.4.2 Typ-2-Diabetes mellitus	18
1.1.4.3 Andere spezifische Diabetes-Typen	19
1.1.5 Folgen des Diabetes mellitus.....	19
1.1.6 Behandlung von Diabetes mellitus	20
1.1.6.1 Orale Antidiabetika.....	20
1.1.6.2 Subcutane Antidiabetika	21
1.2 Inkretine und ihre Signaltransduktion	22
1.2.1 Struktur der Inkretine	23
1.2.2 Der GLP-1-Rezeptor.....	24
1.3 Kardiale Signaltransduktion und Inotropie.....	25
1.3.1 Physiologie des Aktionspotentials	25

1.3.2 Mechanische Kontraktion – Inotropie	26
1.3.3 Pharmakologische Eingriffe in die Signaltransduktion des Myokards	27
1.4 Fragestellung und Ziele.....	28
2 Material und Methoden	29
2.1 Pufferlösungen	29
2.2 Vorhofgewebe	30
2.2.1 Transport von Vorhofgewebe	30
2.2.2 Präparation von Vorhofgewebe	30
2.3 Ventrikuläres Gewebe	32
2.4 Streifenanlage	32
2.5 Substanzen	35
2.6 Versuchsprotokolle.....	35
2.6.1 Rundownversuche.....	35
2.6.2 Dosiswirkungskurve.....	35
2.6.3 Single shot Experimente.....	36
2.6.4 Inhibitorexperimente	36
2.7 Auswertung	36
2.8 Statistik	36
3 Ergebnisse.....	37
3.1 Inotrope Effekte.....	37
3.2 Diastolische Spannung und systolische Kraft.....	39
3.3 Atrium – Rundown-Effekte	40
3.4 Atrium – Exendin-4.....	41
3.5 Atrium – Glucagon-like peptide 1 (GLP-1(7-36)NH ₂)	42
3.6 Atrium – Exendin-3(9-39)NH ₂ + Exendin-4	43
3.7 Atrium – Glucagon-like peptide 1 (GLP-1(9-36)NH ₂)	45
3.8 Atrium – PF-06446009.....	46
3.9 Atrium – PF-06446667	47

3.10 Atrium – Single shot Experimente	48
3.11 Atrium – Inhibitoren	50
3.12 Atrium – Sitagliptin + GLP-1(7-36)NH ₂	51
3.13 Ventrikel – Exendin-4	53
4 Diskussion	55
4.1 Inkretinwirkung auf die Herzfunktion	55
4.2 Signaltransduktion der Inkretine.....	57
4.2.1 cAMP/PKA.....	57
4.2.2 SERCA	57
4.2.3 cAMP/Epac.....	58
4.2.4 Beta-Arrestin.....	59
4.3 DPP 4 und Inkretine	59
4.4 GLUT1	60
5 Literaturverzeichnis	61

Abkürzungsverzeichnis

<i>AC</i>	<i>Adenylatcyclase</i>
<i>ACE</i>	<i>Angiotensin converting enzyme</i>
<i>ADP</i>	<i>Adenosindiphosphat</i>
<i>AKE</i>	<i>Aortenklappenersatz</i>
<i>AT II</i>	<i>Angiotensin II</i>
<i>ATP</i>	<i>Adenosinriphosphat</i>
<i>BMI</i>	<i>Body mass index</i>
<i>BDM</i>	<i>2,3-Butandionmonoxim</i>
<i>Ca²⁺</i>	<i>Calcium-Ion</i>
<i>CABG</i>	<i>Aortocoronarer Bypass</i>
<i>CaCaM</i>	<i>Calcium-Calmodulin</i>
<i>CaCl₂·2H₂O</i>	<i>Calciumchlorid</i>
<i>CaM</i>	<i>Calmodulin</i>
<i>CaMKII</i>	<i>Calmodulinkinase II</i>
<i>cAMP</i>	<i>cyclisches Adenosinmonophosphat</i>
<i>Cl⁻</i>	<i>Chlorid-Ion</i>
<i>cm²</i>	<i>Quadratcentimeter</i>
<i>CO₂</i>	<i>Kohlendioxid</i>
<i>DPP 4</i>	<i>Dipeptidylpeptidase 4</i>
<i>DPP4-Inhibitoren</i>	<i>Inhibitoren der Dipeptidylpeptidase 4</i>
<i>EF</i>	<i>Ejektionsfraktion</i>
<i>Epac</i>	<i>Exchange Protein directly activated by cAMP</i>
<i>Exendin-3(9-36)NH₂</i>	<i>Exendin-3(9-39) Amid</i>

<i>GIP</i>	<i>Glucoseabhängiges insulinotropes Peptid</i>
<i>GLP-1</i>	<i>Glucagon-like Peptide 1</i>
<i>GLP-1(7-36)NH₂</i>	<i>Glucagon-like Peptide 1(7-36) Amid</i>
<i>GLP-1(9-36)NH₂</i>	<i>Glucagon-like Peptide 1(9-36) Amid</i>
<i>H₂PO₄⁻</i>	<i>Dihydrogenphosphat-Ion</i>
<i>HCO₃⁻</i>	<i>Hydrogencarbonat-Ion</i>
<i>HNF-1α</i>	<i>Hepatocyte nuclear factor-1 α</i>
<i>Hz</i>	<i>Hertz</i>
<i>K⁺</i>	<i>Kalium-Ion</i>
<i>K_{ATP}-Kanal</i>	<i>ATP-sensitiver Kaliumkanal</i>
<i>KCl</i>	<i>Kaliumchlorid</i>
<i>KH₂PO₄</i>	<i>Kaliumdihydrogenphosphat</i>
<i>L</i>	<i>Liter</i>
<i>m</i>	<i>männliches Geschlecht</i>
<i>m</i>	<i>milli</i>
<i>Mg²⁺</i>	<i>Magnesium-Ion</i>
<i>MgSO₄·7H₂O</i>	<i>Magnesiumsulfat</i>
<i>mm²</i>	<i>Quadratmillimeter</i>
<i>mol</i>	<i>Mol</i>
<i>μ</i>	<i>mikro</i>
<i>n</i>	<i>nano</i>
<i>N</i>	<i>Newton</i>
<i>Na⁺</i>	<i>Natrium-Ion</i>
<i>NaCl</i>	<i>Natriumchlorid</i>
<i>NaHCO₃</i>	<i>Natriumhydrogencarbonat</i>
<i>Na⁺-Kanal</i>	<i>Natriumkanal</i>

<i>Na⁺/K⁺-ATPase</i>	<i>Natrium-Kalium-ATPase</i>
<i>NCX</i>	<i>Natrium-Calcium-Austauscher</i>
<i>O₂</i>	<i>Sauerstoff</i>
<i>PDX-1</i>	<i>Pancreas duodenum homeobox 1</i>
<i>PKA</i>	<i>Proteinkinase A</i>
<i>p.o.</i>	<i>peroral</i>
<i>PPAR</i>	<i>Peroxisom-Proliferator-aktivierte-Rezeptoren</i>
<i>RT50</i>	<i>Hälfte der Relaxationszeit</i>
<i>S</i>	<i>Siemens</i>
<i>s.c.</i>	<i>subcutan</i>
<i>SEM</i>	<i>Standardfehler (standard error of the mean)</i>
<i>SGLT2</i>	<i>Sodium-glucose linked transporter-2</i>
<i>SERCA</i>	<i>Sarko/endoplasmatic reticulum Ca²⁺-ATPase</i>
<i>SO₄²⁻</i>	<i>Sulfat-Ion</i>
<i>SR</i>	<i>Sarkoplasmatisches Retikulum</i>
<i>T-ASS</i>	<i>Acetylsalicylsäure</i>
<i>vgCaCh</i>	<i>spannungsabhängiger Calciumkanal</i>
<i>VHFA</i>	<i>Vorhofflimmerarrhythmie</i>
<i>w</i>	<i>weibliches Geschlecht</i>

Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung 1:</i>	
<i>Schematische Darstellung der Insulinsekretion und Insulinwirkung.</i>	S.17
<i>Abbildung 2:</i>	
<i>Schematische Darstellung der Calciumsignaltransduktion und pharmakologischer Interventionen in kardialen Myozyten.</i>	S.28
<i>Abbildung 3:</i>	
<i>Fotographie der Messanlage für Muskelstreifen.</i>	S.33
<i>Abbildung 4:</i>	
<i>Fotographie einer Messeinheit: Organbad und Force Transducer.</i>	S.33
<i>Abbildung 5:</i>	
<i>Fotographie von einem Herzohr.</i>	S.33
<i>Abbildung 6:</i>	
<i>Fotographie von einem isolierten und fixierten Trabekel.</i>	S.33
<i>Abbildung 7:</i>	
<i>Originalregistrierung des Experiments SD 8 (10.7.2014).</i>	S.37
<i>Abbildung 8:</i>	
<i>Originalregistrierung der Experimente SD 8 (10.7.2014) & SD 2 (30.5.2014).</i>	S.38
<i>Abbildung 9:</i>	
<i>Originalregistrierung des Experiments Exendin 16 (5.12.2013).</i>	S.38
<i>Abbildung 10</i>	
<i>Modifizierte Originalregistrierung zur Erläuterung der Systole und Diastole.</i>	S.39

Abbildung 11:	
<i>Rundown von humanem atrialen Myokard.</i>	S.40
Abbildung 12:	
<i>Effekt von Exendin-4 auf humanes atriales Myokard.</i>	S.42
Abbildung 13:	
<i>Effekt von GLP-1(7-36)NH₂ auf humanes atriales Myokard.</i>	S.43
Abbildung 14:	
<i>Effekte von Exendin-3(9-39)NH₂ & Exendin-4 auf humanes atriales Myokard.</i>	S.44
Abbildung 15:	
<i>Effekt von GLP-1(9-36)NH₂ auf humanes atriales Myokard.</i>	S.45
Abbildung 16:	
<i>Effekt von PF-06446009 auf humanes atriales Myokard.</i>	S.46
Abbildung 17:	
<i>Effekt von PF-06446667 auf humanes atriales Myokard.</i>	S.47
Abbildung 18:	
<i>Single shot Experimente am humanen atrialen Myokard.</i>	S.49
Abbildung 19:	
<i>Inhibitorenexperimente am humanen atrialen Myokard.</i>	S.51
Abbildung 20:	
<i>Effekte von Sitagliptin & GLP-1(7-36)NH₂ auf humanes atriales Myokard.</i>	S.52
Abbildung 21:	
<i>Effekt von Exendin-4 auf humanes ventrikuläres Myokard.</i>	S.54
Abbildung 22:	
<i>Originalregistrierung des Experiments Exendin D (13.6.2013).</i>	S.54

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:

Übersicht der Wirkstoffklassen und Wirkmechanismen von Antidiabetika. S.22

Tabelle 2:

Zusammensetzung der verwendeten Pufferlösungen. S.29

Tabelle 3:

Patientendemographie der verwendeten Vorhöfe (atriale Trabekel). S.31

Zusammenfassung

Inkretine stellen eine neue Möglichkeit zur Behandlung der weltweit stark verbreiteten Krankheit Typ-2-Diabetes dar. Diese führt über progredient verlaufende Schädigungen des Gefäßsystems zu einer erhöhten Mortalität der Betroffenen. Inkretine vermitteln ihren antidiabetischen Effekt über eine gesteigerte glucoseabhängige Insulinfreisetzung. Zusätzlich üben Inkretine eine Reihe positiver Wirkungen auf das kardiovaskuläre System aus. Die hierbei zugrunde liegenden Mechanismen wurden jedoch noch nicht aufgeklärt, dies gilt insbesondere für humanes Gewebe. Deshalb wurden im Zuge dieser Arbeit elektrisch stimulierte Muskelstreifen (Trabekel) von humanem atrialen und ventrikulären Gewebe mit verschiedenen Inkretinen inkubiert und die darauffolgenden Änderungen der entwickelten systolischen und diastolischen Kraft gemessen. Dabei zeigte sich ein signifikanter dosisabhängiger positiv inotroper Effekt von endogenen (Glucagon-like peptide-1(7-36) Amid), exogenen (Exendin-4) und synthetischen (PF-06446009, PF-06446667) Inkretinen. Interessanterweise konnte dieser Effekt ausschließlich in atrialem, nicht jedoch in ventrikulärem Gewebe beobachtet werden. Die beiden GLP-1-Rezeptor Antagonisten, endogenes Glucagon-like peptide 1(9-36) Amid und exogenes Exendin-3(9-39) Amid, zeigten hingegen auch im Vorhofgewebe keinerlei inotrope Effekte. Dies lässt darauf schließen, dass der GLP-1-Rezeptor als zellmembranständiger Angriffspunkt für Inkretine dient. Weitere Untersuchungen mit Ryanodin, H-89 und Thapsigargin zeigten die Beteiligung von Proteinkinase A und Exchange protein directly activated by cAMP (Epac). Sarco-endoplasmic reticulum calcium ATPase (SERCA) und beta-Arrestine sind möglicherweise auch involviert, es konnten jedoch keine signifikanten Effekte beobachtet werden. Insgesamt stellen Inkretine aufgrund ihres Einflusses auf die kardiale Funktion eine vielversprechende neue Therapieoption von Typ-2-Diabetes dar.

Abstract

Incretins are a new therapeutic approach in dealing with type-2 diabetes, a widespread disease that mainly affects vascular system, thus leading to increased mortality. The efficient antidiabetic effect by incretins is triggered via glucose dependent insuline secretion. Additionally incretins exert various beneficial actions on cardiovascular system. The underlying mechanisms have not yet been fully elucidated, especially in human tissue. Therefore electrically stimulated muscle strips (trabeculae) of human atrial and non-failing ventricular tissue were treated with various incretins and developed systolic and diastolic force was measured. This study shows the significant dose dependent positiv inotropic effect induced by endogenous (Glucagon-like peptide-1(7-36) amide), exogenous (Exendin-4) and synthetic (PF-06446009, PF-06446667) incretins. The observed inotropic effect occurred only in atrial and not in ventricular tissue. However, endogenous Glucagon-like peptide-1(9-36) amide and exogenous Exendin-3(9-39) amide failed to induce positiv inotropy, suggesting Glucagon-like peptide-1 receptor as a relevant target for incretins. Further investigations, using H-89, ryanodine and thapsigargin, revealed a downstream mechanism likely via Proteinkinase A signalling. In addition Exchange protein directly activated by cAMP (Epac) is involved as a second major relevant pathway. Other experiments examined the role of Sarco-endoplasmic reticulum calcium ATPase (SERCA) and beta-Arrestin in cardiac contractility. No significant effects were observed, though there are hints for a possible involvement of these proteins. In sum, incretins are promising new therapeutic agents in diabetes therapy due to their impact on cardiac function.

1 Einleitung

1.1 Glucosestoffwechsel und Diabetes mellitus

Der Begriff Diabetes mellitus umfasst eine Vielzahl von metabolischen Erkrankungen, gekennzeichnet durch eine chronische Hyperglykämie. Ausgelöst durch Defekte bei der Insulinsekretion und/oder der Insulinwirkung liegt ein gestörter Stoffwechsel der Kohlenhydrate, der Fette und der Proteine vor. Neben ständigen akuten Komplikationen wie hyperglykämischen Phasen, die bis zum ketoazidotischen Koma führen können, oder durch Medikamenteneinnahme induzierte Hypoglykämien, hat diese Erkrankung auch schwerwiegende Spätfolgen. Es werden viele Organsysteme in Mitleidenschaft gezogen, es kann sogar zum Versagen einzelner Organe kommen^{1,2}. Der Anteil von Diabetes mellitus an den gesamten Gesundheitsausgaben betrug im Jahr 2010 in Österreich 8,4%³.

1.1.1 Biosynthese von Insulin

Insulin wird in den Beta-Zellen der Langerhans-Inseln, dem endokrinen Teil der Bauchspeicheldrüse (Pankreas) gebildet. Stimuliert wird die Insulintranskription hauptsächlich durch Glucose, die Transkriptionsfaktoren Pancreas duodenum homeobox 1 (PDX-1) und Hepatocyte nuclear factor-1 α (HNF-1 α) spielen in diesem Prozess eine wesentliche Rolle^{1,4}. Über diverse Vorstufen (Prä-Pro-Insulin, Proinsulin) wird Insulin in Sekretgranula unter Abspaltung einiger Peptidketten (C-Peptid) synthetisiert⁵.

1.1.2 Sekretion von Insulin

Das in den Sekretgranula gespeicherte Insulin wird durch eine Depolarisation der Beta-Zelle und folgendem Calciumeinstrom exocytotisch sezerniert. Hauptsächlich wird die Insulinsekretion durch Glucose, daneben noch durch Fettsäuren und Aminosäuren stimuliert. Durch den insulinunabhängigen Glucosetransporter GLUT2, welcher sich in der Membran der Beta-Zelle befindet, wird Glucose ins Zellinnere befördert. Dort wird Glucose durch das Enzym Glucokinase zu

Glucose-6-Phosphat metabolisiert und im weiteren Verlauf im Zuge der Glykolyse zu Adenosintriphosphat (ATP) und Pyruvat abgebaut⁶. Pyruvat tritt daraufhin in den Citratzyklus ein, welcher in den Mitochondrien der Beta-Zellen stattfindet, und aktiviert dort die Produktion von ATP. Durch ein vermehrtes Angebot von ATP im Zellinneren werden ATP-sensitive Kaliumkanäle (K_{ATP} -Kanäle) geschlossen, es resultiert ein Anstieg der Konzentration von Kalium (K^+) und somit die Depolarisation der Zelle. In der Folge öffnen sich spannungsabhängige Calciumkanäle (voltage gated calcium channel; vgCaCh) vom L-Typ, und durch das nun einströmende Calcium (Ca^{2+}) wird Insulin freigesetzt. Die im Darm gebildeten Hormone Glucoseabhängiges insulinotropes Peptid (GIP) und Glucagon-like Peptide 1 (7-36) Amid (GLP-1(7-36)NH₂) führen zu einer starken Verstärkung der Insulinfreisetzung, dieser Umstand wird als Inkretin-Effekt bezeichnet⁷. Die Insulinsekretion erfolgt pulsatil und es kommt dadurch zu einem autokrin positiven Feedback auf die Beta-Zellen⁸.

1.1.3 Wirkung von Insulin

Insulin vermittelt seine vielfältigen Wirkungen über den Insulinrezeptor. Dieser besteht aus einer Tyrosinkinase und führt über mehrere Second Messenger zu einer Senkung des Blutzuckerspiegels. Durch die Translokation des Glucosetransporters GLUT4 in die Plasmamembran wird Glucose aus dem Blut vermehrt in Zellen aufgenommen. Zusätzlich wird durch Insulin vor allem in Leber und Skelettmuskelzellen die Glycogensynthese und Glykolyse aktiviert und zugleich die Gluconeogenese und Glycogenolyse gehemmt⁹. Neben den beschriebenen Wirkungen auf den Kohlenhydratstoffwechsel hat Insulin auch Einfluss auf den Metabolismus der Fette und Proteine. Es steigert die Synthese von Fettsäuren, Triglyceriden und Proteinen, während zugleich der Abbau von Fetten (Lipolyse) und Proteinen (Proteolyse) gehemmt wird¹⁰.

Eine schematische Darstellung der Insulinsekretion und Insulinwirkung ist in Abbildung 1 dargestellt.

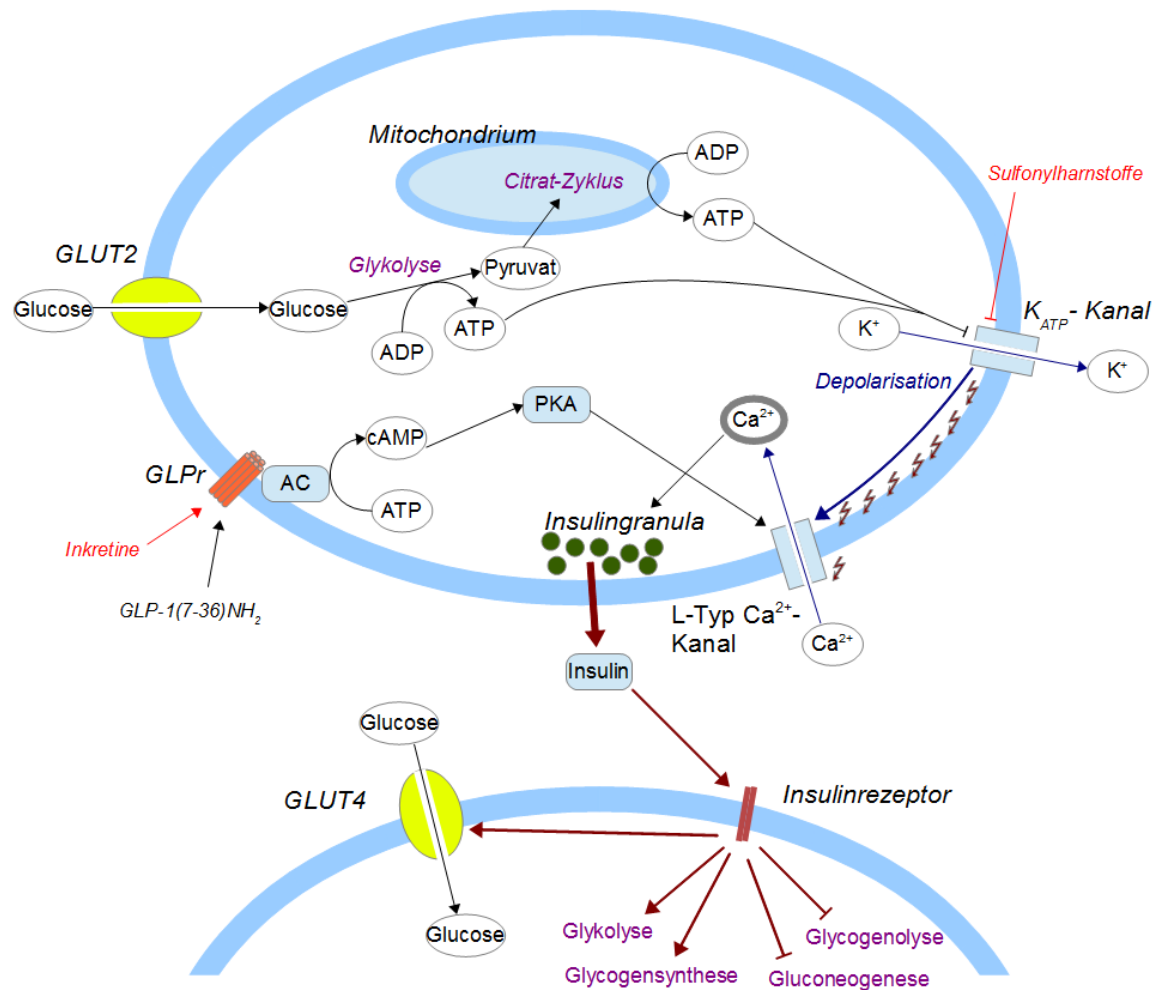


Abb. 1: Schematische Darstellung der Insulinsekretion und Insulinwirkung. Glucose wird über die Glykolyse und den anschließenden Citrat-Zyklus abgebaut, dabei entsteht aus Adenosindiphosphat (ADP) Adenosintriphosphat (ATP). ATP schließt K_{ATP} -Kanäle und bewirkt so eine Depolarisation der Zelle. Dadurch öffnen sich v_gCaCh vom L-Typ und das einströmende Ca^{2+} führt zur Sekretion von Insulin. Der Inkretin-Effekt löst selbst keine Insulinsekretion aus, sondern verstärkt diese. Über den GLP-1-Rezeptor (GLPr) wird die Adenylatcyclase (AC) aktiviert. Dies führt zur Umwandlung von ATP zu cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP) und in weiterer Folge zur Aktivierung der Proteinkinase A (PKA). Diese erhöht die Leitfähigkeit des v_gCaCh , mehr Ca^{2+} kann nun im Zuge der Depolarisation in die Zelle einströmen. Insulin wirkt an Zellen im ganzen Körper über den Insulinrezeptor. Dieser führt über mehrere (nicht dargestellte) Signalkaskaden zu einer Translokation von GLUT4 in die Zellmembran, es wird die Glykolyse und Glycogensynthese aktiviert und zugleich die Gluconeogenese und Glycogenolyse gehemmt. Sulfonylharnstoffe (siehe Kap. 1.1.6.1 Orale Antidiabetika) blockieren die K_{ATP} -Kanäle und es wird in weiterer Folge Insulin freigesetzt. Rot: pharmakologische Substanzen, schwarz: physiologische Substrate, violett: biochemische Prozesse, blau: Ionenströme und Depolarisation.

1.1.4 Einteilung von Diabetes mellitus

Diabetes mellitus wird in unterschiedliche Typen eingeteilt. Die Einteilung erfolgt nach Ätiologie der Erkrankung. Definiert wurde diese Einteilung in dem WHO-Bericht von 1999¹.

1.1.4.1 Typ-1-Diabetes mellitus

Es kommt durch pathologische Prozesse zur Zerstörung der insulinproduzierenden Beta-Zellen in den Langerhans-Inseln der Bauchspeicheldrüse. Sowohl die autoimmunvermittelte Form, wie auch die idiopathischen Formen, bei denen eine bekannte Ursache nicht gefunden werden kann, zählen zum Typ-1-Diabetes. Damit Erkrankte überleben können muss Insulin substituiert werden¹.

1.1.4.2 Typ-2-Diabetes mellitus

Durch eine Vielzahl von Ursachen kommt es zu einem relativen Insulinmangel: der endokrine Teil der Bauchspeicheldrüse produziert nach wie vor Insulin, dieses hat an den Zielzellen aufgrund herabgesetzter Rezeptorwirkung (Insulinresistenz) jedoch weniger bis gar keinen Effekt auf die Glucoseaufnahme der Zellen aus dem Blut⁷. Bevor sich die Krankheit manifestiert versuchen die Beta-Zellen diesen relativen Mangel durch vermehrte Insulinsekretion auszugleichen. Dieser Kompensationsmechanismus stößt jedoch nach einiger Zeit an seine Grenzen, Folge davon ist eine chronische Hyperglykämie. Aufgrund des langsamen Auftretens der Symptome (hoher Blutzucker, kardiovaskuläre Schäden, Retinopathien) wird Typ-2-Diabetes oftmals erst im fortgeschrittenen Krankheitsverlauf diagnostiziert. Daten der International Diabetes Federation sagen, dass im Jahr 2013 weltweit 382 Millionen Menschen an Typ-2-Diabetes erkrankt sind, im Jahr 2035 soll diese Zahl auf 592 Millionen Menschen ansteigen¹¹. Grund hierfür ist der mit steigendem Wohlstand einhergehende Wechsel der Lebensgewohnheiten, die prädestinierend für Typ-2-Diabetes sein können. Neben genetischen Faktoren spielen dabei vor allem körperliche Bewegung und die Essgewohnheiten eine entscheidende Rolle^{1,12}.

1.1.4.3 Andere spezifische Diabetes-Typen

Pathologisch erhöhte Blutzuckerwerte werden dieser Klassifizierung zugeordnet, wenn weder Kriterien für Typ-1-Diabetes, noch für Typ-2-Diabetes erfüllt sind, jedoch eine spezifische Ursache vorliegt¹.

Genetische Defekte, welche die Beta-Zellen in der Bauchspeicheldrüse betreffen, können einen absoluten oder relativen Insulinmangel zur Folge haben. Besonderer Bedeutung kommt einer Mutation am Chromosom 12 zu, das zu einer Veränderung am Transkriptionsfaktor HNF-1 α führt und die Insulintranskription blockiert¹³. Ebenso kann ein Defekt am Chromosom 7 zur Folge haben, dass die Glucokinase ihre Funktion nicht erfüllen kann¹⁴. Bei Erkrankungen des exokrinen Pankreas (zystische Fibrose, Pankreatitis) werden sekundär auch die Langerhans-Inseln und somit der endokrine Teil des Pankreas zerstört, bei Endokrinopathien (Morbus Cushing, Phaeochromozytom) kann es zu pathologisch erhöhten Hormonkonzentrationen im Blut kommen. Einige dieser Hormone (Cortisol, Glucagon, Adrenalin) wirken der Insulinwirkung entgegen und erzeugen somit einen relativen Insulinmangel. Analog der Endokrinopathien kann auch eine externe Zufuhr von diesen Substanzen einen medikamentös induzierten Diabetes auslösen. Ein weiterer Pathomechanismus kann während der Schwangerschaft auftreten. Eine veränderte Stoffwechsellage sowie eine hohe Blutkonzentration von Schwangerschaftshormonen wie Progesteron, Cortisol oder Östrogen können zu einer Insulinresistenz führen. Es kommt dadurch zu einem relativen Insulinmangel. Trotz zwei- bis dreifach gesteigerter Insulinproduktion kann die Insulinwirkung dennoch nicht ausreichend sein um die Blutglucosewerte im physiologischen Bereich zu halten. Es bildet sich ein Gestationsdiabetes aus, der in den meisten Fällen nach Beendigung der Schwangerschaft wieder verschwindet^{1,14-17}.

1.1.5 Folgen des Diabetes mellitus

Diabetes mellitus ist eine langsame, kontinuierlich progredient verlaufende Erkrankung. Es kommt zu spezifischen, durch chronisch erhöhten Blutzuckerspiegel bedingten Veränderungen der Kapillaren (Mikroangiopathie), welche wiederum organspezifische Folgen haben (Nieren: Glomerulosklerose, Augen: Retinopathie, Nerven: Neuropathie). Auch die mittleren und großen

Arterien werden in Mitleidenschaft gezogen und erleiden Schäden durch arteriosklerotische Prozesse (Gefahr von Myokardinfarkt und Insult, Durchblutungsstörungen der Extremitäten). Diese treten prinzipiell bei Nicht-DiabetikerInnen auch auf, bei Vorliegen eines Diabetes mellitus kommt es jedoch in aller Regel zu einem schnelleren und schwereren Verlauf¹⁸.

1.1.6 Behandlung von Diabetes mellitus

Es gibt orale und subcutan zu applizierende Antidiabetika. In diesem Kapitel folgt eine Auflistung verschiedener Wirkstoffklassen (siehe Tabelle 1), das Hauptaugenmerk dieser Arbeit ist auf die Inkretine gelegt. Grundsätzlich wird bei Bestehen eines Typ-2-Diabetes als erste Maßnahme eine Lebensstilmodifikation (Diät, körperliche Bewegung) angestrebt. Falls das alleine nicht ausreichend ist wird zusätzlich eine pharmakologische Therapie eingeleitet^{19,20}.

1.1.6.1 Orale Antidiabetika

Das häufigste eingesetzte orale Antidiabetikum ist Metformin (Wirkstoffklasse: Biguanide). Es hat keine Wirkung auf die Insulinsekretion, es vermindert die bei Typ-2-Diabetes entstehende Insulinresistenz und senkt die Glucosesekretion der Leber über Hemmung der Gluconeogenese in den Hepatozyten²¹.

PPAR γ (Peroxisom-Proliferator-aktivierte-Rezeptoren vom γ -Typ) Agonisten (Rosiglitazon, Pioglitazon), die oft auch als Glitazone oder Thiazolidindione klassifiziert werden, sind orale Antidiabetika und haben auch keine direkte insulinfreisetzende (insulinotrope) Wirkung. Ihr Angriffspunkt liegt direkt im Zellkern, dort regulieren sie die Transkription vor allem von Fettzellen (Adipozyten) und Muskelzellen (Myozyten). Durch diesen Mechanismus werden von Fettzellen einerseits weniger hyperglykämiefördernde Produkte in den systemischen Kreislauf abgeben, andererseits zeigen die Skelettmuskelzellen eine stärkere Reaktion auf Insulin und können Glucose besser verwerten²².

Ebenfalls nicht-insulinotrop wirken α -Glucosidase-Hemmstoffe (Acarbose, Miglitol). Diese verzögern und hemmen die Glucoseaufnahme im Dünndarm. Vor allem postprandialen Hyperglykämien kann so vorgebeugt werden²³.

Sulfonylharnstoffe (Glibenclamid, Glimperid, Carbutamid, Tolbutamid, Gliclazid) hingegen wirken direkt an den Beta-Zellen im Pankreas. Sie schließen die K_{ATP} -Kanäle in der Zellmembran und über die folgende Depolarisation und den damit verbundenen Ca^{2+} -Einstrom wird Insulin freigesetzt. Dieser Mechanismus ist unabhängig von Glucose²⁴ (siehe Kap.1.1.2 Sekretion von Insulin).

Neuere Antidiabetika gehören der Klasse der Inhibitoren der Dipeptidylpeptidase 4 (DPP4-Inhibitoren; Sitagliptin, Vildagliptin, Linagliptin, Saxagliptin, Alogliptin) an. Sie werden auch als Gliptine oder Inkretinverstärker bezeichnet. Diese binden mit hoher Affinität an das Enzym Dipeptidylpeptidase 4 (DPP 4), welches einerseits in der Membran diverser Zelltypen lokalisiert ist²⁵, andererseits gelöst im Blut zirkuliert²⁶, und hemmen dessen Funktion. Physiologisch katalysiert die DPP 4 den Abbau von $GLP-1(7-36)NH_2$, welches seinerseits eine glucoseabhängige insulinfreisetzende Wirkung auf die Beta-Zellen der Bauchspeicheldrüse ausübt. Somit verlängern DPP4-Inhibitoren die Halbwertszeit von $GLP-1(7-36)NH_2$ und dadurch dessen Blutkonzentration. Daneben existieren noch weitere, größtenteils unerforschte pharmakologische Mechanismen, die die Glucose senkende Wirkung erklären^{27,28}. In dieser Arbeit wurde eine Versuchsserie mit dem DPP4-Inhibitor Sitagliptin durchgeführt (siehe Kap. 3.11 Atrium – Sitagliptin + $GLP-1(7-36)NH_2$).

Ebenfalls neue orale Antidiabetika gehören der Klasse der sodium-glucose linked transporter-2 (SGLT-2) Hemmer an. Der Wirkmechanismus beruht auf einer Blockade der Rückresorption von Glucose in den proximalen Tubuli der Niere und verursacht eine stark erhöhte renale Ausscheidung von Glucose. Dadurch kommt es zu einer Senkung der Blutglucose²⁹.

1.1.6.2 Subcutane Antidiabetika

Insulin ist ein Protein und kann nicht peroral substituiert werden, da es eine Reihe von Hindernissen (niedriger pH-Wert, enzymatischer Abbau, Penetration durch Jejunummukosa, First-Pass-Effekt der Leber) für die Aufnahme von Insulin gibt und es somit keine physiologische Wirkung entfalten kann³⁰. Die Applikation erfolgt deshalb routinemäßig subcutan. Es sollte dann zum Einsatz kommen, wenn mit einer nicht-Insulin Therapie kein gewünschter Erfolg in der Behandlung von Diabetes mellitus erreicht wird³¹.

Stoffgruppe	Applikation	Mechanismus
Biguanide	p.o.	<i>Verhindert Insulinresistenz, vermindert Gluconeogenese und Glucoseseekretion in Hepatozyten</i>
PPAR_γ Agonisten	p.o.	<i>Verstärkte Glucoseaufnahme von Myozyten, verminderte Sekretion hyperglykämiefördernder Produkte durch Adipozyten</i>
α-Glucosidase-Hemmstoffe	p.o.	<i>Hemmen Glucoseaufnahme im Dünndarm</i>
Sulfonylharnstoffe	p.o.	<i>Blockieren K_{ATP}-Kanal und über die folgende Depolarisation der Beta-zelle wird glucoseunabhängig Insulin in das Blut abgegeben.</i>
DPP4-Inhibitoren	p.o.	<i>Hemmung der DPP 4 und dadurch Erhöhung der Wirksamkeit von Inkretinen (GLP-1(7-36)NH₂)</i>
SGLT2-Hemmer	p.o.	<i>Hemmung tubulärer Resorption von Glucose in der Niere und somit erhöhte Ausscheidung von Glucose</i>
Insulin	s.c.	<i>Direkte Aktivierung des Insulinrezeptors</i>
Inkretine	s.c.	<i>Glucoseabhängige Verstärkung der Insulinsekretion</i>

Tabelle 1: Übersicht der Wirkstoffklassen und des Wirkmechanismus von Antidiabetika.

1.2 Inkretine und ihre Signaltransduktion

Inkretine stellen eine neue Alternative in der Therapie von Typ-2-Diabetes dar³². Die beiden in Österreich verwendeten Wirkstoffe sind Exenatid (auch: Exenatide; seit 2007) und Liraglutid (seit 2009). Bei diesen Substanzen handelt es sich ebenfalls um Proteine, daher muss die Applikation, wie bei Insulin, subcutan erfolgen. Sie entfalten ihre Wirkung über den Glucagon-like Peptide 1-Rezeptor (GLP-1-R)³³ und haben damit den gleichen Wirkmechanismus wie das in den L-Zellen des Ileum physiologisch gebildeten GLP-1(7-36)NH₂³⁴⁻³⁶. Dieses wird nach granulärer Speicherung bei Stimulation durch hormonelle und nervliche gastrointestinale Signale^{35,37,38} via Exozytose in die Blutbahn abgegeben und kann dann systemisch wirken^{36,37}. Die Wirkung von GLP-1(7-36)NH₂ umfasst eine Stimulation der Insulinsekretion in den Beta-Zellen der Bauchspeicheldrüse bei gleichzeitiger Hemmung der Glucagonsekretion in den Alpha-Zellen. Des Weiteren verlängert es die Magenpassage und führt zu einer Verminderung von Appetit und damit auch der Nahrungsaufnahme³⁹. Neben diesen antidiabetischen Effekten hat

GLP-1(7-36)NH₂ diverse Wirkungen auf das kardiovaskuläre System. Es spielt eine große Rolle in der Regulation von Blutdruck, der Herzfrequenz, der myokardialen Kontraktilität und dem Tonus von Gefäßen⁴⁰⁻⁴³. Der Inkretin-Effekt, auf dem 60% der postprandialen Insulinsekretion beruht³³, ist ebenfalls auf die Sekretion von GLP-1(7-36)NH₂ zurückzuführen. GLP-1(7-36)NH₂ wird jedoch rasch durch DPP 4 abgebaut, es hat eine Halbwertszeit von nur wenigen Minuten³³. Deshalb werden zu therapeutischen Zwecken wesentlich länger wirksame Inkretine angewandt (Exenatid, Liraglutid).

Große Vorteile in der Behandlung mit Inkretinen liegen darin, dass es aufgrund des Wirkmechanismus zu keinen Hypoglykämien kommen kann, da für die insulinfreisetzende Wirkung Glucose benötigt wird⁴⁴ (siehe Kap. 1.1.2 Sekretion von Insulin).

1.2.1 Struktur der Inkretine

Die einzelnen Substanzen der Gruppe der Inkretine ähneln sich in ihrer chemischen Struktur. Glucagon-like Peptide 1 (GLP-1) kommt physiologisch in zwei Isoformen vor, eine mit 30 Aminosäuren (GLP-1(7-36)NH₂), die andere mit 31 Aminosäuren (GLP-1(7-37)NH₂)^{44,45}. Diese beiden Formen des GLP-1 werden neben Glucagon und anderen Substraten aus dem Protein Proglucagon abgespalten⁴⁴. Sie entfalten ihre Wirkung über den GLP-1-R und werden in-vivo rasch durch die DPP 4 unter der Abspaltung von zwei Aminosäuren zu GLP-1(9-36)NH₂ bzw. GLP-1(9-37)NH₂ abgebaut. GLP-1(9-36)NH₂ kann zwar an den GLP-1-R binden, dort jedoch nicht wirken. Somit handelt es sich um einen funktionellen Antagonisten. GLP-1(9-36)NH₂ hat dadurch auch eine regulierende Funktion auf die Wirkung von GLP-1(7-36)NH₂^{45,46}. Exendin-4 ist ein Protein bestehend aus 39 Aminosäuren, das in den Speicheldrüsen der Eidechse Gila monster (*Heloderma suspectum*) erstmals gefunden wurde. Es weist eine Homologie von 53% in der Aminosäuresequenz von GLP-1(7-36)NH₂ auf und ist resistent gegen den Abbau durch die DPP 4. Die synthetisch hergestellte Form von Exendin-4 wird als Exenatid (auch Exenatide) bezeichnet³³. Eine dem Exendin-4 strukturell ähnliche Substanz, das 37 Aminosäure lange Exendin-3(9-39)NH₂, wurde im Speichel der Eidechse *Heloderma horridum* gefunden. Exendin-3(9-39)NH₂ wirkt als starker Antagonist am GLP-1-R⁴⁷. Mit

Liraglutid wurde ein weiteres Inkretin entwickelt. Bei dieser Substanz handelt es sich um ein Strukturanalogon von GLP-1(7-37)NH₂ mit einer Homologie von 97% der Aminosäuresequenz. Liraglutid ist, wie auch Exendin-4, resistent gegen den Abbau durch die DPP 4 und besitzt somit eine Halbwertszeit von mehreren Stunden⁴⁸.

1.2.2 Der GLP-1-Rezeptor

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Identifikation des Wirkmechanismus und die Untersuchung der Effekte von Inkretinen auf das humane Myokard. Inkretine binden spezifisch an den GLP-1-R⁴⁹. Dieser gehört als G-Protein-gekoppelter Rezeptor (G-protein coupled receptor; GPCR) der Superfamilie der heptahelikalen Transmembranproteine an⁵⁰. Er benötigt GLP-1(7-36)NH₂ beziehungsweise Inkretine als Liganden um ein Signal ins Zellinnere weiterzuleiten⁴⁹. GPCR ist gemeinsam, dass über die Spaltung von GTP eine Konformationsänderung des Rezeptors eingeleitet wird, wodurch die Adenylatcyclase (AC) aktiviert und letztendlich cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP) hochreguliert wird, welches seinerseits Proteinkinase A (PKA) aktiviert. PKA zählt zu den Serin/Threonin Kinasen und hat in jedem Gewebe spezifische Funktionen: im Herzwewebe werden durch PKA *vgCaCh* vom L-Typ phosphoryliert und damit deren Leitfähigkeit erhöht⁵¹. In den Beta-Zellen des Pankreas werden durch PKA *K_{ATP}*-Kanäle gehemmt und gleichzeitig die Leitfähigkeit der *vgCaCh* erhöht, dies begünstigt die Insulinfreisetzung⁵² (siehe Kap. 1.1.2 Sekretion von Insulin). In glatter Muskulatur führt PKA zu Relaxation⁵³ und verhindert die Zellproliferation nach Gewebeverletzungen⁵⁴. In Endothelzellen hemmt PKA inflammatorische Prozesse, die Arteriosklerose begünstigen⁵⁵.

Neben PKA aktiviert cAMP auch den Proteinkomplex Exchange protein directly activated by cAMP (Epac). Epac vermittelt seine Effekte über weitere Proteine⁵⁶ und führt zu spezifischen Wirkungen im Herzwewebe. Dadurch ist Epac schlussendlich mitverantwortlich für die Freisetzung von Atrialelem natriuretischem Peptid⁴⁰ (ANP) und spielt auch eine wichtige Rolle in der Entleerung der intrazellulären Ca²⁺-Speicher der kardialen Myozyten. Pathophysiologisch ist Epac somit auch an der Entstehung von Arrhythmien beteiligt⁵⁷. Eine wesentliche Funktion in der intrazellulären Signaltransduktion spielen auch beta-Arrestine. Bei

diesen handelt es sich um Proteine, die einerseits in der Lage sind GPCR in einer inaktiven Form zu blockieren⁵⁸, andererseits beim Abbau von Second Messengern, welche durch die Aktivität der GPCR hochreguliert werden (cAMP, Diacylglycerol), mitzuwirken^{59,60}. Beta-Arrestine besitzen zusätzlich eigene Signaltransduktionsmechanismen⁶¹.

1.3 Kardiale Signaltransduktion und Inotropie

Wie oben beschrieben spielen Inkretine durch ihre Effekte eine wichtige Rolle im kardiovaskulären System. Die Aufgabe des Herzens besteht darin durch rhythmische Kontraktionen den Blutfluss im Organismus aufrecht zu erhalten. Die Herzaktion selbst wird durch viele Signaltransduktionskaskaden gesteuert. Diese werden über hormonelle und nervliche Signale induziert. Der GLP-1-R kommt im Herzwesen vor⁴⁴ und neuere Studien belegen, dass die dortige Aktivierung dieses Rezeptors neben einer positiv inotropen Wirkung⁶² auch zu einer Freisetzung von ANP führt⁴⁰.

1.3.1 Physiologie des Aktionspotentials

Das Herzwesen besitzt die Eigenschaft der automatischen Reizgeneration. Der Sinusknoten fungiert hier als Schrittmacher der Herzaktion. In dessen spezialisierten Herzmuskelzellen entstehen dort über Ionenkanäle selbständige Aktionspotentiale, die sich über das Reizleitungssystem in das gesamte Herz ausbreiten. Diese spontane Depolarisation der Schrittmacherzellen wird durch einen Einstrom von Natriumionen (Na^+) über spezielle, nur in diesen Zellen exprimierte hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated (HCN) Kanäle, erzeugt. Durch die Depolarisation öffnen sich Ca^{2+} -Kanäle vom L-Typ, welche fortan das Aktionspotential bestimmen^{63,64}. In Schrittmacherzellen spielen, anders als im Arbeitsmyokard, spannungsabhängige Natriumkanäle (Na^+ -Kanäle) eine untergeordnete Rolle. Während des starken Ca^{2+} -Einstroms kommt es zu einem Ausstrom von K^+ über spannungsabhängige Kaliumkanäle (K^+ -Kanäle). Dieser Mechanismus führt wieder zur Repolarisation und beendet schließlich das Aktionspotential. Über die Natrium-Kalium-ATPase (Na^+/K^+ -ATPase) wird in die

Schrittmacherzelle geströmtes Na^+ wieder in den Extrazellulärraum befördert, aus der Zelle geströmtes K^+ wird dabei im Gegenzug in die Zelle zurückgepumpt. Ca^{2+} wird im Austausch mit Na^+ über den Natrium-Calcium-Austauscher (NCX) wieder aus dem Zellinneren entfernt⁶⁴.

Durch diese, in den Schrittmacherzellen gebildeten Aktionspotentiale, kann das Arbeitsmyokard erregt werden und mechanisch kontrahieren. Die Aktionspotentiale im Arbeitsmyokard unterscheiden sich hauptsächlich von jenen der Schrittmacherzellen, dass es hier über spannungsabhängige Na^+ -Kanäle zu einem schnellen Aufstrich des Potentials kommt. Anschließend kommt es zu einem Ca^{2+} Einstrom über vCaCh vom L-Typ. Dieses eingeströmte Ca^{2+} bewirkt eine Öffnung des Ryanodinrezeptors (RyR), welcher sich in der Membran des sarkoplasmatischen Retikulums (SR) befindet. Das SR stellt den intrazellulären Ca^{2+} -Speicher der Myozyten dar. Dieser Mechanismus wird „calciuminduzierte Calciumfreisetzung“ genannt⁶⁵. Das so im Zellinneren freigesetzte Ca^{2+} steht einerseits für die mechanische Kontraktion zur Verfügung, andererseits bindet es auch an Calmodulin (CaM). Dieses Ca^{2+} -Calmodulin (CaCaM) hemmt den RyR, um weiteren Ca^{2+} -Ausstrom zu unterbinden und aktiviert gleichzeitig die Calmodulinkinase II (CaMKII), welche den RyR phosphorylieren kann und dadurch dessen Leitfähigkeit im folgenden Aktionspotential erhöht⁶⁶. Ca^{2+} wird schließlich über zwei Wege wieder aus dem Cytoplasma entfernt: einerseits wird es mittels der sarko/endoplasmatic reticulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA)⁶⁷ zurück in das SR gepumpt um dann für das nächste Aktionspotential wieder zur Verfügung zu stehen, andererseits wird es über den NCX im Austausch gegen Na^+ in den Extrazellulärraum gepumpt^{63,64}.

1.3.2 Mechanische Kontraktion – Inotropie

Wie dargestellt spielt Ca^{2+} eine entscheidende Rolle bei der elektrischen Reizentstehung in kardialen Myozyten. Zusätzlich ist es für die im Zuge des Aktionspotentials stattfindende Kontraktion essentiell. Die Kontraktion einer Herzmuskelzelle wird durch eine Konformationsänderung von Myosin, einem Protein, welches an Aktinfilamente bindet, ausgelöst. Somit verkürzt sich die gesamte Zelle. Dieser Vorgang ist ATP-abhängig. Im Ruhezustand ist das Aktinfilament von Proteinkomplexen aus der Familie der Troponine umhüllt.

Besonderer Bedeutung kommt dem Troponin C zu, es blockiert die Bindungsstelle von Myosin an Aktin. Diese wird freigegeben, sobald Troponin C in Kontakt mit Ca^{2+} tritt, welches während des Aktionspotentials aus dem SR in das Cytoplasma ausgeschüttet wird. Dieser Zusammenhang wird auch als elektromechanische Koppelung bezeichnet. Ca^{2+} wird nach erfolgter Kontraktion einerseits wieder über die SERCA zurück in das SR gepumpt, andererseits verlässt es die Zelle im Austausch mit Na^+ über den NCX. Die Änderung der Kontraktionskraft einer Herzmuskelzelle wird als Inotropie bezeichnet. Hormonelle, nervliche oder pharmakologische Signale können zu einer Steigerung (positiv inotrope Wirkung) oder einer Verminderung (negativ inotrope Wirkung) der Kontraktionsfähigkeit des Herzgewebes führen^{68,69}.

1.3.3 Pharmakologische Eingriffe in die Signaltransduktion des Myokards

Im Laufe der vorgestellten Studie wurden die drei unten angeführten Pharmaka eingesetzt, um den Mechanismus der beobachteten positiv inotropen Wirkung von Inkretinen aufzuklären.

Ryanodin (Rya) ist ein starker Agonist am RyR. Die Bindung von Rya bewirkt dass der RyR in einer geöffneten Konformation gehalten wird und Myozyten dadurch die Fähigkeit verlieren Ca^{2+} im SR zu speichern. Stattdessen wird das freigesetzte Ca^{2+} durch den NCX aus dem Cytosol und somit der gesamten Zelle entfernt. Unter diesem Ca^{2+} -Mangel leidet nun die Kontraktionsfähigkeit der Myozyten, Rya hat dadurch einen negativ inotropen Effekt⁵¹.

Thapsigargin (TG) ist ein Inhibitor der SERCA, welche Ca^{2+} vom Cytosol in das SR pumpt. Durch die Blockade dieser Ionenpumpe können die Ca^{2+} -Speicher der Myozyten nicht mehr aufgefüllt werden, das Ca^{2+} verbleibt im Cytosol. Jedoch steigt dort die Ca^{2+} -Konzentration der Myozyten nicht an, da Ca^{2+} durch den NCX aus der Zelle gepumpt wird^{70,71}.

H-89 ist ein spezifischer Inhibitor der PKA, daneben blockiert diese Substanz auch weitere Proteinkinasen⁷². Um aktiv zu werden benötigt PKA cAMP als Second Messenger. Diese ist in der Lage den vgCaCh vom L-Typ zu phosphorylieren und somit die Leitfähigkeit dieses Ionenkanals zu erhöhen. Das nun vermehrt einströmende Ca^{2+} führt zu einer verstärkten Muskelkontraktion^{73,74}.

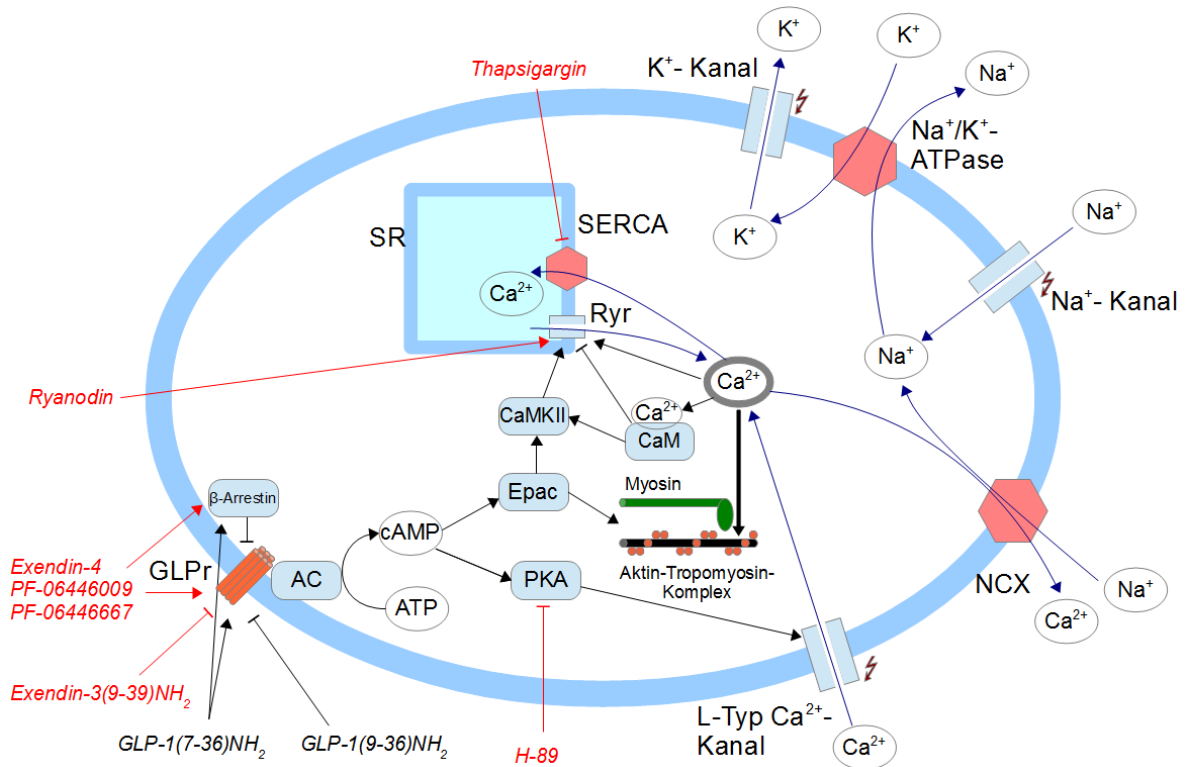


Abb. 2: Schematische Darstellung der Signaltransduktion eines kardialen Myozyten. Inkretine (Exendin-4, PF-06446009, PF-06446667, GLP-1(7-36)NH₂) binden an den GLP-1-Rezeptor (GLPr) und lösen dadurch eine Aktivierung der Adenylatcyclase (AC) aus, welche wiederum ATP zu cAMP umwandelt. cAMP wirkt über zwei verschiedene Schenkel, die beide schlussendlich zu einer intrazellulären Freisetzung von Ca²⁺ führen. Einerseits aktiviert PKA dadurch v_gCaCh vom L-Typ, es folgt ein erhöhter Einstrom von Ca²⁺ und dadurch wird die calciuminduzierte Calciumfreisetzung ausgelöst, andererseits aktiviert Epac über die CaMKII den Ryanodinrezeptor (Ryr), dies führt ebenso zu einer erhöhten Ca²⁺-Freisetzung des SR. Außerdem steigert Epac die Ca²⁺-Sensitivität der Myofilamente. Hier führt Ca²⁺ schließlich zu einer Konformationsänderung des Aktin-Tropomyosin-Komplexes, wodurch Myosin an Aktin binden kann und die gesamte Muskelzelle dadurch kontrahiert. Rot: pharmakologische Eingriffe, schwarz: physiologische Prozesse, blaue Pfeile: Ionenströme.

1.4 Fragestellung und Ziele

In dieser Arbeit wurden die funktionellen Wirkungen der Inkretine auf das humane Herzgewebe mittels in vitro Experimenten untersucht. Dabei wurden neben den inotropen Effekten auch die dahinterstehenden Signaltransduktionswege (PKA, SERCA, RyR, DPP 4) untersucht. Darüber hinaus wurden Proben für weiterführende Untersuchungen (Molekularbiologie, Western Blots) bereitgestellt.

2 Material und Methoden

Es wurden in dieser Arbeit sämtliche Experimente mit zwei verschiedenen Gewebetypen durchgeführt: atriales und ventrikuläres humanes Myokard.

2.1 Pufferlösungen

Um nach Erhalt des Gewebes autolytische Prozesse zu vermeiden muss es rasch in eine Nährlösung eingebracht werden. Hierfür eignet sich ein modifizierter Krebs-Henseleit-Puffer (Tyrode-Lösung) besonders gut. Die genaue Zusammensetzung der Tyrode-Lösung ist in Tabelle 2 angeführt.

<i>Krebs-Henseleit-Puffer</i>			
<i>Kationen</i>	<i>Konzentration</i>	<i>Anionen</i>	<i>Konzentration</i>
<i>Na⁺</i>	152 mmol/L	<i>Cl⁻</i>	129,5 mmol/L
<i>K⁺</i>	3,6 mmol/L	<i>HCO₃⁻</i>	25 mmol/L
<i>Mg²⁺</i>	0,6 mmol/L	<i>H₂PO₄⁻</i>	1,3 mmol/L
<i>Ca²⁺</i>	0,2 mmol/L	<i>SO₄²⁻</i>	0,6 mmol/L

<i>Tyrode-Lösung</i>		<i>BDM-Tyrode-Lösung</i>	
<i>Feststoff</i>	<i>Einwaage (1 L)</i>	<i>Feststoff</i>	<i>Einwaage (1 L)</i>
<i>NaCl</i>	7,422 g	<i>NaCl</i>	7,422 g
<i>NaHCO₃</i>	2,100 g	<i>2,3-BDM</i>	3,000 g
<i>Glucose</i>	2,018 g	<i>NaHCO₃</i>	2,100 g
<i>KH₂PO₄</i>	0,177 g	<i>Glucose</i>	2,018 g
<i>KCl</i>	0,172 g	<i>KH₂PO₄</i>	0,177 g
<i>MgSO₄·7H₂O</i>	0,148 g	<i>KCl</i>	0,172 g
<i>CaCl₂·2H₂O</i>	0,029 g	<i>MgSO₄·7H₂O</i>	0,148 g
<i>Altinsulin</i>	5 I.E.	<i>CaCl₂·2H₂O</i>	0,029 g

Tabelle 2: Zusammensetzung der verwendeten Pufferlösungen

Um Bedingungen wie im menschlichen Körper zu simulieren muss der pH-Wert der Tyrode-Lösung auf 7,4 eingestellt werden. Dies wird erreicht indem der Puffer ausreichend mit Carbogen (95% O₂, 5% CO₂) begast wird. Zusätzlich wird der Tyrode-Lösung 2,3-Butandionmonoxim (BDM) zugesetzt. BDM-Tyrode-Lösung eignet sich gut um einem Gewebsuntergang der gewonnen multizellulären Präparate entgegenzuwirken^{75,76}.

2.2 Vorhofgewebe

Vorhofgewebe wird bei herzchirurgischen Operationen von PatientInnen gewonnen. Bei einer Bypass- beziehungsweise Aortenklappenersatzoperation muss ein Herzstillstand mittels Infusion einer kardioplegen Lösung, die einen Depolarisationsblock zur Folge hat, ausgelöst werden. PatientInnen müssen bereits zuvor an eine Herz-Lungen-Maschine angeschlossen werden und eine extrakorporale Zirkulation zu erhalten. Die Kanülierung an die Herz-Lungen-Maschine kann direkt über den rechten Vorhof erfolgen. Dabei wird das rechte Herzohr (Abb. 3) abgesetzt und kann für experimentelle Versuche verwendet werden⁷⁷. Das Herzohr ist im Durchschnitt etwa 2x1x1 cm groß. Auf diese Weise wurde Herzgewebe von 68 Patienten (Tabelle 3) gewonnen.

2.2.1 Transport von Vorhofgewebe

Nach der Kanülierung an die Herz-Lungen-Maschine wird das rechte Herzohr abgesetzt und direkt mit einer sterilen Pinzette in einen zuvor vorbereiteten Einwegbecher eingebracht. In diesem befinden sich circa 100 mL mit Carbogen begaster BDM-Tyrode-Lösung. Nach dem Erhalt des Herzohres wird es rasch (innerhalb von 10 Minuten) in das Labor gebracht.

2.2.2 Präparation von Vorhofgewebe

Nach dem Transport ins Labor und dem dortigen Auswaschen des Herzohrs wird dieses in eine Präparierschale überführt. Darin befindet sich mit Carbogen aufgesättigte BDM-Tyrode-Lösung. Es können mit Hilfe eines Mikroskops, einer

Pinzette und einer Mikroschere kleine Trabekel (Abb. 6) aus dem Herzohr isoliert werden. Die Trabekel sollten möglichst unverzweigt sein und nur quer geschnitten werden. Die Trabekel sollten außerdem keinen größeren Querschnitt als 0,6 cm² aufweisen, da bei größerem Querschnitt für die innersten Schichten der Trabekel die Gefahr der Unterversorgung mit Sauerstoff besteht und somit eine Hypoxie droht⁷⁸. Die Präparation selbst sollte möglichst atraumatisch erfolgen, vor allem Dehnungen der Trabekel müssen vermieden werden, es können dadurch irreversible Strukturschäden auftreten.

Alle Patienten; N=68, Daten von 67			
Geschlecht, N [m] (%)	48 (72%)		
Geschlecht, N [w] (%)	19 (28%)		
Alter (Jahren)	68,0 ± 9,9; 70		
BMI	27,0 ± 4,4; 26,1	Medikation:	
CABG, N (%)	46 (68%)	T-ASS, N (%)	32 (48%)
AKE, N (%)	7 (11%)	Statine, N (%)	46 (69%)
CABG + AKE, N (%)	14 (21%)	AT II Antagonisten, N (%)	18 (27%)
Sinusrhythmus, N (%)	63 (94%)	ACE Hemmer, N (%)	24 (36%)
VHFA, N (%)	4 (6%)	B-Blocker, N (%)	48 (72%)
Paroxysmale VHFA, N (%)	14 (21%)		
Diabetes mellitus II, N (%)	22 (33%)		
Hypertonie, N (%)	63 (94%)		
Diastolische Dysfunktion, (N)*	20 (61%); 20 von 33		
EF [%] (N)	59,4 ± 9,4; 64		

Tabelle 3: Patientendemographie, atriale Trabekel.

m = männlich; w = weiblich; BMI = body mass index; CABG = coronary artery bypass graft, aortocoronarer Bypass; AKE = Aortenklappenersatz; VHFA = Vorhofflimmerarrhythmie; EF = Ejektionsfraktion des linken Ventrikels; T-ASS = Acetylsalicylsäure; AT II = Angiotensin II; ACE = Angiotensin converting enzyme.

*: Diastolische Dysfunktion: Daten nur von 33 PatientInnen erhebbar.

Nach der Isolation werden die Trabekel mit einer Transferpipette in ein mit BDM-Tyrode-Lösung gefülltes Gefäß überführt und können in weiterer Folge für das Experiment verwendet werden⁷⁷. Je nach Größe und innerer Struktur können aus einem Herzohr im Schnitt zwischen null und zehn Trabekel gewonnen werden. Insgesamt werden circa 350 Trabekel präpariert, Daten von 141 Trabekeln können gesammelt und ausgewertet werden.

2.3 Ventrikuläres Gewebe

Ventrikuläres Gewebe wurde aus Herzen von Patienten entnommen, welche als Organspender klassifiziert wurden, bei denen das Herz jedoch aus verschiedenen Gründen, wie Alter, Virusinfektionen, bestehende Herzkrankheiten oder Tumoren, nicht transplantiert worden ist. Die Präparation der Trabekel aus dem Ventrikel erfolgte in den Laboratorien des ZMF (Zentrum für medizinische Grundlagenforschung, Medizinische Universität Graz) analog der Präparation von Vorhofgewebe⁷⁹. Die isolierten Trabekel wurden ebenfalls mittels einer Transferpipette in ein mit BDM-Tyrode-Lösung gefülltes Gefäß überführt und konnten in diesem zur Versuchsanlage gebracht werden. Insgesamt wurde ventrikuläres Gewebe aus der rechten und linken Herzkammer von sieben Herzen gewonnen. Es wurden circa 70 Trabekel präpariert, 26 konnten in experimentellen Versuchen verwendet werden.

2.4 Streifenanlage

Sämtliche Experimente wurden an der in Abb. 3 dargestellten Messanlage durchgeführt. Diese setzt sich aus folgenden Elementen zusammen:

- Messeinheit (Abb. 4) mit Force Transducer (Scientific Instruments, Deutschland)
- Stimulator STM1 (Scientific Instruments, Deutschland)
- Rollpumpe MC MS (Ismatec, Schweiz)
- Stereomikroskop VMT (Olympus, Japan)

-4-Kanal-Thermoschreiber Graphtec Linearcorder WR 3320 (Graphtec, Japan)

-Computer mit Softwareprogramm Labview

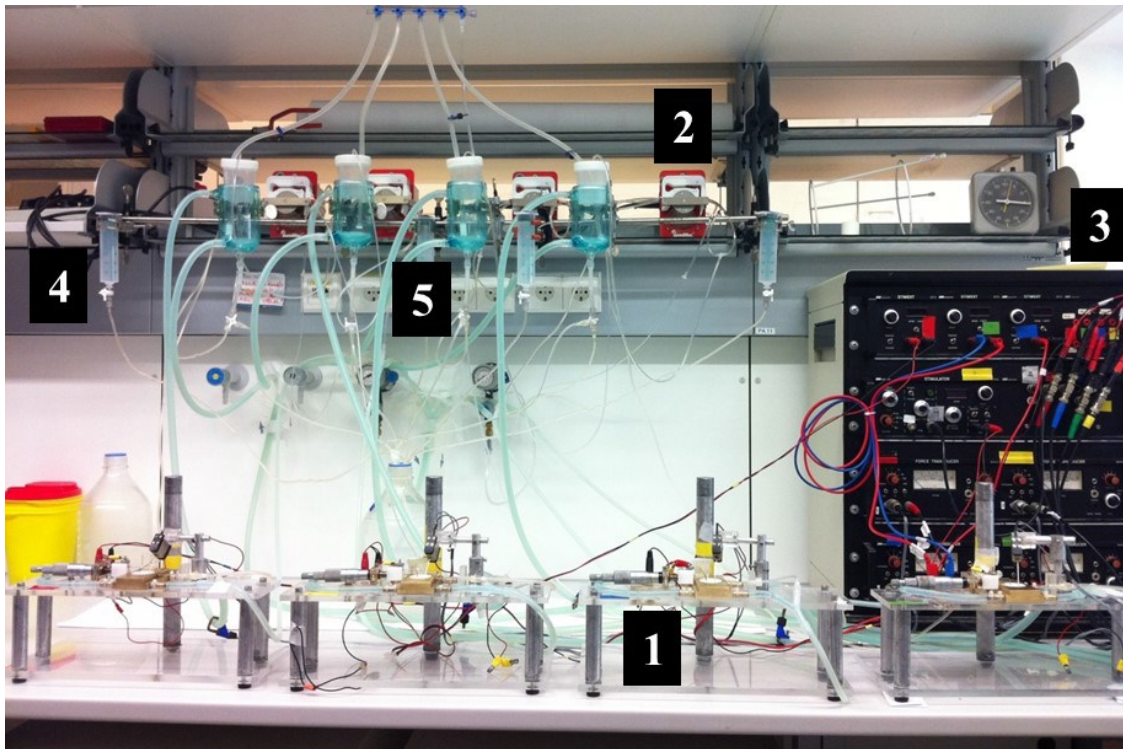


Abb. 3: Die Messanlage. 1: Messeinheit mit Force Transducer, Organbad, 2: Rollpumpe, 3: Stimulator, 4: 50 mL Perfusorenspritze zum Ablassen von Flüssigkeit, 5: Tyrode-Becken mit Schlauchsystem.

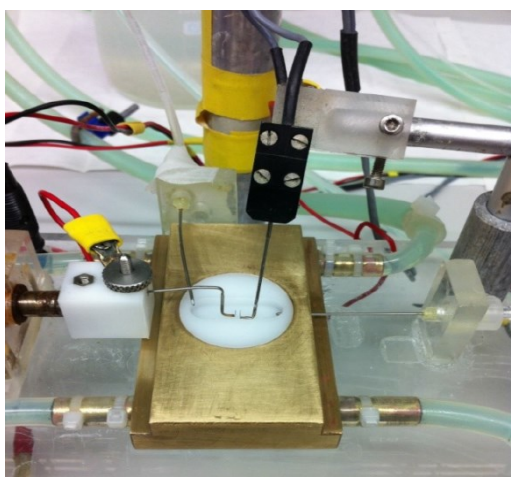


Abb. 4: Messeinheit; Organbad, in Thermoblock eingefasst und Force Transducer (schwarzes Element).



Abb. 5: Herzohr, Blick durch das Mikroskop



Abb. 6: Isolierter und auf den Minutiennadeln fixierter Trabekel, Blick durch das Mikroskop

Nach der Präparation der Trabekel wurden diese in die Streifenanlage eingehängt um funktionelle Inotropiemessungen durchführen zu können. Die Anlage besteht aus vier parallelen Kanälen, welche jeweils über ein eigenes Organbad (Abb. 4), eigene Begasung sowie eigene Temperaturregulation verfügen (Abb. 3). Jeder Kanal ist ein geschlossener Kreislauf. Als Nährflüssigkeit für die Trabekel dient die Tyrode-Lösung. Diese befindet sich in einem Tyrode-Becken, welches über eine Wärmepumpe stets auf einer Temperatur von 37° C gehalten wird und über eine Fritte permanent mit Carbogen begast wird, um den pH-Wert konstant auf 7,4 zu halten. Das Organbad ist das zentrale Element der Versuchsanordnung. Es besteht aus Teflon und ist in einen Thermoblock eingefasst. Die präparierten Trabekel werden darin auf eigens angefertigten Minutiennadeln aufgehängt. Eine der Nadeln ist mit einem Force Transducer, der die Kontraktionskraft und kinetischen Daten misst, die andere Nadel ist mit einer Mikrometerschraube verbunden. Der eingehängte Trabekel kann so auf eine optimale Länge (=L_{max}) gedehnt werden. Durch die Dehnung wird eine steigende Vorlast (preload) simuliert, anhand des Frank-Starling-Mechanismus steigt die isometrische Kontraktion der Trabekel auf einen Maximalwert an⁸⁰. Die in das Organbad gepumpte Tyrode-Lösung wird über eine Kanüle wieder abgesaugt und über das Schlauchsystem zurück zum Tyrode-Becken gepumpt. Dieses wird auf weiten Strecken nach dem Gegenstromprinzip temperaturreguliert: das Schlauchsystem, in dem die Tyrode-Lösung zum Organbad gepumpt wird ist in ein Schlauchsystem der Wärmepumpe integriert. So wird garantiert dass die Tyrode-Lösung während des Experiments eine konstante Temperatur aufweist. Eine ständige Messung der Temperatur erfolgt auch direkt über die Wärmepumpe.

Die elektrische Stimulation der Trabekel erfolgt über einen Stimulator. Frequenz und Spannung können verändert werden. In allen durchgeführten Experimenten dieser Arbeit wurden die Trabekel mit einer Frequenz von 1 Hz stimuliert. Die kinetischen Daten wurden von dem Force Transducer digital an einen Computer und analog an einen Drucker übermittelt. Bevor mit der Stimulation der Muskelstreifen begonnen wurde, musste eine physiologische Ca²⁺-Konzentration aufgebaut werden. Dies erfolgte in zwei Schritten, zunächst wurde die Konzentration von 0,2 mmol/L durch Zugabe von 1 M CaCl₂-Lösung auf 1,2 mmol/L erhöht. Es wurde einige Minuten gewartet um den Trabekeln Zeit zu geben sich an die höhere Ca²⁺-Konzentration anzupassen, danach wurden die

Trabekel elektrisch stimuliert und die Ca^{2+} -Konzentration wurde auf die in allen Experimenten gewählte Endkonzentration von 2,5 mmol/L erhöht. Nun wurden die Trabekel auf L_{max} gedehnt, wenn diese erreicht wurde, konnte das eigentliche Experiment begonnen werden. Trabekel, welche eine andauernde Arrhythmie bzw. einen Eigenrhythmus entwickelten, wurden ausgeschlossen.

2.5 Substanzen

Ryanodin und H-89 wurden bei Calbiochem (Darmstadt, Deutschland), Thapsigargin, NaCl, NaHCO_3 , KH_2PO_4 und 2,3-BDM bei Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland), KCl, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ und (+)D-Glucose bei Merck (Darmstadt, Deutschland) erworben. Exendin-3(9-39) NH_2 , Exendin-4, GLP-1(7-36) NH_2 und GLP-1(9-36) NH_2 wurden von Tocris (Bristol, Vereinigtes Königreich) gekauft, die GLP-1-R Agonisten PF-06446009 und PF-06446667 sowie der DPP4-Inhibitor Sitagliptin wurden von Pfizer Inc. (Milwaukee, Vereinigte Staaten) synthetisiert und zur Verfügung gestellt. Destilliertes Wasser (Milli-Q Integral 5 System; Billerica, Vereinigte Staaten) mit einem elektrischen Leitwert von $<125 \text{ nS}$ wurde verwendet.

2.6 Versuchsprotokolle

2.6.1 Rundownversuche

Die stimulierten Trabekel verlieren mit zunehmender Experimentdauer an Kraft. Dieses Phänomen wird als physiologischer Rundown bezeichnet. Die Rundownexperimente dienen als Vergleichsgruppe für alle weiteren durchgeführten Experimente, da eine mögliche positiv inotrope Wirkung durch den Rundown-Effekt verschleiert werden kann.

2.6.2 Dosiswirkungskurve

Je nach Versuchsserie laufen Dosiswirkungskurven über 75 bis 120 Minuten, dies entspricht fünf bis acht Konzentrationsstufen. Diese wurden fest gewählt, die

getesteten Substanzen wurden in der jeweiligen Konzentrationsstufe für 15 Minuten inkubiert, dann erfolgte eine Erhöhung der Konzentration.

2.6.3 Single shot Experimente

Anhand der Dosiswirkungskurven wurde eine maximal wirksame Konzentration ermittelt, in den Single shot Experimenten wurde eine einmalige Zugabe der Substanzen in dieser Konzentration durchgeführt. Neben dem Erfassen der maximal inotropen Wirkung (Kraftsteigerung) nach 15 Minuten wurde der zeitliche Verlauf der Substanzwirkung für 60 Minuten beobachtet.

2.6.4 Inhibitorexperimente

Es wurden die Trabekel zunächst für eine bestimmte Zeit (15-30 Minuten) mit Inhibitorsubstanzen präinkubiert, danach wurde die positiv inotrop wirkende Substanz in steigenden Konzentrationen oder als Single shot hinzugefügt. Ziel war es eine Aussage zu erhalten, ob die inotrope Wirkung blockiert werden konnte.

2.7 Auswertung

Die Daten wurden an den gewählten Messpunkten aus einem Mittelwert von jeweils fünf aufeinanderfolgenden Kontraktionen gewonnen. Die folgenden Parameter wurden erfasst:

- Systolische Kraft (maximal entwickelte Kraft)
- Diastolische Spannung (Ruhekraft)
- RT50 (Zeit bis zur 50%ige Relaxation)

2.8 Statistik

Zur statistischen Auswertung wurden die verschiedenen Versuchsgruppen jeweils mit ungepaarten T-Tests untersucht. Signifikante Ergebnisse wurden bei Werten von $P < 0,05$ angenommen, hochsignifikante Ergebnisse bei $P < 0,01$.

3 Ergebnisse

3.1 Inotrope Effekte

Die Beurteilung der inotropen Effekte der getesteten Substanzen wird in den Abbildungen 7-9 veranschaulicht. Es handelt sich um Originalregistrierungen von Experimenten verschiedener Versuchsserien.

In Abbildung 7 wird der physiologische Kraftverlust der Muskelstreifen über die Zeit bei gleichbleibenden Bedingungen demonstriert. Keine positiv oder negativ inotrop wirksame Substanz wurde hinzugefügt, die Muskelkraft nahm innerhalb von 30 Minuten kontinuierlich und langsam von 25,2 mN/mm² auf 22,9 mN/mm² ab. Dieser Kraftverlust nennt sich Rundown. In Abbildung 8 werden positiv inotrope Effekte dargestellt. Kurz nach Zugabe der wirksamen Substanzen (oben: Exendin-4, unten: PF-06446667) kam es zu einem starken Anstieg der Kontraktionskraft der Muskelstreifen gefolgt von einer stetigen Abnahme. Diese Kraftreduktion ist ein kombinierter Effekt aus physiologischem Rundown und einer Abnahme der Wirksamkeit der zugesetzten Substanzen (Exendin-4 und PF-06446667). In Abbildung 9 wird ein negativ inotroper Effekt gezeigt. Kurz nach Zugabe der negativ inotrop wirkenden Substanz Ryanodin kam es zu einer starken Reduktion der Muskelkraft. Nach Erreichen eines steady state Zustandes blieb die Muskelkraft konstant.

SD8
10.7.2014
human atrium

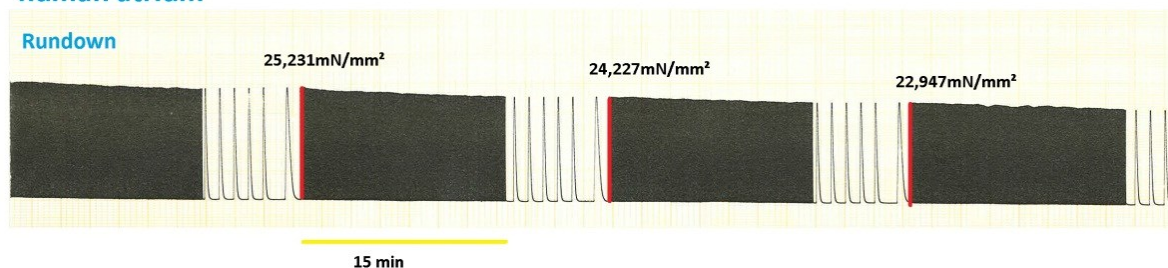


Abb. 7: Originalregistrierung des Experiments SD 8 vom 10.7.2014. Humanes Vorhofgewebe, 37 °C, 1 Hz. Die stetige Abnahme der Kontraktionskraft ohne durchgeführter Intervention wird als Rundown-Effekt bezeichnet. Schwarzer Balken: Papiervorschub 5 mm pro Minute, Einzelzacken: Papiervorschub 5 mm pro Sekunde.

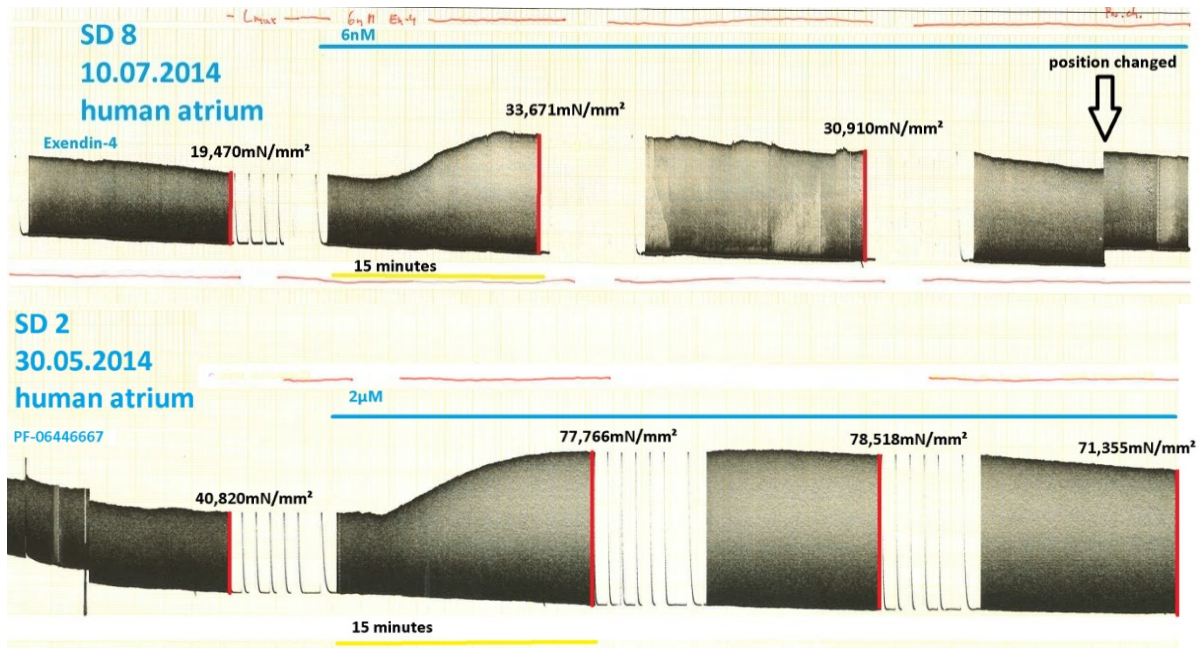


Abb. 8: Originalregistrierung des Experiments SD 8 vom 10.7.2014 (oben) bzw. SD 2 vom 30.5.2014 (unten). Humanes Vorhofgewebe, 37 °C, 1 Hz. Jeweils ein positiv inotroper Effekt nach Substanzzugabe als Single shot (oben: 6 nM Exendin-4, unten: 2 µM PF-06446667) ist dargestellt. Nach Erreichen der Maximalkraft fällt der inotrope Effekt als Folge von Rundown und Effektverlust der Substanzen ab. Schwarzer Balken: Papiervorschub 5 mm pro Minute, Einzelzacken: Papiervorschub 5 mm pro Sekunde.

Exendin 16
5.12.2013
human atrium

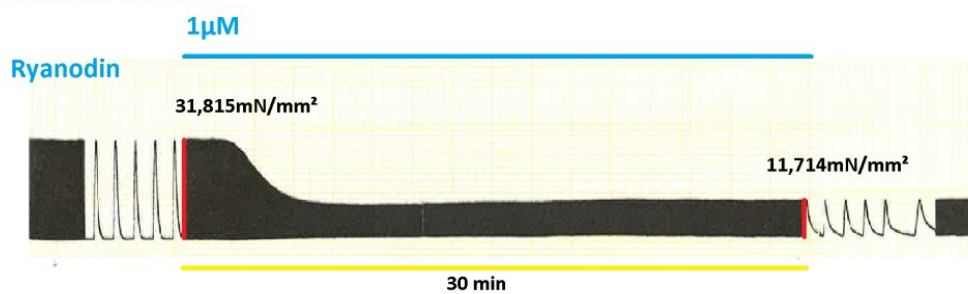


Abb. 9: Originalregistrierung des Experiments Exendin 16 vom 5.12.2013. Humanes Vorhofgewebe, 37 °C, 1 Hz. Darstellung eines negativ inotropen Effekts. Nach Zugabe einer einmaligen Dosis von Ryanodin (1 µM) nimmt die entwickelte Kraft des Herzmuskelgewebes stark ab und bleibt dann auf einem stabilen Niveau. Schwarzer Balken: Papiervorschub 5 mm pro Minute, Einzelzacken: Papiervorschub 5 mm pro Sekunde.

3.2 Diastolische Spannung und systolische Kraft

Die diastolische Spannung (=diastolische Kraft) ist die Ruhespannung der eingehängten Muskelstreifen. Diese wurden in einem schlaffen Zustand („slack“) auf den Minutiennadeln fixiert, daraufhin wurde die diastolische Spannung genullt („zero adjustment“). Durch Dehnung der Muskelstreifen bis L_{max} stieg die diastolische Spannung jeweils unterschiedlich stark an, somit wichen in den einzelnen Experimenten die Ausgangswerte dieses Parameters teils erheblich voneinander ab. Zum einfacheren statistischen Vergleich der Versuchsserien wurde die diastolische Spannung – analog zur entwickelten systolischen Kraft – in relativen Werten (Start des Experiments = 100% = Baseline) abgebildet. Somit können nach Substanzgabe auftretende Effekte sehr gut veranschaulicht werden. In Abb. 10 ist die diastolische Spannung und die entwickelte systolische Kraft, sowie deren Bezug zur Nulllinie (0 mN/mm²) in einer Originalregistrierung dargestellt.

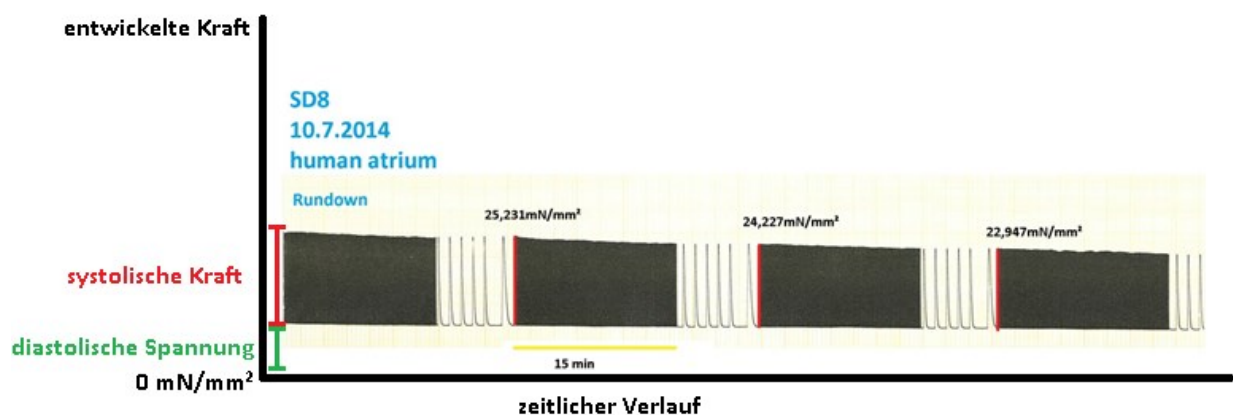


Abb. 10: Originalregistrierung des Experiments SD 8 vom 10.7.2014. Humanes Vorhofgewebe, 37 °C, 1 Hz. Modifizierte Darstellung der Abbildung 7 (Kap. 3.1 Inotrope Effekte). Die stetige Abnahme der Kontraktionskraft ohne durchgeführter Intervention wird als Rundown-Effekt bezeichnet. Schwarzer Balken: Papiervorschub 5 mm pro Minute, Einzelzacken: Papiervorschub 5 mm pro Sekunde. Die schwarz eingezeichnete X-Achse „zeitlicher Verlauf“ stellt gleichzeitig die Nulllinie der Y-Achse („entwickelte Kraft“) dar. Grün: diastolische Spannung, rot: systolische Kraft.

3.3 Atrium – Rundown-Effekte

Ein in vitro arbeitender Herzmuskelstreifen verliert über die Zeit an Kraft. Dieser Kraftverlust wird als Rundown bezeichnet. Es wurden Experimente durchgeführt, in denen alle 15 Minuten die kinetischen Parameter gemessen wurden, ohne dass eine Intervention stattgefunden hat (Abb. 11). Die Abszissenachse markiert den zeitlichen Verlauf, in der Ordinatenachse ist die entwickelte Kraft abgebildet.

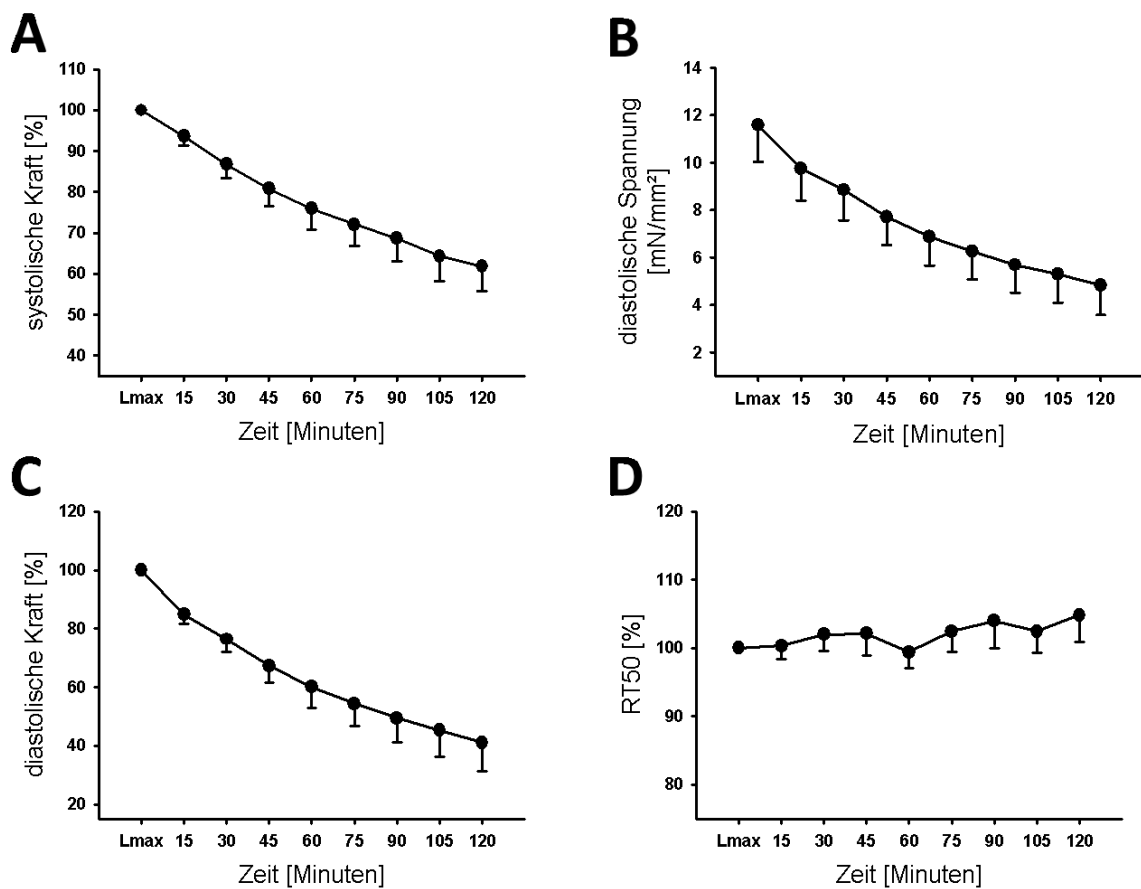


Abb. 11: Rundown von humanem atrialen Myokard, 37 °C; 1 Hz.

A: Keine Intervention: die Muskelstreifen ($n=10$) verlieren annähernd einer linearen Funktion folgend an systolischer Kraft ($[\%] \pm SEM$).

B: Keine Intervention: abgebildet ist die diastolische Spannung (=diastolische Kraft) im zeitlichen Verlauf (Absolutwerte als Mittelwert $[mN/mm^2] \pm SEM$). Die Muskelstreifen ($n=10$) verlieren annähernd einer linearen Funktion folgend an diastolischer Spannung.

C: Keine Intervention: die Muskelstreifen ($n=10$) verlieren annähernd einer linearen Funktion folgend an diastolischer Kraft ($[\%] \pm SEM$).

D: Keine Intervention: die RT50 ($[\%] \pm SEM$) der Muskelstreifen ($n=10$) ändert sich im zeitlichen Verlauf nicht.

Nach zwei Stunden entwickelten die Herzmuskelstreifen noch $61,8\% \pm 6,1\%$ der systolischen Kraft (Abb. 11A) beziehungsweise $41,1\% \pm 9,8\%$ der diastolischen Kraft (Abb. 11C) gemessen zur Baseline am Startpunkt des Experiments (jeweils 100%). In Abb. 11B sind die gemittelten absoluten Werte der diastolischen Spannung abgebildet, diese fiel vom Startpunkt der Experimente von $11,6 \text{ mN/mm}^2 \pm 1,5 \text{ mN/mm}^2$ auf $4,8 \text{ mN/mm}^2 \pm 1,3 \text{ mN/mm}^2$ an deren Ende ab (nach 120 Minuten). Die Relaxationszeit (Abb. 11D) änderte sich im zeitlichen Verlauf der Experimente nicht. Nach zwei Stunden machte die RT50 $104,8\% \pm 4,0\%$ der Zeit gemessen zum Startpunkt des Experiments (100%) aus. Die Rundown-Experimente dienten in weiterer Folge als Kontrollgruppe zu jenen Experimenten, bei denen Interventionen durchgeführt wurden und Effekte gemessen werden konnten.

3.4 Atrium – Exendin-4

Es wurden verschiedene Agonisten des GLP-1-R hinsichtlich der inotropen Effekte am humanen Vorhofgewebe getestet. Die Abb. 12 zeigt die dosisabhängigen Effekte des GLP-1-R Agonisten Exendin-4. Aus den ermittelten Daten wurde eine Dosiswirkungskurve (Konzentrationsbereich: 0,06 nM bis 6 nM) erstellt. Nacheinander wurde jede Konzentration für 15 Minuten in steigender Reihenfolge inkubiert, die Startpunkte der Experimente wurden mit 100% (Baseline) festgelegt. Als Kontrollgruppe (Ctrl) dienten die Rundown-Experimente.

Nach Zugabe von Exendin-4 kam es zunächst zu einem Abfall der systolischen Kraft (Abb. 12A; nach 45 Minuten bzw. 0,6 nM $82,5\% \pm 3,9\%$ gemessen zur Baseline). Dieser Abfall konnte durch ein Rundownverhalten der Muskelstreifen erklärt werden, da die Kontrollgruppe zum gleichen Zeitpunkt eine systolische Kraft von $80,8\% \pm 4,2\%$ gemessen zur Baseline aufwies. Mit weiter steigenden Konzentrationen von Exendin-4 nahm die systolische Kraft zu. Ein maximaler Kraftanstieg wurde bei einer Konzentration von 6 nM beobachtet ($155,48\% \pm 28,10\%$ gemessen zur Baseline). Zum Zeitpunkt des maximalen Effekts von Exendin-4 nach 90 Minuten hatte die Kontrollgruppe eine systolische Kraft von $72,1\% \pm 5,3\%$. Dies entspricht einem signifikanten Unterschied.

Hingegen keine signifikante Änderung nach Zugabe von Exendin-4 zeigte die diastolische Kraft (Abb. 12B), diese fiel mit steigenden Konzentrationen analog der Kontrollgruppe ab (bei 6 nM $71,1\% \pm 8,2\%$ (Exendin-4) bzw. $54,3\% \pm 7,5\%$ (Rundown) gemessen zur Baseline).

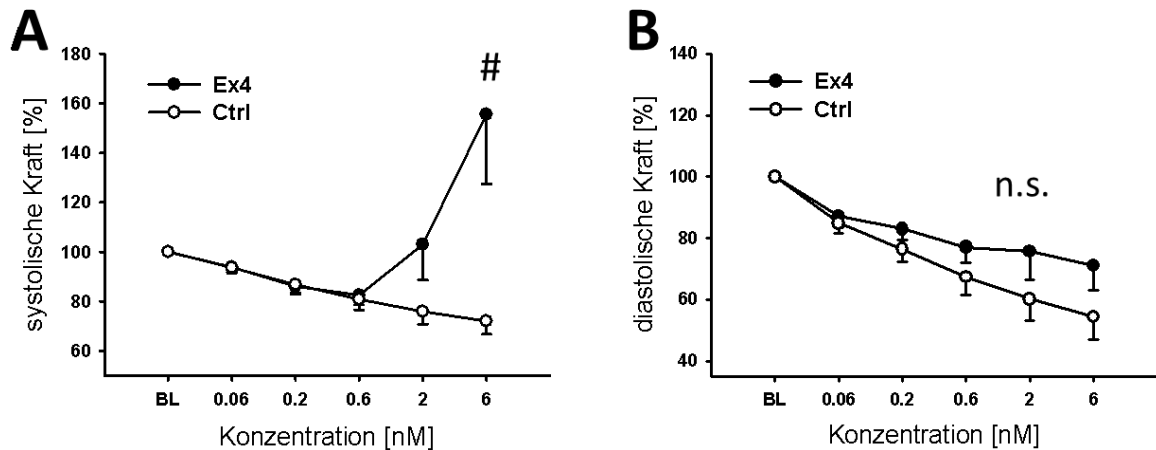


Abb. 12: Effekt von Exendin-4 auf humanes atriales Myokard, 37 °C; 1 Hz.

A: Dosiswirkungskurve: Auswirkung von Exendin-4 (schwarze Punkte, $n=10$) auf die systolische Kraft ($[\%] \pm SEM$). Mit steigenden Konzentrationen (6 nM) kommt es zu einem signifikanten Kraftanstieg gegenüber der Kontrollgruppe (weiße Punkte, $n=10$). #: $P<0,05$

B: Dosiswirkungskurve: Auswirkung von Exendin-4 (schwarze Punkte, $n=10$) auf die diastolische Kraft ($[\%] \pm SEM$). Es kommt zu keinen signifikanten Änderung gegenüber der Kontrollgruppe (weiße Punkte, $n=10$). n.s.: nicht signifikant.

3.5 Atrium – Glucagon-like peptide 1 (GLP-1(7-36)NH₂)

Neben Exendin-4 wurden andere GLP-1-R Agonisten hinsichtlich inotroper Effekte getestet. Die Abb. 13 zeigt die Effekte, die GLP-1(7-36)NH₂ auf das humane atriale Myokard ausübt. Aus den ermittelten Daten wurde erneut eine Dosiswirkungskurve (Konzentrationsbereich von 2 nM bis 600 nM) erstellt. Jeder Konzentrationsschritt wurde wieder für 15 Minuten inkubiert. Als Kontrollgruppe (Ctrl) dienten die Rundown-Experimente. Nach anfänglichem Kraftabfall auf $82,4\% \pm 4,2\%$ nach 30 Minuten bzw. bei 6 nM (Vergleich Kontrollgruppe: nach 30 Minuten $86,8\% \pm 3,4\%$ gemessen zur Baseline) stieg die systolische Kraft (Abb. 13A) an, ein maximaler Effekt konnte bei 200 nM beobachtet werden ($111,5\% \pm 15,0\%$ gemessen zur Baseline). Zu diesem Zeitpunkt hatte die Kontrollgruppe eine systolische Kraft von $68,6\% \pm 5,6\%$ gemessen zur Baseline,

wiederum ein signifikanter Unterschied. Der initiale Kraftabfall nach Zugabe von GLP-1(7-36)NH₂ stellt keinen negativ inotropen Effekt dar, sondern kann durch Rundown-Verhalten der Muskelstreifen erklärt werden. Die diastolische Kraft (Abb. 13B) wurde von GLP-1(7-36)NH₂ nicht beeinflusst, diese fiel analog zur Kontrollgruppe mit steigenden Konzentrationen im zeitlichen Verlauf ab (bei 600 nM 54,6% ± 7,4% bzw. 49,4% ± 8,1% gemessen zur Baseline).

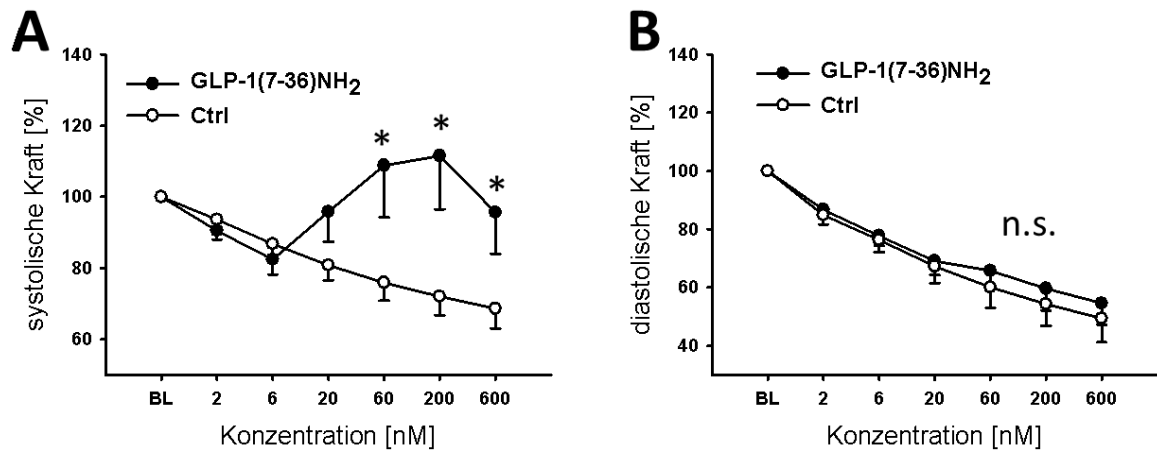


Abb. 13: Effekt von GLP-1(7-36)NH₂ auf humanes atriales Myokard, 37 °C; 1 Hz.

A: Dosiswirkungskurve: Auswirkung von GLP-1(7-36)NH₂ (schwarze Punkte, n=10) auf die systolische Kraft ([%] ± SEM). Mit steigenden Konzentrationen (60, 200, 600 nM) kommt es zu einem signifikanten Kraftanstieg gegenüber der Kontrollgruppe (weiße Punkte, n=10). *: P<0,01

B: Dosiswirkungskurve: Auswirkung von GLP-1(7-36)NH₂ (schwarze Punkte, n=10) auf die diastolische Kraft ([%] ± SEM). Es kommt zu keinen signifikanten Änderung gegenüber der Kontrollgruppe (weiße Punkte, n=10). n.s.: nicht signifikant.

3.6 Atrium – Exendin-3(9-39)NH₂ + Exendin-4

Um zu untersuchen ob die Wirkung von Exendin-4 GLP-1-R abhängig ist, wurde in der nächsten Versuchsserie zusätzlich Exendin-3(9-39)NH₂ eingesetzt. Exendin-3(9-39)NH₂ ist ein Antagonist am GLP-1-R (24). Bei den am humanen atrialen Myokard durchgeführten Experimenten wurde zunächst 70 nM Exendin-3(9-39)NH₂ zugesetzt und erst nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten wurden die konzentrationsabhängigen inotropen Effekte von Exendin-4 (Konzentrationsbereich von 2 nM bis 200 nM) untersucht (Abb. 14A). Der Punkt vor der Zugabe von Exendin-4 stellt die Baseline der Experimente (100%) dar.

Exendin-4 alleine führte, wie oben gezeigt, zu einer dosisabhängigen Steigerung der systolischen Kraft (bei 6 nM $182,4\% \pm 34,6\%$). In Anwesenheit von 70 nM Exendin-3(9-39)NH₂ hatte Exendin-4 bei derselben Konzentration keinen positiv inotropen Effekt (bei 6 nM $96,9\% \pm 4,2\%$ gemessen zur Baseline). Der Kraftverlust konnte durch Rundown-Effekte erklärt werden. Erst sehr hohe Konzentrationen von Exendin-4 führten zu einer Steigerung der systolischen Kraft (bei 60 nM $116,0\% \pm 8,7\%$ gemessen zur Baseline). Somit konnte Exendin-3(9-39)NH₂ sehr wirkungsvoll den Effekt von Exendin-4 blockieren und es kam zu einer starken Rechtsverschiebung des Effekts von Exendin-4. Abb 14B zeigt, dass Exendin-3(9-39)NH₂ alleine zu keiner Änderung der systolischen Kraft im Vergleich zur Rundown-Kontrollgruppe führte. Nach Zugabe von 70 nM Exendin-3(9-39)NH₂ fiel die systolische Kraft nach 30 Minuten auf $87,3\% \pm 5,8\%$ gemessen zur Baseline ab. Die Kontrollgruppe hatte zu diesem Zeitpunkt eine systolische Kraft von $86,8\% \pm 3,4\%$.

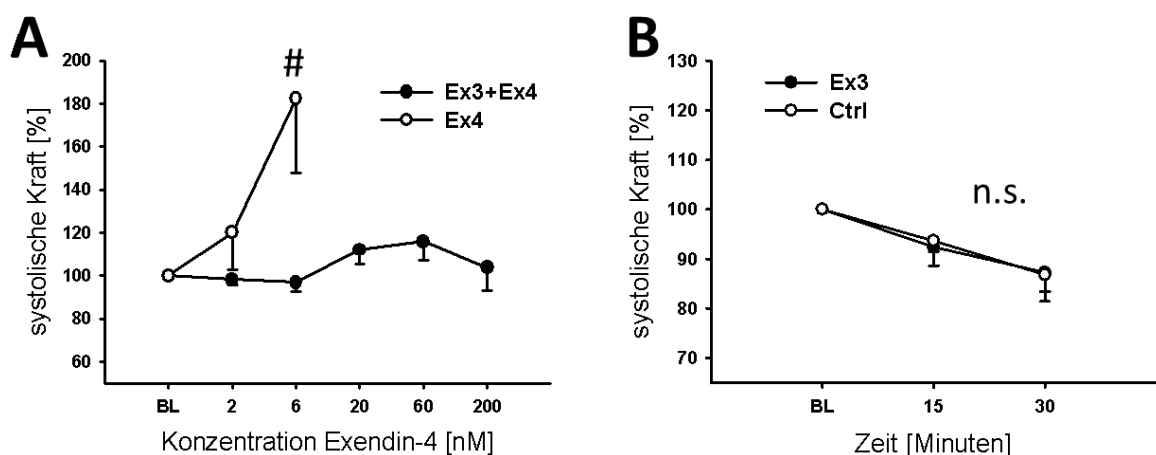


Abb. 14: Effekte von Exendin-3(9-39)NH₂ + Exendin-4 auf humanes atriales Myokard, 37 °C; 1 Hz.

A: Dosiswirkungskurve: Auswirkung von Exendin-4 alleine (weiße Punkte, n=10) auf die systolische Kraft ([%] ± SEM). Es kommt bei einer Konzentration von 6 nM zu einem signifikanten Kraftanstieg gegenüber mit 70 nM Exendin-3 präinkubierten Muskelstreifen (schwarze Punkte, n=9). Bei diesen tritt der positiv inotrope Effekt von Exendin-4 erst bei sehr hohen Konzentrationen auf (20, 60, 200 nM). #: $P < 0,05$ im Vergleich zu Ex3+Ex4

B: Single shot: Auswirkung von Exendin-3 (schwarze Punkte, n=9) auf die systolische Kraft ([%] ± SEM). Es kommt zu keiner signifikanten Änderung gegenüber der Kontrollgruppe (weiße Punkte, n=10). n.s.: nicht signifikant.

3.7 Atrium – Glucagon-like peptide 1 (GLP-1(9-36)NH₂)

GLP-1(9-36)NH₂ ist ein Abbauprodukt des GLP-1(7-36)NH₂ und wirkt als funktioneller Antagonist am GLP-1-R. Die Abb. 14 zeigt die Effekte von GLP-1(9-36)NH₂ auf humanes atriales Myokard. Aus den gemessenen Daten wurde eine Dosiswirkungskurve (Konzentrationsbereich von 0,6 nM bis 200 nM) erstellt. Die Rundown-Experimente wurden als Kontrollgruppe (Ctrl) herangezogen. Mit steigenden Konzentrationen von GLP-1(9-36)NH₂ kam es zu keinem signifikanten systolischen Kraftanstieg (Abb. 15A, bei 200 nM bzw. nach 90 Minuten 69,8% ± 10,0% gemessen zur Baseline) gegenüber der Kontrollgruppe (nach 90 Minuten 68,6% ± 5,6% gemessen zur Baseline), wie es bei GLP-1(7-36)NH₂ und Exendin-4 der Fall war. Der Kraftverlust während des Experiments konnte durch Rundown-Effekte erklärt werden, in ihrem Verlauf ähnelten sich die Dosiswirkungskurven von GLP-1(9-36)NH₂ und der Kontrollgruppe stark. Die diastolische Kraft (Abb. 15B) wurde durch GLP-1(9-36)NH₂ ebenfalls nicht beeinflusst, diese fiel mit steigenden Konzentrationen analog der Kontrollgruppe im zeitlichen Verlauf ab und es konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (bei 200nM 36,0% ± 10,5% bzw. 49,4% ± 8,1% gemessen zur Baseline).

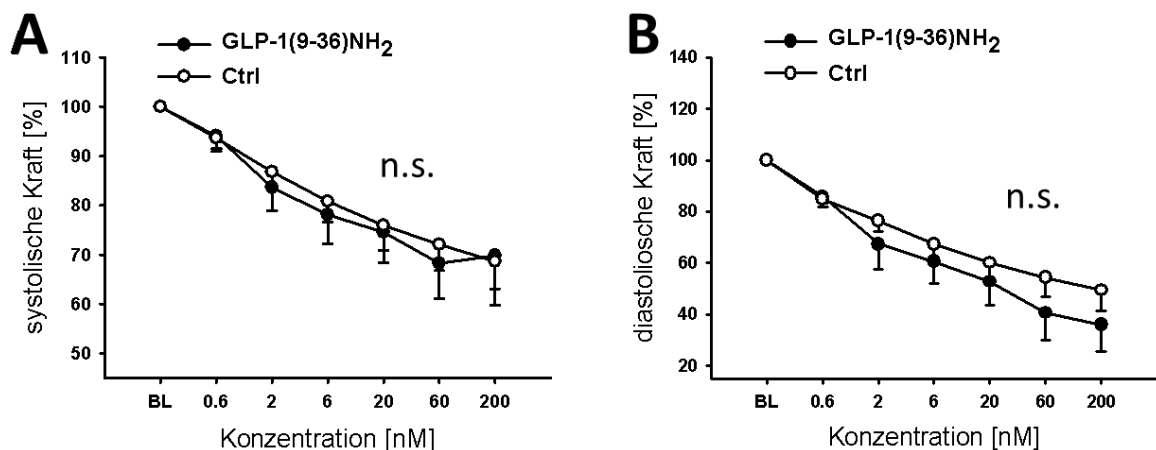


Abb. 15: Effekt von GLP-1(9-36)NH₂ auf humanes atriales Myokard, 37 °C; 1 Hz.

A: Dosiswirkungskurve: Auswirkung von GLP-1(9-36)NH₂ (schwarze Punkte, n=7) auf die systolische Kraft ([%] ± SEM). Es kommt zu keiner signifikanten Änderung gegenüber der Kontrollgruppe (weiße Punkte, n=10). n.s.: nicht signifikant.

B: Dosiswirkungskurve: Auswirkung von GLP-1(9-36)NH₂ (schwarze Punkte, n=7) auf die diastolische Kraft ([%] ± SEM). Es kommt zu keiner signifikanten Änderung gegenüber der Kontrollgruppe (weiße Punkte, n=10). n.s.: nicht signifikant.

3.8 Atrium – PF-06446009

In weiteren Versuchsserien wurden zwei experimentelle Substanzen am humanen atrialen Myokard getestet. PF-06446009 wirkt als starker Agonist am GLP-1-R und wurde hinsichtlich der inotropen Wirkung untersucht. Aus den gewonnenen Daten wurde erneut eine Dosiswirkungskurve (Abb. 16, Konzentrationsbereich von 0,6 nM bis 200 nM) erstellt, verglichen wurden die kinetischen Parameter mit den Rundown-Experimenten (Ctrl).

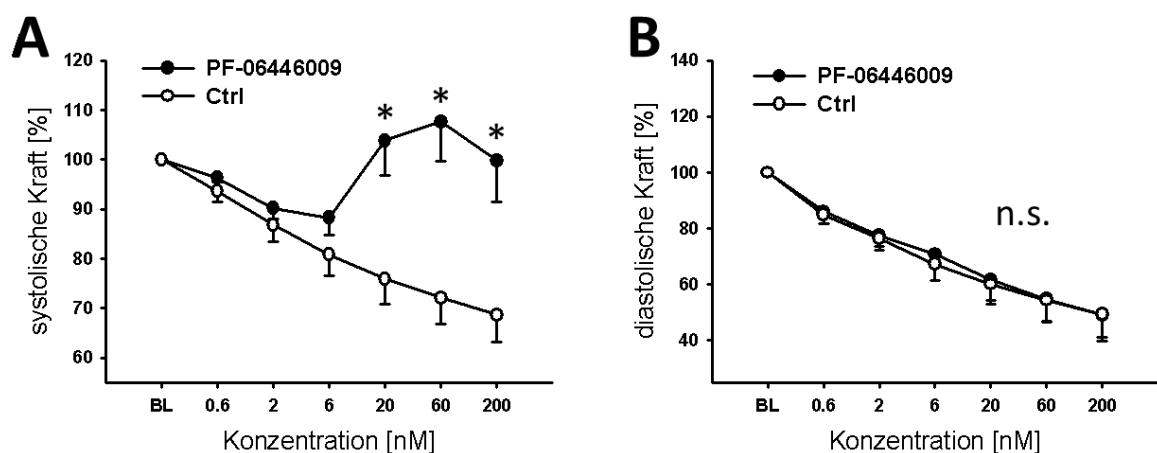


Abb. 16: Effekt von PF-06446009 auf humanes atriales Myokard, 37 °C; 1 Hz.

A: Auswirkung von PF-06446009 (schwarze Punkte, n=10) auf die systolische Kraft ([%] ± SEM). Mit steigenden Konzentrationen (20, 60, 200 nM) kommt es zu einem signifikanten Kraftanstieg gegenüber der Kontrollgruppe (weiße Punkte, n=10). *: P<0,01

B: Auswirkung von PF-06446009 (schwarze Punkte, n=10) auf die diastolische Kraft ([%] ± SEM). Es kommt zu keiner signifikanten Änderung gegenüber der Kontrollgruppe (weiße Punkte, n=10). n.s.: nicht signifikant.

Zunächst kam es auch hier nach Zugabe von PF-06446009 zu einem Abfall der systolischen Kraft (Abb. 16A, bei 6 nM bzw. nach 45 Minuten 88,3% ± 3,5% gemessen zur Baseline). Dieser Kraftverlust konnte auf Rundown-Effekte zurückgeführt werden, da die Kontrollgruppe zu diesem Zeitpunkt eine systolische Kraft von 80,8% ± 4,2% gemessen zur Baseline hatte. Mit steigenden Konzentrationen kam es auch zu einem Anstieg der systolischen Kraft, ein

maximaler Effekt konnte bei 60 nM ($107,6\% \pm 8,0\%$ gemessen zur Baseline) ermittelt werden. Zu diesem Zeitpunkt wies die Kontrollgruppe eine systolische Kraft von $72,1\% \pm 5,3\%$ gemessen zur Baseline auf, dies stellt einen signifikanten Unterschied dar. Die diastolische Kraft (Abb. 16B) wurde durch PF-06446009 nicht beeinflusst. Diese sank analog der Kontrollgruppe im zeitlichen Verlauf und mit steigenden Konzentrationen von PF-06446009 kontinuierlich ab (bei PF-06446009 200 nM $49,2\% \pm 9,2\%$ bzw. bei Ctrl nach 90 Minuten $49,4\% \pm 8,1\%$ gemessen zur Baseline).

3.9 Atrium – PF-06446667

Zum Unterschied der anderen getesteten GLP-1-R Agonisten ist PF-06446667 nur ein partieller Agonist des beta-Arrestin, welches einen G-Protein unabhängigen Signalweg der GPCR darstellt. Untersucht wurden die dosisabhängigen Effekte von PF-06446667 auf humanes atriales Myokard. Die erstellte Dosiswirkungskurve hat einen Konzentrationsbereich von 2 nM bis 6 μ M.

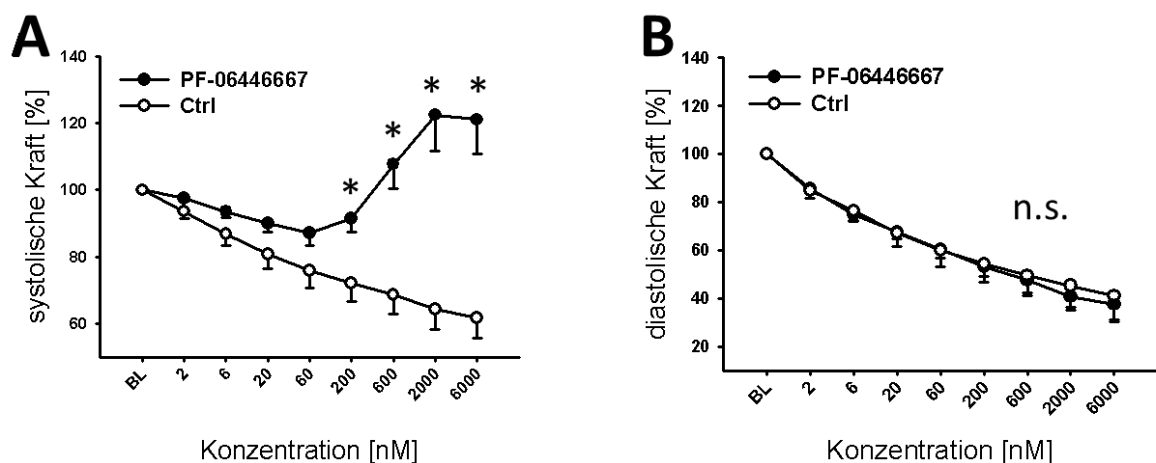


Abb. 17: Effekt von PF-06446667 auf humanes atriales Myokard. 37 °C; 1 Hz.

A: Dosiswirkungskurve: Auswirkung von PF-06446667 (schwarze Punkte, $n=10$) auf die systolische Kraft ($[\%] \pm SEM$). Mit steigenden Konzentrationen (200, 600, 2000, 6000 nM) kommt es zu einem signifikanten Kraftanstieg gegenüber der Kontrollgruppe (weiße Punkte, $n=10$). *: $P < 0,01$

B: Dosiswirkungskurve: Auswirkung von PF-06446667 (schwarze Punkte, $n=10$) auf die diastolische Kraft ($[\%] \pm SEM$). Es kommt zu keiner signifikanten Änderung gegenüber der Kontrollgruppe (weiße Punkte, $n=10$). n.s.: nicht signifikant.

Bei niedrigen Konzentrationen kam es zu einem Abfall der systolischen Kraft (Abb. 17A) bis $87,1\% \pm 3,6\%$ (bei 60 nM bzw. nach 60 Minuten) gemessen zur Baseline. Die Kontrollgruppe hatte zu diesem Zeitpunkt eine systolische Kraft von $76,0\% \pm 5,1\%$. Die weitere Erhöhung der Konzentration von PF-06446667 führte zu einem stark positiv inotropen Effekt, es konnte eine Maximalkraft von $122,4\% \pm 10,8\%$ gemessen zur Baseline bei der Konzentration von $2\mu\text{M}$ (bzw. nach 105 Minuten) bestimmt werden. Hier hatte die Kontrollgruppe eine systolische Kraft von $61,8\% \pm 6,1\%$. Wie in Abb. 17B ersichtlich beeinflusst PF-06446667 die diastolische Kraft nicht, diese fällt nahezu analog der Kontrollgruppe auf $37,38\% \pm 7,1\%$ (bei $6\mu\text{M}$ bzw. Nach 120 Minuten) gemessen zur Baseline ab. Die Kontrollgruppe hatte nach zwei Stunden eine diastolische Kraft von $41,1\% \pm 9,8\%$.

3.10 Atrium – Single shot Experimente

Um Unterschiede hinsichtlich der Stärke der inotropen Wirkung festzustellen wurden Single shot Experimente mit den Substanzen Exendin-4, PF-06446009 und PF-06446667 durchgeführt. Die eingesetzten Konzentrationen wurden anhand der in den Dosiswirkungskurven ermittelten maximalen Effekte gewählt. So kann gezeigt werden inwiefern der Effekt von G-Proteinen und beta-Arrestin abhängig ist. Nachdem der maximale Effekt nach bereits 15 Minuten erreicht wurde, konnten die bis dahin stattgefundenen Rundown-Effekte vernachlässigt werden. Den stärksten positiv inotropen Effekt (Abb. 18A) hatte PF-06446009 (60 nM, nach 15 Minuten: $192,7\% \pm 25,6\%$ gemessen zur Baseline). Es konnte jedoch kein signifikanter Unterschied zu den beiden anderen getesteten Substanzen festgestellt werden. Exendin-4 hatte nach 15 Minuten bei einer Konzentration von 6 nM eine systolische Kraft von $150,9\% \pm 16,6\%$. Bei Zugabe von $2\mu\text{M}$ PF-06446667 stieg die systolische Kraft nach 15 Minuten auf $146,6\% \pm 20,7\%$. Im zeitlichen Verlauf nahm die Kraft bei jedem GLP-1-R Agonisten ab, hier schlagen sich die Auswirkungen von Rundown-Effekten und Effektverlust der zugesetzten Substanzen nieder. Den niedrigsten Kraftverlust hatte PF-06446667, die Unterschiede zwischen den einzelnen Substraten sind nach 60 Minuten jedoch nicht signifikant. Die diastolische Kraft (Abb. 18B) änderte

sich nach Zugabe einer einzelnen maximal wirksamen Dosis im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht, diese nahm bei allen zugesetzten GLP-1-R Agonisten kontinuierlich ab. Auch die Relaxationszeiten (Abb. 18C) änderten sich im zeitlichen Verlauf nicht. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass sich die einzelnen GLP-1-R Agonisten hinsichtlich inotroper Effekte sehr ähneln.

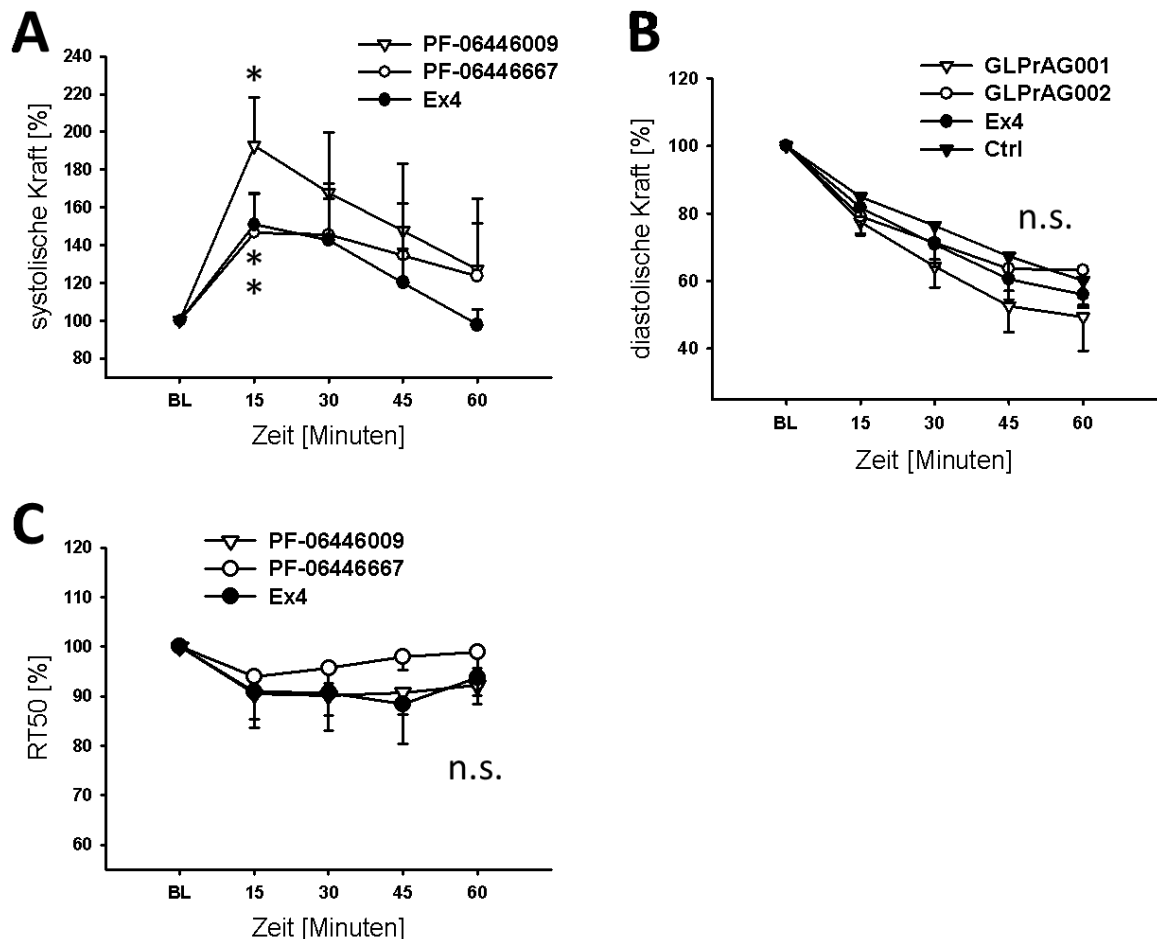


Abb. 18: Effekte der GLP-1-R Agonisten auf humanes atriales Myokard. 37 °C; 1 Hz.

A: Single shot: Bei den in den Dosiswirkungskurven ermittelten maximal wirksamen Konzentration von PF-06446009 (weiße Dreiecke, n=8), PF-06446667 (weiße Kreise, n=7) und Exendin-4 (schwarze Kreise, n=8) kommt es 15 Minuten nach Substanzzugabe zu einem signifikanten Kraftanstieg der Systole ([%] ± SEM) gegenüber der Baseline. *: P<0,01

B: Single shot: Keiner der zugefügten GLP-1-R Agonisten hat einen Effekt auf die diastolische Kraft ([%] ± SEM) im Vergleich zur Kontrollgruppe. n.s.: nicht signifikant.

C: Single shot: Keiner der zugefügten GLP-1-R Agonisten hat einen signifikanten Effekt auf die Relaxationszeit ([%] ± SEM) gemessen zur Baseline. n.s.: nicht signifikant.

3.11 Atrium – Inhibitoren

Die bisherigen Resultate zeigen, dass Inkretine die systolische Kraft von humanem atrialen Myokard erhöhen, ohne dabei die diastolische Kraft und die Relaxationszeit zu beeinflussen. Um den zugrunde liegenden Mechanismus für diesen positiv inotropen Effekt ausfindig zu machen wurden Experimente durchgeführt, in denen der Effekt von Exendin-4 mittels einiger Inhibitoren versucht wurde zu blockieren. Bei den Inhibitoren handelt es sich um Ryanodin, Thapsigargin und H-89.

Es wurden atriale Muskelstreifen zunächst mit den jeweiligen Inhibitoren (1 μ M Ryanodin, 10 μ M Thapsigargin, 5 μ M H-89) für 30 Minuten inkubiert und die systolische Kraft gemessen (Abb. 19A). Ein Kontrollstreifen (Ctrl) wird keiner Intervention unterzogen. Danach wird jeweils 2 nM Exendin-4 hinzugefügt und ein weiteres Mal die systolische Kraft bestimmt (Abb. 19B).

Die Effekte der einzelnen Inhibitoren auf die Muskelstreifen waren unterschiedlich: Ryanodin (RYA) wirkte stark negativ inotrop, nach 30 Minuten sank die systolische Kraft auf $36,2\% \pm 5,0\%$ gemessen zur Baseline ab, was einen signifikanten Unterschied zur Baseline darstellt. Thapsigargin (TG) und H-89 hatten jeweils leicht negativ inotrope Effekte, die sich kaum zum gemessenen Rundown (Ctrl) unterschieden (Abb. 19A; TG: $69,2\% \pm 6,7\%$, H-89: $66,6\% \pm 6,1\%$, Ctrl: $86,8\% \pm 3,4\%$ nach 30 Minuten gemessen jeweils zur Baseline).

In Abb. 19B ist der Effekt von Exendin-4 auf die mit den Inhibitoren präinkubierten Muskelstreifen dargestellt. 2 nM Exendin-4 alleine führt zu einem leicht positiv inotropen Effekt (Kontrollgruppe), die systolische Kraft stieg auf $124,1\% \pm 12,7\%$ gemessen zur Baseline (100%) an. Mit Ryanodin präinkubierte Muskelstreifen zeigten ein nahezu identes Verhalten auf Zugabe von 2 nM Exendin-4: die systolische Kraft stieg auf $119,3\% \pm 8,8\%$ gemessen zur Baseline (100%) an. H-89 blockierte den Effekt von 2 nM Exendin-4 beinahe zur Gänze. Die gemessene systolische Kraft betrug am Ende der Experimente $103,3\% \pm 5,46\%$ gemessen zur Baseline (100%). Dies stellt keinen signifikanten Unterschied zur Baseline dar. Präinkubation von Thapsigargin bewirkte eine teilweise Blockierung der Wirkung von Exendin-4. Die systolische Kraft stieg von 100% (Baseline) auf

107,0% ± 9,1%. Dies stellt ebenfalls keinen signifikanten Unterschied zur Baseline dar.

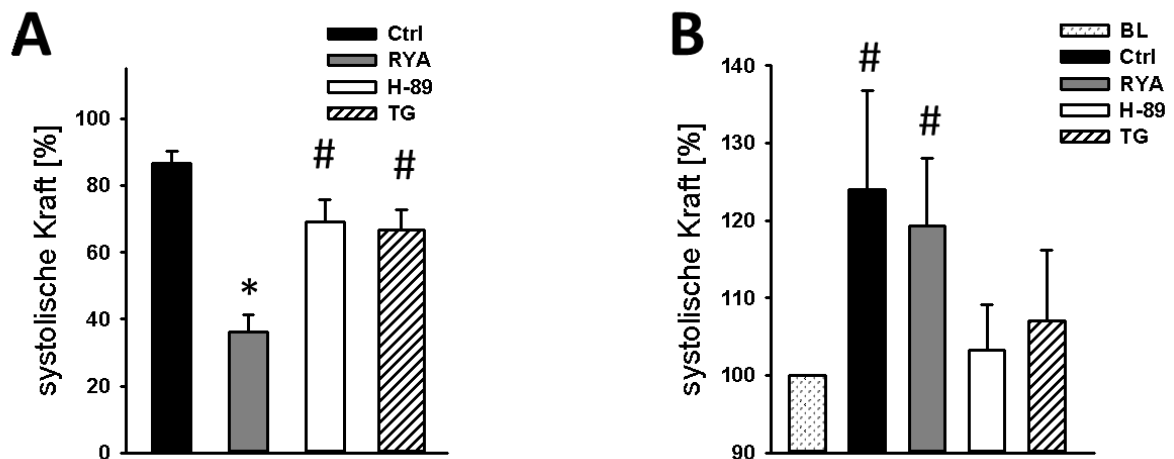


Abb. 19: Effekte der Inhibitoren Ryanodin, Thapsigargin und H-89 auf humanes atriales Myokard. 37 °C; 1 Hz.

A: Single shot: 1 μ M Ryanodin (grauer Balken, n=9) führt zu einem stark negativ inotropen Effekt; 5 μ M H-89 (weißer Balken, n=8) und 10 μ M Thapsigargin (schwarz/weißerer Balken, n=10) führen zu einem leicht negativ inotropen Effekt im Vergleich zur Kontrollgruppe (schwarzer Balken, n=10). #: $P < 0,05$ gemessen gegen Ctrl. *: $P < 0,01$ im Vergleich zu Ctrl.

B: Single shot: zu jedem, mit Inhibitoren präinkubierten Muskelstreifen wurde 2nM Exendin hinzugefügt. Ryanodin (grauer Balken, n=9) zeigt wie Exendin-4 (schwarzer Balken, n=8) einen positiv inotropen Effekt gemessen zur Baseline (schwarz gepunkteter Balken). Bei Thapsigargin (schwarz/weißer Balken, n=10) und H-89 (weißer Balken, n=8) ist dieser Effekt weniger stark ausgeprägt. #: $P < 0,05$ im Vergleich zur Baseline.

3.12 Atrium – Sitagliptin + GLP-1(7-36)NH₂

In einer weiteren Experimentenserie wurde die Wirkung des DPP4-Inhibitors Sitagliptin auf GLP-1(7-36)NH₂ untersucht. Die Muskelstreifen wurden zunächst für 30 Minuten mit 300 nM Sitagliptin inkubiert. Dabei zeigte sich kein Effekt auf die systolische Kraft im Vergleich mit der Kontrollgruppe ohne Intervention

(Abb. 20D). Danach wurde 60nM GLP-1(7-36)NH₂ als Einzeldosis hinzugefügt. Es kam bei beiden Gruppen, also bei An- wie Abwesenheit von Sitagliptin, zu einem stark positiv inotropen Effekt (Abb. 20A,B).

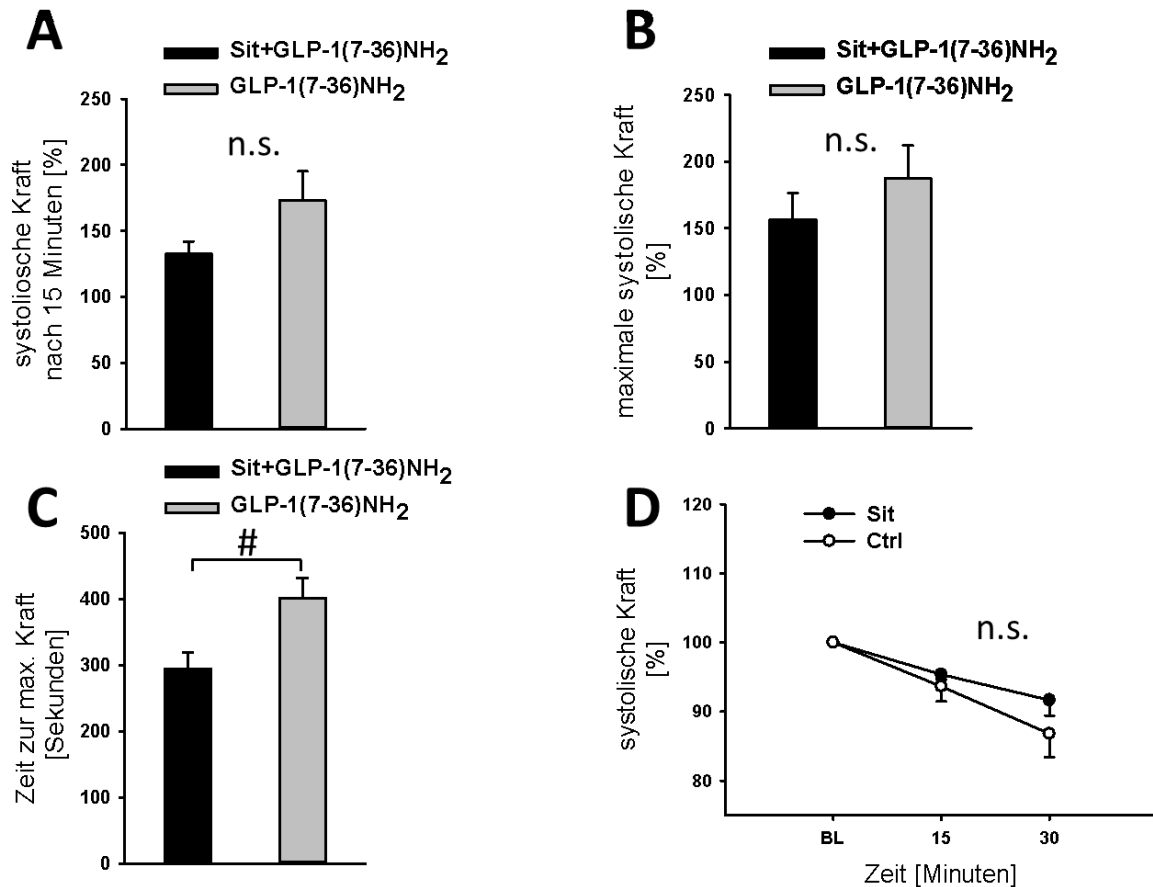


Abb. 20: Effekte von Sitagliptin und GLP-1(7-36)NH₂ auf humanes atriales Myokard. 37 °C; 1 Hz.

A: Systolische Kraft ([%] ± SEM) nach 15 Minuten: sowohl in der mit Sitagliptin präinkubierten Gruppe (schwarzer Balken, n=10) als auch in der Kontrollgruppe (grauer Balken, n=7) zeigt sich ein stark positiv inotroper Effekt nach Zugabe von GLP-1(7-36)NH₂. n.s.: nicht signifikant.

B: Maximal erreichte systolische Kraft ([%] ± SEM): in der mit Sitagliptin präinkubierten Gruppe (schwarzer Balken, n=10) und in der Kontrollgruppe (grauer Balken, n=7) zeigt sich ein stark positiv inotroper Effekt nach Zugabe von GLP-1(7-36)NH₂. n.s.: nicht signifikant

C: Zeit bis zum Erreichen der maximalen Kraft ([Sekunden] ± SEM): die mit Sitagliptin präinkubierte Gruppe (schwarzer Balken, n=10) benötigt weniger Zeit als die Kontrollgruppe (grauer Balken, n=7) um nach der Zugabe von GLP-1(7-36)NH₂ die maximale systolische Kraft zu erreichen. #: P<0,05

D: Single shot: Auswirkung von Sitagliptin (schwarze Punkte, n=10) auf die systolische Kraft ([%] ± SEM). Es kommt zu keiner signifikanten Änderung gegenüber der Kontrollgruppe (weiße Punkte, n=10). n.s.: nicht signifikant.

Da der Effekt von GLP-1(7-36)NH₂ in beiden Gruppen transient erschien, wurde die erreichte systolische Maximalkraft (Abb 20B) und die systolische Kraft 15 Minuten nach Zugabe von GLP-1(7-36)NH₂ (Abb 20A) gemessen. Sitagliptin verstärkte nicht die positiv inotrope Wirkung von GLP-1(7-36)NH₂, es ließen sich keine signifikanten Unterschiede bei der erreichten maximalen (bei Sitagliptin und GLP-1(7-36)NH₂ 156,7% ± 19,6%, bei GLP 7-36 187,4% ± 24,6% gemessen zur Baseline 100%) und der nach 15 Minuten gemessenen systolischen Kraft (bei Sitagliptin und GLP-1(7-36)NH₂ 132,4% ± 9,5%, bei GLP 7-36 173,2% ± 21,9% gemessen zur Baseline 100%) ermitteln. Ein weiterer Aspekt dieser Experimentenserie lag in dem Verlauf des Kraftanstiegs nach Zugabe von GLP-1(7-36)NH₂. In Anwesenheit von Sitagliptin kam es zu einem signifikant schnelleren Erreichen der maximalen systolischen Kraft (Abb. 20C: bei Sitagliptin und GLP-1(7-36)NH₂ nach 294,0 ± 25,0 Sekunden, bei GLP-1(7-36)NH₂ nach 401,1 ± 31,4 Sekunden).

3.13 Ventrikel – Exendin-4

Exendin-4 hat einen stark positiv inotropen Effekt auf humanes atriales Gewebe. In einer weiteren Versuchsserie wurden die dosisabhängigen Effekte von Exendin-4 auf humanes ventrikuläres Myokard untersucht und aus den gewonnenen Daten eine Dosiswirkungskurve erstellt (Konzentrationsbereich von 0,06 nM bis 6 nM; in einzelnen Versuchen bis 200 nM). Es wurde Gewebe aus dem rechten und linken Ventrikel benutzt. Exendin-4 hatte hier jedoch keine inotropen Effekte (Abb. 20), stattdessen sank die systolische Kraft (Abb. 21A) kontinuierlich ab (bei 6 nM 73,6% ± 7,6% gemessen zur Baseline). Dieser Kraftverlust trat auch in der Kontrollgruppe auf (nach 90 Minuten 64,4% ± 2,3% gemessen zur Baseline) und konnte somit durch Rundown-Effekte erklärt werden.

In Abb. 21B wird noch einmal die Wirkung von Exendin-4 auf humanes atriales und ventrikuläres Myokard gezeigt und verglichen. Während beim atrialen Gewebe ein dosisabhängiger stark positiv inotroper Effekt nach Zugabe Exendin-4 auftritt, kommt es beim ventrikulären Gewebe zu keinem solchen Effekt.

In einem einzelnen Experiment konnte ein positiv inotroper Effekt von Exendin-4 auf humanes ventrikuläres Gewebe nachgewiesen werden. In Abbildung 22 ist dieser Effekt (Originalregistrierung) abgebildet. In einer weiteren Versuchsserie (Daten nicht gezeigt) konnte in einem weiteren Herzen ein positiv inotroper Effekt (von GLP-1(7-36)NH₂) auf humanes ventrikuläres Myokard erzielt werden.

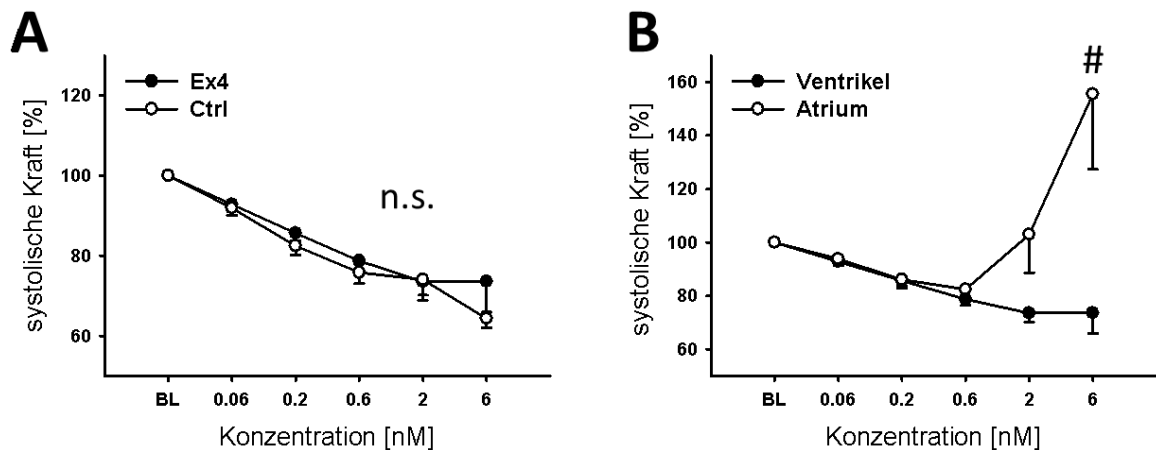


Abb. 21: Effekt von Exendin-4 auf humanes ventrikuläres Myokard, 37 °C; 1Hz.

A: Dosiswirkungskurve: Auswirkung von Exendin-4 (schwarze Punkte, n=14) auf die systolische Kraft ([%] ± SEM). Es kommt zu keiner signifikanten Änderung gegenüber der Kontrollgruppe (weiße Punkte, n=12). n.s.: nicht signifikant.

B: Dosiswirkungskurve: Vergleich des Effekts von Exendin-4 zwischen ventrikulärem Gewebe (schwarze Punkte, n=14) und atrialem Gewebe (weiße Punkte, n=10). Nur beim atrialen Gewebe kommt es zu einem signifikanten Kraftanstieg. #: P<0,05

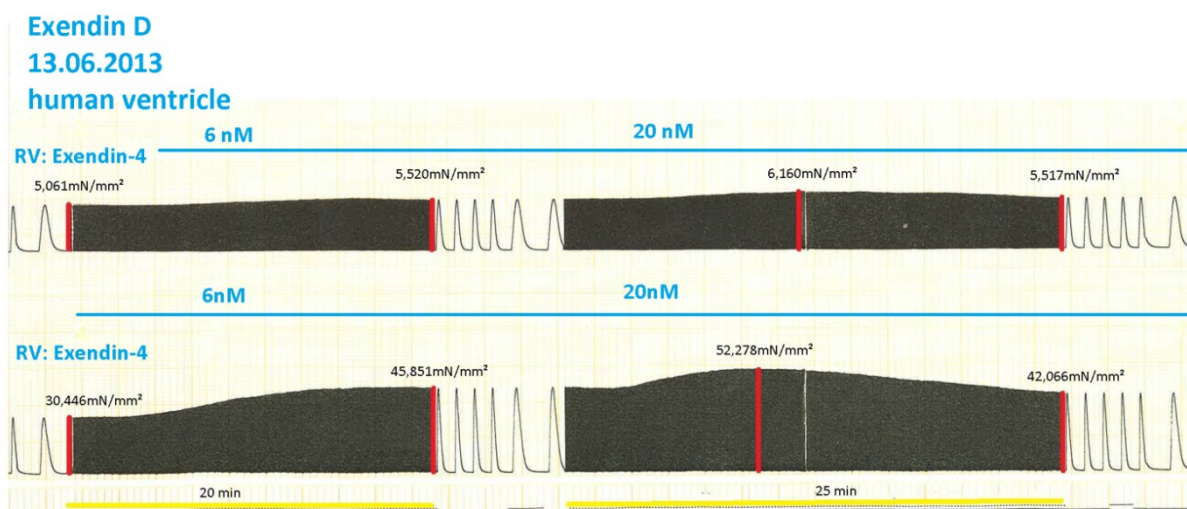


Abb. 22: Originalregistrierung des Versuchs Exendin D vom 13.6.2013 (rechter humaner Ventrikel), 37° C, 1 Hz. Dosisabhängiger positiv inotroper Effekt. Schwarzer Balken: Papiervorschub 5 mm pro Minute, Einzelzacken: Papiervorschub 5 mm pro Sekunde.

4 Diskussion

In dieser Arbeit wurden erstmalig die Effekte von Inkretinen, sowohl GLP-1-R Agonisten als auch Antagonisten, an multizellulärem humanem Herzgewebe beschrieben. Es wurde demonstriert, dass (1) die eingesetzten Substanzen eine dosisabhängige positiv inotrope Wirkung am Vorhof ausüben. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass (2) dieser Effekt über den cAMP-PKA Signaltransduktionsweg vermittelt wird. Weiters wurde beobachtet, dass auch SERCA an diesem Effekt beteiligt ist. Außerdem wurde festgestellt, dass die inotropen Effekte (3) ausschließlich in atrialem, nicht jedoch in ventrikulärem Gewebe auftraten und zusätzlich, dass (4) der Effekt von GLP-1(7-36)NH₂ durch den DPP4-Inhibitor Sitagliptin zwar beschleunigt, jedoch in der inotropen Wirkung nicht erhöht werden konnte.

4.1 Inkretinwirkung auf die Herzfunktion

Die vielfältigen Wirkungen der Inkretine auf das kardiovaskuläre System werden durch den GLP-1-R vermittelt. Generell werden Inkretine mit positiven Wechselwirkungen auf dieses Organsystem assoziiert. In klinischen Studien wurden bereits antihypertensive Wirkungen nach Verabreichung von Inkretinen festgestellt, außerdem verlangsamten diese Medikamente effektiv die Entstehung von Arteriosklerose⁸¹. Bei Untersuchungen der Effekte von Inkretinen auf die Kontraktilität von kardialen Myozyten konnten bisher jedoch sehr kontroverse Ergebnisse beobachtet werden⁸². In in-vivo Modellen von Ratten kam es nach einer Behandlung mit Inkretinen zu einer Zunahme des Blutdrucks und der Herzfrequenz^{42,83}. Eine verstärkte Kontraktion des Herzens könnte dafür verantwortlich sein. Bei weiteren in in-vitro Modellen, wiederum von Ratten, wurde zwar eine Erhöhung des zellulären cAMP, jedoch eine Abnahme der Kontraktilität der Kardiomyozyten festgestellt⁴¹.

Interessanterweise wurden all diese Experimente letztendlich mit ventrikulärem Gewebe durchgeführt. Neue Erkenntnisse legen nahe, dass der GLP-1-R zwar in atrialen, nicht jedoch in ventrikulären Myozyten exprimiert wird⁸⁴. Die

beschriebenen kraftsteigernden bzw. kraftsenkenden Effekte könnten daher auch über andere, GLP-1-R unabhängige, pharmakologische Signale vermittelt werden. Dass der GLP-1-R für spezifische Wirkungen von Inkretinen nicht benötigt wird, konnte auch kürzlich gezeigt werden. Eine Forschungsgruppe stellte fest, dass es bei Mäusen trotz Ausschaltung der kardialen GLP-1-R (GLP-1-Rezeptor-knockout) zu den typischen kardioprotektiven Effekten in der Behandlung mit Inkretinen kommt⁸⁵.

In dieser Arbeit konnte ein klarer positiv inotroper Effekt von GLP-1-R Agonisten an humanem atrialem Gewebe dargestellt werden. In der Stärke dieses Effekts unterscheiden sich die einzelnen getesteten Substanzen (GLP-1(7-36)NH₂, Exendin-4, PF-06446009, PF-06446667) kaum voneinander. PF-06446009 hatte tendenziell die stärkste Wirkung, es konnte jedoch kein signifikanter Unterschied zu Exendin-4 und PF-06446667 beobachtet werden. Es konnte bei dem Abbauprodukt von GLP-1(7-36)NH₂, dem GLP-1-R Antagonisten GLP-1(9-36)NH₂ keine kraftsteigernde Wirkung beobachtet werden. Dennoch hat dieses Protein eine wichtige biologische Funktion. In einem Vergleich zwischen GLP-1(7-36)NH₂ und GLP-1(9-36)NH₂ erzielten beide Proteine eine nahezu idente Steigerung der Auswurfleistung bei Hunden mit schrittmacherinduzierter Kardiomyopathie⁸⁶. Der Effekt von GLP-1(9-36)NH₂ könnte aber durch einen anderen Signalweg vermittelt werden, da es für seine Wirkung den GLP-Rezeptor nicht benötigt. Exendin-3(9-39)NH₂ kann diese GLP-1-R unabhängigen Effekte jedoch blockieren⁸⁷. Diese Daten legen nahe, dass es möglicherweise einen weiteren, bisher noch unidentifizierten, GLP-Rezeptor gibt, der im Gegensatz zu dem klassischen GLP-1-R keine inotropen Effekte vermittelt.

Übereinstimmend mit der Entdeckung, dass der GLP-1-R nicht in ventrikulärem Gewebe exprimiert wird, konnte in dieser Arbeit auch keine positiv inotrope Wirkung an non-failing Herzen gezeigt werden. Bei zwei einzelnen Experimenten, eines wie oben beschrieben durchgeführt mit Exendin-4, das andere mit GLP-1(7-36)NH₂ als Substrat (Daten nicht gezeigt), konnte jedoch ein dosisabhängiger positiv inotroper Effekt gezeigt werden. Die Ursache hierfür ist nicht klar, möglicherweise kam es wegen einer speziellen individuellen Situation zu einer Expression des GLP-1-R im ventrikulären Gewebe. Weitere

molekularbiologische Untersuchungen dieses Gewebes könnten eine Erklärung liefern.

Insgesamt ist es schwierig abzuschätzen in wie weit die beobachteten in-vitro Daten für die in-vivo Situation relevant sind, da sich die positiv inotrope Wirkung in den vorliegenden Experimenten auf den Vorhof beschränkt und dieser im Gegensatz zu den Herzkammern eine nur untergeordnete Rolle in der gesamten Herzleistung spielt. Dennoch wurde festgestellt, dass bei einem Ausfall des linken Vorhofs die Auswurfleistung der linken Herzkammer um 15-20% sinkt⁸⁸.

4.2 Signaltransduktion der Inkretine

Die Ergebnisse dieser Arbeit demonstrieren, dass die positiv inotrope Wirkung der eingesetzten Inkretine GLP-1-R abhängig ist, da Exendin-3(9-39)NH₂ den Effekt von Exendin-4 7-39 blockierte. Neben Exendin-3(9-39)NH₂ konnte auch der PKA-Inhibitor H-89 diese inotropen Effekte verhindern, der SERCA-Inhibitor Thapsigargin hingegen schwächte die beobachteten Effekte von Exendin-4 ab, während Ryanodin gar keinen Einfluss auf diese hatte.

4.2.1 cAMP/PKA

Diese Daten zeigen, dass die Signaltransduktion über einen cAMP-PKA abhängigen Mechanismus erfolgt. Der GLP-1-R in den Beta-Zellen der Bauchspeicheldrüse von Ratten führt so zu einer erhöhten Insulinfreisetzung^{52,89}. Über die Signalwege der kardialen GLP-1-R ist jedoch weniger bekannt. Inkretine führen hier zu einer Erhöhung der intrazellulären cAMP Konzentration^{40,41}. Ähnliche Effekte bewirken DPP4-Inhibitoren, diese sind in der Lage über einen PKA-abhängigen Mechanismus die Größe von Infarktarealen bei artifiziell induzierten Koronararterienverschlüssen in Ratten signifikant zu verringern⁹⁰.

4.2.2 SERCA

Kontrovers sind die Ergebnisse des SERCA-Inhibitors Thapsigargin zu betrachten. Zwar konnte eine Reduktion des Effekts von Exendin-4 erzielt werden, jedoch war

dieser nicht signifikant. Auch in anschließenden Experimenten, in denen versucht wurde die Expression der SERCA in den mit Exendin-4 behandelten Geweben mittels der Western-Blot Methode zu messen (Daten nicht gezeigt), zeigten keine signifikanten Unterschiede zu der Kontrollgruppe. Andere Forschungsgruppen hingegen fanden eine Beteiligung von SERCA als Effektor von Exendin-4 bei Mäusen, so konnte über SERCA eine Reduktion der Apoptoseraten kardialer Myozyten, die hyperglykämischen Bedingungen ausgesetzt wurden, erzielt werden⁹¹. Eine mögliche Ursache für diese unterschiedlichen Ergebnisse könnte darin liegen, dass sich die Konzentrationen von Exendin-4 deutlich unterscheiden (2 nM gegen 30 nM). Weitere Untersuchungen über den Zusammenhang zwischen Exendin-4 und SERCA sollten daher bei entsprechend höheren Konzentrationen durchgeführt werden, um so festzustellen, wie stark die Aktivierung von SERCA an den inotropen Effekten von Exendin-4 beteiligt ist. Daneben können speziesspezifische Unterschiede in der Wirkung von Exendin-4 eine Rolle spielen.

4.2.3 cAMP/Epac

Eine weitere intrazelluläre Signaltransduktion findet über das cAMP abhängige Protein Epac statt. So konnte bereits gezeigt werden, dass die ANP-Freisetzung in Ratten GLP-1-R und in weiterer Folge Epac abhängig ist⁴⁰. Übereinstimmend damit konnte auch in weiterführenden Untersuchungen eine signifikante Translokation von Epac mittels Immunofluoreszenzmikroskopie von mit Exendin-4 behandeltem, humanem atrialen Gewebe (Daten nicht gezeigt) dargestellt werden. Verschiedene Forschungsgruppen stellten bereits die Bedeutung von Epac in kardialen Myozyten fest. So wird die intrazelluläre Ca^{2+} Wirkung über dieses Protein beeinflusst, indem es zu einer Steigerung der Ca^{2+} -Sensitivität von Myofilamenten kommt⁹². Zusätzlich wird über eine Aktivierung der CamKII der RyR aktiviert und dadurch der Ausstrom von Ca^{2+} aus dem SR während eines Aktionspotentials erhöht, gleichzeitig jedoch die gesamten Ca^{2+} Ströme vermindert^{93,94}. Diese beiden Effekte von Epac könnten, neben den bekannten PKA-abhängigen positiv inotropen Wirkungen über erhöhte Aktivität von vgCaCh vom L-Typ⁶³, einen wesentlichen Einfluss auf die Kontraktionskraft der kardialen Myozyten ausüben.

4.2.4 Beta-Arrestin

Die in dieser Arbeit verwendeten Inkretine unterscheiden sich in ihrer Affinität zu beta-Arrestinen. Beta-Arrestine spielen eine Rolle in der sogenannten Desensibilisierung von GPCR indem sie an inaktive Formen dieser Rezeptoren binden und dadurch sterisch blockieren⁵⁸. Neue Erkenntnisse legen nahe, dass beta-Arrestine auch in der Elimination von Second Messengern beteiligt sind und auch ihre eigene Signaltransduktion-unabhängig von GPCR-besitzen^{59,60}. Ihnen werden kardioprotektive Effekte zugeschrieben, so kam es in Mäusen, die keine Arrestine bilden konnten, zu verstärkten Apoptoseraten von kardialen Myozyten und einer Dilatation des linken Ventrikels⁶¹.

Bei Exendin-4, PF-06446009 und GLP-1(7-36)NH₂ handelt es sich um Agonisten der beta-Arrestine, PF-06446667 hingegen ist nur ein partieller Agonist. Dennoch hatte PF-06446667, genauso wie die anderen eingesetzten Inkretine, einen dosisabhängigen positiv inotropen Effekt. Auch in den Single shot Experimenten konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Inkretinen ausfindig gemacht werden. Diese Daten deuten darauf hin, dass beta-Arrestine keine Rolle in der Signaltransduktion der Inotropie spielen. Alle GLP-1-R Agonisten zeigten-unabhängig davon ob als Einzeldosis oder in steigenden Konzentrationen getestet-transiente positiv inotrope Effekte (veranschaulicht in Kap. 3.10 Atrium - Single shot Experimente). Dies könnte in Zusammenhang mit deren Affinität zu beta-Arrestin stehen, da beta-Arrestine GPCR desensibilisieren und so inaktivieren. Weitere Experimente mit entsprechenden Inhibitoren könnten Erkenntnisse über diesen Zusammenhang liefern.

4.3 DPP 4 und Inkretine

Das physiologisch gebildete Inkretin GLP-1(7-36)NH₂ wird in-vivo durch DPP 4 abgebaut. In der Therapie von Typ-2-Diabetes wird dieser Umstand ausgenutzt, und durch die Hemmung dieses Enzyms die Halbwertszeit von GLP-1(7-36)NH₂ verlängert. Neben einer im Blut gelösten Form kommt DPP 4 in der Membran vieler Zelltypen vor, hauptsächlich in Endothel- und Epithelzellen, in geringeren Mengen jedoch auch im Herzgewebe²⁵. GLP-1(7-36)NH₂ könnte somit zu

GLP-1(9-36)NH₂ abgebaut und in seiner Wirkung beeinträchtigt werden, einerseits durch absoluten Verlust von GLP-1(7-36)NH₂, andererseits, da GLP-1(9-36)NH₂ als Antagonist am GLP-1-R wirkt. Dieser Prozess wird durch Sitagliptin, einem Inhibitor der DPP 4, blockiert. Sitagliptin selbst übt keine signifikanten inotropen Effekte aus (Abb. 20D). Das interessante Ergebnis im Vergleich des inotropen Effekts von GLP-1(7-36)NH₂ in An- und Abwesenheit von Sitagliptin ist, dass es keinen signifikanten Unterschied der beiden Gruppen gibt. Tendenziell war der positiv inotrope Effekt ohne Sitagliptin sogar stärker. Der Abbau von GLP-1(7-36)NH₂ durch DPP 4 scheint hierbei in-vitro eine nur untergeordnete Rolle zu spielen. Jedoch kam es in Anwesenheit von Sitagliptin zu einem signifikant schnelleren Erreichen des inotropen Effekts. Verantwortlich hierfür könnte sein, dass durch die Ausschaltung der membrangebundenen DPP 4 gewebnahe schneller höhere Konzentrationen von GLP-1(7-36)NH₂ erreicht werden und somit auch der inotrope Effekt schneller auftritt.

4.4 GLUT1

In weiterführenden Untersuchungen der mit Exendin-4 behandelten Proben wurde eine signifikant erhöhte Translokation des Glucosetransporters GLUT1 in die Zellmembran der Myozyten festgestellt (Daten nicht gezeigt). Dies könnte eine Bedeutung in der kardialen Kontraktion spielen, da durch vermehrte Aktivität von GLUT1 auch mehr Glucose ins Zellinnere befördert wird und dort metabolisiert wird. Dies bedeutet dass in weiterer Folge mehr ATP für Kontraktionen bereitgestellt wird. Der Einfluss von Inkretinen auf GLUT1 wird in der Literatur jedoch kontrovers diskutiert. Während einige Forschungsgruppen davon ausgehen, dass Exendin-4 und andere GLP-1-R Agonisten Einfluss auf GLUT1 nehmen^{81,95} existieren auch gegenläufige Ergebnisse⁹⁶. Es könnte sich daher um einen gewebespezifischen und möglicherweise auch speziesspezifischen Effekt handeln.

5 Literaturverzeichnis

1. World Health Organization. Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and its Complications. Report of a WHO Consultation. Part 1: Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Geneva: WHO Department of Noncommunicable Disease Surveillance*, 1-59 (1999).
2. Slynkova, K., Mannino, D.M., Martin, G.S., Morehead, R.S. & Doherty, D.E. The role of body mass index and diabetes in the development of acute organ failure and subsequent mortality in an observational cohort. *Critical care* **10**, R137 (2006).
3. Griebler, R., Geißler, W. & Winkler, P. Zivilisationskrankheit Diabetes: Ausprägungen - Lösungsansätze - Herausforderungen. Österreichischer Diabetesbericht 2013. *Wien: Bundesministerium für Gesundheit*. (2013).
4. Hui, H. & Perfetti, R. Pancreas duodenum homeobox-1 regulates pancreas development during embryogenesis and islet cell function in adulthood. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies* **146**, 129-141 (2002).
5. Adams, G., Champion, S., Figg, G. & Jervis, A. The Therapeutic Role of C-peptide in the Amelioration of Type 1 Diabetes Associated Microvascular Dysfunction of the Kidneys and Nerves. *Journal of Diabetes & Metabolism* **4**, 267 (2013).
6. Ohtsubo, K., Chen, M.Z., Olefsky, J.M. & Marth, J.D. Pathway to diabetes through attenuation of pancreatic beta cell glycosylation and glucose transport. *Nature medicine* **17**, 1067-1075 (2011).
7. Muoio, D.M. & Newgard, C.B. Mechanisms of disease: Molecular and metabolic mechanisms of insulin resistance and beta-cell failure in type 2 diabetes. *Nature reviews. Molecular cell biology* **9**, 193-205 (2008).
8. Aspinwall, C.A., Lakey, J.R. & Kennedy, R.T. Insulin-stimulated insulin secretion in single pancreatic beta cells. *The Journal of biological chemistry* **274**, 6360-6365 (1999).
9. Saltiel, A.R. & Kahn, C.R. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* **414**, 799-806 (2001).

10. Dimitriadis, G., Mitrou, P., Lambadiari, V., Maratou, E. & Raptis, S.A. Insulin effects in muscle and adipose tissue. *Diabetes research and clinical practice* **93 Suppl 1**, S52-59 (2011).
11. International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas: 6th Edition. <http://www.idf.org/diabetesatlas>. *Brussels, Belgium*. (2013).
12. Forouhi, N.G. & Wareham, N.J. The EPIC-InterAct Study: A Study of the Interplay between Genetic and Lifestyle Behavioral Factors on the Risk of Type 2 Diabetes in European Populations. *Current nutrition reports* **3**, 355-363 (2014).
13. Yamagata, K., *et al.* Mutations in the hepatocyte nuclear factor-4alpha gene in maturity-onset diabetes of the young (MODY1). *Nature* **384**, 458-460 (1996).
14. American Diabetes, A. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes care* **37 Suppl 1**, S81-90 (2014).
15. Picard, F., *et al.* Progesterone receptor knockout mice have an improved glucose homeostasis secondary to beta -cell proliferation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 15644-15648 (2002).
16. Buchanan, T.A. & Xiang, A.H. Gestational diabetes mellitus. *The Journal of clinical investigation* **115**, 485-491 (2005).
17. Colberg, S.R., Castorino, K. & Jovanovic, L. Prescribing physical activity to prevent and manage gestational diabetes. *World journal of diabetes* **4**, 256-262 (2013).
18. Forbes, J.M. & Cooper, M.E. Mechanisms of diabetic complications. *Physiological reviews* **93**, 137-188 (2013).
19. Fowler, M.J. Diabetes Treatment, Part 1: Diet and Exercise. *Clinical Diabetes* **25**, 105-109 (2007).
20. Fowler, M.J. Diabetes Treatment, Part 2: Oral Agents for Glycemic Management. *Clinical Diabetes* **25**, 131-134 (2007).
21. Viollet, B., *et al.* Cellular and molecular mechanisms of metformin: an overview. *Clinical science* **122**, 253-270 (2012).

22. Abbas, A., Bandon, J., Rude, J., Elfar, A. & Mukherjee, D. PPAR- gamma agonist in treatment of diabetes: cardiovascular safety considerations. *Cardiovascular & hematological agents in medicinal chemistry* **10**, 124-134 (2012).
23. Derosa, G. & Maffioli, P. alpha-Glucosidase inhibitors and their use in clinical practice. *Archives of medical science : AMS* **8**, 899-906 (2012).
24. Thule, P.M. & Umpierrez, G. Sulfonylureas: a new look at old therapy. *Current diabetes reports* **14**, 473 (2014).
25. Abbott, C.A., Baker, E., Sutherland, G.R. & McCaughan, G.W. Genomic organization, exact localization, and tissue expression of the human CD26 (dipeptidyl peptidase IV) gene. *Immunogenetics* **40**, 331-338 (1994).
26. Lambeir, A.M., Durinx, C., Scharpe, S. & De Meester, I. Dipeptidyl-peptidase IV from bench to bedside: an update on structural properties, functions, and clinical aspects of the enzyme DPP IV. *Critical reviews in clinical laboratory sciences* **40**, 209-294 (2003).
27. Mulvihill, E.E. & Drucker, D.J. Pharmacology, physiology, and mechanisms of action of dipeptidyl peptidase-4 inhibitors. *Endocrine reviews* **35**, 992-1019 (2014).
28. Omar, B. & Ahren, B. Pleiotropic mechanisms for the glucose-lowering action of DPP-4 inhibitors. *Diabetes* **63**, 2196-2202 (2014).
29. Neumiller, J.J. Empagliflozin: a new sodium-glucose co-transporter 2 (SGLT2) inhibitor for the treatment of type 2 diabetes. *Drugs in context* **3**, 212262 (2014).
30. Heinemann, L. & Jacques, Y. Oral insulin and buccal insulin: a critical reappraisal. *Journal of diabetes science and technology* **3**, 568-584 (2009).
31. Handelsman, Y., et al. American Association of Clinical Endocrinologists Medical Guidelines for Clinical Practice for developing a diabetes mellitus comprehensive care plan. *Endocrine practice : official journal of the American College of Endocrinology and the American Association of Clinical Endocrinologists* **17 Suppl 2**, 1-53 (2011).

32. Parks, M. & Rosebraugh, C. Weighing risks and benefits of liraglutide--the FDA's review of a new antidiabetic therapy. *The New England journal of medicine* **362**, 774-777 (2010).
33. Gentilella, R., Bianchi, C., Rossi, A. & Rotella, C.M. Exenatide: a review from pharmacology to clinical practice. *Diabetes, obesity & metabolism* **11**, 544-556 (2009).
34. Nauck, M.A., Holst, J.J., Willms, B. & Schmiegel, W. Glucagon-like peptide 1 (GLP-1) as a new therapeutic approach for type 2-diabetes. *Experimental and clinical endocrinology & diabetes : official journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association* **105**, 187-195 (1997).
35. Nauck, M.A., Vardarli, I., Deacon, C.F., Holst, J.J. & Meier, J.J. Secretion of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) in type 2 diabetes: what is up, what is down? *Diabetologia* **54**, 10-18 (2011).
36. Lim, G.E. & Brubaker, P.L. Glucagon-Like Peptide 1 Secretion by the L-Cell: The View From Within. *Diabetes* **55**, S70-S77 (2006).
37. Tolhurst, G., Reimann, F. & Gribble, F.M. Nutritional regulation of glucagon-like peptide-1 secretion. *The Journal of physiology* **587**, 27-32 (2009).
38. Rocca, A.S. & Brubaker, P.L. Role of the vagus nerve in mediating proximal nutrient-induced glucagon-like peptide-1 secretion. *Endocrinology* **140**, 1687-1694 (1999).
39. Drucker, D.J. & Nauck, M.A. The incretin system: glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes. *Lancet* **368**, 1696-1705 (2006).
40. Kim, M., *et al.* GLP-1 receptor activation and Epac2 link atrial natriuretic peptide secretion to control of blood pressure. *Nature medicine* **19**, 567-575 (2013).
41. Vila Petroff, M.G., Egan, J.M., Wang, X. & Sollott, S.J. Glucagon-like peptide-1 increases cAMP but fails to augment contraction in adult rat cardiac myocytes. *Circulation research* **89**, 445-452 (2001).
42. Barragan, J.M., Rodriguez, R.E. & Blazquez, E. Changes in arterial blood pressure and heart rate induced by glucagon-like peptide-1-(7-36) amide in rats. *The American journal of physiology* **266**, E459-466 (1994).

43. Tate, M., Chong, A., Robinson, E., Green, B.D. & Grieve, D.J. Selective targeting of glucagon-like peptide-1 signalling as a novel therapeutic approach for cardiovascular disease in diabetes. *British journal of pharmacology* **172**, 721-736 (2015).
44. Holst, J.J. The physiology of glucagon-like peptide 1. *Physiological reviews* **87**, 1409-1439 (2007).
45. Drucker, D.J. Minireview: the glucagon-like peptides. *Endocrinology* **142**, 521-527 (2001).
46. Vahl, T.P., Paty, B.W., Fuller, B.D., Prigeon, R.L. & D'Alessio, D.A. Effects of GLP-1-(7–36)NH₂, GLP-1-(7–37), and GLP-1-(9–36)NH₂ on Intravenous Glucose Tolerance and Glucose-Induced Insulin Secretion in Healthy Humans. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **88**, 1772-1779 (2003).
47. Raufman, J.P., Singh, L. & Eng, J. Exendin-3, a novel peptide from *Heloderma horridum* venom, interacts with vasoactive intestinal peptide receptors and a newly described receptor on dispersed acini from guinea pig pancreas. Description of exendin-3(9-39) amide, a specific exendin receptor antagonist. *The Journal of biological chemistry* **266**, 2897-2902 (1991).
48. Rossi, M.C. & Nicolucci, A. Liraglutide in type 2 diabetes: from pharmacological development to clinical practice. *Acta bio-medica : Atenei Parmensis* **80**, 93-101 (2009).
49. Underwood, C.R., *et al.* Crystal structure of glucagon-like peptide-1 in complex with the extracellular domain of the glucagon-like peptide-1 receptor. *The Journal of biological chemistry* **285**, 723-730 (2010).
50. Thorens, B. Expression cloning of the pancreatic beta cell receptor for the gluco-incretin hormone glucagon-like peptide 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**, 8641-8645 (1992).
51. Fill, M. & Copello, J.A. Ryanodine receptor calcium release channels. *Physiological reviews* **82**, 893-922 (2002).
52. Light, P.E., Manning Fox, J.E., Riedel, M.J. & Wheeler, M.B. Glucagon-like peptide-1 inhibits pancreatic ATP-sensitive potassium channels via a protein

- kinase A- and ADP-dependent mechanism. *Molecular endocrinology* **16**, 2135-2144 (2002).
53. Pfitzer, G. Invited review: regulation of myosin phosphorylation in smooth muscle. *Journal of applied physiology* **91**, 497-503 (2001).
54. Indolfi, C., *et al.* Activation of cAMP-PKA signaling in vivo inhibits smooth muscle cell proliferation induced by vascular injury. *Nature medicine* **3**, 775-779 (1997).
55. Ouchi, N., *et al.* Adiponectin, an adipocyte-derived plasma protein, inhibits endothelial NF-kappaB signaling through a cAMP-dependent pathway. *Circulation* **102**, 1296-1301 (2000).
56. Holz, G.G., Kang, G., Harbeck, M., Roe, M.W. & Chepurny, O.G. Cell physiology of cAMP sensor Epac. *The Journal of physiology* **577**, 5-15 (2006).
57. Pereira, L., *et al.* Epac2 mediates cardiac beta1-adrenergic-dependent sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ leak and arrhythmia. *Circulation* **127**, 913-922 (2013).
58. DeWire, S.M., Ahn, S., Lefkowitz, R.J. & Shenoy, S.K. Beta-arrestins and cell signaling. *Annual review of physiology* **69**, 483-510 (2007).
59. Nelson, C.D., *et al.* Targeting of diacylglycerol degradation to M1 muscarinic receptors by beta-arrestins. *Science* **315**, 663-666 (2007).
60. Perry, S.J., *et al.* Targeting of cyclic AMP degradation to beta 2-adrenergic receptors by beta-arrestins. *Science* **298**, 834-836 (2002).
61. Patel, P.A., Tilley, D.G. & Rockman, H.A. Beta-arrestin-mediated signaling in the heart. *Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society* **72**, 1725-1729 (2008).
62. Abu-Hamdah, R., *et al.* Clinical review: The extrapancreatic effects of glucagon-like peptide-1 and related peptides. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **94**, 1843-1852 (2009).
63. Nerbonne, J.M. & Kass, R.S. Molecular physiology of cardiac repolarization. *Physiological reviews* **85**, 1205-1253 (2005).
64. Fearnley, C.J., Roderick, H.L. & Bootman, M.D. Calcium signaling in cardiac myocytes. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **3**, a004242 (2011).

65. Fabiato, A. Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. *The American journal of physiology* **245**, C1-14 (1983).
66. Balshaw, D.M., Xu, L., Yamaguchi, N., Pasek, D.A. & Meissner, G. Calmodulin binding and inhibition of cardiac muscle calcium release channel (ryanodine receptor). *The Journal of biological chemistry* **276**, 20144-20153 (2001).
67. Periasamy, M. & Kalyanasundaram, A. SERCA pump isoforms: their role in calcium transport and disease. *Muscle & nerve* **35**, 430-442 (2007).
68. Lamb, G.D. Excitation-contraction coupling in skeletal muscle: comparisons with cardiac muscle. *Clinical and experimental pharmacology & physiology* **27**, 216-224 (2000).
69. Gordon, A.M., Homsher, E. & Regnier, M. Regulation of contraction in striated muscle. *Physiological reviews* **80**, 853-924 (2000).
70. Baudet, S., Shaoulian, R. & Bers, D.M. Effects of thapsigargin and cyclopiazonic acid on twitch force and sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ content of rabbit ventricular muscle. *Circulation research* **73**, 813-819 (1993).
71. Rogers, T.B., Inesi, G., Wade, R. & Lederer, W.J. Use of thapsigargin to study Ca²⁺ homeostasis in cardiac cells. *Bioscience reports* **15**, 341-349 (1995).
72. Lochner, A. & Moolman, J.A. The many faces of H89: a review. *Cardiovascular drug reviews* **24**, 261-274 (2006).
73. Leblais, V., *et al.* Phosphatidylinositol 3-kinase offsets cAMP-mediated positive inotropic effect via inhibiting Ca²⁺ influx in cardiomyocytes. *Circulation research* **95**, 1183-1190 (2004).
74. Kamp, T.J. & Hell, J.W. Regulation of cardiac L-type calcium channels by protein kinase A and protein kinase C. *Circulation research* **87**, 1095-1102 (2000).
75. Wheeler, T.J. & Chien, S. Protection of rat cardiac myocytes by fructose-1,6-bisphosphate and 2,3-butanedione. *PloS one* **7**, e35023 (2012).
76. Mulieri, L.A., Hasenfuss, G., Ittleman, F., Blanchard, E.M. & Alpert, N.R. Protection of human left ventricular myocardium from cutting injury with 2,3-butanedione monoxime. *Circulation research* **65**, 1441-1449 (1989).

77. Holubarsch, C., *et al.* Angiotensin I and II exert inotropic effects in atrial but not in ventricular human myocardium. An in vitro study under physiological experimental conditions. *Circulation* **88**, 1228-1237 (1993).
78. Sutton, M.G., Ritman, E.L. & Paradise, N.F. Biphasic changes in maximum relaxation rate during progressive hypoxia in isometric kitten papillary muscle and isovolumic rabbit ventricle. *Circulation research* **47**, 516-524 (1980).
79. Pieske, B., *et al.* Alterations in intracellular calcium handling associated with the inverse force-frequency relation in human dilated cardiomyopathy. *Circulation* **92**, 1169-1178 (1995).
80. Solaro, R.J. Mechanisms of the Frank-Starling law of the heart: the beat goes on. *Biophysical journal* **93**, 4095-4096 (2007).
81. Ussher, J.R. & Drucker, D.J. Cardiovascular biology of the incretin system. *Endocrine reviews* **33**, 187-215 (2012).
82. Sheikh, A. Direct cardiovascular effects of glucagon like peptide-1. *Diabetology & metabolic syndrome* **5**, 47 (2013).
83. Yamamoto, H., *et al.* Glucagon-like peptide-1 receptor stimulation increases blood pressure and heart rate and activates autonomic regulatory neurons. *The Journal of clinical investigation* **110**, 43-52 (2002).
84. Richards, P., *et al.* Identification and characterization of GLP-1 receptor-expressing cells using a new transgenic mouse model. *Diabetes* **63**, 1224-1233 (2014).
85. Ussher, J.R., *et al.* Inactivation of the cardiomyocyte glucagon-like peptide-1 receptor (GLP-1R) unmasks cardiomyocyte-independent GLP-1R-mediated cardioprotection. *Molecular metabolism* **3**, 507-517 (2014).
86. Nikolaidis, L.A., Elahi, D., Shen, Y.T. & Shannon, R.P. Active metabolite of GLP-1 mediates myocardial glucose uptake and improves left ventricular performance in conscious dogs with dilated cardiomyopathy. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* **289**, H2401-2408 (2005).
87. Ban, K., *et al.* Glucagon-like peptide (GLP)-1(9-36)amide-mediated cytoprotection is blocked by exendin(9-39) yet does not require the known GLP-1 receptor. *Endocrinology* **151**, 1520-1531 (2010).

88. Stefanadis, C., Dernellis, J. & Toutouzas, P. A clinical appraisal of left atrial function. *European heart journal* **22**, 22-36 (2001).
89. Drucker, D.J., Philippe, J., Mojsov, S., Chick, W.L. & Habener, J.F. Glucagon-like peptide I stimulates insulin gene expression and increases cyclic AMP levels in a rat islet cell line. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **84**, 3434-3438 (1987).
90. Ye, Y., *et al.* The myocardial infarct size-limiting effect of sitagliptin is PKA-dependent, whereas the protective effect of pioglitazone is partially dependent on PKA. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* **298**, H1454-1465 (2010).
91. Younce, C.W., Burmeister, M.A. & Ayala, J.E. Exendin-4 attenuates high glucose-induced cardiomyocyte apoptosis via inhibition of endoplasmic reticulum stress and activation of SERCA2a. *American journal of physiology. Cell physiology* **304**, C508-518 (2013).
92. Cazorla, O., Lucas, A., Poirier, F., Lacampagne, A. & Lezoualc'h, F. The cAMP binding protein Epac regulates cardiac myofilament function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 14144-14149 (2009).
93. Pereira, L., *et al.* The cAMP binding protein Epac modulates Ca²⁺ sparks by a Ca²⁺/calmodulin kinase signalling pathway in rat cardiac myocytes. *The Journal of physiology* **583**, 685-694 (2007).
94. Oestreich, E.A., *et al.* Epac and phospholipase Cepsilon regulate Ca²⁺ release in the heart by activation of protein kinase Cepsilon and calcium-calmodulin kinase II. *The Journal of biological chemistry* **284**, 1514-1522 (2009).
95. Ban, K., *et al.* Cardioprotective and vasodilatory actions of glucagon-like peptide 1 receptor are mediated through both glucagon-like peptide 1 receptor-dependent and -independent pathways. *Circulation* **117**, 2340-2350 (2008).
96. Vyas, A.K., *et al.* Exenatide improves glucose homeostasis and prolongs survival in a murine model of dilated cardiomyopathy. *PloS one* **6**, e17178 (2011).