Regulation und Funktion von Glucagon-like Peptide 1 und 2 unter inflammatorischen Bedingungen

Von der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften der RWTH Aachen University zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Sebastian Timo Diebold
aus Heidelberg

Berichter: Prof. Dr. med. Michael Lehrke

Prof. Dr. phil. nat. Gabriele Pradel

Prof. Dr. rer. nat. Johannes Bohrmann

Tag der mündlichen Prüfung: 02.07.2019

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Universitätsbibliothek der RWTH online verfügbar.

Zusammenfassung

Glucagon-like Peptide 1 (GLP-1) spielt bei der nahrungsabhängigen Insulinsekretion eine Rolle. Das kosezernierte, intestinotrope GLP-2 fördert die Darmzellproliferation sowie Nährstoffresorption im Darm.

GLP-1 hat auch kardioprotektive Eigenschaften, wie die Verbesserung der kardialen Kontraktilität und der myokardialen Zellfunktion. Der Mechanismus der Kardioprotektion ist unverstanden. Gegen einen direkten Mechanismus spricht, dass GLP-1-Rezeptoren (GLP-1R) in ventrikulären Kardiomyozyten nicht exprimiert werden und GLP-1R-Agonisten in GLP-1R-Knockout-(KO)-Mäusen wirksam bleiben. GLP-1 wird durch die Dipeptidylpeptidase 4 (DPP-4) metabolisiert, daher können DPP-4-Inhibitoren (z.B. Linagliptin) die GLP-1-Spiegel erhöhen. DPP-4-Inhibitoren und GLP-1-Agonisten werden zur Therapie des Diabetes mellitus eingesetzt. Bei kardiovaskulären Erkrankungen (CVD) wie dem akuten Myokardinfarkt (MI) werden pro-inflammatorische Zytokine sezerniert, die als Stimulatoren der GLP-1-Sekretion identifiziert wurden.

Die vorliegende Studie analysierte die kardioprotektive Rolle von GLP-1 beim akuten MI in einem Mausmodell (LAD-Ligatur) und in Patientensera. Sowohl bei den Patienten als auch im Mausmodell kam es nach dem MI zu einer transienten Erhöhung des GLP-1-Serumspiegels. Eine Behandlung der Mäuse mit dem DPP-4 Inhibitor Linagliptin erhöhte die GLP-1-Spiegel und steigerte die kardiale Kontraktilität. Der inverse Agonist des GLP-1R (Exendin-9) und die Verwendung eines GLP-1R-KO-Modell verhinderten den Effekt, was auf eine Beteiligung des GLP-1R hindeutet. Linagliptin und exogenes GLP-1 steigerten in isolierten Mitochondrien aus nicht infarziertem murinen Herzgewebe die respiratorische Kapazität, was die Steigerung der kardialen Kontraktilität erklären könnte. Auf Proteinebene korrelierte u.a. die Expression von p-AMPK mit den GLP-1-Effekten. Zusätzlich wurde die gesteigerte Kontraktilität durch einen AMPK-Inhibitor aufgehoben. Die Experimente belegen, dass ein MI als inflammatorischer Stimulus für die Erhöhung der GLP-1-Spiegel und für dessen kardioprotektive Effekte ausreicht. Trotz des Nachweises von Veränderungen auf der Proteinebene (Induktion von AMPK + CD36, Reduktion von GLUT4 + Akt) bleibt der Mechanismus der GLP-1R-abhängigen kardialen Funktionssteigerung ungeklärt. Aufgrund des Fehlens von GLP-1 Rezeptoren auf Kardiomyozyten ist

von einem indirekten Effekt durch die Vermittlung von Endothelzellen auszugehen.

Der zweite Teil der Arbeit analysierte den Einfluss von GLP-2 auf inflammatorische Darmerkrankungen (IBD) anhand von Patientensera, IBD-Mausmodellen (Dextran Sodium Sulfat (DSS) und *Clostridium difficile* Infektionen (CDI). Obwohl GLP-2 bereits in der Therapie des Kurzdarmsyndroms (SBS) eingesetzt wird, ist sein Wirkmechanismus weitgehend unverstanden. In Sera von Patienten mit Morbus Crohn und Colitis ulcerosa, in Lipopolysaccharid-(LPS)-behandelten Mäusen sowie in den Colitismodellen traten signifikant erhöhte GLP-2 Spiegel im Vergleich zu den Kontrollen auf. Im Mausmodell führte eine Lipopolysaccharid-(LPS)-Exposition dosisabhängig zu einer Erhöhung der GLP-2-Spiegel. Diese inflammatorisch bedingte Sekretion konnte den α-Zellen des Pankreas zugeordnet werden. Eine DPP-4-Inhibition (Linagliptin) führte zu einem gesteigerten GLP-2-Spiegel, einhergehend mit einem milderen Verlauf der Erkrankung und einer reduzierten Serumkonzentration des pro inflammatorischen Zytokins Interleukin-(IL)-6. Histologisch zeigte sich eine reduzierte Darminflammation und es konnte funktionell eine bessere Darmbarriere nachgewiesen werden. Neben DPP-4-Inhibitoren waren auch GLP-2-Agonisten in der Lage, die Inflammation einzudämmen (CDI-Colitismodell). Dieser Effekt wurde durch die Antagonisierung des GLP-2R aufgehoben.

Die vorliegenden Daten belegen, dass im Rahmen inflammatorischer Prozesse (MI, IBD) die Serumspiegel von GLP-1/2 ansteigen. Beide Proteine helfen, den Krankheitsprozess zu kontrollieren. Es konnten molekulare Mechanismen identifiziert werden die zur Erklärung der protektiven Eigenschaften beitragen, jedoch sind weitere präklinische Studien erforderlich, um diese Mechanismen vollständig zu klären.

Summary

Glucagon-like Peptide 1 is a key component of food dependent insulin secretion. The co-secreted, intestinotrope GLP-2 increases intestinal cell proliferation as well as nutrient absorption in the intestine.

Further GLP-1 has cardioprotective properties leading to improvement of cardiac contractility and myocardial function. The mechanisms of cardioprotection are not understood. A direct mechanism seems unlikely as GLP-1 receptors are not expressed on ventricular cardiomyocytes and GLP-1R agonists stay effective in GLP-1R-Knockout mice. GLP-1 is metabolized in a dipeptidedylpeptidase 4 dependent manner, thus DPP-4 Inhibitors (i.e. Linagliptin) can increase GLP-1 levels. DPP-4 inhibitors and GLP-1 agonists are used for the therapy of diabetes mellitus. In cardiovascular diseases such as acute myocardial infarction, pro-inflammatory cytokines are secreted, which have been identified as a stimulus of GLP-1 secretion.

This study investigates the cardioprotective relevance of GLP-1 during acute myocardial infarction (MI) in a mouse model (LAD-Ligation) and in patient samples. Patient samples as well as the mouse model showed a transient increase of GLP-1 serum levels after MI. Treatment of mice with the DPP-4 inhibitor Linagliptin increased GLP-1 levels and cardiac contractility. An inverse agonist of the GLP-1R (Exendin-9) and usage of GLP-1R-KO mice prevented this effect, indicating involvement of the GLP-1R. Linagliptin and exogenous GLP-1 increased the respiratory capacity in isolated mitochondria from non-infarcted murine heart tissue, which could explain the improvement of cardiac contractility. On a protein level, the expression of p-AMPK correlated with the effects of GLP-1. In addition, Linagliptin-dependent increase of cardiac contractility was abrogated by AMPK inhibition. These experiments demonstrate that MI is a sufficient stimulus to increase GLP-1 levels, which have cardio protective efficacy. Although these experiments give some molecular insight, the mechanisms of GLP-1R dependent cardioprotection remain incompletely understood and will require additional studies.

The second part of this study investigates the relevance of GLP-2 for inflammatory bowel diseases (IBD) using patient samples and IBD mouse models (dextran sodium sulfate (DSS), clostridium difficile infection (CDI)). Despite the established use of GLP-2 for the treatment of short bowel syndrome (SBS), its

mechanism of action is incompletely understood. Patient samples with Crohn's disease and ulcerative colitis, lipopolysaccharide (LPS) treated mice as well as mouse colitis models were found to have increased GLP-2 levels in comparison to the controls. Lipopolysaccharide treatment led to a dosage dependent increase of circulating GLP-2 levels in mice. The inflammatory GLP-2 secretion was attributed to pancreatic α-cells. In colitis models DPP-4 inhibition (by Linagliptin) lead to increased GLP-2 levels, reduced serum concentration of the pro inflammatory cytokine Interleukin-6 and improved disease severity. In addition, histological and functional analysis revealed reduced intestinal inflammation and improved gut barrier. In addition to DPP-4 inhibitors, GLP-2 agonists reduced intestinal inflammation (CDI-colitis model). This effect was abrogated by antagonization of the GLP-2R.

The presented data demonstrates that inflammatory diseases processes (MI, IBD) increase serum levels of GLP-1/2, while both proteins help to control disease severity. We were able to demonstrate some molecular mechanisms relevant for protective effects. However, additional pre-clinical studies are required to further elucidate the underlying mechanisms.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis VIII

Tabellenverzeichnis XII

Abbildungsverzeichnis XIII

1 Einleitung 1
- 1.1 Glucagon-like Peptide 1 und 2 1
- 1.2 Dipeptidylpeptidase 4 (DPP-4) und DPP-4-Inhibitoren 5
- 1.3 GLP-Rezeptoren 8
- 1.4 GLP-1/2R-Agonisten und -Antagonisten 12
- 1.5 GLP-1/2 im Verdauungstrakt 14
- 1.6 Glukosemetabolismus / Diabetes mellitus / GLP-1/2 23
- 1.7 Kardiovaskuläres System und GLP-1/2 25
- 1.8 Ziel der Arbeit 38

2 Material und Methoden 41
- 2.1 Material 41
- 2.2 Tierexperimente 45
- 2.3 Mauslinien 45
- 2.4 Behandlung zur Analyse der GLP-1-abhängigen Kardioprotektion 46
- 2.5 Behandlung zur Analyse der GLP-2 abhängigen Protektion bei IBD 48
- 2.6 Blut- und Organentnahmen 49
- 2.7 Mitochondrien 50
- 2.8 Proteinphosphorylierung 51
- 2.9 Nachweis von GLP-1/2 und Insulin 54
- 2.10 *In vivo* Permeabilitätsassay 54
- 2.11 Myeloperoxidase-Assay 54
- 2.12 DPP-4-Aktivitätsassay 55
- 2.13 Nachweis von Blutparametern mit dem Multiplex-Assay 55
- 2.14 Histologische Untersuchung von Colongewebe 55
- 2.15 Statistik 57

3 Ergebnisse 58
- 3.1 Analyse der Rolle von GLP-1 beim MI 58
- 3.1.1 GLP-1-Spiegel in Patienten mit ACS 58
- 3.1.2 GLP-1 Serumspiegel im murinen Tiermodell nach akutem MI 59
- 3.1.3 Blutglukose- und Insulinspiegel nach akutem MI 60
- 3.1.4 Effekt des DDP-4-Inhibitors Linagliptin auf die GLP-1 induzierten Blutglukose- und Insulinspiegel im akuten MI 61

3.1.5 Rolle von IL-6 bei der MI-abhängigen Induktion von GLP-1 63
3.1.6 Linagliptin abhängige Zunahme der LV-Kontraktilität nach LAD-Ligatur 64
3.1.7 GLP-1(7-36) abhängige Zunahme der LV-Kontraktilität nach LAD-Ligatur 66
3.1.8 Beteiligung von AMPK an der kardialen Kontraktilität 68
3.1.9 GLP-1(7-36) und Linagliptin verbessern die Respiration primärer Mitochondrien aus nicht infarziertem Myokard nach LAD-Ligatur . 70
3.1.10 Der GLP-1R-Antagonisten Ex-9 reduziert die LV-Kontraktilität nach LAD-Ligatur 71
3.1.11 Die Linagliptin-abhängige Zunahme der kardialen Kontraktilität geht durch Antagonisierung des GLP-1 Rezeptors verloren 72
3.1.12 Effekt des GLP-1R-Antagonisten Ex-9 6 h nach LAD-Ligatur auf die AMPK- und p-AMPK-Expression 73
3.1.13 Kardiale Kontraktilität in GLP-1-R-KO-Mäusen unter DPP-4-Inhibition 74
3.1.14 Mitochondriale Respiration von GLP-1R$^{-/-}$-Mäusen nach LAD-Ligatur 75
3.1.15 Effekt von Linagliptin auf die AMPK-Phosphorylierung in GLP-1R-KO-Mäusen 76
3.1.16 Effekt der DPP-4-Inhibition auf die AMPK-abhängige Zunahme der kardialen Kontraktilität 77
3.2 Analyse der Rolle von GLP-2 bei IBD 78
3.2.1 GLP-2-Serumkonzentration bei Patienten mit IBD 78
3.2.2 GLP-2-Serumkonzentration bei Mäusen mit IBD 79
3.2.3 Effekt von LPS auf die Serumkonzentration von GLP-2 80
3.2.4 GLP-2-Sekretion erfolgt aus den α-Zellen des Pankreas 81
3.2.5 Einfluss der DPP-4 Inhibition auf den Krankheitsverlauf im DSS-Colitismodell 82
3.2.6 Einfluss der DPP-4 Inhibition auf den Krankheitsverlauf im CDI-Colitismodell 85
3.2.7 Einfluss von GLP-2 auf den Krankheitsverlauf *im CDI-Colitismodell* 85

4 Diskussion 88
4.1 GLP-1 im akuten MI 88
4.2 GLP-2 in inflammatorischen Darmerkrankungen 93

5 Ausblick 98

Literaturverzeichnis 106

Abkürzungsverzeichnis

AC	Adenylatcyclase
ACH	Acetylcholin
ACS	Akutes Koronarsyndrom – acute coronary syndrome
ADA	Adenosin-Deaminase
ADP	Adenosindiphosphat
AKT	Proteinkinase B
AMPK	Adenosinmonophosphat-aktivierte Proteinkinase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BMI	Bodymass-Index
BNP	Brain natriuretic peptide
BrDU	Bromodeoxyuridin
BSA	Bovines Serumalbumin
CAD	Koronararterien Erkrankungen – Coronary Artery Disease
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
CD	Cluster of differentiation
CDI	*Clostridium difficile* Infection
CHD	Koronare Herzerkrankung – Coronary heart disease
CVD	Kardiovaskuläre Erkrankungen – cardiovascular disease
CXCR2	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 2
DAI	Disease-activity-index
DAPI	4′,6-Diamidin-2-phenylindol
DM	Diabetes mellitus
dNA	Desoxyribonukleinsäure
Dp/dt	Delta pressure (Druck) / Delta time (Zeit)
DPP-4	Dipeptidylpeptidase 4
DSS	Dextran-Sodium Sulfate
ECL	Extracellular loop
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether) tetraacetic acid
ELISA	Enzym-linked-Immunosorbent Assay

EPAC	Exchange factor directly activated by cAMP
EPO	Erythropoetin
ERK	Extrazellulär regulierte Kinase
ESC	European Society of Cardiology
EU	Europäische Union
Ex-4, Ex-9	Exendin 4, Exendin 9
FATP	Fettsäuretransporter
FDA	Food and Drug Administration
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
GABA	Gamma-aminobutyric acid
G-CSF	Granulocyte colony stimulating factor
GIP	Gastric inhibitory peptide
GLP-1/2	Glucagon-like Peptide 1/2
GLP-1/2R	Glucagon-like Peptide 1/2 Receptor
GLUT	Glukose Transporter
GRP	Gastrin-releasing peptide
GRP120	G-Protein gekoppelter Rezeptor 120
GRPP	Glycin-related polypeptide
GSK3	Glycogen synthase kinase-3
H&E	Hämatoxylin-Eosin Färbung
HCl	Salzsäure
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HRP	Horseradish peroxidase
i.p.	intraperitoneal
IBD	Inflammatory bowel disease (Inflammatorische Darmerkrankung)
ICL	Intracellular loop
IL	Interleukin
INF	Interferon
IP	Intervening peptide
K_{ATP} Channel	Adendosin Triphosphat abhängige Kaliumkanäle
kDA	Kilo Dalton
KO	*Knockout*

LAD	Left anterior descending
LDL	Low density Lipoproteine
Lox1	lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1
LPS	Lipopolysaccharid
LV	Linksventrikulär
MACE 3	Major Averse Cardiac Effect
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MC	Morbus Crohn
MDC	Macrophage chemokine
MI	Myokardinfarkt
MIG	Monokine induced by gamma interferon
MIP	Macrophage inflammatory protein
MPO	Myeloperoxidase
mRNA	messenger ribonucleic acid
MUFA	monounsaturated fatty acids (Einfach ungesättigte Fettsäuren)
MW	Mittelwert
NOD	Nucleotide-binding oligomerization domain
NPY	Neuropeptide Y
OP	Operation
oxLDL	Oxidiertes LDL
p-	phosphoryliert
pAKV	Periphere arterielle Verschlusskrankheit
PBS	Phosphate buffered saline
PC	Prohormon-Convertase
PCI	Perkutane Koronarintervention
PDX	Pancreatic duodenal homeobox protein X
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
pNa	p-Nitroanilin
PYY	Peptid YY

RA	Reactivation
RISK	Reperfusion injury salvage kinase
RIVA	Ramus interventricularis anterior
RNA	ribonucleic acid
ROS	Reactive oxygen species
RT	Raumtemperatur
SBS	Short bowel syndrome (Kurzdarmsyndrom)
SDF1	Stromal cell derived factor-1
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SDV	Standard Deviation (Standardabweichung)
SEM	Standard Error of the Mean, Standardfehler
SGLT	Sodium dependent glucose transporter (Natrium abgängiger Glukosetransporter)
STEMI	ST-Strecken-Hebungsinfarkt
TBST	Tris-buffered saline with Tween20
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGF	Transforming growth factor
TNF-α	Tumornekrosefaktor α
TRIS	Trishydroxymethyl-aminomethan
UC	Colitis ulcerosa
Vil	Villin
VIP	vasoaktives intestinales Peptid
WHO	World Health Organization
WT	Wildtyp
ZNS	zentrales Nervensystem

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Vergleich von kurz und lang wirksamen GLP-1-Agonisten...... 13
Tabelle 2: Verwendete Laborgeräte 41
Tabelle 3: Verbrauchsmaterialien 42
Tabelle 4: Verwendete Reagenzien 42
Tabelle 5: Übersicht der GLP-2 gemessenen Patienten in IBD 79

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Proglukagon-Gen, mRNA, Protein und durch die gewebespezifische Prozessierung entstehende Peptide. 3
Abbildung 2: Signalwege der GLP-1-Sekretion. A: 4
Abbildung 3: Dipeptidyl-Peptidase-4 (DPP-4) – Struktur und Funktionen. . 7
Abbildung 4: Aktivierungszyklus G-Protein gekoppelter Rezeptoren 10
Abbildung 5: Querschnitt durch die vier Schichten des Darmes – Serosa, Submukosa, Mukosa und Muscularis. 16
Abbildung 6: Aufbau der Darmwand. 17
Abbildung 7: Pharmakologische und Physiologische Mechanismen von GLP-2. 23
Abbildung 8: Effekt von GLP-1 auf verschiedene Gewebe 25
Abbildung 9: Übersicht der kardiovaskulären Todesursachen. 26
Abbildung 10: Globale Übersicht der Mortalität ischämischer Herzerkrankungen pro 100.000 Einwohner. 27
Abbildung 11: Anatomie des Herzes. 29
Abbildung 12: Verlauf der Atherosklerose. 31
Abbildung 13: Vermeidbare und unvermeidbare kardiovaskuläre Risikofaktoren als Ursache für Atherosklerose sowie den damit verbundenen Gefäßereignissen wie periphere arterielle Verschlusskrankheit (PAVK), Gehirninfarkt und koronare Herzerkrankungen und damit verbundenen Erkrankungen Angina pectoris, Herzinsuffizienz oder Myokardinfarkt (MI). 32
Abbildung 14: Elektrokardiogramm mit STEMI. 33
Abbildung 15: Induktion eines MI durch Abbinden der linken abgehenden Koronararterie im Mausmodell. 34
Abbildung 16: Direkte und indirekte Wirkung von GLP-1 auf die Kardioprotektion 35
Abbildung 17: Funktionen der GLP-1R-Expression im Herzen und in den Blutgefäßen. 37
Abbildung 18: Aufbau der Transferkassette zur Übertragung der Proteine auf die Nitrocellulose Membran 53
Abbildung 19: GLP-1-Spiegel und IL-6 Spiegel von MI-Patienten und Kontrollpatienten 59
Abbildung 20: Zeitabhängiger Anstieg der Serum-GLP-1-Konzentration nach permanenter LAD-Ligatur in C57BL/6J Mäusen (A) und IL-6 Spiegel (B). 60
Abbildung 21: Zeitabhängige Glukose- und Insulinspiegel 3, 6 und 12 h nach MI oder Sham-Operation in C57BL/6J Mäusen. 61
Abbildung 22: DPP-4-Aktivität in C57BL/6J Mäusen nach Linagliptin-Behandlung. 62

Abbildung 23: Aktiver GLP-1-Spiegel unter DPP-4 Inhibition 6 h nach LAD-Ligatur in C57BL/6J Mäusen. 62
Abbildung 24: Glukose- und Insulinspiegel in C57BL/6J Mäusen nach MI mit und ohne Linagliptin-Behandlung. 63
Abbildung 25: GLP-1 Spiegel 6 h nach MI in IL-6$^{-/-}$-KO- und WT-Mäusen.. 63
Abbildung 26: Kardiale Kontraktilität 6 h nach permanenter LAD-Ligatur ± Vorbehandlung mit dem DPP-4-Inhibitor Linagliptin. 64
Abbildung 27: Kardiale Kontraktilität 3 h nach LAD-Ligatur ± Vorbehandlung mit dem DPP-4 Inhibitor Linagliptin. 65
Abbildung 28: Kardiale Kontraktilität 3 h (A–C) und 6 h (D–F) nach permanenter LAD Ligatur und Vorbehandlung mit GLP-1(7-36)(100 nM/kg). 67
Abbildung 29: Western-Blot Analyse aus nicht infarziertem Herzgewebe 6h nach Myokardinfarkt. 69
Abbildung 30: Mitochondriale Funktion (A und C) und mitochondriale Respiration ohne Substrat (State 1) nach Zugabe von Pyruvat/Malat (State 2) und zusätzlicher Zugabe von ADP (State 3) sowie Oligomycin (State 4) (B und D). 70
Abbildung 31: Kardiale Kontraktilität unter Antagonisierung des GLP-1R mit Exendin-9 (100nM/kg) in C57BL/6J Mäusen 6 h nach permanenter LAD Ligatur oder Sham OP. 71
Abbildung 32: Der GLP-1R-Antagonist Ex-9 hebt die Linagliptin-abhängige Zunahme der LV-Kontraktilität 6 h nach LAD-Ligatur auf. 73
Abbildung 33: Western-Blots aus nicht infarziertem Herzgewebe nach Ex-9 Vorbehandlung. 74
Abbildung 34: Kardiale Kontraktilität von GLP-1R$^{-/-}$- und WT-Mäusen mit und ohne Linagliptin-Behandlung nach permanenter LAD-Ligatur. . 75
Abbildung 35: Fehlende Zunahme der kardialen mitochondrialen Respiration nach Linagliptin-Behandlung in GLP-1R$^{-/-}$-Mäusen 6 h nach LAD-Ligatur. 76
Abbildung 36: Western-Blot aus nicht infarziertem Herzgewebe von GLP-1R$^{-/-}$-Mäusen mit und ohne Linagliptin (3 mg/kg). 77
Abbildung 37: Verhinderung der Linagliptin-abhängige Zunahme der LV-Kontraktilität 6 h nach LAD-Ligatur durch eine AMPK-Inhibition 78
Abbildung 38: Serum GLP-2 Konzentration von Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen. 79
Abbildung 39: GLP-2 Serum Spiegel in experimentellen Colitismodellen in C57BL/6J Mäusen. 80
Abbildung 40: Dosisabhängiger Anstieg der GLP-2-Serumkonzentration nach LPS-Gabe. 81
Abbildung 41: GLP-2 Messung in Prä-Proglukagon-KO Mäusen mit gewebespezifischer reaktivierten der Prä-Proglukagon Expression im Pankreas (Gcg pdx1RA) oder im Darm (Gcg Vil RA). 82

Abbildung 42: Einfluss der DPP-4-Inhibition auf den Krankheitsverlauf im DSS-Colitismodell 84
Abbildung 43: Gewichtsverlauf in 10 Wochen alten, weiblichen C57BL/6J Mäusen im CDI-Colitismodell...... 85
Abbildung 44: Gewichtsverlust und inflammatorischer Index in 10 Wochen alten, weiblichen C57BL/6J Mäusen im CDI-Colitismodell...... 86
Abbildung 45: Histologische Schnitte des Colons (H&E Färbung) von 10 Wochen alten, weiblichen C57BL/6J Mäusen im CDI-Colitismodell.. 87

Leerseite

1 Einleitung

1.1 Glucagon-like Peptide 1 und 2

In den letzten Jahrzehnten sind die intestinalen Peptide Glucagon-like Peptide 1 (GLP-1) und Glucagon-like Peptide 2 (GLP-2) aufgrund ihrer Vielzahl an therapeutischen Einsatzmöglichkeiten in den Fokus der Forschung gerückt. Aktivatoren des GLP-1-Rezeptors (GLP-1R) werden aktuell in der Therapie des Diabetes mellitus (DM) eingesetzt und Aktivatoren des GLP-2Rezeptors bei der Behandlung von Erkrankungen des gastrointestinalen Traktes, wie dem Kurzdarmsyndrom (SBS) oder inflammatorischen Darmerkrankungen (IBD). In der vorliegenden Arbeit wird die Rolle von GLP-1 auf das kardiovaskuläre System und von GLP-2 auf den Verdauungstrakt unter inflammatorischen Bedingungen untersucht. Beide Peptide werden nahrungsabhängig von neuroendokrinen L-Zellen des Darms ausgeschüttet. GLP-1 steigert als Inkretin die Insulinsekretion der ß-Zellen der Langerhans'schen Inseln des Pankreas. GLP-2 hemmt u.a. die Sekretion der Magensäure und die Darmaktivität.
GLP-1 wurde bereits 1979 entdeckt, jedoch erst 1990 nach der Klonierung und Sequenzierung der Proglukagon messenger ribonucleic acid (mRNA) näher charakterisiert. GLP-2 wurde 1983 entdeckt (Bell et al., 1983, Heinrich et al., 1984). GLP-1/2 weisen eine Sequenzhomologie von 35,5% auf, besitzen eigene Rezeptoren und unterscheiden sich in ihrer Funktion (Kreymann et al., 1987, Creutzfeldt, 1979, Kauth and Metz, 1987).

Synthese

GLP-1/2 werden von endokrinen L-Zellen des Darmes und in Zellen des Pankreas sezerniert. Beide Proteine werden von dem Proglukagon-Gen, das sich auf dem langen Arm des humanen Chromosoms 2 befindet, kodiert. Die kodierende Sequenz von Proglukagon setzt sich aus 6 Exons und 5 Introns zusammen, wobei die Sequenzen für GLP-1/2 in Exon 4 enthalten sind (White and Saunders, 1986). Die Synthese von GLP-1/2 ist in Abbildung 1 schematisch dargestellt.
Die Expression der Proglukagon-mRNA erfolgt in den pankreatischen Inselzellen in Abhängigkeit von einer Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) und des Adenosinmonophosphat-aktivierte Proteinkinase (AMPK) / Proteinkinase A (PKA) Signalweges. Die Expression im Darm ist mit der im Pankreas vergleichbar und resultiert insbesondere aus einem Anstieg des intrazellulären zyklischen

Adenosinmonophosphats (cAMP) und der Aktivierung des cAMP / PKA-Signalwegs. Die Proglukagon-mRNA wird in ein 160 Aminosäuren langes Protein translatiert und anschließend durch das Enzym Prohormon-Convertase (PC) prozessiert. Die weitere posttranslationale Modifikation ist gewebespezifisch und unterscheidet sich in intestinalen L-Zellen und pankreatischen α-Zellen. In pankreatischen α-Zellen wird Proglukagon durch die PC-2 in vier Fragmente gespalten. Diese sind das Glycin-related polypeptide (GRPP), das intervening peptide 1 (IP-1), Glukagon sowie das Proglukagon-Hauptfragment. In intestinalen L-Zellen und im zentralen Nervensystem (ZNS) wird Proglukagon durch die PC-1/3 gespalten. Dadurch entstehen drei separate Peptide GLP-1, GLP-2 und das intervening peptide 2 (IP-2) (Mojsov et al., 1986, Holst, 2007). GLP-1 entsteht aus dem Proglukagon-Fragment 78-107 und GLP-2 aus dem Abschnitt 126-158 (Dhanvantari et al., 1996, Ugleholdt et al., 2004).

In vivo sezernieren die L-Zellen des Darmes verschiedene Formen von GLP-1. Die inaktiven Formen GLP-1(1-37) entsteht aus einer ersten PC-1/3 abhängigen Spaltung des Proglukagon in endokrinen L-Zellen (Orskov et al., 1993, Dhanvantari et al., 1996). Das biologisch aktive GLP-1(7-37) geht durch eine weitere PC-1/3-abhängigen Spaltung aus GLP-1(1-37) hervor. Zusätzlich entsteht als zweite biologisch aktive Form das GLP-1(7-36)amid über die Abspaltung des C-terminalen Glycins und Amidierung des nun C-terminalen Arginins durch das Enzym Peptidyl-Glycine-α-amidase-monooxygenase (Orskov et al., 1989, Holst, 2007, Wettergren et al., 1998). GLP-1(7-36)amid und GLP-1(7-37) besitzen die gleiche biologische Aktivität am GLP-1R, wobei die GLP-1(7-36)amid eine längere Halbwertszeit und höhere Stabilität im Plasma aufweist. Das GLP-1(7-36)amid ist mit 80% die häufigste aktive GLP-1-Form im Menschen (Orskov et al., 1994). GLP-2 besitzt nur eine aktive Form das GLP-2(1-33). Die Spaltung zu GLP-2(1-33) erfolgt analog zu GLP-1 durch PC-1/3.

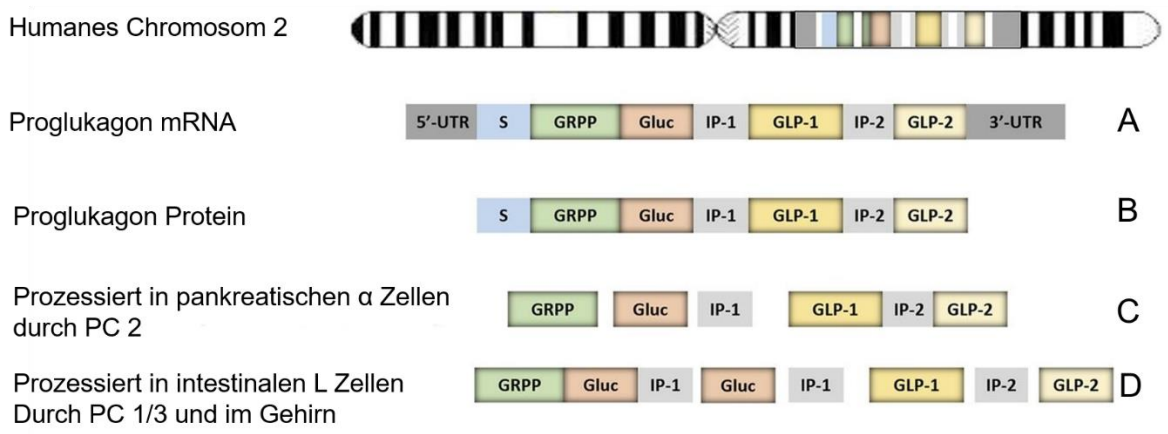


Abbildung 1: Proglukagon-Gen, mRNA, Protein und durch die gewebespezifische Prozessierung entstehende Peptide. Das Proglukagon-Gen ist auf dem humanen Chromosom 2 lokalisiert und wird im Gewebe des Pankreas, Darms und ZNS exprimiert (A) Proglukagon-mRNA und erstes Proglukagon-Protein nach Prozessierung durch die Prohormon-Convertase (PC) (B). Prozessierung durch PC-2 in pankreatischen α-Zellen in Glycin-related polypeptide (GRPP), Glukagon (Gluc), intervening peptide 1 (IP-1) und das Haupt-Proglukagon-Fragment (C). Im Dünndarm und ZNS wird Proglukagon durch PC-1/3 in die Peptide intervening peptide 2 (IP-2), GLP-1 und GLP-2 (D) prozessiert. Entnommen und angepasst nach (Graaf et al., 2016)

Sekretion

GLP-1/2 werden von endokrinen L-Zellen des Darms, α-Zellen des Pankreas sowie in Neuronen des Hypothalamus und des Hirnstamms gebildet. Beide Peptide werden in einem Verhältnis von 1:1 sezerniert. Die Sekretion erfolgt nach einem biphasischen Muster. Die erste, starke und rasch einsetzende Phase beginnt 10–30 min, die zweite, schwächere Phase 90–120 min nach Beginn der Nahrungsaufnahme. Die erste Phase der Sekretion wird über neuro-endokrine Signalwege vermittelt (Herrmann et al., 1995). In dieser Phase kommen die Nahrungsbestandteile noch nicht mit den distal, im Verdauungstrakt liegenden L-Zellen in Kontakt. An der frühen, neuronal vermittelten Sekretion sind Neurotransmitter wie Gastrin-releasing peptide (GRP) und Acetylcholin beteiligt, die zentralnervös gesteuert auf die Neuronen in unmittelbarer Nachbarschaft zu den L-Zellen wirken (Rocca and Brubaker, 1999). In der zweiten Phase kommt es zu einem direkten Kontakt der gespaltenen Nahrungsbestandteile (Fette, Kohlenhydrate) mit den intestinalen L-Zellen, was zu einer schwächeren jedoch länger andauernden Sekretion von GLP-1 führt (Roberge and Brubaker, 1991) (Brubaker, 2006).

GLP-2 wird mit GLP-1 von den entero-endokrinen L-Zellen kosezerniert. Auch hier erfolgt die Sekretion nahrungsabhängig nach einem biphasischen Muster (Brubaker et

al., 1997a). Die nahrungsabhängige Sekretion von GLP-1/2 wird somit indirekt über einen proximal-distalen neuroendokrinen Regelkreis und direkt über den Kontakt von Nährstoffen mit den intestinalen L-Zellen stimuliert. Neben diesem klassischen nahrungsabhängigen Sekretionsweg konnte gezeigt werden, dass auch inflammatorische Stimuli wie Endotoxine, Interleukin-(IL)-1β oder IL-6 die Sekretion steigern (Kahles et al., 2016).

Eine Vielzahl intrazellulärer Signalmoleküle sind unter dem Einfluss der oben besprochenen Stimuli (Glukose, Fettsäuren, neuronale Reize) an der Auslösung der Sekretion der GLP-Peptide in den intestinalen L-Zellen beteiligt (s. Abb. 2) (Thorens, 1992, Drucker et al., 1987, Holz et al., 1995, Lim and Brubaker, 2006).

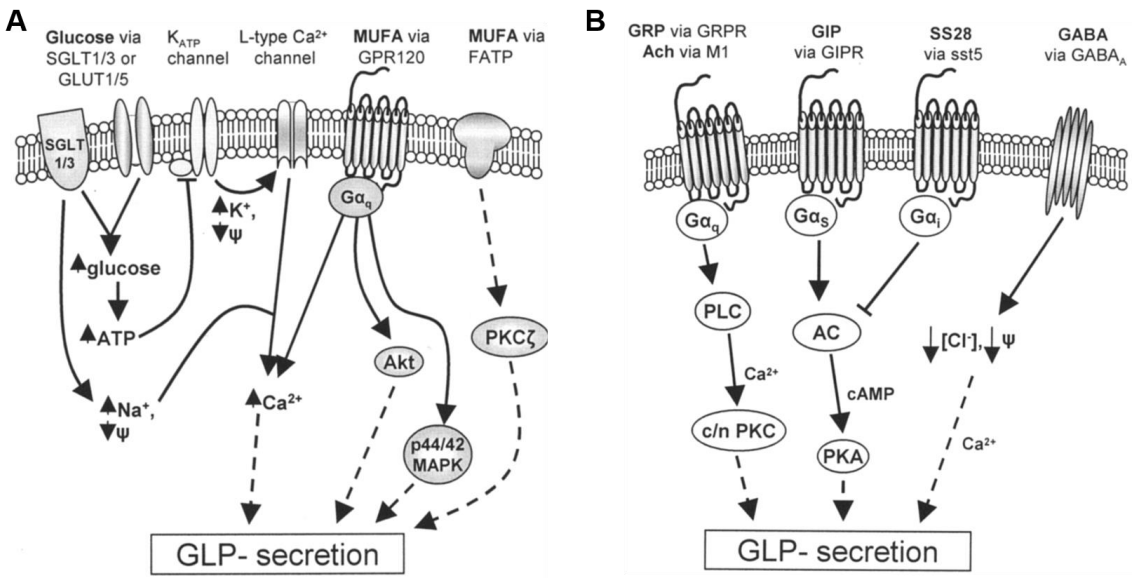


Abbildung 2: Signalwege der GLP-1-Sekretion. A: Signalweg nach direktem Nährstoffkontakt. Glukoseaufnahme in die Zelle über Natrium/Glukose-Cotransporter (SGLT) oder Glukosetransporter (GLUT) führt durch erhöhtes Adenosintriphosphat (ATP) zur Schließung von Kalium-(K_{ATP})-Kanälen, was zu einer Änderung des Membranpotentials und über Kalzium-Kanäle zu einer GLP-1 Sekretion beiträgt. Fettsäuren (MUFA) führen über den G-Protein gekoppelten Rezeptor 120 (GPR120) und über Proteinkinase B (AKT) und die Mitogen-activated protein-(MAP)-kinase zu einer GLP-1-Sekretion, können aber auch über den Fettsäuretransporter (FATP) und PKC direkt auf die Sekretion wirken. **B:** Indirekte Sekretionsvermittlung. Bindung von Gastrin-releasing peptide (GRP) und Acetylcholin (ACH) an den GRP- bzw. M1-Rezeptor führt PKC-vermittelt zu einer GLP-1 Sekretion. Gastric inhibitory peptide (GIP) bewirkt über Phospholipase C (PLC) und Kalzium eine PKA-abhängige GLP-1 Sekretion. Aktivierung des GIP-Rezeptors führt über die Adenylatzyklase (AC), erhöhtem cAMP über PKA zu einer GLP-1-Sekretion. Gamma-Amino-Buttersäure (GABA) (aus dem enterischen System) bewirkt durch öffnen von Ionenkanälen und folgendem Einstrom von Chlorid Ionen eine Depolarisierung der L-Zellen und dadurch eine Kalzium abhängige GLP-1 Sekretion. Durchgezogene Pfeile beschreiben bekannte Mechanismen, während gestrichelte Pfeile nicht vollständig geklärte Signalwege markieren. Adaptiert und modifiziert nach (Lim and Brubaker, 2006)

Metabolismus

Die Plasmakonzentration des aktiven GLP-1 ist bei Nahrungsmangel niedrig und kaum messbar (0-10 pMol/l) (Orskov et al., 1994). Nach der Nahrungsaufnahme steigt die Plasmakonzentration des aktiven GLP-1 um das Zwei- bis Dreifache an (Vilsboll et al., 2001, Muscelli et al., 2006). Die maximal sezernierte aktive GLP-1-Menge hängt von der Zusammensetzung und der Menge der Nahrung ab (Xiao et al., 1999, Elliott et al., 1993).

Beide GLP-1-Peptide (GLP-1(7-36)amid und GLP-1(7-37)) besitzen eine kurze Halbwertszeit von wenigen Minuten (Deacon et al., 1995a). Die schnelle Inaktivierung erfolgt durch die Abspaltung von zwei Aminosäuren am N-terminalen Ende der Peptide. Dies geschieht durch die ubiquitäre Dipeptidylpeptidase 4 (DPP-4), die bevorzugt Peptide mit einem Alanin an der zweiten Position vom N-Terminus abbaut (Mentlein et al., 1993). Durch die Spaltung des aktiven GLP-1(7-36)Amid und GLP-1(7-37) entstehen die inaktiven Metaboliten GLP-1(9-36)Amid und GLP-1(9-37). Die Metabolite weisen eine Halbwertszeit von ca. 5 min auf (Meier et al., 2004).

Die aktive Form von GLP-2, GLP-2(1-33), besitzt wie GLP-1 an der zweiten Aminosäureposition vom N-Terminus aus gesehen ein Alanin. Die Inaktivierung erfolgt ebenfalls durch eine Spaltung des Peptides durch die DPP-4 in ein Dipeptid und das inaktive GLP-2(3-33). Im Vergleich zu GLP-1 ist GLP-2 mit einer Halbwertszeit von ca. 7 min beständiger (Hartmann et al., 2000a, Brubaker et al., 1997a, Hartmann et al., 2000b, Drucker et al., 1997). Das inaktive GLP-2(3-33) fungiert als partieller Agonist des GLP-2R (Thulesen et al., 2002). *In vitro* Untersuchungen zeigen, dass die Bindungsaffinität von GLP-2(3-33) im Vergleich zu GLP-2(1-33) nur ca. 15% entspricht. Jedoch kann GLP-2(3-33) in hohen Konzentrationen *in vivo* den Effekt von GLP-2(1-33) aufgrund seiner partiellen Agonisten-Funktion aufheben (Thulesen et al., 2002). Nach der Inaktivierung durch DPP-4 werden GLP-2 als auch GLP-1 über die Niere ausgeschieden, was zu einer starken Erhöhung der zirkulierenden Spiegel bei Patienten mit Niereninsuffizienz führt (Drucker et al., 1997, Tavares et al., 2000).

1.2 Dipeptidylpeptidase 4 (DPP-4) und DPP-4-Inhibitoren

Das Enzym wurde 1966 entdeckt (Hopsu-Havu and Glenner, 1966) und zunächst als Dipeptid-Naphthylamidase bezeichnet. Aufgrund seiner Eigenschaften wurde es später DPP-4 genannt (Callahan et al., 1972, Kenny et al., 1976). Daneben ist das 110 kDA große Protein auch als T-Zell Antigen Cluster of differentiation 26 (CD26) bekannt.

DPP-4 kommt sowohl membrangebunden als auch gelöst im Plasma vor (Hartel et al., 1988, Iwaki-Egawa et al., 1998). DPP-4 gehört zu den Serinproteasen (Lambeir et al., 2003, de Meester et al., 2003). Das 766 Aminosäuren lange Protein wird von der Leber, der Niere, der Lunge, von Endothelzellen sowie dem Pankreas exprimiert (Hartel-Schenk et al., 1990, Hildebrandt et al., 1991, Mentlein and Heymann, 1982, Grondin et al., 1999). Die Lokalisation von DPP-4 in Endothelzellen und damit in unmittelbarer Nähe vom Sekretionsort von GLP-1/2 bewirkt, dass ein Teil des GLP-1/2 direkt nach der Sekretion wieder inaktiviert wird (Mulvihill and Drucker, 2014). DPP-4 besitzt zwei Hauptaufgaben:

1. **Signaltransduktion-Funktion:** Das membrangebundene DPP-4 bindet an Adenosin-Desaminase (ADA) siehe Abbildung 3. Durch die ADA Bindung kommt es zu Aktivierung von Plasminogen-2 welches zu erhöhten Plasmin-Level führt, welche wiederrum zur Degradation von Matrixproteinen beitragen, was auf Remodellingprozesse hinweist. Durch die Bindung an CD45 kommt es außerdem zu einer gesteigerten T-Zell Aktivierung (Röhrborn et al., 2015). DPP-4 ist somit Teil von Signaltransduktionsketten (Hegen et al., 1990)
2. **Enzym-Funktion:** Sowohl das lösliche als auch das membrangebundene DPP-4 spaltet Peptide, die an der zweiten Aminosäureposition vom N-Terminus aus gesehen ein Alanin oder Prolin aufweisen (de Meester et al., 2003). Auch beim Vorliegen von Hydroxyprolin, Glycin, Valin, Threonin oder Leucin an dieser Stelle ist eine DPP-4 abhängige Spaltung möglich (Mentlein, 1999, Augustyns et al., 1999). DPP-4 besitzt verschiedene Substrate wie Peptidhormone, Neuropeptide, Chemokine und Zytokine (De Meester et al., 1999, Mentlein, 1999) und ist an der Regulation verschiedener zellulärer Funktionen, neuraler und metabolischer Vorgänge beteiligt. Der Aufbau, die Signaltransduktion, die katalytische Aktivität und die wichtigsten Substrate (physiologische und pharmakologisch) von DPP-4 sind in Abbildung 3 schematisch dargestellt (Kieffer et al., 1995, Drucker et al., 1997, Zhong et al., 2015b).

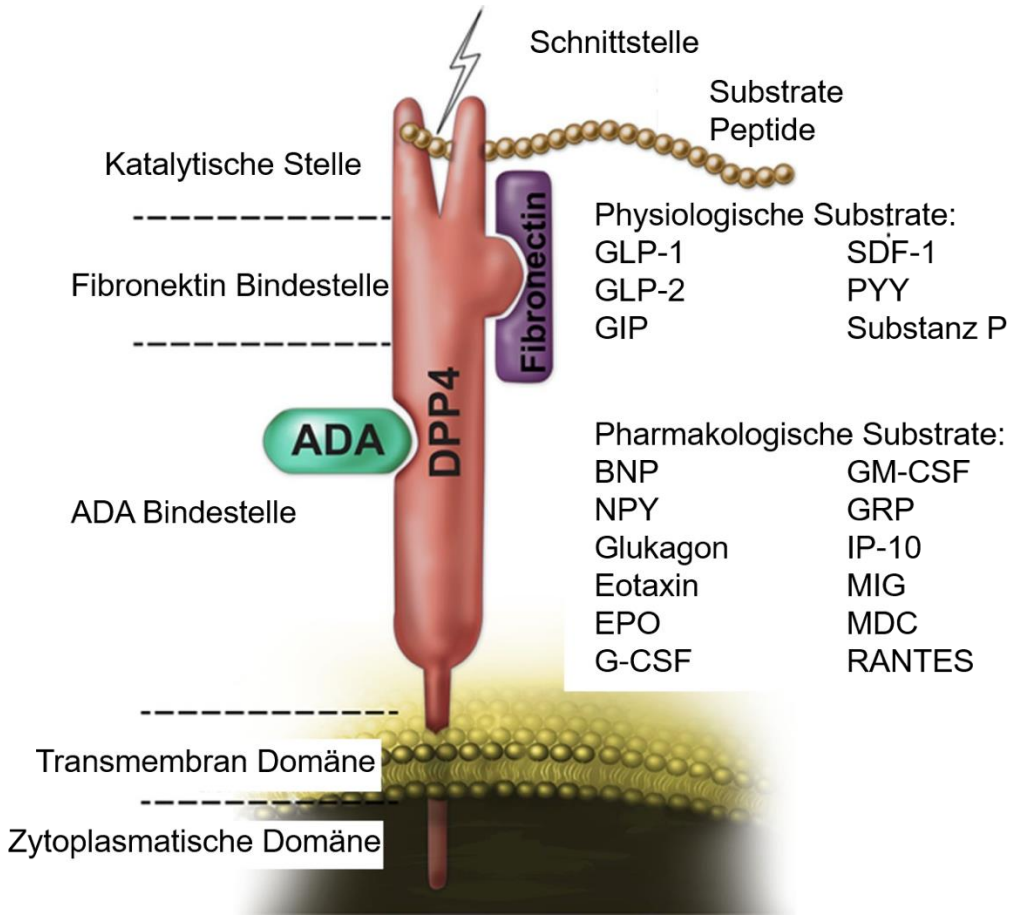


Abbildung 3: Dipeptidyl-Peptidase-4 (DPP-4) – Struktur und Funktionen. Das Protein besteht aus einer zytoplasmatischen Region mit 6 Aminosäuren, hat eine 22 AS lange Transmembrandomäne und eine große extrazelluläre Region. Diese extrazelluläre Region ist auch für die DPP-4-Aktivität verantwortlich. Hier werden die Adenosin-Desaminase (ADA) und Fibronectin gebunden. Pharmakologische Substrate: Brain natriuretic Peptide (BNP), Granolocyte-macrophage colony stimulation factor (GM-CSF), neuropeptide Y (NPY), Erythropoetin (EPO), Gastrin releasing peptide (GRP), Monokine induced peptide by INF-y (MIP), macrophage derived chemokine (MDC) Granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) INF-y induced protein 10 (IP-10), RANTES, Eotaxin, Glukagon. Physiologische Substrate: Gastric inhibitory Peptide (GIP), stromal-cell-derived factor 1 (SDF-1) Glucagon-like Peptide 1/2 (GLP-1/2), Protein YY (PYY) und Substanz P. Modifiziert nach (Zhong et al., 2015a).

DPP-4 Inhibitoren

DPP-4 Inhibitoren (Synonym: Gliptine) hemmen kompetitiv das aktive Zentrums von DPP-4 und damit Abbau von Substraten wie GLP-1/2. DPP-4 Inhibitoren erhöhen die Konzentration der aktiven Formen von GLP-1/2 im Plasma (Behme et al., 2003). Dieser Zusammenhang wird klinisch genutzt, um die Glukose-abhängige Insulinsekretion über GLP-1 zu stimulieren, wodurch eine anti-diabetische Wirkung erreicht wird.

Eine Reihe von DPP-4-Inhibitoren wie Linagliptin, Saxagliptin und Sitagliptin (McIntosh et al., 2005) sind zur Diabetes Mellitus Therapie zugelassen. Durch die DPP-4-Inhibitoren wird die Halbwertszeit von aktivem GLP-1/2 erhöht, ohne die Gesamtkonzentration der Peptide zu verändern (Deacon et al., 1995a, Deacon et al., 1995b). Durch die verschiedenen Funktionen von DPP-4 und der großen Anzahl an möglichen Substraten besitzen DPP-4-Inhibitoren ein breites Wirkspektrum (Zhong et al., 2015b, Zhong and Rajagopalan, 2015). Eine Metaanalyse zufolge zeigen DPP-4-Inhibitoren keine negativen Effekte auf die Mortalität, kardiovaskuläre Mortalität und Schlaganfallinzidenz (Wu et al., 2014). Bisher zugelassene Gliptine besitzen keine kardiovaskulären Risiken, lediglich unter Saxagliptin fiel eine erhöhte Hospitalisationsrate auf Grund von Herzinsuffizienz auf (Savarese et al., 2015). Die Metaanalyse von Linagliptin, das auch in der vorliegenden Arbeit als DPP-4 Inhibitor verwendet wird, zeigte in einer kleineren Studie eine Reduktion des kardiovaskulären Risikos (Johansen et al., 2012). Aktuell wird in einer großen, bis 2019 laufenden, klinischen Studie (CAROLINA) die Wirkung von Linagliptin auf kardiovaskuläre Mortalität und das kardiovaskuläre Outcome bei Patienten mit Diabetes untersucht (Marx et al., 2015).

DPP-4-Inhibitoren führen ebenfalls zu einem verzögerten Abbau von GLP-2. Höhere GLP-2-Konzentrationen unter DPP-4 Inhibition könnten einen positiven Effekt auf den gastrointestinalen Trakt haben. Daher könnten DPP-4-Inhibitoren beim SBS und bei anderen Darmerkrankungen, wie der *Clostridium difficile* Infektion (CDI), Verwendung finden (Booth et al., 2004, Boushey et al., 1999, Boushey et al., 2001). Der Einfluss einer DPP-4-Inhibition auf GLP-2 vermittelte Effekte wurde bisher noch nicht ausreichend untersucht.

1.3 GLP-Rezeptoren

GLP-1R

Der GLP-1R besteht aus 463 Aminosäuren und wird beim Menschen auf Chromosom 6, Band p21.1 kodiert (Thorens et al., 1993, Dillon et al., 1993). Der G-Protein-gekoppelte Klasse B Sekretin-Rezeptor mit sieben Transmembrandomänen (Brubaker and Drucker, 2002) bildet zusammen mit den Rezeptoren von GLP-2 und Glukagon die Glukagon-Rezeptor-Familie (Song et al., 2017, Wootten et al., 2016a, Wootten et

al., 2016b). G-gekoppelte Rezeptoren erkennen extrazelluläre Liganden und aktvieren nach ihrer Bindung unterschiedliche Signalwege in der Zelle.

Der GLP-1R bindet über zwei extrazelluläre Domänen den C-Terminus von GLP-1 und über eine Transmembrandomäne den N-Terminus. Der Rezeptor ist somit in der Lage, verschiedene strukturelle Merkmale von GLP-1, seiner Agonisten oder Antagonisten zu erkennen. Der Rezeptor besteht aus sieben α-helikalen Transmembrandomänen, drei intrazellulären (ICL 1-3) und drei extrazellulären Loops (ECL1-3) (Palczewski et al., 2000). Der GLP-1R bindet seine Liganden nach der 2-Domänen-Methode (Bergwitz et al., 1996, Hoare, 2005). Zunächst erfolgt eine Bindung des N-Terminus an die C-terminale Region des Liganden. Die daraus folgende Konformationsänderung des Rezeptors aktiviert die N-terminale Region sowie die Kernregion des Rezeptors, wodurch ein aus drei Untereinheiten bestehendes G-Protein aktiviert wird. Dieser Prozess ist in Abbildung 4 schematisch dargestellt.

Die GLP-1R-complementary-DNA (cDNA) wurde 1990 zunächst aus pankreatischen Inselzellen-cDNA Bibliotheken der Ratte und des Menschen geklont und sequenziert und war der erste Nachweis eines GLP-1 Rezeptors (Thorens, 1992). Es zeigte sich ein strukturell gleicher GLP-1R im Ratte und Mensch (Thorens, 1992). Der GLP-1R wird in vielen Geweben (z.B. Lunge, Herz, Nieren, ZNS) exprimiert. Hohe Expressionsraten zeigen α, β und γ Zellen des pankreatischen Gewebes, Leberzellen und Zellen im Hypothalamus (Flint et al., 1998, Flint et al., 2001). Für die vorliegende Arbeit ist die Expression des GLP-1R im Herzen relevant, die kontrovers diskutiert wird. Eine GLP-1R-Expression im atrialen und ventrikulären Myokard wurde initial mit immunhistologischen Methoden beschrieben (Ban et al., 2008, Ussher and Drucker, 2014, Ussher and Drucker, 2012), was in der weiteren Analyse jedoch korrigiert werden musste (Panjwani et al., 2013). Mit Hilfe einer Reporter-Maus, die Cre-Rekombinase in Abhängigkeit des GLP-1R-Promoter exprimiert, konnte eine GLP-1R-Expression ausschließlich in atrialen, nicht jedoch in ventrikulären Kardiomyozyten nachgewiesen werden (Kim et al., 2013, Richards et al., 2014, Pyke et al., 2014). Ventrikuläre Kardiomyozyten sind maßgeblich an der Kontraktion des Herzens beteiligt. Bisher ging man davon aus, dass der kardioprotektive Effekt von GLP-1 auf einer Bindung an GLP-1R auf ventrikulären Kardiomyozyten beruht. Die fehlende Expression des GLP-1R in ventrikulären Kardiomyozyten schließt eine direkte Wirkung aus. Die Lokalisation des GLP-1R im Atrium und auf Endothelzellen (u.a. im Herzen)

spricht für eine indirekte Signalvermittlung. Die Mechanismen der GLP-1 abhängigen Kardioprotektion sind letztlich nicht geklärt (Ussher and Drucker, 2014).

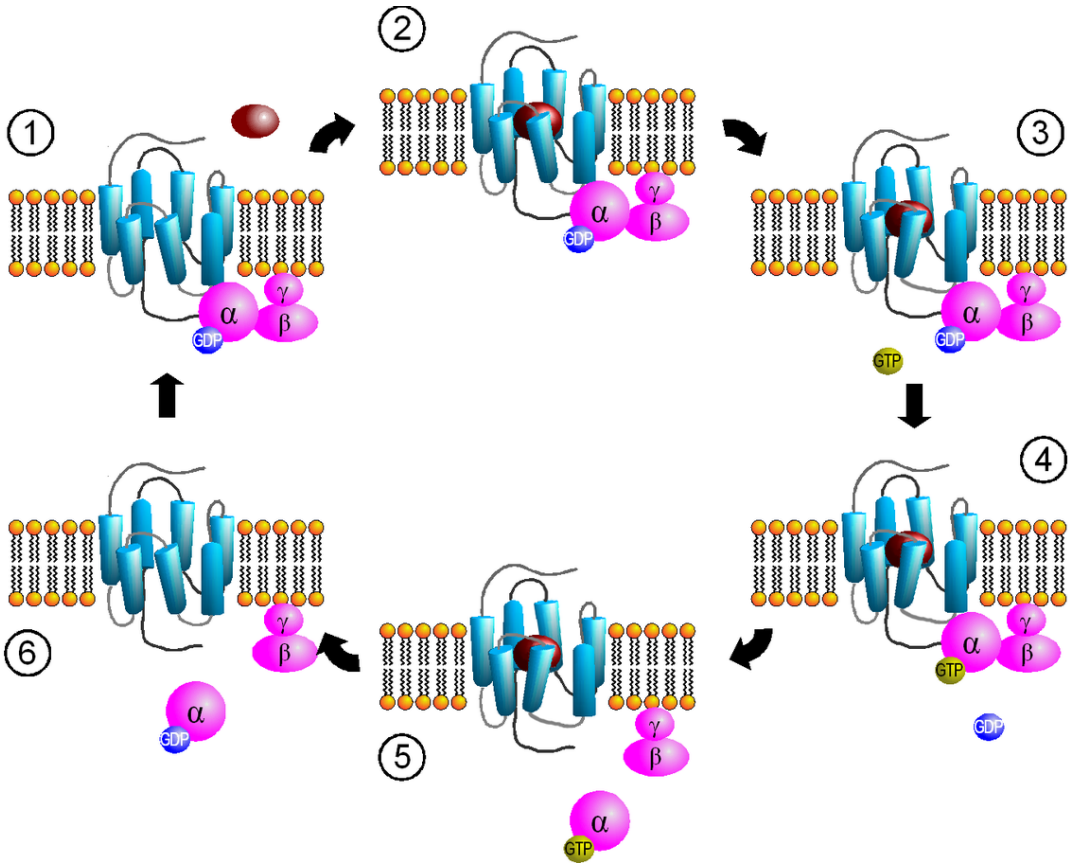


Abbildung 4: Aktivierungszyklus G-Protein gekoppelter Rezeptoren. Sven Jähnichen, CC BY-SA 3.0, https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=730049

Die Funktion des GLP-1R ist bisher am besten in der ß-Zelle des Pankreas untersucht. Hier kommt es durch die Aktivierung des GLP-1R und der Gα1-Einheit zu einer Erhöhung der cAMP-Konzentration (Nauck et al., 1993, Coopman et al., 2010) und folglich zu einer Aktivierung von PKA und des Exchange factor directly activated by cAMP (EPAC) (Shigeta et al., 2012, Sauve et al., 2010, Theiss et al., 2013). Dies bewirkt die Schließung von Kalium-ATP-(K_{ATP})-Kanälen mit nachfolgender Exozytose der Insulin-haltigen Granula. Dieser Prozess ist streng Glukose-abhängig, sodass bei niedrigen Glukosekonzentrationen keine Insulinausschüttung erfolgt, wodurch Hypoglykämien vermieden werden. ß-Zellen nehmen Glukose über den Glukosetransporter (Glut-2) auf und wandeln es in Pyruvat um. Durch die mitochondriale oxidative Phosphorylierung kommt es zu einem Anstieg der zellulären ATP-Konzentration. Der hiermit verbundene Abfall von Adenosindiphosphat (ADP)

führt zu Schießung von K_{ATP}-Kanälen mit verstärktem Ca^{2+}-Einstrom und anschließender Exozytose von Insulin (Baggio and Drucker, 2007).
Gegenwärtig ist nur ein Rezeptor für aktives GLP-1 bekannt. Möglicherweise existieren aber noch weitere GLP-1-Rezeptoren (Ban et al., 2010). Diese Vermutung stützt sich auf dem Befund, dass der GLP-1(9-37)-Metabolit sowohl in Wildtyp- (WT) als auch GLP-1R-Knockout-(KO)-Mäusen vaskuläre und kardioprotektive Wirkungen zeigt (Fung et al., 1998, Nishizawa et al., 2000, Drucker, 2016).

GLP-2R

Der GLP-2R gehört wie der GLP-1R zur Glukagon-Rezeptor-Familie. Der GLP-2R besteht aus 550 Aminosäuren und wird beim Menschen auf Chromosom 17p13.3 kodiert. Die stärkste GLP-2R-Expression wurde im gastrointestinalen Trakt (Magen, Colon, Jejunum, Ileum) nachgewiesen (Munroe et al., 1999). In welchen weiteren Zellen der GLP-2R exprimiert wird, kann aufgrund der geringen Sensitivität und Spezifität der verfügbaren Antisera nicht eindeutig geklärt werden (Guan et al., 2006, Orskov et al., 2005, Nelson et al., 2007, Bjerknes and Cheng, 2001). Studien im Menschen und in der Ratte konnten den GLP-2R auf entero-endokrinen Zellen und enterischen Neuronen (Yusta et al., 2000b, Bjerknes and Cheng, 2001) sowie im ZNS (Munroe et al., 1999, Yusta et al., 2000b) lokalisieren. GLP-2 bindet mit hoher Affinität an den GLP-2R. Dagegen zeigen GLP-1 und Glukagon nur eine schwache Affinität zum GLP-2R, ohne ihn zu aktivieren (DaCambra et al., 2000). Im Darm wird der GLP-2R von endokrinen Zellen, sub-endothelialen Myofibroblasten und Neuronen, (Yusta et al., 2000b) nicht jedoch von Zellen der Mukosa (speziell Enterozyten) exprimiert (Bjerknes and Cheng, 2001) obgleich die GLP-2-Wirkung insbesondere bei Mukosazellen nachweisbar ist, sodass ebenfalls eine indirekte Signalvermittlung unter Zwischenschaltung GLP-2-Rezeptor exprimierender Zellen vermutet wird. (Yusta et al., 2000b).
Eine Aktivierung des GLP-2R führt zu einer Erhöhung von cAMP (Yusta et al., 2000b) welches zwar mit einer verbesserten Proliferation der Darmzellen verknüpft ist, jedoch genauere Mechanismen noch ungeklärt bleiben (Mayo et al., 2003, Yusta et al., 2000a, Yusta et al., 2002, Yusta et al., 2000b). Auch der GLP-2(3-33) Metabolit bindet als partieller Agonist an den GLP-2R, allerdings ohne diesen im vollen Ausmaß zu aktivieren. Entsprechend wirkt GLP-2(3-33) in pharmakologischen Konzentrationen als partieller Agonist, bei physiologischen Konzentrationen jedoch als Antagonist am

GLP-2R (Shin et al., 2005, Thulesen et al., 2002). Kürzlich wurde gezeigt, dass auch weitere Metabolite des GLP-2, insbesondere GLP-2(11-33) antagonistische Wirkungen am GLP-2R aufweisen (Thulesen et al., 2002, Yamazaki et al., 2013). In der vorliegenden Arbeit wir GLP-2(3-33) als Antagonist der GLP-2-Wirkung verwendet.

1.4 GLP-1/2R-Agonisten und -Antagonisten

GLP-1R-Agonisten und Antagonisten

Die Aktivität des GLP-1R lässt sich über verschiedene Peptide modulieren. So wurde Exendin-9 (Ex-9) als inverser Agonist (Takahashi, 2010) und Exendin-4 (Ex-4) als Agonist (Göke et al., 1993) identifiziert. Bei Ex-4 handelt es sich um ein DPP-4 resistentes, den GLP-1R aktivierendes Peptid, das aus der Gila-Krustenechse isoliert und 2005 als erstes Inkretin-Mimetikum zugelassen wurde (Eng et al., 1992, Furman, 2012). Interessanterweise besitzt Ex-4 nur 53% Sequenzhomologie zu GLP-1(7-36)Amid, fungiert aber am GLP-1R als voller Agonist.

Bei dem bekannten GLP-1R-Antagonisten Ex-9 handelt es sich um ein um 8 Aminosäuren N-terminal verkürztes Ex-4 (Schirra et al., 1998, Göke et al., 1993). Ex-9 ist ein inverser Agonist am GLP-1R und belegt diesen mit hoher Affinität, wodurch die Bindung von anderen Agonisten oder nativem GLP-1 verhindert wird. Dadurch wird die Signalweiterleitung über den GLP-1R blockiert (Calabria et al., 2012, Serre et al., 1998). Die Blockade vom GLP-1R durch Ex-9 wurde in *in vitro* und *in vivo* Experimenten nachgewiesen (Scrocchi et al., 1996, Serre et al., 1998). *In vivo* wird die nahrungsabhängige Insulinsekretion von GLP-1 durch Ex-9 gehemmt (Bose et al., 2005a, Nikolaidis et al., 2005a).

Die GLP-1R-Agonisten lassen sich nach ihrer Halbwertszeit in kurz und lang wirksame Agonisten einteilen. Zu den kurz wirksamen GLP-1R-Agonisten (Halbwertszeit 2–5 h) zählen Exenatid und Lixisenatid, zu den lang wirksamen (Halbwertszeit 12 h – mehrere Tage) Liraglutid, Albiglutid, Semaglutid und Duraglutid. Tabelle 1 zeigt, dass sich kurz und lang wirksame GLP-1R-Agonisten in ihren Effekten unterscheiden.

Tabelle 1: Vergleich von kurz und lang wirksamen GLP-1-Agonisten. Tabelle modifiziert nach (White and Baker, 2016) (Meier, 2012)

Parameter	Kurz wirksame GLP-1R-Agonisten	Lang wirksame GLP-1R-Agonisten
Medikamente	Exenatid Lixisenatid	Albiglutid Dulaglutid Exenatid LAR Liraglutid
Halbwertszeit	2-5 h	12 h bis mehrere Tage
Effekte		
Blutglukosewerte (nüchtern)	Mäßige Reduktion	Starke Reduktion
Hyperglykämie (postprandial)	Starke Reduktion	Mäßige Reduktion
Insulinsekretion (nüchtern)	Mäßige Stimulation	Starke Reduktion
Insulinsekretion (postprandial)	Reduktion	Mäßige Reduktion
Glukagon Sekretion	Reduktion	Reduktion
Magenentleerung	Verlangsamt	Kein Effekt
Blutdruck	Reduktion	Reduktion
Herzfrequenz	Kein Effekt	Mäßige Steigerung (2–5 Schläge pro Minute)

GLP-2R-Agonisten und -Antagonisten

Zu den intestinalen Wirkungen von GLP-2 gehören (a) ein erhöhtes intestinales Wachstum mit Proliferation der Kryptzellen, Inhibition von Apoptose und Steigerung der Villi Höhe (Drucker et al., 1996, Tsai et al., 1997a, Tsai et al., 1997b), (b) eine verbesserte intestinale Barrierefunktion und damit verringerte Darmpermeabilität (Benjamin et al., 2000) und (c) eine gesteigerte Energieabsorption durch eine verbesserte Nährstoffaufnahme durch die Expression von Nährstofftransportern und Verdauungsenzymen (Brubaker et al., 1997b, Kato et al., 1999, Jeppesen et al., 2001b).

In der Klinik wird Teduglutid als ein durch die Food and Drug Administration (FDA) und in der EU zugelassener GLP-2R-Agonist verwendet. Teduglutid besteht aus der gleichen Peptidsequenz wie GLP-2, lediglich Alanin an Position 2 wurde durch Glycin ersetzt. Dadurch entsteht eine erhöhte Resistenz gegenüber DPP-4. Teduglutid zeigt bei SBS-Patienten günstige Eigenschaften bezüglich der Villi Länge, Krypten Tiefe und Absorption von Nährstoffen (Jeppesen et al., 2011, Jeppesen et al., 2005). Weitere

Agonisten wie ZP1848, ZP1846 und FE203799 sind derzeit in der klinischen Entwicklung (Skarbaliene et al., 2011, Hargrove et al., 2011). Diese Mimetika sollen beim SBS und bei IBD (Morbus Crohn (MC) und Colitis Ulcerosa (CU)) eingesetzt werden. In einem SBS-Mausmodell wurde eine Stimulation des Mukosawachstums, eine Reduktion der Diarrhoe und eine gesteigerte Proliferation der Kryptzellen beobachtet (Jeppesen et al., 2011, Skarbaliene et al., 2011, Wisniewski et al., 2016). Einige dieser Effekte (z.B. verbesserte Krypten Tiefe und Villi Höhe, verbesserte Energieabsorption durch gesteigerte Nährstoffaufnahme) wurden auch in SBS-Patienten nachgewiesen, wobei jedoch vereinzelt Übelkeit und abdominale Schmerzen auftraten (Jeppesen et al., 2011, Jeppesen et al., 2012, Jeppesen et al., 2005).

GLP-1 und GLP-2 haben je nach Peptid besonderen Einfluss auf:

1. **Den Verdauungstrakt**
2. **Den Glukosemetabolismus**
3. **Das kardiovaskuläre System**

Im nun Folgenden Teil möchte ich auf die einzelnen Punkte und die Wirkung der Peptide genauer eingehen.

1.5 GLP-1/2 im Verdauungstrakt

Die Peptidhormone GLP-1/2 werden insbesondere im Verdauungstrakt prozessiert und sezerniert. Es folgt eine Übersicht über die Anatomie und die Funktionen des Verdauungstraktes sowie die hierfür relevante Wirkung von GLP-1/2.

Anatomie und Funktion

Der Verdauungstrakt hat die Aufgabe, Nahrung aufzunehmen, zu zerkleinern und weiter zu transportieren sowie Unverdauliches auszuscheiden. Des Weiteren spielt er eine Rolle bei der Regulation des Immunsystems (Mason et al., 2008). Der Verdauungstrakt umfasst verschiedene Organe. In der Mundhöhle und im Rachen (Kopfteil) erfolgt die erste mechanische Zerkleinerung der Nahrung. Der Rumpfteil des Verdauungstraktes besteht aus Magen, Dünn- und Dickdarm sowie Leber und Pankreas. Das Pankreas sezerniert Enzyme, die die Nahrung in Bestandteile (Monosaccharide, Aminosäuren und Fette) zerlegen, die der Körper verwerten kann (Johnson, 2013). Die Leber produziert Gallenflüssigkeit die über die Gallenblase in den

Darm sezerniert wird und ebenfalls bei der Verdauung des der Nahrung helfen, besonders bei der Verwertung von Fetten. Da in der vorliegenden Arbeit die Eigenschaften von GLP-1/2 im Mittelpunkt stehen, soll hier der Dünn- und Dickdarm näher beschrieben werden.

Der Dünndarm ist mit seinen Abschnitten Duodenum, Jejunum und Ileum ca. 3–5 m lang. Hier erfolgt der Abbau der Nahrung durch Enzyme sowie die Resorption der Nahrungsbestandteile (Johnson, 2013, Robert G. Carroll, 2007). Im anschließenden Dickdarm werden Wasser und Salze resorbiert. Die im Darm befindlichen Bakterien helfen bei der Zersetzung unverdaulicher Bestandteile mit und versorgen den Organismus mit Vitaminen (z.B. Vitamin K). Diese symbiotische Beziehung des Organismus mit verschiedenen Bakteriengattungen ist wichtig für die Verdauung, Immunabwehr und Nährstoffversorgung (Mason et al., 2008, Belkaid and Hand, 2014). Die nach der Nahrungsaufnahme sezernierten entero-endokrinen Peptide stimulieren und inhibieren die Peristaltik und haben so eine unterstützende oder hemmende Funktion auf die Verdauung (OpenStax, 2014, Baggio and Drucker, 2007, Campbell and Drucker, 2013, Drucker and Yusta, 2014).

Aufbau der Darmwand

Die vierschichtige Darmwand besteht aus der Mukosa, Submukosa, Muscularis externa und Serosa (Patton, 2009, Johnson, 2013). Wie Abbildung 5 zeigt, sind diese Schichten nochmals unterteilt. Bei der Mukosa können das Epithelium, die Lamina propria und eine dünne Muskelschicht als Abtrennung zur Submukosa unterschieden werden. Für die vorliegende Arbeit ist die Mukosa relevant, die den gesamten Verdauungstrakt auskleidet. Die Mukosa im oberen Teil des Verdauungstrakts hat die Aufgabe, den Organismus vor mechanischen, chemischen und thermischen Einflüssen zu schützen. Im unteren Teil (Magen, Dünn- und Dickdarm) kommt zu dieser Barrierefunktion noch eine sekretorische Funktion hinzu. Die Mukosa sezerniert u. a. Schleim und Enzyme (Peterson and Artis, 2014, Johnson, 2013). Die Epithelschicht bildet für die meisten Nährstoffe eine impermeable Barriere. Daher findet der Transport von Nährstoffen meist über Membranproteine (aktive oder passive Transportmechanismen) statt (Johnson, 2013). Durch die in der Mukosaschicht gelegenen Blutgefäße werden endokrine Hormone und Nährstoffe in die Darmwand transportiert und Nährstoffe abtransportiert. Die Lamina propria der Mukosa ist wesentlich an der Abwehr von Pathogenen beteiligt. Die Muscularis Mukosa ist

zusammen mit weiteren Schichten des Darms (Submukosa und Muscularis externa) für die Schluckbewegung, Motilität und die peristaltischen Bewegungen des Darms verantwortlich (Patton, 2009).

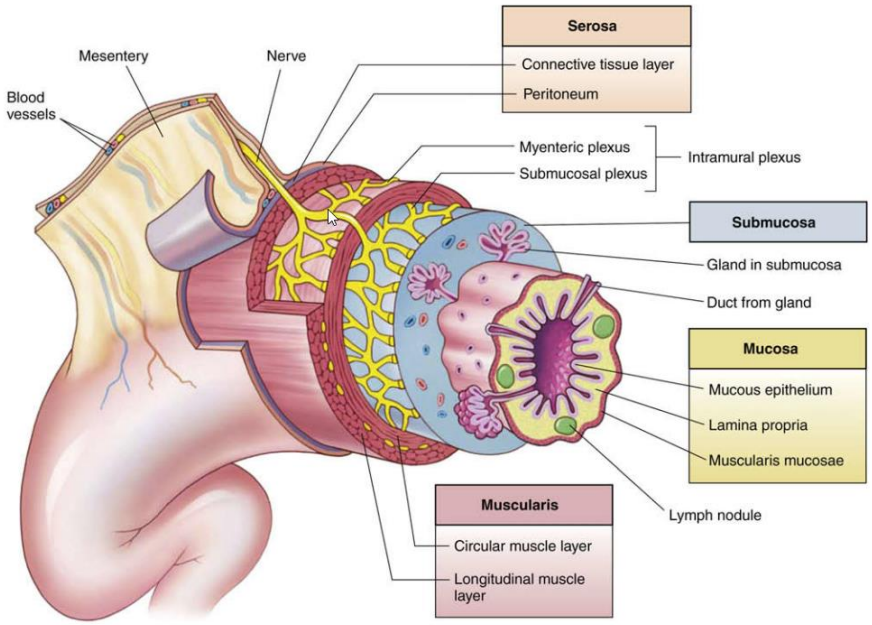


Abbildung 5: Querschnitt durch die vier Schichten des Darmes – Serosa, Submukosa, Mukosa und Muscularis. Adaptiert nach (Patton, 2009)

Der Hauptanteil der Nährstoffaufnahme findet im Dünndarm statt (Johnson, 2013). Durch die Länge und die Faltung (Kerckring-Falten) des Dünndarmes kommt es zu einer verlängerten Verweildauer der Nahrung im Darm und damit zu einer intensiveren Nährstoffabsorption. Die Mukosa des Dünndarms enthält die für den Dünndarm typischen Zotten (Villi) mit den darauf befindlichen Mikrovilli. Die daraus resultierende Oberflächenvergrößerung des Darms erhöht die Absorption von Nährstoffen (s. Abb. 6 A). Alle Villi besitzen eine eigene Versorgung mit Blutgefäßen und durch Stammzellen, die in der Wurzel jedes Villus liegen. Die Enterozyten (Epithelzellen) des Darmes erneuern sich fortwährend, sodass innerhalb von 4–7 Tagen alle Epithelzellen des Darmes neu gebildet werden. Neben Epithelzellen befinden sich auch entero-endokrinen Zellen in der Epithelschicht, die für die GLP-1/2-Ausschüttung verantwortlich sind. Bei Nahrungskontakt oder als Reaktion auf neuro-endokrine Signale werden, wie oben beschrieben, die GLP-Peptide direkt ins Blut abgeben (Johnson, 2013, Baggio and Drucker, 2007, Campbell and Drucker, 2013).

Der Dickdarm ist im Vergleich zum Dünndarm wesentlich kürzer und besitzt aufgrund der fehlenden Villi eine geringere Oberfläche. Stattdessen kommen im Dickdarm Krypten (Einstülpungen in die Darmwand) vor, die ebenfalls eine Oberflächenvergrößerung bewirken. Die auskleidenden Zellen der Krypten besitzen Mikrovilli, die für die Wasserresorption zuständig sind (s. Abb. 6 B). Die Hauptaufgabe des Dickdarms ist die Resorption von Wasser und Elektrolyten aus dem Nahrungsbrei (Specian and Oliver, 1991).

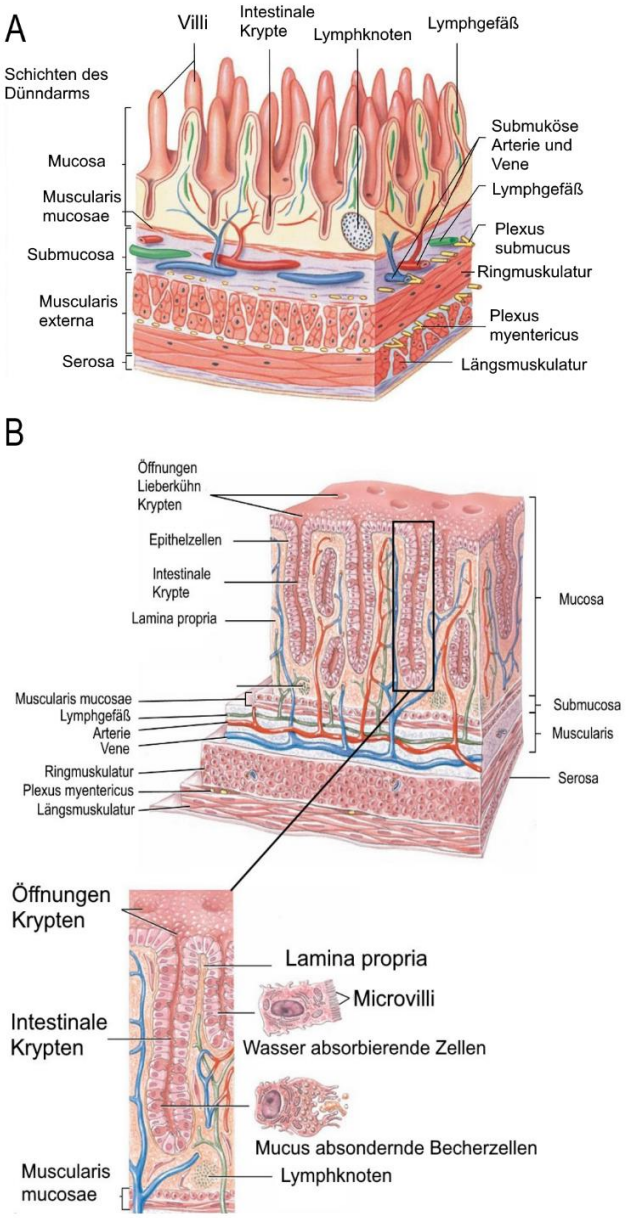


Abbildung 6: Aufbau der Darmwand. **A:** Querschnitt der Dünndarmwand. **B:** Querschnitt der Dickdarmwand mit Ausschnitt einer einzelnen intestinalen Krypte. Adaptiert und modifiziert nach (Management, 2019, Silverthorn, 2019)

Inflammatorische Darmerkrankungen

Die Inzidenz und Prävalenz der IBD hat in den vergangenen Jahren zugenommen. Zu den häufigsten IBD zählen MC und UC, die in Deutschland 200–500 Menschen pro 100.000 Einwohner betreffen (Baumgart and Carding, 2007). Weltweit sind aktuell ca. 5 Millionen Menschen an einer IBD erkrankt, davon allein in den USA 1,4 Millionen und in der EU 3,4 Millionen (Burisch et al., 2013). Damit sind insbesondere industriell fortschrittliche Länder von der Erkrankung betroffen (Molodecky et al.). Regionale Häufungen von IBD-Erkrankungen lassen vermuten, dass Umwelteinflüsse und der Lebensstil an der Pathogenese beteiligt sind (Shivananda et al., 1996). Eine IBD wird häufig in den ersten 20 Lebensjahren oder nach dem 65. Lebensjahr diagnostiziert (Rogers et al., 1971, Mir-Madjlessi et al., 1986). Mit einer IBD ist eine um 34% gesteigerte Mortalität gegenüber gesunden Patienten im gleichen Alter verknüpft (Wolters et al., 2006, Bewtra et al., 2013).

Bei UC und MC handelt es sich um komplexe, immunologisch vermittelte Erkrankungen des Darmes. Klinisch unterscheiden sich beide Erkrankungen durch die Lokalisation sowie die beteiligten Wandabschnitte des Darms. Während MC den gesamten Darm befallen kann, ist die UC auf das Kolon begrenzt. Die Auslöser dieser Krankheiten sind trotz intensiver Forschung nicht exakt bekannt. Im Verdacht stehen genetische Veranlagung, immunologische Veränderungen aber auch mikrobielle und bakterielle Reize (Podolsky, 2002, Kugathasan and Fiocchi, 2007). Des Weiteren spielen die Ernährung, Hygiene und Medikamente eine entscheidende Rolle (Ananthakrishnan, 2015). Als weitere Ursache werden Autoimmunerkrankungen in Betracht bezogen, bei denen sich das Immunsystem gegen Zellen des gastrointestinalen Traktes richtet (Baumgart and Carding, 2007, Xavier and Podolsky, 2007, Baumgart and Sandborn, 2007). Dagegen stellt Rauchen nur für MC einen Risikofaktor dar, wirkt jedoch protektiv gegen UC (Cottone et al., 1994). In den vergangenen Jahren konnten einige Gene, darunter die für Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein-(NOD)-2, inflammatory bowel disease protein-(IBD)-1 und IL-23R identifiziert werden, die zur Entstehung von IBD beitragen (Ogura et al., 2001, Hugot et al., 2001, Okazaki et al., 2008). Insgesamt werden über 150 Gene mit einer Protektion oder einem erhöhten Risiko bei IBD in Verbindung gebracht (Huttenhower et al., 2014). Die genannten Risikofaktoren können eine IBD begünstigen oder auslösen, sind jedoch nicht alleine für deren Auftreten verantwortlich. Vielmehr wird von einer multifaktoriellen Genese ausgegangen.

Patienten mit IBD werden meist medikamentös behandelt. Beim Auftreten von Komplikationen, wie Stenosen, Fisteln oder schweren Blutungen, kann eine Resektion von betroffenen Darmabschnitten notwendig werden. Werden größere Darmabschnitte reseziert, so ist der verbleibende Darm möglicherweise nicht mehr in der Lage, die Nahrung im ausreichenden Masse zu verdauen und Nährstoffe zu resorbieren, wodurch ein SBS entsteht (Thompson et al., 2003). Bei IBD sind je nach Entität (UC oder MC) die Funktionen des Dünn- und/oder des Dickdarms betroffen. Im Dickdarm kommt es durch die reduzierte Anzahl von Epithelzellen zu einer gestörten Rückresorption von Salzen und Wasser (Dorofeyev et al., 2013, Robert G. Carroll, 2007). Im Dünndarm tritt durch die Inflammation und Zellschädigung eine verminderte Nährstoffaufnahme auf (Dorofeyev et al., 2013, Robert G. Carroll, 2007).

Patienten mit IBD weisen inflammationsbedingt eine gestörte Darmflora auf, was mit einem erhöhten Risiko für *clostridium difficile* Infektionen (CDI) einhergeht. CDI treten häufig in Krankenhäusern unter einer Therapie mit Antibiotika auf, kommen in den vergangenen Jahren jedoch zunehmend häufiger auch in der Allgemeinbevölkerung vor (Loo et al., 2005, Chitnis et al., 2013). Klinisch manifestiert sich eine CDI mit Durchfall als pseudomembranöse Colitis (Bartlett et al., 1978), die unbehandelt in eine Sepsis mit Multiorganversagen übergehen kann. Am häufigsten sind Patienten über 65 Jahre, immunsupprimierte Personen oder Patienten mit früheren CDI-Erkrankungen betroffen (Pepin et al., 2005). Die Inzidenz liegt bei bis zu 20 Fällen pro 100.000 Einwohnern in Deutschland und bei weit über 100 Fällen pro 100.000 Einwohnern in Nordamerika (Burckhardt et al., 2008, Grünewald et al., 2010). Die Entwicklung geht auch mit einer steigenden CDI-bedingten Mortalität einher. CDI haben mit 14000 Toten/Jahr Multi-resistenter Staphylococcus aureus (MRSA)-bedingte Todesfälle bereits abgelöst (Miller et al., 2011). Sieben von 10.000 stationären Patienten entwickeln in der EU eine CDI (Davies et al., 2014).

Clostridium difficile ist ein grampositives, anaerobes Bakterium, das primär nicht pathogen ist. Als Folge eines Selektionsdrucks können Enterotoxin A und Zytotoxin B bildende, virulente Stämme entstehen (Bartlett et al., 1978, Solomon, 2013). Durch die Toxine werden Epithelzellen zerstört und pro-inflammatorische Zytokine freigesetzt, die zu einer akuten, großflächigen Inflammation im Darm führen (Vedantam et al., 2012, Solomon, 2013). Kürzlich wurde ein zusätzliches Toxin in hypervirulenten Stämmen entdeckt, das die Wirkung der beiden bekannten Toxine verstärkt (Kelly and LaMont, 2008, Gerding et al., 2014). Die Toxine schädigen die Darmmorphologie und

-funktion. Aktuell werden CDI mit bakteriostatischen Antibiotika behandelt (Bolton and Culshaw, 1986, Goldstein et al., 2012). Durch den Einsatz von Antibiotika wird eine Resistenzbildung begünstigt. Versagen die Antibiotika kann eine chirurgische Therapie notwendig werden (Lübbert et al., 2014).

Zusammengefasst schädigen IBD und CDI die Funktionen (Resorption und Sekretion von Nährstoffen/Enzymen, Wasserhaushalt, Motilität) des Darmes. Die Effekte sind auf eine Schädigung der Morphologie des Darms (Reduktion der Villi Höhe, Kryptenverkürzung, geringerer Kryptendichte, unregelmäßige Mukosaschicht) durch nekrotische Prozesse zurückzuführen (Geboes and Dalle, 2002). In den vergangenen Jahren wurden für GLP-2 protektive und regenerative Eigenschaften in Mausmodellen (Booth et al., 2004, Skarbaliene et al., 2011) und bei Patienten mit IBD bzw. SBS beschrieben (Jeppesen et al., 2011).

Für die Erforschung von IBD gibt es verschiedene etablierte Tiermodelle. Durch die Gabe von Dextran-Sodium-Sulfat (DSS) kann eine Colitis konzentrationsabhängig chemisch induziert werden (Perše and Cerar, 2012). Die DSS-induzierte Colitis spricht auf Standardtherapien der IBD wie der Applikation von Tumornekrosefaktor-(TNF)-α-Antikörper an (Murthy et al., 1999). Die DSS-induziere Colitis ist ein klinisch relevantes Modell, das in der experimentellen Durchführung jedoch aufgrund der herstellerabhängigen Variation der DSS-Partikel sowie durch den Einfluss der Darmflora einer hohen Variabilität unterliegt (Solomon et al., 2010). Aufgrund der weiten Verbreitung und der klinischen Relevanz wurde dieses Modell auch in der vorliegenden Untersuchung verwendet.

Ein weiteres Mausmodell für eine IBD ist die pseudomembranöse Colitis durch eine Infektion mit dem Bakterium *Clostridium difficile*. Bei diesem Modell erfolgt, nach der Zerstörung der natürlichen Darmflora durch eine Antibiotikatherapie, die Infektion des Darms mit *Clostridium difficile*. Die Toxine des sich schnell vermehrenden Bakteriums führen zu einer schweren Darmerkrankung mit starkem Flüssigkeitsverlust durch Diarrhoe (Chen et al., 2008). Auch dieses Modell wurde in der vorliegenden Untersuchung verwendet.

GLP-2 in inflammatorischen Darmerkrankungen

Die exogene Applikation von GLP-2 führt im Mausmodell zu einer verringerten Apoptose und erhöhten Proliferation der Epithelzellen des Darms (Tsai et al., 1997b, Drucker et al., 1996). GLP-2 inhibiert in murinen sub-epithelialen Myofibroblasten cAMP-abhängig die Inhibition der Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) und nachfolgend die Apoptose (Yusta et al., 2000a, Yusta et al., 2002). Durch eine Antagonisierung des GLP-2R kommt es im murinen SBS-Modell zu einer gestörten Kryptzellmorphologie mit defekter Mukosaschicht, die auch bei GLP-2-KO-Mäusen auftritt (Bahrami et al., 2010). In weiteren präklinischen Studien wurde festgestellt, dass GLP-2 die Barrierefunktion des Darms verbessert und die zelluläre Resorptionskapazität der Darmmukosa im diabetischen Mausmodell und im Enteritis-Mausmodell erhöht (Cani et al., 2009, Lee et al., 2012). Diese Befunde wurden in verschiedenen IBD-Modellen bestätigt (Benjamin et al., 2000, Kouris et al., 2001), was durch die Induktion von anti-inflammatorischen Mediatoren sowie durch eine effizientere Ausbildung von tight junctions bedingt wird. In verschiedenen präklinischen IBD-Modellen wurde gezeigt, dass GLP-2 zu einem verbesserten Überleben, reduziertem Epithelschaden, geringeren Bakterientranslokation, verbesserter Darmmorphologie und Reduktion inflammatorischer Zytokine wie TNF-α und Interferon-(IFN)-γ führt (Guan et al., 2005, Prasad et al., 2000, Drucker et al., 1999, L'Heureux and Brubaker, 2003).

Des Weiteren führt GLP-2 in Mukosa-Zelllinien sowie primären Astrozyten PKA-abhängig zu einer gesteigerten Proliferation und verminderten Apoptose unter Beteiligung verschiedener Signalwege (u.a. Caspase-3, Caspase-8 und Glykogensynthase Kinase 3 (GSK3) (Shin et al., 2005).

Darüber hinaus wirkt GLP-2 auch außerhalb des Darmes und führt in SBS-Patienten über eine gesteigerte Mineralienabsorption zu einer erhöhten Knochendichte (Haderslev et al., 2002), was eine mögliche Behandlungsoption für eine Osteoporose darstellt (de Heer et al., 2007, Henriksen et al., 2003, Henriksen et al., 2004, Henriksen et al., 2007).

Beim SBS bewirkt GLP-2 eine schnelle Flüssigkeits- und Elektrolytaufnahme (Madsen et al., 2013). Die schnellere Energiegewinnung und Gewichtszunahme durch die verbesserte Nährstoffaufnahme äußert sich auch in einer verbesserten Mukosahistologie (Jeppesen et al., 2001a). GLP-2 erhöht in SBS-Patienten das Körpergewicht und förderte die Endothelproliferation des Darms mit gesteigerter

Villilänge und Mukosadicke (Liu et al., 2006, Scott et al., 1998, Washizawa et al., 2004). Auch das bereits in der Klinik verwendete GLP-2-Analog Teduglutid bewirkt in Mäusen eine Zunahme der Krypten Tiefe und Villi Höhe, wodurch sich das Überleben von Mäusen in einem Strahlungsmodell (Modell für Mukositis von Radio/Chemotherapie Patienten) verbessert (Booth et al., 2004). Die Effekte von Teduglutid konnten in ersten SBS-Patientenstudien bestätigt werden (Jeppesen et al., 2011).

Ob die proliferationssteigernde Wirkung von GLP-2 ein onkogenes Potential beinhaltet ist unklar. Die GLP-2R-mRNA wurde in humanen karzinogenen Tumorzellen nachgewiesen (Trivedi et al., 2012, Koehler et al., 2008). Im präklinischen Kolonkarzinom-Mausmodell (Iakoubov et al., 2009, Thulesen et al., 2004) und Xenograft-Mausmodell (Koehler et al., 2008) verstärkt GLP-2 die Tumorgenese. Interessanterweise ließ sich das Tumorwachstum durch Applikation eines GLP-2R-Antagonisten reduzieren (Iakoubov et al., 2009). Andere Studien fanden dagegen keine erhöhte Kanzerogenität von GLP-2 Analoga in Zelllinien und Mäusen (Koehler et al., 2008, Thulesen et al., 2004, Iakoubov et al., 2009, Jeppesen et al., 2011). Zusammenfassend belegen die Daten, dass eine durch GLP-2 ausgelöste, gesteigerte Karzinogenität vom gewählten Modell abhängt. Trotz dieser Befunde ergaben sich in den Studien mit Teduglutid keine Sicherheitsbedenken und keine Hinweise für eine erhöhte Malignomhäufigkeit beim Menschen, wobei die Nachbeobachtung auf 24 Monate begrenzt war (Schwartz et al., 2016). Die Langzeitwirkung von GLP-2 beim Menschen bleibt unklar. In Abbildung 7 sind die intestinalen und extra-intestinalen Eigenschaften von GLP-2 zusammengefasst.

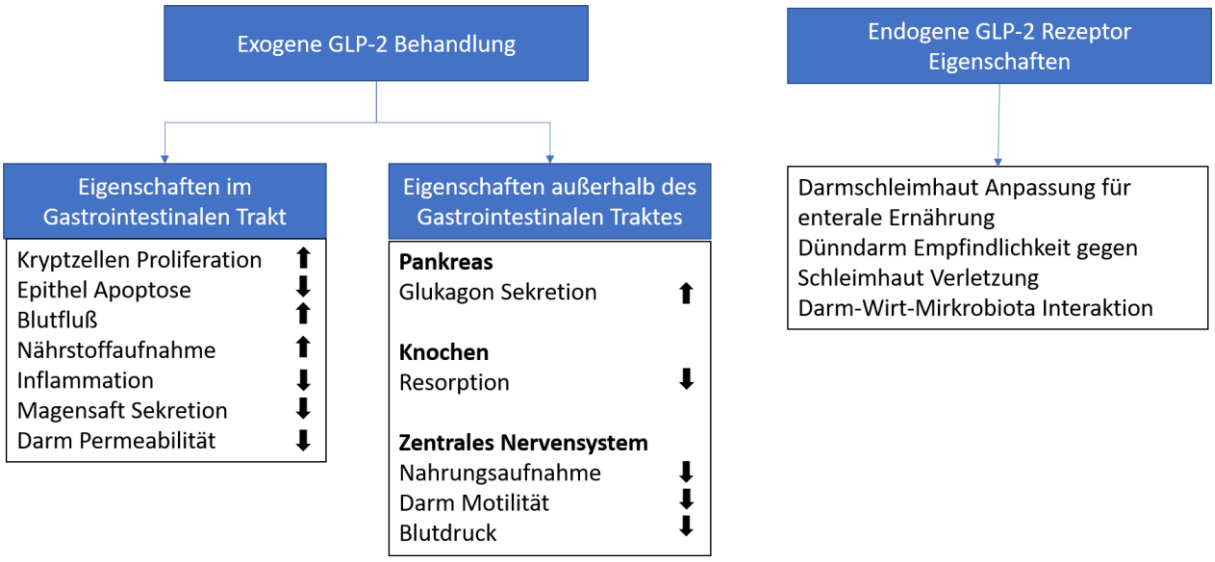


Abbildung 7: Pharmakologische und Physiologische Mechanismen von GLP-2. Gezeigt werden Auswirkungen von exogenem GLP-2 auf den gastrointestinalen Trakt und andere Wirkorte und die Eigenschaften des GLP-2R. Schema adaptiert und modifiziert nach (Drucker and Yusta, 2014)

1.6 Glukosemetabolismus / Diabetes mellitus / GLP-1/2

GLP-1/2 werden nach Nahrungsaufnahme von endokrinen L-Zellen des Darms sezerniert. GLP-1 bindet an den GLP-1R auf pankreatischen β-Zellen und führt zu einer Glukose-abhängigen Steigerung der Insulinsekretion. Die nahrungsabhängige Wirkung gastrointestinaler Hormone auf die Insulinsekretion wurde erstmals 1902 beschrieben und konnte 1980(Bayliss and Starling, 1902, Perley and Kipnis, 1967) vollständig geklärt werden (Kreymann et al., 1987, Creutzfeldt, 1979).

Da metabolische Erkrankungen wie DM eine steigende Prävalenz aufweisen und GLP-1 durch seine Insulin-sezernierende Wirkung eine therapeutische Option für den DM darstellt, wird im Folgenden auf die Epidemiologie und Pathogenese des DM genauer eingegangen.

Diabetes mellitus

DM ist eine komplexe metabolische Erkrankung des Glukose- und Insulinstoffwechsels (Ahmed, 2002). Dabei ist der Organismus aufgrund einer gestörten Insulinsekretion und/oder Insulinwirkung nicht mehr in der Lage, die Glukosekonzentration im Blut zu regulieren (NIH, 2016).

Der DM lässt sich in zwei Typen einteilen. Typ-1 DM ist eine Autoimmunerkrankung, die zumeist im jungen Alter auftritt und zu einem kompletten Verlust der pankreatischen β-Zellen und der Insulinsekretion führt. Entsprechend sind Patienten

mit Typ-1 DM auf eine exogene Insulinapplikation angewiesen (Atkinson et al., 2014). Typ-2 DM tritt meist im mittleren bis hohen Alter auf und zeichnet sich durch eine verminderte Insulinwirkung (Insulinresistenz) aus, die initial durch eine gesteigerte Insulinproduktion kompensiert werden kann, bei sekundärem Versagen der β-Zellen jedoch zur Manifestation eines DM führt.
Typ-2 DM ist mit 90–95% die häufigste Form des Diabetes (Olokoba et al., 2012, NIH, 2016). Beim Typ-2 DM sind Übergewicht, Adipositas und die genetische Veranlagung die Hauptrisikofaktoren ((CDC). 2004). Weitere Risikofaktoren wie eine geringe physische Aktivität, Zigaretten und Alkoholkonsum tragen zur Entstehung eines Typ-2 DM bei (Hu et al., 2001). Im direkten Zusammenhang steht der Typ-2 DM auch mit dem metabolischen Syndrom, das durch eine Kombination aus Übergewicht, Bluthochdruck und gestörtem Fett- und Glukosestoffwechsel charakterisiert ist. Für die komplexe Erkrankung gibt es aktuell verschiedene Therapieformen, darunter die oben erwähnten GLP-1-Analoga und DPP-4 Inhibitoren.

Einfluss von GLP-1 auf den Metabolismus

GLP-1 beeinflusst den Glukosemetabolismus entscheidend (Nauck, 2011) und führt zu einer Stimulation der Glukose-abhängig Insulinsekretion nach Nahrungsaufnahme (Gromada et al., 2004, Nauck et al., 2004). Daneben reduziert GLP-1 auch den Appetit, was zu einer geringeren Nahrungsaufnahme und Kalorienzufuhr führt. Des Weiteren wird die Magenentleerung verlangsamt. Diese Effekte wurden sowohl in gesunden Kontrollpatienten aus auch in Typ-2 DM-Patienten gezeigt (Nauck et al., 2004, Flint et al., 1998, Flint et al., 2001, Verdich et al., 2001). In Tiermodellen verbesserte GLP-1 die β-Zell-Neogenese, das β-Zell-Wachstum und die β-Zell-Regeneration und führte so zu einer höheren β-Zell Masse (Xu et al., 1999, Stoffers et al., 2000, Hui et al., 2001, Rolin et al., 2002). *In vitro* inhibierte GLP-1 die β-Zell-Apoptose PI3K-abhängig (Hui et al., 2003). Darüber hinaus hat GLP-1 weitere günstige Eigenschaften, z.B. auf das kardiovaskuläre System (s. Kap. 1.7). In Abbildung 8 wird die GLP-1 Wirkung auf unterschiedliche Organe dargestellt.

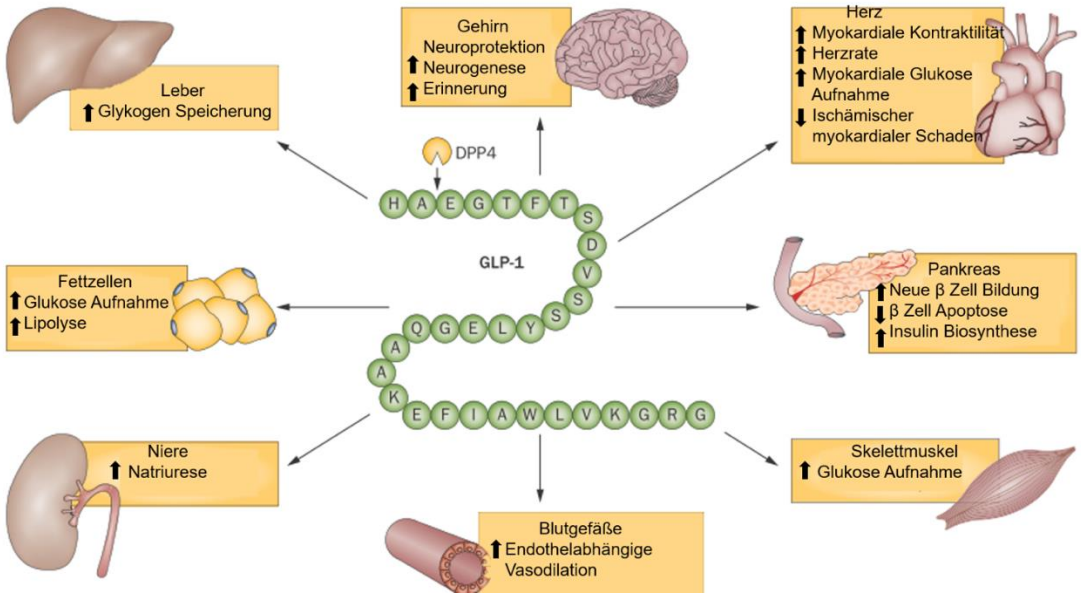


Abbildung 8: Effekt von GLP-1 auf verschiedene Gewebe Glucagon like peptide 1 (GLP-1) weist eine Wirkung auf das Herz, das Pankreas, den Skelettmuskel, die Blutgefäße, die Niere, die Fettzellen, die Leber und das Gehirn auf. Adaptiert und modifiziert nach (Meier, 2012)

1.7 Kardiovaskuläres System und GLP-1/2

Zu den wesentlichen Komplikationen des DM zählen mikro- und makrovaskuläre Erkrankungen. In experimentellen Modellen konnten die kardioprotektiven Eigenschaften von GLP-1 demonstriert werden (Bose et al., 2005a, Bose et al., 2005c, Nikolaidis et al., 2005b, Sokos et al., 2006, Read et al., 2012, Read et al., 2010). In einer aktuellen Metaanalyse randomisierter Studien führt die klinische Anwendung von GLP-1R-Agonisten- zu einer signifikanten Reduktion der kardiovaskuläre Mortalität (Monami et al., 2017).

Herzerkrankungen – Mortalität und Risikofaktoren

Kardiovaskuläre Erkrankungen (CVD) sind die häufigste Todesursache weltweit. 2015 starben insgesamt 17,7 Millionen Menschen an CVD, was 31% der globalen Todesfälle entsprach (WHO, 2017). Besonders betroffen ist dabei die Bevölkerung in Ländern mit geringem und mittlerem Einkommen. In armen Gesellschaftsschichten erkranken Menschen öfters in jungen Jahren an einem Myokardinfarkt (MI). Auch die Reinfarkt-Rate ist in wohlhabenderen Gesellschaftsschichten höher. In den Industrienationen beträgt das Sterberisiko durch einen MI ungefähr 10% (White and Chew, 2008, O'Gara et al., 2013).

Unter CVD werden Erkrankungen der Herzgefäße (z.B. MI) und zerebrovaskuläre Erkrankungen (z.B. zerebrale Durchblutungsstörungen) zusammengefast (s. Abb. 9). Relevante Risikofaktoren sind (a) eine ungesunde Ernährung (b) DM (c) Tabakkonsum (d) Arterielle Hypertonie(e) Adipositas (f) genetische Veranlagung (WHO, 2017). Einige der genannten Risikofaktoren sind vermeidbar und können durch Medikamente (z.B. Blutdrucksenker) oder Lebensstiländerungen (z.B. Ernährungsumstellung) reduziert werden (Wong, 2014) (siehe Abb. 13).

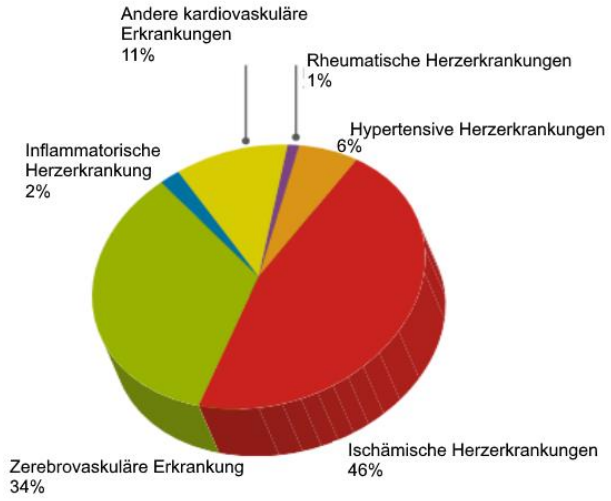


Abbildung 9: Übersicht der kardiovaskulären Todesursachen. Angepasst und modifiziert nach (Shanthi Mendis, 2011)

Tabakkonsum und Adipositas haben einen Anteil von 36% bzw. 20% an der kardiovaskulären Mortalität (Kivimaki et al., 2012, WHO, 2017). Ein weiterer wichtiger Risikofaktor ist eine unausgewogene Ernährung (zu viele gesättigte Fettsäuren, wenig frisches Obst und Gemüse, hoher Salzkonsum). Nach Einschätzung der WHO ist etwa jeder zehnte kardiovaskulären Todesfall auf einen zu hohen Salzkonsum (> als 2 g/d) zurückzuführen (WHO, 2017). Eine schlechte Ernährung geht mit einer zunehmenden Häufigkeit von Fettleibigkeit (Adipositas) einher. Es zeichnet sich ein Trend ab, dass die Adipositas mit einem geringen Einkommen verknüpft ist (Shanthi Mendis, 2011).

Am häufigsten sind ältere Menschen von einer CVD betroffen. Die Sterberate steigt mit dem Alter an. Tritt die CVD im Alter zwischen 60–80 auf, liegt die Sterberate bei 71%, bei Menschen über 80 Jahren bei 85% (Shanthi Mendis, 2011, WHO, 2017). 10% aller CVD-bedingten Todesfälle werden durch eine akute MI verursacht. Allein 2015 starben in Deutschland 49.000 Menschen an der Folge des akuten MI.

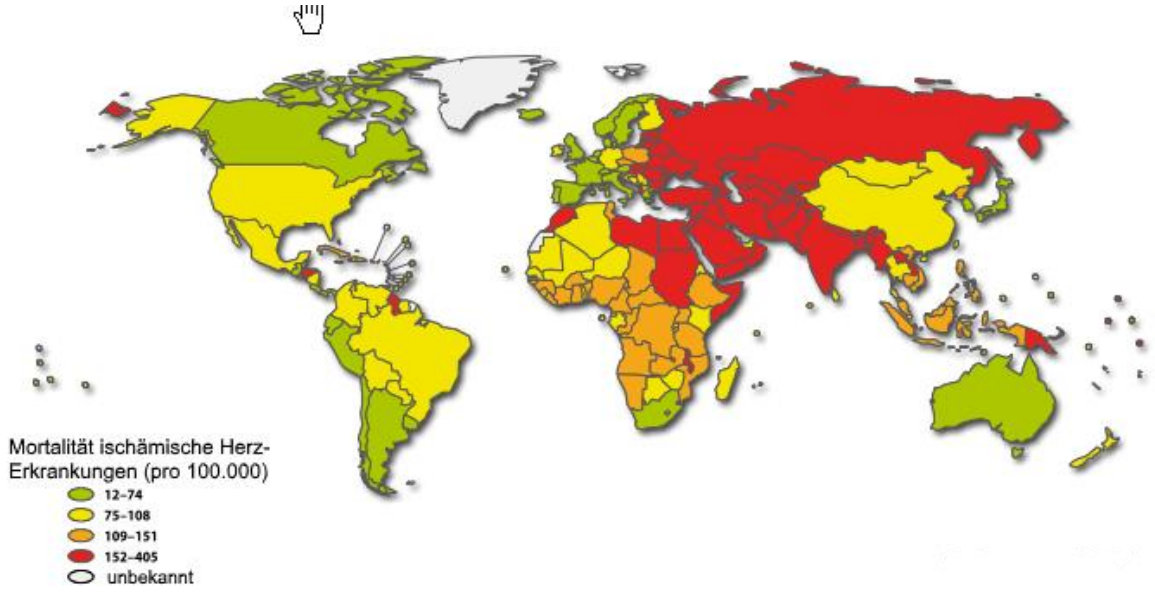


Abbildung 10: Globale Übersicht der Mortalität ischämischer Herzerkrankungen pro 100.000 Einwohner. Alters standardisiert. Angepasst und modifiziert nach (Shanthi Mendis, 2011)

In industriell hoch entwickelten Ländern beträgt das mittlere CVD-bedingte Sterbealter 80 Jahre, in weniger entwickelten Ländern 68 Jahre (Mozaffarian et al., 2016). Die CVD-bedingte Sterberate ist in hoch entwickelten Ländern in den letzten Jahren rückläufig (s. Abb. 10). Trotzdem bleiben CVD die häufigste Todesursache. Der Grund für die rückläufige kardiovaskuläre Mortalität ist eine bessere Früherkennung mit moderner Diagnostik und Biomarkern und schnelle medizinische Versorgung (Albert, 2011, Wang et al., 2017).

Kardiovaskuläre Erkrankungen – Definition

CVD umfassen eine Vielzahl verschiedener Erkrankungen des Herzens und der um das Herz liegenden Gefäße. Dazu zählen koronare Herzerkrankungen (CHD), Erkrankungen der koronaren Arterien (CAD) sowie das akute Koronarsyndrom (ACS).

Das ACS ist eine Unterkategorie der koronaren Arterienerkrankung und die CHD resultieren aus den CAD (Shanthi Mendis, 2011). Bei den CAD sind neben dem Herzen auch periphere Venen und das Gehirn versorgende Gefäße betroffen (WHO, 2017). Klinisch manifestiert sich die ACS meist einem kompletten Verschluss eines Gefäßes im Herzen welches zu einem akuten MI oder einer instabilen Angina pectoris führt (Libby et al., 2016, Libby et al., 2002, Libby and Theroux, 2005) (Abb. 13) Dahingegen sind die CAD meist symptomlos und mit einer Atherosklerose, einem schleichenden Prozess, verbunden, der jedoch in die beschriebene ACS führen kann. Die Symptome des akuten MI sind die dafür typischen, heftigen Brustschmerzen welche durch den kompletten Verschluss und damit einem Mangel an Sauerstoff und Nährstoffen in den Zellen der betroffenen Region verbunden sind.

Das Herz

Das menschliche Herz ist ein hinter dem Brustbein lokalisiertes, muskuläres Hohlorgan (Faller, 2004), das ungefähr 0,5% des Körpergewichtes ausmacht. Das Herz versorgt alle Zellen des Körpers mit sauerstoffreichem Blut und Nährstoffen und schlägt im Durchschnitt siebzigmal pro Minute (Patton, 2009). Die Blutversorgung wird durch zwei Kreisläufen – den Lungenkreislauf und den Herzkreislauf – gewährleistet. Beide Kreisläufe sind durch eine rechte und linke Herzkammer mit rechtem und linken Vorhof voneinander getrennt (s. Abb. 11 B).

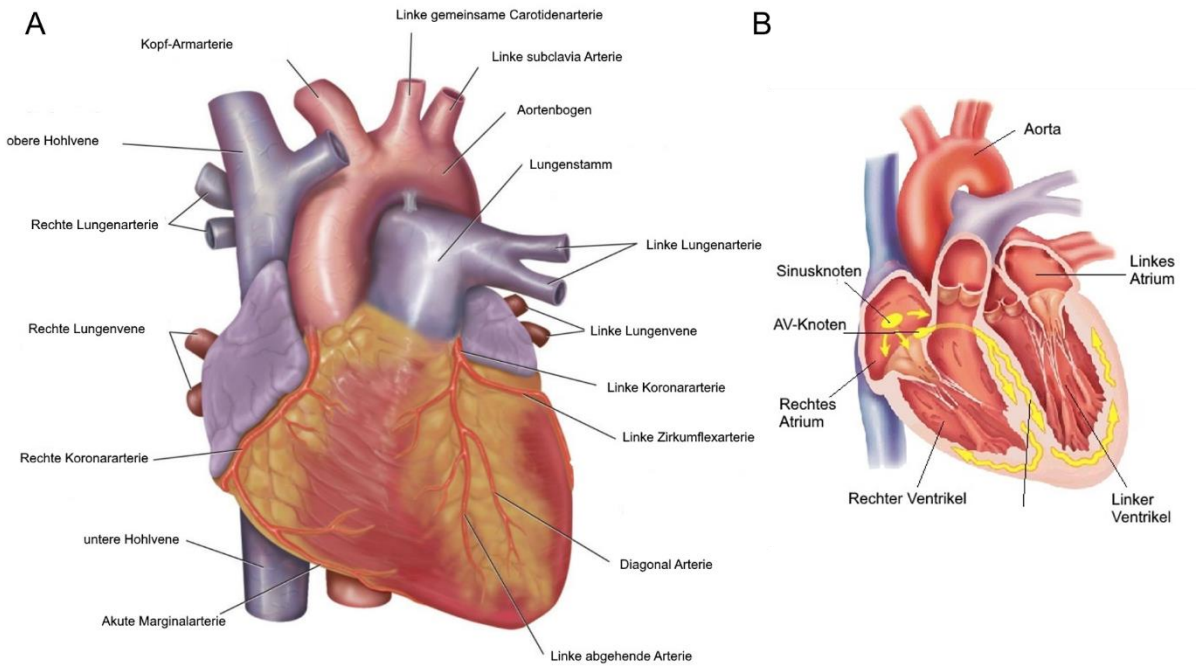


Abbildung 11: Anatomie des Herzes. Zu- und Abgänge des menschlichen Herzens **(A)** und Querschnitt des Herzens mit Reizweiterleitung (in Gelb) **(B)**. Adaptiert und modifiziert nach (Britannica, 2018).

Atherosklerose

Bei der Atherosklerose handelt es sich um einen progressiven, inflammatorischen Prozess der kardiovaskulären Blutgefäße. Als frühe Manifestation einer atherosklerotischen Gefäßschädigung kommt es zu einer endothelialen Dysfunktion (Woollard and Geissmann, 2010). In diesem Stadium lagern sich Lipide, insbesondere low-density Lipoproteinpartikel (LDL) und deren Oxidationsprodukte (ox-LDL) in die Gefäßwand ein. Die daraus folgende Inflammationsreaktion geht mit der Aktivierung von Endothelzellen und der Expression von Adhäsionsmolekülen einher, was wiederum die Einwanderung von Immunzellen (Monozyten, Makrophagen, T-Zellen) zur Folge hat (Liu et al., 2016). Damit verbunden kommt es zur Freisetzung von inflammatorischen Zytokinen wie IL-6 oder TNF-α (Kosmala et al., 2005). Die ox-LDL Moleküle werden von Makrophagen durch Scavenger Rezeptoren (SRA), CD36 und lectin like oxidized low densitiy lipoprotein receptor 1 (LoX1) erkannt und unkontrolliert aufgenommen. Die begrenzte Fähigkeit Lipidpartikel wieder an die Umgebung abzugeben, führt zu einer lokalen Akkumulation in der Gefäßwand. Morphologisch sind die sogenannten Schaumzellen zu erkennen. Wiederum kommt es zur Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine wie IL-6, IL-1ß oder TNF-α sowie von

Metalloproteinasen (Newby, 2000, Libby et al., 2002). Durch die anhaltende Entzündungsreaktion wandern vermehrt Leukozyten in die atherosklerotischen Plaques ein, was mit einer Aktivierung vaskulärer Gefäßmuskelzellen und einer verstärkten Kollagenbildung einhergeht und häufig zur Ausbildung eines nekrotischen Kerns im Zentrum der atherosklerotischen Plaque führt. Dieser Prozess kann über mehrere Jahre unerkannt bleiben und sich erst bei Stenosierung des Gefäß Lumens mit Limitation des Blutflusses durch eine Angina pectoris Symptomatik bemerkbar machen (Nelken et al., 1991, Libby et al., 2016, Libby et al., 2002).

Atherosklerotische Plaques werden nach ihrer Vulnerabilität in stabile und instabile Plaques eingeteilt. Stabile Plaques zeichnen sich durch eine dicke fibröse Kappe aus, während instabile Plaque eine dünne fibröse Kappe besitzen, die mit einem höheren Risiko für eine Fissur mit Exposition des nekrotischen Kerns an das Blut und der Induktion einer thrombotischen Reaktion einhergeht (Libby and Theroux, 2005).

Eine Plaqueruptur führt über die Endothelverletzung zu einer Aktivierung der extrinsischen und intrinsischen Blutgerinnung mit Freisetzung sub-endothelialer Faktoren, die zusammen mit Kollagen und dem von Willebrandfaktor, Thrombozyten anlocken. Diese heften sich an die verletzte Stelle an. Die inflammationsbedingt eingewanderten neutrophilen Granulozyten setzen den Inhalt ihrer γ-Granula frei, wodurch Thrombozyten aktiviert werden und es zur Vernetzung mit Fibrinogen durch Thrombin kommt. Durch die Gerinnungskaskade bildet sich letztendlich ein Thrombus, der das Gefäß komplett verschließen kann. Die folgende absolute Ischämie induziert einen ST-Strecken Hebungsinfarkt (STEMI) (Abb. 12) (Libby et al., 2002, Libby and Theroux, 2005).

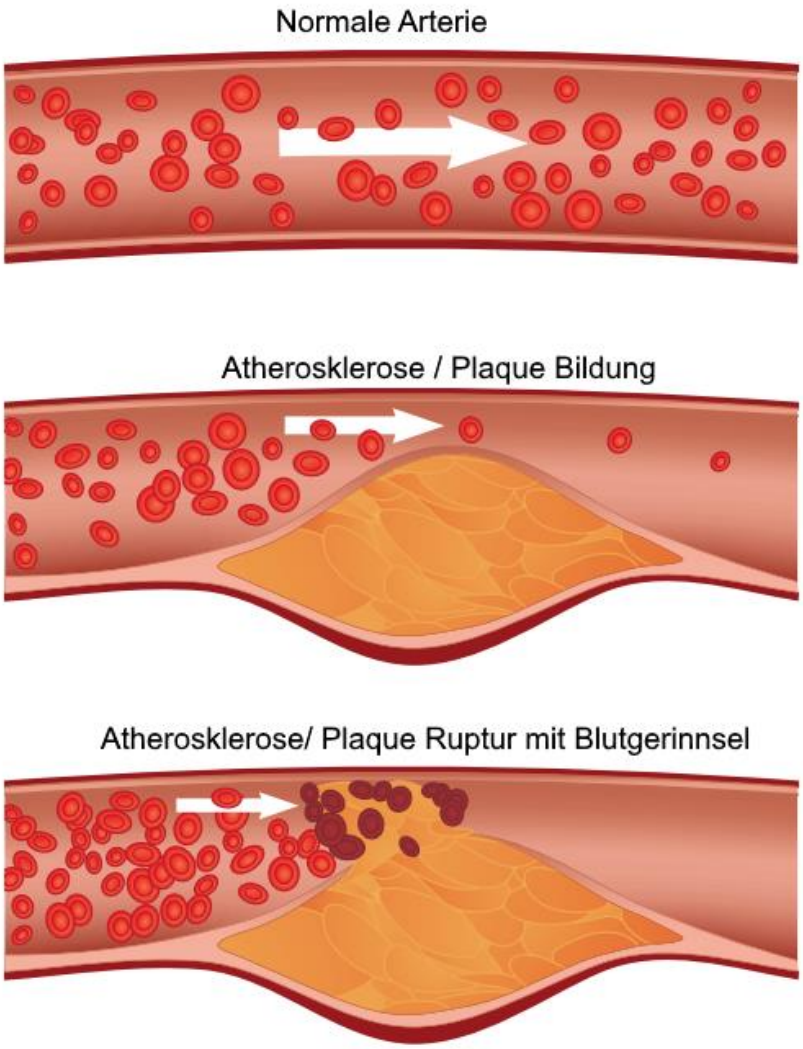


Abbildung 12: Verlauf der Atherosklerose. A: Normaler Blutfluss in einer Arterie. **B:** Entstehung der Plaques durch Ablagerungen in der Gefäßwand und Bildung von Schaumzellen aus Makrophagen. **C:** Plaqueruptur mit folgender Thrombusbildung und Gefäßverschluss. Angepasst und modifiziert nach The (Yeadon, 2017).

Myokardinfarkt

MI werden in STEMI (Abb. 14) und NSTEMI (nicht ST-Strecken Hebungsinfarkt) unterteilt. Der STEMI ist ein akutes, lebensbedrohliches Ereignis in Folge eines kompletten Verschlusses eines koronaren Gefäßes durch atherosklerotische Prozesse (Van de Werf et al., 2008). Der NSTEMI ist ebenfalls ein MI, jedoch ohne kompletten Gefäßverschluss. Beim STEMI kommt es zu einer dauerhaften Ischämie mit Durchblutungsstörung und Minderversorgung des betroffenen Gewebes (Colledge et al., 2010). Dabei gilt, umso näher der Infarkt an der Aorta Verzweigung liegt, umso größer ist das betroffene Versorgungsareal und damit die geschädigte Myokardregion. Durch die Minderversorgung mit Sauerstoff kann die Energieversorgung und damit die

Funktion der Zelle nicht aufrechterhalten werden; es kommt zur Apoptose und Nekrose (Buja, 2005). Durch den MI entsteht eine Leukozytose (Ruparelia et al., 2013, Reed et al., 2016). Im Rahmen der Inflammation und der damit verbundenen Immunantwort werden verschiedene Zytokine wie IL-6, IL-1, IL-10 und TNF-α freigesetzt. Die mit der Immunreaktion verbundenen typischen Reparaturmechanismen (Liehn et al., 2011) unterteilen sich in drei Phasen (Inflammation-, Proliferation- und Heilungsphase). In der ersten Phase (0–4 d nach MI) werden Zytokine und Chemokine synthetisieret (z.B. cxc-motiv-chemocinrezeptor 2 (CXCR2), macrophage inflammatory protein (MIP), stromal cell-derived factor 1 (SDF1α)), die Neutrophile für die Beseitigung von toten Zellen rekrutieren. In der zweiten Phase (bis 3–4 Wochen nach MI) wird die Inflammation durch IL-10 und Transforming-growth factor-(TGF)-β gestoppt. In der dritten Phase (bis 4–6 Wochen nach MI) kommt es zur Ausbildung von Narbengewebe (Colledge et al., 2010, Liehn et al., 2011). Diese Modulierung des ischämischen Gewebes ist notwendig, um die Herzfunktion weiter aufrechtzuerhalten.

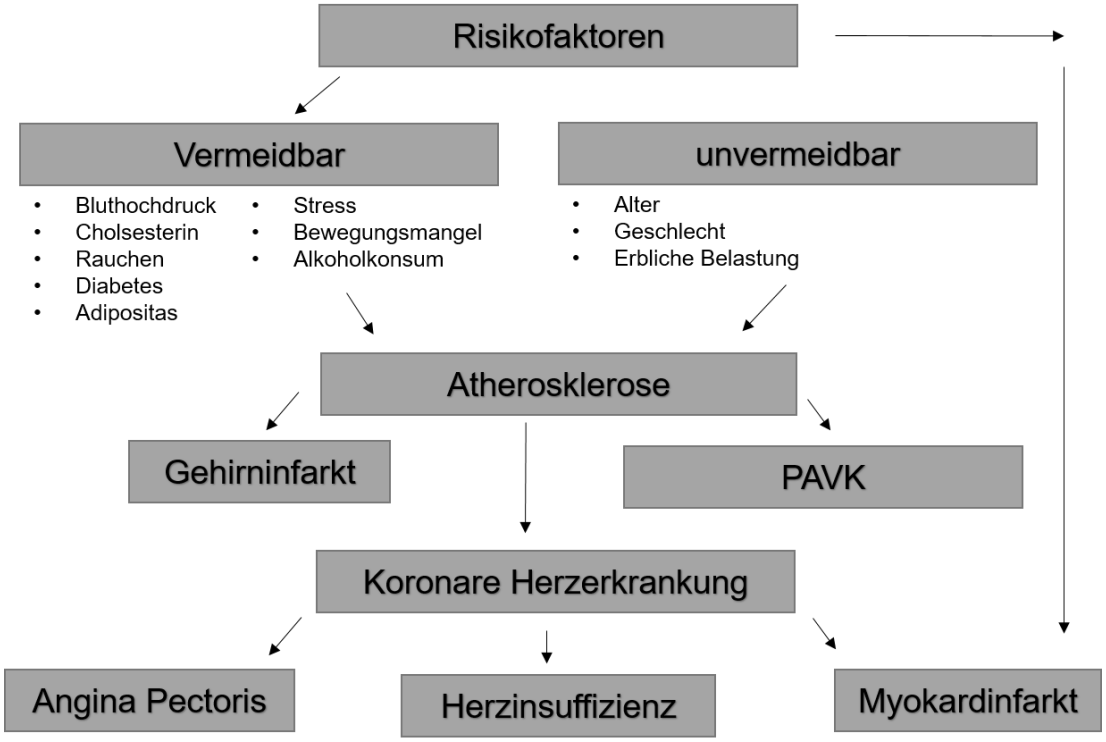


Abbildung 13: Vermeidbare und unvermeidbare kardiovaskuläre Risikofaktoren als Ursache für Atherosklerose sowie den damit verbundenen Gefäßereignissen wie periphere arterielle Verschlusskrankheit (PAVK), Gehirninfarkt und koronare Herzerkrankungen und damit verbundenen Erkrankungen Angina pectoris, Herzinsuffizienz oder Myokardinfarkt (MI).

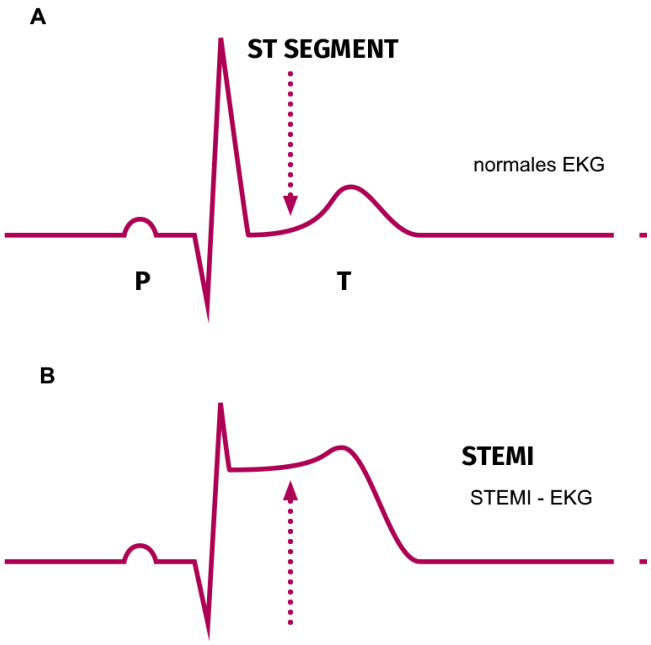


Abbildung 14: Elektrokardiogramm mit STEMI. A: Normales EKG eines gesunden Menschen. **B:** STEMI (ST-Strecken-Hebungsinfarkt) Adaptiert von (Bayer-Pharma-AG, 2017).

Der Verschluss eines Koronargefäßes lässt sich im Elektrokardiogramm (EKG) durch eine Elevation der ST-Strecke als Zeichen einer transmuralen Ischämie und Repolarisationsstörung detektieren. Des Weiteren kann die myokardiale Schädigung über Biomarker (z.B. herzmuskelspezifisches hs-Troponin) nachgewiesen werden. Laut der aktuellen Leitlinie der European Society of Cardiology (ESC) soll bei einem STEMI innerhalb von 60 min eine Perkutane Koronarintervention (PCI) erfolgen. Kann eine PCI nicht innerhalb von 120 min gewährleitstet werden, ist umgehend eine Lysetherapie einzuleiten (Steg et al., 2012).

Interessanterweise zeigen verschiedene Medikamente wie GLP-1 Agonisten und DPP-4-Inhibitoren kardioprotektive Eigenschaften, die zu einer Reduktion der Infarktgröße bei stattgehabtem MI beitragen können.

Mausmodell – Myokardinfarkt

Zu den etablierten Tiermodellen für die Analyse der akuten Phase des MI gehört die permanente Ligatur des Ramus interventricularis anterior (RIVA) in der Maus. Die Ligatur erzeugt einen kompletten Gefäßverschluss mit Apoptose und Nekrose der betroffenen Region. In Abb. 15 ist die Unterbindung des RIVA mittels eines Fadens schematisch dargestellt. (Kolk et al., 2009).

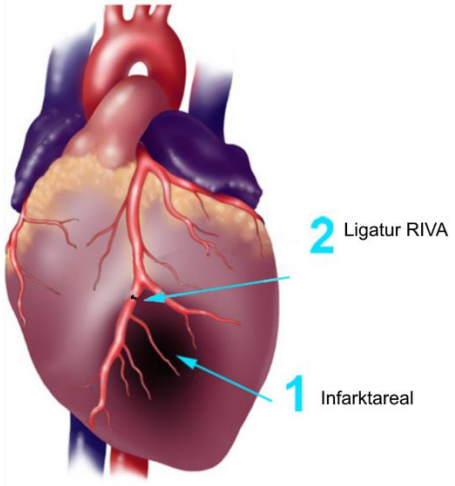


Abbildung 15: Induktion eines MI durch Abbinden der linken abgehenden Koronararterie im Mausmodell. Adaptiert und modifiziert nach(Wu et al., 2011)

GLP-1 bedingte Kardioprotektion

Durch Risikofaktoren wie Übergewicht, DM und schlechte Ernährung steigt vor allem in Industrieländern die Zahl der Patienten mit CVD. Typ-2 DM bildet den Boden für mikro- und makrovaskuläre Schäden als Ursache von CVD (Gerstein et al., 2011, Patel et al., 2008, Ghatak et al., 2010). Dieser Zusammenhang macht GLP-1-Agonisten, die den GLP-1R aktivieren, und DPP-4-Inhibitoren, die den Abbau von GLP-1 und somit den Spiegel von aktivem GLP-1 im Blut erhöhen und nachfolgend den Blutzucker senken, zu vielversprechenden Kandidaten für eine kardioprotektive Therapie (Havale and Pal, 2009, Golightly et al., 2012).

Bereits gezeigt wurde, dass GLP-1 zur Kardioprotektion beträgt und die Funktion des Herzens verbessert (Drucker, 2002). Beim akuten MI ist eine schnelle Auflösung des Thrombus und Revaskularisierung der betroffenen Gefäße erforderlich. Die Aktivierung des Reperfusion-Injury-Salvage-Kinase-(RISK)-Signalwegs, der die PI3K, Extracellular-signal regulated Kinase (ERK) und AKT beinhaltet, reduziert den durch oxidativen Stress bedingten Reperfusionsschaden um bis zu 50% (Hausenloy et al.,

2013). Interessanter Weise konnte gezeigt werden, dass GLP-1 ebenfalls zu einer Aktivierung des RISK-Signalweges führt (Nikolaidis et al., 2005b, Ban et al., 2010). Durch die Prozessierung von aktivem GLP-1 in verschiedene Metabolite sind weitere Effekte in verschiedenen Organen nicht ausgeschlossen (s. Abb. 16) (Campbell and Drucker, 2013, Sivertsen et al., 2012)

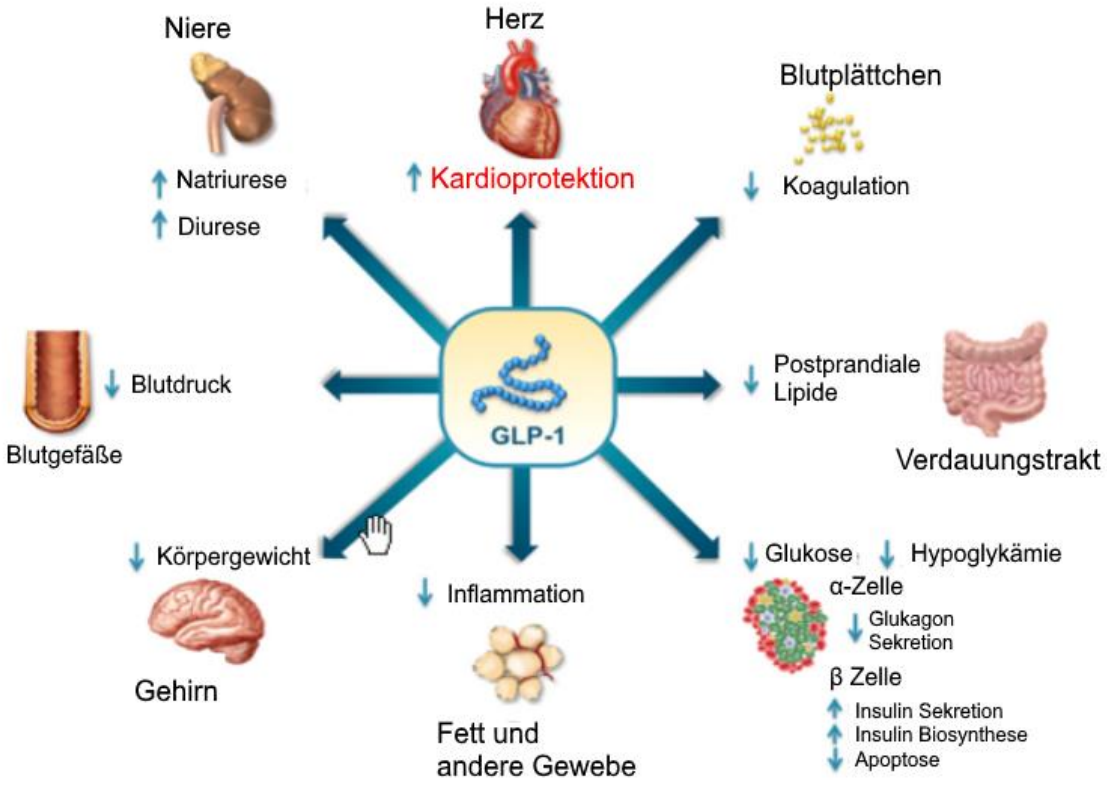


Abbildung 16: Direkte und indirekte Wirkung von GLP-1 auf die Kardioprotektion. Modifiziert nach (Drucker, 2016)

Im Folgen möchte ich etwas näher auf die kardioprotektiven Eigenschaften von GLP-1 eingehen. Zum einen ist bisher bekannt, dass GLP-1 in Folge einer Inflammation und Nahrungsaufnahme ansteigt. Des Weiteren hat GLP-1 aber auch kardio-protektive Eigenschaften durch kardiale Schutzfunktionen aber auch langwirksame GLP-1 Rezeptor Antagonisten führen zu einem verbesserten kardiovaskulären Überleben in Hochrisiko-Patienten mit Diabetes. Diese Eigenschaften von GLP-1 wurden zuerst in präklinischen Studien nachgewiesen (Nikolaidis et al., 2004, Ossum et al., 2009, Read et al., 2012, Sonne et al., 2008, Bose et al., 2005a). So kam es zu einer verbesserten Herzfunktion und einer Reduktion der Infarktgröße in einem Reperfusionsmodell in Ratten (Noyan-Ashraf et al., 2009, Sonne et al., 2008). In einem weiteren Modell in der

Ratte konnte die Infarktgröße durch GLP-1 4 Wochen nach MI reduziert werden, welches mit einer verbesserten linksventrikulären Funktion einherging (Zhao et al., 2006, Bose et al., 2005a, Ban et al., 2008). Somit konnte gezeigt werden, dass GLP-1 einen Effekt auf das kardiovaskuläre System hat. Dieser Effekt wurde durch den Einsatz des DPP-4 Inhibitors Sitagliptin zwar in Bezug auf die erhöhte linksventrikuläre Herzfunktion betätigt jedoch wurde keine reduzierte Infarktgröße 14 Tage nach MI festgestellt (Sauve et al., 2010). In einem permanenten Infarktmodell, welches auch in der hier vorliegenden Arbeit angewandt wird, kam es in einer Langzeitbeobachtung von 30 Tage unter DPP-4 Inhibition zu einem verbesserten Überleben, reduzierter Infarktgröße, gesteigertem diastolischem Endvolumen sowie zu einer LV Wandverdickung (Zaruba et al., 2009, Zhao et al., 2006). Im Vergleich zu den DPP-4 Inhibitoren bewirken GLP-1 Rezeptor Antagonisten einen höheren kardialen Output 4 Wochen nach permanentem MI in Mäusen (Noyan-Ashraf et al., 2009). Des Weiteren zeigten sich durch die Behandlung mit GLP-1 Rezeptor Antagonisten eine höhere linksventrikuläre Funktion, reduziertes Remodelling und ein verbessertes Überleben in einem Langzeitversuch von 11 Wochen in Mäusen (Liu et al., 2010). Zusammenfassend über die genannten Effekte wurde gezeigt, dass diese über GLP-1 Rezeptor abhängige als auch unabhängig Mechanismen vermittelt werden (Ban et al., 2008). In präklinischen Studien wurde zudem gezeigt, dass eine Protektion auch über erwähnte nicht-rezeptorvermittelte Vorgänge der Metabolite (Pyke and Knudsen, 2013, Zhao et al., 2006, Ban et al., 2009) erfolgt. Das durch die Behandlung mit GLP-1 verkleinerte Infarktareal (Kristensen et al., 2009, Sauve et al., 2010, Timmers et al., 2009) hat eine schnellere postischämische Erholung und gesteigerte Überlebensraten zur Folge (Sokos et al., 2007, Read et al., 2012, Quoyer et al., 2010). Um nun weiter auf den Mechanismus einzugehen, kam es in einem Versuch im Tiermodell mit Liraglutid zu einer verringerten Serumskonzentrationen der inflammatorischen Zytokine TNF-α und IL-6 (Gao et al., 2015, Parthsarathy and Holscher, 2013). Des Weiteren steigert GLP-1 *in vitro,* in glatten Gefäßmuskelzellen, die Mitochondrienaktivität (Morales et al., 2014) was für den erhöhten Energiebedarf bei kardialen Kontraktionen positiv ist. Auch in Ratten steigert GLP-1 die β-Zell-Funktion und damit die Mitochondrienmasse und -leistung (Kang et al., 2015). Obwohl der Mechanismus der GLP-1-Wirkung bisher noch nicht geklärt wurde, sind die Effekte der *ex vivo* und *in vivo* Experimente reproduzierbar (Sokos et al., 2007, Ban et al., 2008, Kavianipour et al., 2003).

Der GLP-1-Effekt welcher im Abschnitt davor in Mäusen beschrieben wurde, konnte auch im Menschen reproduziert werden. Auch hier führte GLP-1 nach Myokardinfarkt zu einer verminderten Apoptose und zu einer Verbesserung der Funktion des linken Ventrikels (LV) (Vyas et al., 2011, Bose et al., 2005c). Abbildung 17 zeigt die über GLP-1R im Herzen und in den Gefäßen vermittelten Effekte (Richards et al., 2014).

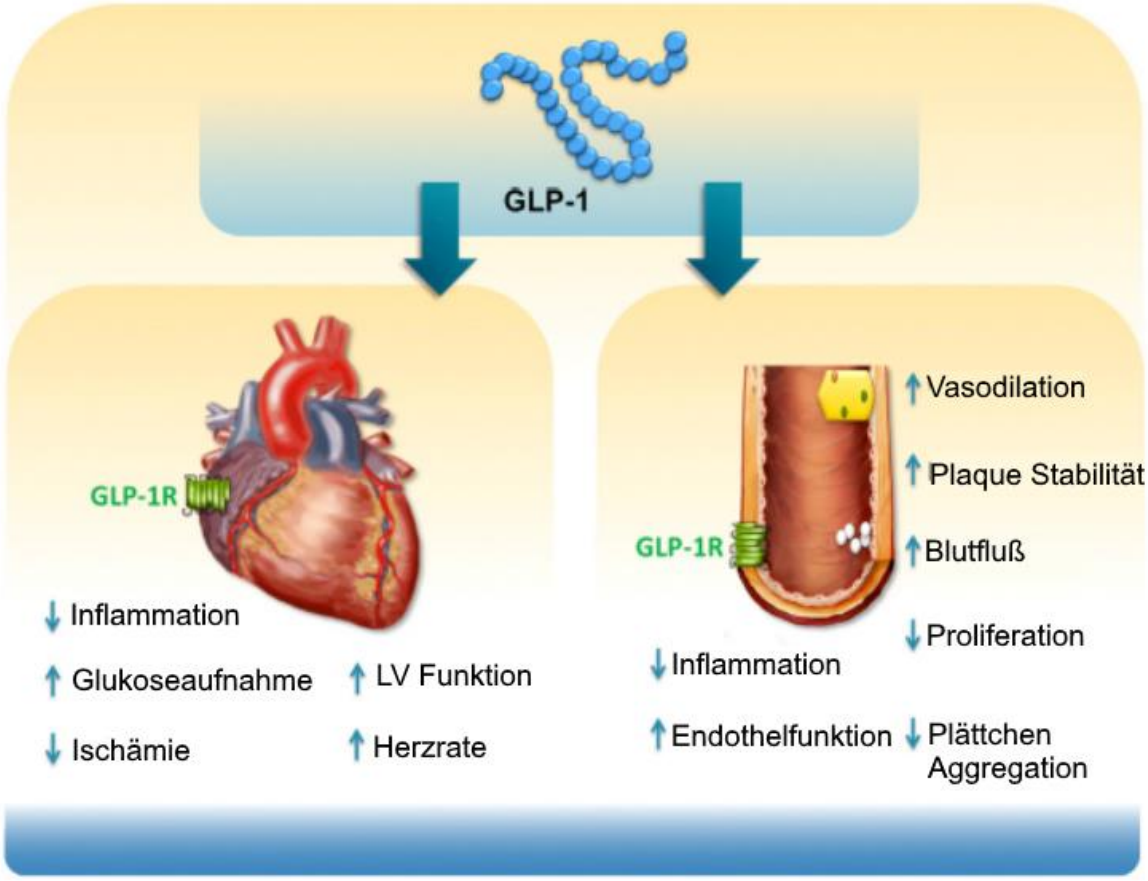


Abbildung 17: Funktionen der GLP-1R-Expression im Herzen und in den Blutgefäßen. Der GLP-1R wird hauptsächlich von Zellen im Atrium des Herzens und von glatten Gefäßmuskelzellen exprimiert, sodass die Kardioprotektivität auf indirekten und direkten Mechanismen beruhen kann. Der genaue Mechanismus ist bisher nicht vollständig geklärt. Abbildung modifiziert nach (Drucker, 2016)

Bei Menschen verringerte sich die Infarktgröße durch Exenatid nach einem STEMI (Lonborg et al., 2012). Als relevante Zielgruppe für eine Kardioprotektion durch GLP-1-vermittelte Mechanismen gelten diabetische Patienten. Auch in diabetischen Mäusen reduzierte eine Liraglutid-Behandlung die Hypertrophie und Fibrose und verbesserte die LV-Funktion des Herzens (Noyan-Ashraf et al., 2013). Entsprechend reduzierte Liraglutid in Typ-2 DM-Patienten den Blutdruck unabhängig vom Gewicht und von der Blutzuckersenkung (Wang et al., 2013).

DPP-4 Inhibitoren bewirken im Tiermodell (Sauve et al., 2010, Huisamen et al., 2011) und im humanen System (McCormick et al., 2014) eine reduzierte Infarktgröße nach Ischämie und verbessern die LV-Funktion.
Zu GLP-1-basierten Therapien wurden bereits mehrere große Studien durchgeführt (DPP-4-Inhibitoren: SAVOR-TIMI 53, EXAMINE, TECOS; GLP-1-Agonisten: ELIXA, LEADER SUSTAIN-6) (Scirica et al., 2013, White et al., 2013, Green et al., 2015). In den Studien SAVOR TIMI 53 (Saxagliptin), EXAMINE (Alogliptin) und TECOS (Sitagliptin) erwiesen sich die DPP-4 Inhibitoren als CV-sicher jedoch nicht überlegen (Scirica et al., 2013, White et al., 2013, Green et al., 2015). Unter Saxagliptin ließ sich jedoch eine erhöhte Hospitalisierung wegen Herzinsuffizienz nachweisen (Savarese et al., 2015).
GLP-1-Agonisten zeigten in den klinischen Studien ELIXA (Lixisenatid), LEADER (Liraglutid) und SUSTAIN-6 (Semaglutid) keine kardiovaskulären Nebenwirkungen. Jedoch kam es in der LEADER-Studie zu einer Reduktion der kardiovaskulären Mortalität (Marso et al., 2013). Aktuell laufen weitere klinische Studien zu DPP-4 Inhibitoren u.a. Linagliptin (Carolina Studie), welche ebenfalls die kardiovaskuläre Sicherheit und eine mögliche reduzierte Mortalität aufzeigen soll. Diese ist durch die positiven Eigenschaften der DPP-4 Inhibition durch GLP-1 begünstigt.

1.8 Ziel der Arbeit

Laut der aktuellen Datenlage sind GLP-1-Agonisten und DPP-4-Inhibitoren als kardiovaskulär sicher einzustufen, während einige GLP-1 Rezeptor Agonisten (Liraglutid und Semaglutid) zu einer Reduktion CV-Ereignisse führen. Die Wirkmechanismen der Kardioprotektion sind in diesem Zusammenhang weitgehend unverstanden.
Insbesondere in Bezug auf den akuten MI und die damit verbundene inflammatorische Antwort im kardiovaskulären System werden weitere mechanistische Untersuchungen benötigt. Im Rahmen dieser Dissertationsarbeit sollen die zellulären Mechanismen der kardioprotektiven Effekte von GLP-1 bei einem akuten MI untersucht werden.

GLP-1 wird durch inflammatorische Prozesse induziert. Daher wurde in dieser Arbeit die Frage gestellt, ob GLP-1 auch bei einem MI als inflammatorischer Stimulus erhöht ist und welche Effekte sich daraus auf das kardiovaskuläre System ergeben. In der Arbeit wird deshalb zu Beginn darauf eingegangen, ob GLP-1 im akuten MI im Menschen und im Tiermodell erhöht ist. Dies soll in Patientenproben nach MI und

experimentell durch induzierten MI im Mausmodell untersucht werden. Dazu wird in Mäusen ein MI induziert und anschließend die GLP-1 Spiegel zu verschiedenen Zeitpunkten gemessen. Da bereits bekannt ist, dass GLP-1 in inflammatorischen Prozessen ansteigt, erwarten wir auch hier einen Anstieg der GLP-1 Spiegel. Im darauf aufbauenden Versuchen soll untersucht werden, ob GLP-1 auch im akuten MI kardioprotektive Eigenschaften besitzt und die LV-Funktion verbessert. Dies wird im Tiermodell nach Induktion eines MI untersucht. Als Endpunkt für eine Millar-Katheter Messung zur Erfassung der hämodynamischen Parameter des Herzens wird der Zeitpunkt mit der höchsten gemessenen GLP-1 Konzentration verwendet. Wir erwarten in diesem Teil der Studie eine gesteigerte LV Funktion, da es bereits Langzeitstudien mit GLP-1 und einer gesteigerten LV Funktion gibt. Wir gehen davon aus, dass dies auch im akuten Stadium zutrifft. Um anschließend zu überprüfen, ob GLP-1 für eine möglich LV-Funktionssteigerung verantwortlich ist, wird durch Hemmung des GLP-1-Abbaus (DPP-4-Inhibitoren) oder über eine Applikation von GLP-1 die LV Funktion ermittelt. Dies soll im Tiermodell durch den Einsatz von Linagliptin (DPP-4-Inhibitor) und exogenem aktivem GLP-1 untersucht werden. Wir gehen von einer Steigerung der kardialen Kontraktilität aus. Um den Mechanismus zu untersuchen, ist der nächste logische Schritt die Frage, ob die kardioprotektive Wirkung von GLP-1 über den GLP-1R vermittelt wird und geht diese Wirkung bei der Verwendung von GLP-1R-Antagonisten oder GLP-1R-KO-Mäusen verloren. Hierzu wird der Versuch wie schon in dem Modell davor in GLP-1 R KO Mäusen bzw. unter Verwendung eines GLP-1 Rezeptor Antagonisten Exendin- 9 wiederholt und entsprechend die Kontraktilität nach MI sowie molekularbiologische Veränderungen in isoliertem Herzgewebe untersucht. Im folgenden Schritt soll geklärt werden, über welchen Mechanismus die GLP-1 abhängige Kardioprotektion vermittelt ist. Dazu sollen zum einen Veränderungen auf Proteinebene untersucht werden und zum anderen die Respiration der Mitochondrien, isoliert aus dem nicht-infarzierten Bereich des Herzens nach MI, gemessen werden. Dies wird durch eine Messung im Oxygraph für Mitochondrien ermittelt und metabolische Veränderungen auf Proteinebene in Westernblots untersucht. Wir erwarten durch die erhöhten GLP-1 Spiegel einen veränderten Metabolismus im Herzen.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die inflammatorische Regulation und die Wirkung von GLP-2 bei IBD untersucht. Dabei wurde die Hypothese überprüft, dass GLP-2 wie GLP-1 durch inflammatorische Stimuli induziert wird und eine protektive Wirkung im

Rahmen einer Colitis im Darm entfaltet. Um diese Hypothese zu klären wurde zuerst untersucht, ob ein inflammatorischer Stimulus ausreicht, um GLP-2 als Folge daraus zu erhöhen. Diese Frage wurde zum einen in Patienten mit einer Colitis, als auch im Tiermodell untersucht. Im Tiermodell wurden hierfür 2 verschiedene Modelle gewählt. Zum einen das chemisch induzierte Dextran-Sodium Sulfat Modell und zum anderen das bakteriell induzierte *Clostridium difficile* Modell. Beide induzieren eine Colitis im Darm der Mäuse. Nach Etablierung der Modelle und dem Nachweis einer erhöhten GLP-2 Serumkonzentration sollen in den Modellen eine Modulation des GLP-2 Systems vorgenommen werden, um den Krankheitsverlauf unter experimentellen Bedingungen zu mildern. Es soll der DPP-4 Inhibitor Linagliptin, der GLP-2 Agonist (Teduglutid) und der GLP-2 Antagonist GLP-2(3-33) eingesetzt werden. Der Krankheitsverlauf stellt in diesen Experimenten das Hauptkriterium für einen milderen Verlauf dar. Des Weiteren soll in histologischen Untersuchungen nachgewiesen werden, dass es durch einen höheren GLP-2 Spiegel zu morphologischen Veränderungen des Darmes kommt um eine höhere Nährstoffresorption zu schaffen. Wir erwarten bei einem erhöhten GLP-2 Spiegel einen milderen Verlauf der Colitis im Mausmodell sowie bereits in anderen Modellen beschriebene morphologische Veränderungen der Darmwand hinsichtlich einer Steigerung der Nährstoffresorption.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Geräte

In Tabelle 2 sind die verwendeten Laborgeräte gelistet.

Tabelle 2: Verwendete Laborgeräte

Gerät	Hersteller
Autoklav	Systec 2540EL (Systec, Deutschland)
Feinwaage	Sartorius, Deutschland
Zentrifugen	Thermo Scientific, Raumzentrifuge Hettich, Mikro 200R Tischzentrifuge
Fluoreszenzplattenleser	Infinite M200 (Tecan, Deutschland)
pH-Meter	InoLab Level 1 (WTW, Deutschland)
Homogenisierer	TissueLyser LT (Quiagen, Hilden, Deutschland)
Heizblock	Eppendorf, Deutschland
Nanodrop	Thermo Scientific, USA
WB-Entwickler	Cemidoc, Biorad, USA
Kryobehälter	Isotherm KG
Gewebelysierer-Mixer	Janke und Kenkel Ultrafurax T25
Oxygraph Plus Einheit	Hansatech, Germany
Millar-Gerät	Millar Inc, USA
Mikroskop	DM 2500 (Leika, Germany)
Westernblot Kammer	BioRad, Germany
Schüttler	VWR, Germany
Mäusebeatmung	Minivent 845

Mäuse

Die WT-Mäuse C57BL/6J wurden von Charles River Deutschland entsprechend der gültigen deutschen Genehmigungsverfahren bezogen. Die Tiere wurden in einem 12 h-Tag/Nacht-Rhythmus in der Tierversuchskunde der RWTH untergebracht. Die Versorgung erfolgte durch Tierpfleger des Instituts für Versuchstierkunde. Die Tiere hatten ständigen Zugang zu Wasser und Nahrung. GLP-1R-KO-Mäuse und IL-6-KO-Mäuse wurden ebenfalls von Charles River bezogen und unter den gleichen Bedingungen wie die WT-Mäuse gehalten. Die Tiere für die GLP-1-Versuche waren männlich und hatten ein Alter von 6 Wochen. Die Tiere für die GLP-2-Versuche waren weiblich und bei Versuchsbeginn 10 Wochen alt.

Die in Versuch (3.2.4) verwendeten Präproglucagon Knockoutmäuse wurden von unserem Kooperationspartner verwendet. Die Versuche wurden an der Universität

Michigan Labor Dr. Sandoval durchgeführt und genehmigt. Wir erhielten für unsere Analysen die Blutserumproben aus diesen Versuchen.

Allgemeines Verbrauchsmaterial

In Tabelle 3 sind die verwendeten Verbrauchsmaterialien gelistet.

Tabelle 3: Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
96 Mikrotiterplatte (Flacher Boden)	Greiner-BioOne, Germany
96 Mikrotiterplatte (Schwarz)	Greiner-BioOne, Germany
FACS-Röhrchen	Sarstedt, Germany
EDTA-beschichtete Blutentnahmeröhrchen	Sarstedt, Germany
Nadeln	Braun, Germany
Spritzen 1 ml, 20 ml	BD, USA
Nahtmaterial 7-0 Seide, 6-0 Seide	Ethicon, USA
15 und 50 ml Reaktionsgefäße	BD, USA
Contour-Sensoren zur Blutzuckermessung	Bayer, Germany
Na-Heparin-Kapillarpipetten	Hirschmann, Germany
Operationsbesteck	FST, Germany
Zellkulturschale 10 cm	Sarstedt, Germany
Reaktionsgefäße 1,5 ml, 2 ml	Eppendorf, Germany
Nitrocellulosemembran®	Whatman® GE Healthcare
Einmalskalpell	Feather

Reagenzien, Medien und Puffer

In Tabelle 4 sind die verwendeten Reagenzien gelistet.

Tabelle 4: Verwendete Reagenzien

Reagenzien	Hersteller
100% Methanol	VWR, Germany
Aceton	J.T. Baker, USA
Acrylamid	Carl Roth, Germany
ADP (Adenosindiphosphat)	Carl Roth, Germany
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Carl Roth, Germany
Bromodeoxyuridin (BRDU)	Sigma, Germany
Chloroform	Carl Roth, Germany
Clindamycin	Ratiopharm, Germany
Clostridium difficile Sporen	Reinkultur AG Sellge, RWTH, Germany
Complete Protease Inhibitor Cocktail	Carl Roth, Germany
Dextran-Sodium-Sulfat (DSS) Salz	MP Biochemicals
Dikaliumhydrogenphosphat (K_2HPO_4)	Merck, Germany
Diprotin A	Abcam, UK
Dobutamin	Sigma, Germany
Dorsomorphin	Sigma, Germany
DPP-4 Substrat (H-Gly-Pro-pNa)	Bachem, Germany
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	Carl Roth, Germany

EGTA (Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N′,N′-tetraessigsäure)	Carl Roth, Germany
Eisessig	Carl Roth, Germany
Ethanol Absolut	Fischar, Germany
Exendin-9	Bachem, Schweiz
Fluorescein-Isothiocyanat-(FITC)-Dextran	TdB Consultancy
GLP-1 (7-36)	Bachem, Schweiz
Glukose	Carl Roth, Germany
HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure)	Merck, Germany
Hexadecyltrimethylammonium-Bromid	Sigma, Germany
Isofluran	Abbvie, USA
Isopropanol	Carl Roth, Germany
Kaliumchlorid	Carl Roth, Germany
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Merck, Germany
Ketamin	Medistar, Germany
Linagliptin	Böhringer Ingelheim, Germany
Lipopolysaccharide (LPS)	Sigma, Germany
Magnesiumchlorid ($MgCl_2$)	Carl Roth, Germany
Magnesiumchlorid Hexahydrat ($MgCl_2$ x $6H_2O$)	Carl Roth, Germany
Malat	Carl Roth, Germany
Mannitol	Sigma, Germany
Maus Myeloperoxidase	R&D Systems
Methanol	Carl Roth, Germany
MilliQ Wasser	Millipore, Germany
Natriumchlorid (NaCl)	Braun, Germany
Natriumdihydrogenphosphat (NaH_2PO_4)	Carl Roth, Germany
o-Dianisidin-Hydrochlorid	Sigma, Germany
Oligomycin	Sigma, Germany
PBS (Phosphate-buffered saline)	Sigma, Germany
p-Nitrolanilin (pNa)	Sigma, Germany
Proteinase	Sigma, Germany
Pyruvat	Carl Roth, Germany
Reagenzien	**Hersteller**
SDS (Sodium Dodecyl Sulfat)	Carl Roth, Germany
Sukrose	Carl Roth, Germany
TEMED (Tetramethylethylendiamin)	Carl Roth, Germany
TRIS (Tris-aminomethan)	Carl Roth, Germany
Tris-HCl	Sigma, Germany
Tween 20	Carl Roth, Germany
Wasserstoffperoxid (H_2O_2) 30%	Applichem, USA
Xylazin	Ceva, Tiergesundheit, Germany
Formalin Histofix 10%	Carl Roth, Germany

In Tabelle 5 sind die verwendeten Puffer aufgeführt.

Tabelle 5: Lösungen und Puffer

Name	Zusammensetzung
Linagliptin-Gavagelösung	5 mg Linagliptin gelöst in 1 ml ddH_2O, zum kompletten Lösen 2 µl 5 N Salzsäure zugegeben. Arbeitslösung 1:10 Verdünnung. Gavage von 5 µl/g Mausgewicht.
Narkose-Injektionslösung	100 µl Ketamin (Endkonzentration 100 mg/ml) 50 µl Xylazin (Endkonzentration 10 mg/ml) und Zugabe von 850 µl 0,9% NaCl. Maus Narkose 5 µl/g Maus
Mitochondrien Isolationslösung	225 mM Mannitol (2,04 g), 75 mM Sukrose (1,28 g), 2 mM HEPES (0,02 g),1 mM EGTA (0,02 g): Gelöst in ddH_2O (50 ml) pH auf 7,4 mit Tris-Base oder Tris-HCl eingestellt
Name	**Zusammensetzung**
Mitochondrien Lagermedium	225 mM Mannitol (2,04 g), 75 mM Sukrose (1,28 g), 2 mM HEPES (0,02 g): Gelöst in ddH_2O (50 ml) pH auf 7,4 mit Tris-Base oder Tris-HCl eingestellt
Mitochondrien Atmungspuffer	137 mM KCl, 2 mM KH_2PO_4, 2,5 mM $MgCl_2$ * $6H_2O$, 20 mM HEPES, 0,5 mM EGTA: Gelöst in ddH_2O, pH eingestellt auf 7,2 mit 1 M KOH
Antikörper Verdünnungslösung	5% Bovines Serumalbumin (BSA)
Westernblot-Waschpuffer	24,2 g Tris-Base, 80 g NaCl: Mit ddH2O auffüllen und pH auf 8,5 eingestellt
Westernblot-Transferpuffer	25 mM Tris-Base, 192 mM Glycin, 20% Methanol: In 1 l ddH_2O, pH auf 8,5 eingestellt
Westernblot-Blockierlösung	5% Milchpulver in TBS gelöst
Westernblot-Laufpuffer	30,3 g Tris-Base, 141 g Glycin, 10 g SDS: Auf 1 l mit ddH_2O, pH 8,3
Acrylamid Gel	12% Gel: 4 ml Acrylamid 30%ig, 2,5 ml Tris HCl pH 8,8 1,5 M, 100 µl 10%iges SDS,3,3 ml ddH_2O, 100 µl APS, 20 µl TEMED
Westernblot Zelllyse Puffer	0,25M Sucrose, 2,2mM Na2-EDTA, 10mM Tris sowie Phosphostop und Complete (Roche)

In Tabelle 6 sind die verwendeten Antikörper aufgeführt.

Tabelle 6: Verwendete Antikörper

Antikörper	Hersteller
p-AMPK (p-AMPKa (Thr172)	Cell Signalling, USA
AMPK (AMPKa)	Cell Signalling, USA
Caveolin 3	BD Biosciences, USA
Glukosetransporter-(GLUT)-4	Cell Signalling, USA
CD-36	Novus Biologicals, USA
Akt	Cell Signalling, USA
p-Akt (Thr308)	Cell Signalling, USA
Anti BRDU (Maus)	GE Health Care

In Tabelle 7 sind die verwendeten kommerziellen Kits bzw. die kooperierenden externen Institute aufgeführt.

Tabelle 7: Verwendete kommerzielle Kits und externe Institute

Kit	Hersteller
GLP-1 (total)	Merck, Germany
GLP-2 (total)	Merck, Germany
GLP-1 (aktiv)	Merck, Germany
Multiplex Messung von IL-6 aus Blutserum	MyriadRBM, USA
Ultra sensitive Insulin Elisa	Alpco, USA

In Tabelle 8 ist die verwendete Software gelistet.

Tabelle 8: Liste verwendeter Software

Software	Hersteller
Graphpad Prism 6	Graphpad, USA
Millar-iOX	Emka Technologies, France
O2View	Hansatech, Germany
ImageLAB	BioRad, USA
Oxygraph Plus	Hansatech, Germany
Image J	NIH, USA

2.2 Tierexperimente

Alle Tiere wurden im Institut für Versuchstierkunde an der RWTH Aachen unter standardisierten Bedingungen gehalten. Die Tiere hatten dauerhaften Zugang zu Nahrung und Wasser (falls nicht anders angegeben) und wurden in Käfig Typ 1 Super Long zu je 4 Tieren gehalten. In den Haltungsräumen herrschte ein 12-h-Tag/Nacht-Rhythmus bei 20–24 °C Raumtemperatur (RT) und einer Luftfeuchtigkeit von 40–65%. Die Tiere wurden regelmäßig von Tierpflegern in frische Käfige umgesetzt, versorgt und auf ihren allgemeinen Zustand überprüft. Die Behandlung mit Substanzen und die versuchsbezogene Versorgung (Narkose, Schmerztherapie) wurde eigenständig durchgeführt.

2.3 Mauslinien

Versuche zur GLP-1-abhängigen Kardioprotektion

In den Versuchen zu GLP-1 beim akuten MI wurden C57BL/6J Mäuse (Charles River) verwendet. Die GLP-1R-abhängigen Versuche erfolgten mit GLP-1R-KO-Mäusen

(Glp1r^{tm1Ddr}, GLP-1R$^{-/-}$, Charles River). Daneben wurden IL-6-KO-Mäuse (IL6^{tm1Kopf}, IL-6$^{-/-}$, Charles River) benutzt. Es wurden ausschließlich 6 Wochen alte, männliche Mäuse verwendet.

Versuche zur GLP-2-abgängigen Protektion

Um den Einfluss von GLP-2 auf die IBD zu untersuchen, wurden 10 Wochen alte, weibliche C57BL/6J Mäuse verwendet. Diese Mäuse wurden aufgrund der Kontaminationsgefahr durch Clostridium difficile in speziellen Räumlichkeiten gehalten und eigenhändig versorgt. Die Haltungsbedingungen waren identisch mit denen in Kapitel 2.2 geschilderten.

2.4 Behandlung zur Analyse der GLP-1-abhängigen Kardioprotektion

Sham-operierte Tiere oder MI-Tiere wurden mit verschiedenen Substanzen behandelt: Linagliptin wurde in einer Konzentration von 3 mg/kg gelöst in 150 µl Wasser durch orale Gavage über 3 Tage einmal täglich verabreicht, die letzte Applikation erfolgte eine Stunde vor LAD-Ligatur.

GLP-1(7-36) gelöst in 0,9% NaCl wurde in einer Konzentration von 100 nM durch intraperitoneale Injektion (i.p.) 12 h sowie 1 h vor dem Infarkt injiziert. Die Kontrolltiere erhielten Natriumchlorid (NaCl).

Der GLP-1R-Antagonist Ex-9 wurde in einer Konzentration von 100 nM in NaCl (0,9%) per i.p. Injektion (100 µl) 12 h sowie 1 h vor LAD-Ligatur Infarkt verabreicht.

Der AMPK-Inhibitor Dorsomorphin wurde in einer Konzentration von 10 mg/kg 12 h sowie 1 h vor LAD-Ligatur i.p. appliziert.

LAD-Ligatur

Die Tiere wurden 1 h vor der Operation zum letzten Mal mit den zu untersuchenden Substanzen behandelt und danach mit Ketamin (100 mg/kg) und Xylazin (10 mg/kg) in NaCl (0,9%) per i.p. Injektion gewichtsadaptiert narkotisiert. Nach Rasur und Desinfektion des Operationareals wurden die Tiere in Rückenlage auf der Operationsplatte mit Wärmeunterlage fixiert. Die Augen wurden gegen Austrocknung mit Bepanthen-Salbe geschützt und eine Schmerztherapie mit Temgesic (0,1 mg/kg subkutan (s.c.)) eingeleitet. Die Intubation und Beatmung der Maus erfolgte oral über die Trachea (Minivent 845, Stroke Volumen 200 µl, Respirationsrate 120 Schläge pro min). Die Intubation wurde unter Sicht durch den Mund des Tieres gelegt. Im Anschluss wurde der Thorax mittels lateraler Thorakotomie (1 cm Schnittlänge) eröffnet und das

Herzen unter Verwendung eines Operationsmikroskops freipräpariert. Die proximale linke Koronararterie wurde mit einem 7-0 Polyamid Faden unterbunden (LAD-Ligatur) und somit ein MI induziert (visuelle Kontrolle des infarzierten Gewebes bei Erblassen des Myokards distal der Ligatur). Mit einem 6-0-Faden wurde der Thorax schichtweise wieder verschlossen. Bei der Sham-OP wurden die Tiere bis auf die LAD-Ligatur gleich behandelt. Die Tiere wurden bei bestehenden Schutzreflexen und suffizienter Eigenatmung wieder extubiert, anschließend in frische Käfige verbracht und mit Wasser jedoch nicht mit Nahrung versorgt. Die Tiere wurden stündlich kontrolliert, um ggf. Leiden zu ersparen.

Herzfunktionsuntersuchung durch Millar-Katheter

Je nach Versuch wurde 3 oder 6 h nach der LAD-Ligatur eine kardiale Kontraktilitätsmessung mittels Millar-Katheter durchgeführt. Hierfür wurden ein spezieller Druckkatheter (Mouse Millar PV Catheter 1,4 F, 4 E, 4,5 mm, 4,5 cm, SPR 1000 ADInstruments, Oxford, United Kingdom) verwendet. Vor der Durchführung wurde die Narkose gewichtsadaptiert mit 10 µl/g Maus Ketamin (100 mg/kg Körpergewicht) und Xylazin (10 mg/kg Körpergewicht) in NaCl (0,9%) eingeleitet. Die Tiere wurden mittels einer Intubationskanüle (1,1 mm Durchmesser, 27 mm Länge) intubiert. Über einen Hautschnitt am lateralen Hals (ca. 1 cm) und stumpfes Präparieren des subkutanen Gewebes wurde die rechte Arteria carotis freigelegt. Um die Arterie mit dem Katheter zu kanülieren, wurde das freipräparierte Gefäß mit Seidenfäden angeschlungen. Der kranialwärts gelegene Faden wurde geknotet und legiert, um eine Blutung zu verhindern. Der andere Faden blieb vorgelegt, bis die Arterie nach einem kleinen Schnitt zur Eröffnung des Gefäß Lumens mit dem Katheter unter dem Stereomikroskop kanüliert wurde und im Anschluss das Gefäß zusammen mit dem Katheter dicht verschloss. Über die Aortenklappe wurde der Katheter in den LV vorgeschoben. Die korrekte Lage wurde anhand von LV-typischen Druckkurven verifiziert. Über den Millar-Katheter wurde die minimale und maximale kardiale Kontraktilität (dp/dt_max/min) sowie die Herzfrequenz (Schläge/ Minute) erfasst. Die Messungen wurden jeweils mit und ohne Dobutamin (1 mg/kg über i.p. Injektion) durchgeführt. Durch Dobutamin wird die kardiale Kontraktilität auf ein Maximum angehoben.

2.5 Behandlung zur Analyse der GLP-2 abhängigen Protektion bei IBD

Dextran-Sodium-Sulfat (DSS) induzierte Colitis

Die Mäuse erhielten 7 Tage lang DSS (3%ig) über das Trinkwasser. Einige Tiere wurden mit dem DPP-4-Inhibitor Linagliptin in einer Konzentration von 3 mg/kg gelöst in 100 µl Wasser einmal täglich über 7 d behandelt. Die Kontrolltiere wurden entsprechend mit der gleichen Menge Trägersubstanz gavagiert. An Tag 6 erfolgte eine 3-stündige Fastenperiode, die mit der oralen Gavage von 100 µl FITC-markiertem Dextran (90 mg/100 g) begann. Nach 4 h erfolgte eine einmalige retrobulbäre Blutentnahme von 150 µl. Die Tiere hatten danach wieder freien Zugang zu Wasser und Nahrung. 2 h vor Versuchsende erhielten die Tiere 100 µl BRDU (3 mg/ml) i.p. Der GLP-2R-Agonist Teduglutid und der GLP-2R-Antagonist GLP-2(3-33) wurden in einer Konzentration von 200 µg/kg in Wasser gelöst verwendet. Die Gabe erfolgte per s.c. Injektion in die Flanke der Tiere zweimal täglich über die Behandlungsdauer. An den Tagen 0, 3, 5 und 7 wurde eine Gewichtskontrolle durchgeführt. Der Gewichtsverlust wurde für die Bewertung der Schwere der Colitis verwendet.

Die Schwere der Colitis wurde mit dem Disease-activity-index (DAI) bewertet. Dieser setzt sich aus den Kriterien Gewichtsverlust, Stuhlbeschaffenheit und rektale Blutung zusammen. Der Gewichtsverlust wurde in Bezug zum Gewicht bei Versuchsbeginn klassifiziert (0: <1% Gewichtsverlust; 1: 1-5% Gewichtsverlust; 2: 5-10%; 3: 10-15% Gewichtsverlust; 4: >15% Gewichtsverlust, jeweils bezogen auf das Ausgangsgewicht). Auch die Stuhlkonsistenz (0: normal; 1: flüssiger Stuhl; 2: Diarrhö; 3: starke Diarrhö). und rektale Blutungen (Haemoccult Test, Beckmann Haemoccult Kit; 0: keine Blutung; 1: wenig Blut; 2: mittel starke Blutung; 3: starke Blutung) bewertet.

Clostridium difficile induzierte Colitis

Die Tiere wurden mit dem Antibiotikum Clindamycin 1,3 µg/ml einmalig per i.p. Injektion behandelt. Am Folgetag erfolgte die orale Gavage von 300 *Clostridium difficile* Sporen in 100 µl PBS. Innerhalb von 3 d besiedelte das Bakterium den Darm und die Tiere erlitten eine akute Colitis. Es wurden täglich Gewichtskontrollen durchgeführt und das allgemeine Befinden der Mäuse begutachtet. Der Gewichtsverlust wurde für die Bewertung der Schwere der Colitis verwendet. Die Linagliptin-Behandlung erfolgte wie in den vorherigen Versuchen mit 3 mg/kg in Wasser per oraler Gavage einmal täglich. Die Behandlung mit Linagliptin erfolgte einen

Tag vor Induktion der Colitis und wurde bis zum Versuchsende an Tag 3 der Colitis durchgeführt. Der GLP-2R-Agonist Teduglutid und der GLP-2R-Antagonist GLP-2(3-33) wurden in einer Konzentration von 200 µg/kg gelöst in Wasser verwendet. Die Gabe erfolgte per s.c. Injektion in die Flanke der Tiere und wurde ebenfalls einen Tag vor Induktion der Colitis begonnen und bis Versuchende zweimal täglich durchgeführt. Die Kontrolltiere wurden entsprechend mit Trägersubstanz behandelt.

2.6 Blut- und Organentnahmen

Die Tiere wurden nach finaler Millar-Katheter-Messung durch zervikale Dislokation getötet. Mittels 1 ml Injektionskanüle wurde Blut direkt aus dem Herzen entnommen, in EDTA-Röhrchen gesammelt und direkt auf Eis bis zur Weiterverarbeitung gelagert. Die Blutproben wurden bei 2000 g für 20 min und 4°C zentrifugiert, in neue 1,5 ml Gefäße überführt und bei -80°C gelagert.

Diese Methode zur Blutentnahme wurde auch bei den Versuchstieren mit der induzierten Colitis angewandt. Hier wurden die Tiere zuerst durch eine Isofluran-Kurznarkose betäubt, per zervikaler Dislokation getötet und das Herz innerhalb kurzer Zeit freipräpariert, um durch die Herzspitze Blut zu entnehmen. Die Organentnahme wurde direkt im Anschluss an die Blutentnahme durchgeführt.

In den MI-Studien wurde das Herz entnommen und in kaltem PBS gespült. Der infarzierte Bereich wurde mit einem Schneideblock (gekühlt, aus Aluminium) mit definiertem Schnittabstand vom Herzen abgetrennt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Der nicht-infarzierte Teil des Herzens wurde nochmals in zwei Teile geschnitten. Davon wurde der zur Herzspitze zugewandte Teil für weitere biochemische Methoden in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Von dem übrigen Stück wurden die anliegenden Gefäße und Vorhöfe abgetrennt und das verbleibende Myokard in der Mitochondrien-Isolationslösung zur Weiterverarbeitung gelagert.

In den Colitis-Modellen wurde der Darm freipräpariert, das Kolon bis zum Zäkum entnommen, aufgeschnitten, in PBS gespült und danach vermessen. Zwei 1 cm lange Teilstücke wurden für weitere biochemische Analysen in Kryoröhrchen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und danach bei -80 °C gelagert. Das übrige Kolon wurde für histologische Untersuchungen in Formaldehyd (10%) gelagert, entwässert und in Paraffin eingebettet.

Für die Bestimmung der GLP-1 Kinetik wurde sowohl vor der MI- bzw. Sham-OP als auch 3, 6 und 12 h nach OP retrobulbär 100 µl Blut entnommen. Um die Belastung der

Tiere gering zu halten, wurden die Tiere in Gruppen eingeteilt, die eine mehrfache postoperative Blutentnahme pro Tier ausschloss. Dementsprechend wurde bei jedem Tier eine basale sowie eine postoperative Blutentnahme durchgeführt. Das Blut wurde in EDTA-Röhrchen gesammelt, bei 2000 g für 20 min und 4°C zentrifugiert, in 1,5 ml Gefäße überführt und bei -80°C gelagert.
Bei den Patienten erfolgte die Blutentnahme durch approbierte Ärzte. Die Proben wurden zentral in einer biologischen Probenbank der Medizin 1 des Uniklinikums RWTH aufbewahrt. Nach Entnahme wurde das Blut zentrifugiert und als Plasma bei -80°C bis zur Verwendung eingefroren. Die für die GLP-1-Versuche verwendeten Proben wurden nach Alter, Geschlecht und Bodymass-Index (BMI) gematcht. Bei dem GLP-2-Projekt wurden ausschließlich Proben von Colitis-Patienten (GLP-2-Projekt) mit einem Calprotektin-Wert >200 mg/kg (Inflammationsmarker) eingeschlossen.

Blutzuckermessung

Die Blutglukose wurde mit dem Blutzuckermesser Contour Bayer® bestimmt. Hierzu wurde retrobulbär mittels einer Kapillare ein Tropfen Blut entnommen oder Serum (-80°C) aufgetaut und der Glukosegehalt nach Anleitung des Geräteherstellers bestimmt.

2.7 Mitochondrien

Ein nicht infarzierter Teil des Herzens wurde nach der Gewebeentnahme für die Isolation der Mitochondrien in kaltem Isolationspuffer (s. Puffer und Lösungen) gelagert und innerhalb von 30 min weiterverarbeitet. Das Gewebe wurde mit 500 µl BSA/Proteinase-Lösung in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt, mit einem Metallbeat versehen und auf Eis gelagert. In einem gekühlten TissueLyzer wurde das Gewebe bei 25 Hz 3 min lysiert und nach erneuter Zugabe von 500 µl BSA/Proteinase-Lösung für weitere 3 min bei 25 Hz lysiert. Die Lösung wurde im Anschluss auf Eis in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei 400 g für 5 min und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde entnommen und bei 7700 g für 10 min bei 4°C zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde in 1,4 ml Mitochondrien-Suspensionslösung resuspendiert und erneut zwei Mal bei 7700 g für 5 min bei 4°C zentrifugiert. Zwischen den Zentrifugationsschritten erfolgte jeweils ein Waschschritt mit 1,4 ml Mitochondrien-Suspensionslösung, in denen jeweils die im Pellet enthaltenen Mitochondrien weiterverarbeitet wurden, wobei eine Proteinbestimmung nach Lowry erfolgte.

Messung der Atmungskettenaktivität der Mitochondrien

Die Messung der Atmungskettenaktivität der Mitochondrien wurde in einem Oxygraph Plus durchgeführt.

400 µg Mitochondrien wurden in 2 ml Atmungspuffer in die Sondenkammer überführt. Anschließend wurde die Kammer verschlossen. Die Messung erfolgte unter ständigem Rühren bei 37°C. Zur Ermittlung der Respirationsleistung der Mitochondrien wurden verschiedene Komponenten der Atmungskette mit einer Hamilton-Spritze über einen Injektionsport in die Kammer injiziert und die darauffolgende Respiration mit der gerätespezifischen Software O2View aufgezeichnet. Für die erste Reaktion wurden 200 µM Pyruvat/Malat (Substrat, Endkonzentration 5 mM) zugeführt. Bei der darauffolgenden Messung wurde 200 mM ADP (Endkonzentration 1 mM) injiziert. Im letzten Schnitt wurde die ATP-Synthase und damit die Atmungskette durch Zugabe von Oligomycin (Endkonzentration 1,3 µM) unterbrochen. Der Respirationskurvenverlauf wurde mit der Oxygraph Plus Software ausgewertet. Dazu wurde die Steigung der einzelnen Abschnitte (Mitochondrien, Substrat, Substrat + ADP) ermittelt und verglichen. Die Steigung spiegelt den Sauerstoffverbrauch in den Komplexen der Atmungskette wider. Für den respiratorischen Quotienten wurde das Verhältnis Substrat + ADP / Substrat gebildet und ist in den einzelnen Ergebnissen als respiratorischer Quotient betitelt. Zusätzlich werden die einzelnen Atmungskomplexe (Komplex 1-4) in den Ergebnissen dargestellt.

2.8 Proteinphosphorylierung

Für die Analyse von Proteinphosphorylierungen wurden Western-Blots aus nicht infarzierten Herzgewebe durchgeführt. Dies erfolgte unter Verwendung der p-AMPK(Thr172) sowie entsprechemdem AMPK total Antikörper (Energiesensor in der Zelle), p-Akt(thr308) und entsprechendem Akt total (Glucose Metabolismus), CD36 (Insulinmetabolismus), Glut4 (Glukosetransporter) und einer Reverenz Caveolin3.

Proteinisolation

Das nicht-infarzierte Herzgewebe wurde nach Entnahme in Kryoröhrchen in flüssigem Stickstoff schockgefrostet und anschließend bei -80°C gelagert. Zur Proteinisolation wurden gleiche Mengen an gefrorenem Gewebe in 300 µl Zelllysepuffer in ein FACS-Röhrchen überführt und auf Eis 3 x 10 sec mit einem Gewebe-Tissue-Mixer lysiert. Die Suspension wurde in 2 ml Reaktionsgefäße überführt und 3 x 30 sec im Ultraschallbad

und Eiswasser sonifiziert. Die Proben wurden bei -80°C gefroren, erneut aufgetaut und bei 14.000 rpm bei 4°C für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in neue Reaktionsgefäße überführt, aliquotiert und bei -80°C gelagert.

Sodium Dodecyl Sulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese-(SDS-PAGE)

Die SDS-Page ist eine Standardmethode für die Auftrennung von Proteinen nach ihrer Molekülmasse in einem elektrischen Feld. Durch den Denaturierungsprozess erhalten die Proteine eine stark negative Ladung und ein gleiches Ladungs-Masse-Verhältnis, wodurch eine Auftrennung nach der Molekülmasse möglich wird.
Für den Einsatz äquivalenter Proteinmengen wurde eine Proteinbestimmung nach Lowry (BioRAD DC Reagenz Kit) durchgeführt. Für die Proteintrennung wurden 1 mm dicke 12%ige Trenngele mit 4%igen Sammelgelen verwendet (s. Tab. 9).

Tabelle 9: Komponenten für die verwendeten Gele.

Trenngel	12%	Sammelgel
Acrylamid 30%	4 ml	0,65 ml
Tris-HCl 1,5 M (pH 8,8)	2,5 ml	1,25 ml
SDS 10%	100 µl	50 µl
dd-H_2O	3,3 ml	3 µl
APS 10%	100 µl	50 µl
TEMED	20 µl	10 µl

Vor dem Beladen der Geltaschen wurden die Proben mit SET-Puffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 50 mM EDTA, 20% w/v Sucrose) auf eine einheitliche Konzentration (25 µg Protein) aufgefüllt und mit 4 µl Reduzierpuffer ergänzt. Nach der Denaturierung (5 min, 95 °C) wurden die Gele beladen. Als Standard wurde der SeeBlue Standard von Biorad verwendet.

Western-Blots

Bei diesem Verfahren werden die durch SDS-PAGE aufgetrennten und im denaturierenden Gel gebundenen Proteine mittels Elektrophorese auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Abbildung 18 zeigt den Aufbau der Transferkassette. Bei 100 V und 75 min wanderten die negativ geladenen Proteine von der Kathode zur Anode und wurden auf der Membran gebunden. Das Blotten erfolgte mit gekühltem Transferpuffer. Die Kammer stand ebenfalls auf Eis.

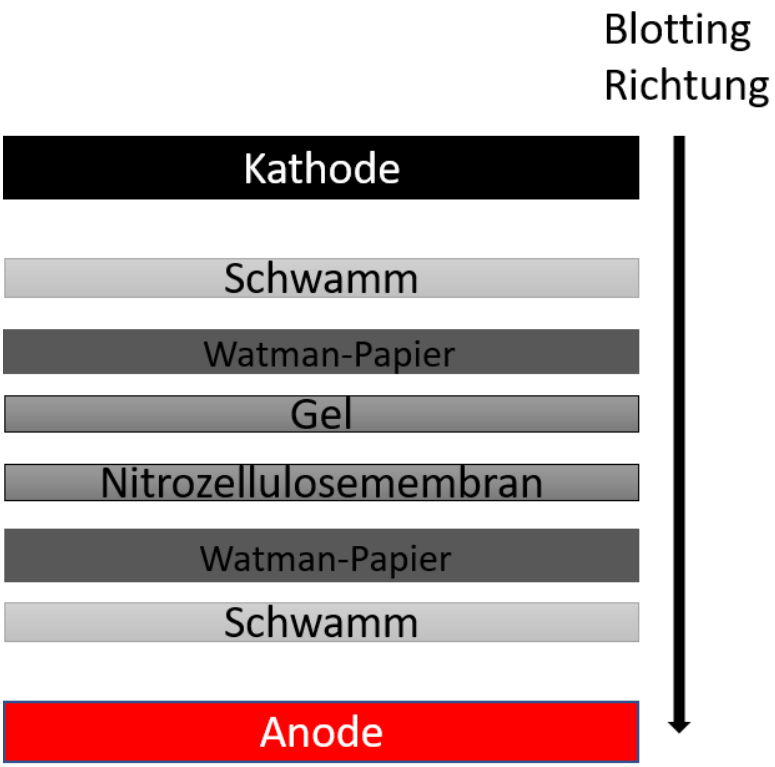


Abbildung 18: Aufbau der Transferkassette zur Übertragung der Proteine auf die Nitrocellulose Membran

Immunodetektion

Nach dem Transfer wurden die Nitrocellulosemembranen zur Abdeckung unspezifischer Bindungsstellen 1 h in 5% Milchpulver in TBS bei RT inkubiert. Danach wurde die Membran in TBST-Puffer gewaschen und mit dem Primärantikörper über Nacht bei 4°C auf einer Schüttlereinheit bei 400 rpm inkubiert (s. Tab. 10). Nach drei Waschschritte mit TBST (jeweils 5 min) wurde die Membran 1 h mit dem Horse-Radish-Peroxidase-(HRP)-konjugierten Sekundärantikörper inkubiert. Nach drei weiteren Waschschritten mit TBST wurden die Proteine direkt im Anschluss unter Verwendung des Super Signal West Pico Chemilumineszenz Substrates im BioRAD Entwickler detektiert.

Tabelle 10: Antikörper-Verdünnungen

		Verdünnung
Primärantikörper	p-AMPK	1:1000
	AMPK	1:1000
	Cav 3	1:1000
	p-Akt	1:1000
	Akt	1:1000

	CD36	1:1000
	Glut-4	1:1000
Sekundärantikörper	Ziege-Anti-Kaninchen, HRP konjugiert	1:10.000
	Ziege-Anti-Maus, HRP konjugiert	1:10.000

Für den Nachweis von mehreren Proteinen auf einer Membran wurden gebundene Antikörper mit einer Detergenzien-haltigen Stripping-Lösung (Thermo Fischer, 15 min, RT, 400 rpm) von der Membran entfernt. Die Membran wurde im Anschluss mit einem anderen Antikörpern inkubiert. Die Detektion und densitometrische Auswertung erfolgte im BioRad Entwickler.

2.9 Nachweis von GLP-1/2 und Insulin

GLP-1/2

Die Detektion des aktiven und gesamten GLP-1 erfolgte mit einem ELISA-Kit (Merck Millipore) nach Herstellerangaben. Die Proben wurden unverdünnt eingesetzt und bei 495 nM im Plattenleser (TECAN) gemessen.

Insulin

Die Insulindetektion erfolgte nach Herstellerangaben (ALPCO). Als Proben dienten murine Serumproben (5 µl). Die Detektion erfolgte im Plattenleser (Tecan) bei 450 nm.

2.10 *In vivo* Permeabilitätsassay

Die Permeabilitätsmessung (DSS-Colitis-Modell) erfolgte mit FITC-markiertem Dextran (Napolitano et al., 1996). Ein Tag vor Versuchsende wurden die Tiere für 3 h nüchtern gesetzt und mit 4 kD FITC-Dextran (0,06 mg/g KG) durch orale Gavage behandelt. Nach 4 h wurde eine Blutentnahme retrobulbär durchgeführt. 100 µl Blut wurden in einer 96-Well-Platte pipettiert und gegen eine FITC-Standardreihe (100µl) verglichen. Die Messung erfolgte im Platten Leser (TECAN) bei einer Extinktion von 492 nm und einer Emission von 525 nm.

2.11 Myeloperoxidase-Assay

Die gesäuberten Colon-Gewebestücke wurde in kaltem Kaliumphosphatpuffer (50 mM K_2HPO_4, 50 mM KH_2PO_4, pH=6,0 und 0,5% Hexadecyltrimethylammonium-Bromid) homogenisiert. Nach 3 Zyklen des Einfrierens und Wiederauftauens wurden das

Homogenisat bei 4000 rpm für 15 min zentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt. 20 µl Überstand oder Myeloperoxidase-Standard wurden in 1 mg/ml o-Dianisidin-Hydrochlorid und 0,0005% Wasserstoffperoxid gegeben. Nach exakt 3 min wurde die Absorption bei 450 nm im Tecan Reader gemessen.

2.12 DPP-4-Aktivitätsassay

Der DPP-4-Assay wurde wie beschrieben durchgeführt (Underwood et al., 1999, Nagakura et al., 2003, Durinx et al., 2000). 5 µl Probe wurden mit 150 µl Tris-HCl (50 mM, pH=7,5) und 1 mM DPP-4 Substrat (DPP-4 H-Gly-Pro-pNa) in eine ELISA-Platte pipettiert und gegen eine Standardreihe aus DPP-4 gemessen. Der Standard bestand aus 1,4 mg p-Na in 10 ml Tris-HCl (höchste Konzentration 1000 µM). Die Messung erfolgte im Tecan Plattenlesegerät bei 405 nm nach 0 und 60 min bei 37°C. Für die Quantifizierung wurde der Wert t=0 (X) min und t=60 (Y) min bei gebildetem pNa in 5µl Plasma über 60 min mit der Formel

$$Aktiviät\ pro\ mL = \frac{(Y*0{,}155)-(X*0{,}155)}{60} * \frac{1000}{5} * \frac{1}{1000}\,\mu mol/min/ml$$

berechnet.

2.13 Nachweis von Blutparametern mit dem Multiplex-Assay

Beim Multiplex-Assay handelt es sich um eine auf magnetischen Antikörper-Beads beruhende Methode, mit der bis zu 60 verschiedene Parameter (Wachstumsfaktoren, Zytokine, Chemokine) in einem geringen Blutvolumen gleichzeitig gemessen werden können. Diese Messungen wurden von einem externen Partner (Myriad RBM) durchgeführt. Die Proben bestanden aus 50 µl Serum. Dies wurde in der Arbeit für die Bestimmung der Maus IL-6 Spiegel verwendet.

2.14 Histologische Untersuchung von Colongewebe

In der vorliegenden Studie wurden mit der Hämatoxylin-Eosin-(H&E) - Färbung entzündete Darmabschnitte, die Oberfläche der Mukosa, die Inflammation und die Immunreaktion bewertet. Für eine Untersuchung der Proliferation im Kolongewebe wurde die BRDU-Färbung genutzt.

H&E-Färbung

Die Gewebestücke wurden nach Entnahme in Formaldehyd (10%) gelagert, anschließend entwässert und in Paraffin eingebettet. Es wurden 4 µM dicke Schnitte angefertigt. Für (immun)histologische Färbungen wurden die Schnitte entparaffiniert (s. Tab. 11) und gewaschen.

Tabelle 11: Entparaffinisierung von Gewebestücken

Prozedur	Zeit
Xylol	2 x 10 min
100% Ethanol	2 x 5 min
96% Ethanol	5 min
70% Ethanol	5 min
Wasser	5 min

Es folgte die H&E-Färbung nach dem in Tabelle 12 aufgelisteten Protokoll.

Tabelle 12: H&E Färbung

Ablauf	Zeit
Hämalaun (filtriert)	2 min
Wasser (waschen)	5 min
Eosin	15 Sekunden
Wasser mit 3% Essigsäure	2 min
Wasser (waschen)	Kurz eintauchen
70% Ethanol	2 min
96% Ethanol	2 min
100% Ethanol	2 min
Xylol	5 min

Die Schnitte wurden nach der Färbung mit Viroclud bedeckt und mit einem Deckglas verschlossen. Für eine längere Lagerung wurden die Schnitte mit Nagellack versiegelt. Die Schnitte wurden unter dem Durchlichtmikroskop anhand der Kriterien Epithelschaden, Ödem und Zellinfiltration bewertet (Theriot et al., 2011):

Ödem: 0 = kein Ödem; 1 = mild mit geringer submuköser Ausdehnung, 2 = moderates Ödem 2–3-fache submuköse Ausdehnung, 3 = starkes Ödem >3-fache Ausdehnung, 4 = starkes Ödem diffuse Submukosa-Ausdehnung.

Zelleinwanderung (Neutrophile): 0 = keine Inflammation, 1 = minimale neutrophile Inflammation, 2 = moderate neutrophile Inflammation, 3 = starke Inflammation weite Areale betroffen, 4 = starke Inflammation mit Abszess-Bildung.

Epithelschaden: 0 = kein Epithelschaden, 1 = minimaler Epithelschaden mit Villus-Rückbildung, 2 = moderater Epithelschaden mit Villus-Rückbildung und apoptotischen Prozessen, 3 = starker Epithelschaden mit Pseudomembranbildung und fibröser

Matrix, 4 = starker Epithelschaden mit deutlicher Pseudomembran oder Epithel-Ulceration.

BRDU-Immunfluoresenz-Mikroskopie

Mit der BRDU-Färbung werden proliferierende Zellen markiert. Die Tiere erhielten BRDU (i.p. 30 µg/g Körpergewicht) 2 h vor Versuchsende. Die Kolongewebestücke wurden bei -80°C in TissueTek eingefroren. 7 µm dicke Kryoschnitte wurden bei RT getrocknet und anschließend mit -20°C kaltem Aceton für 10 min fixiert. Es schloss sich eine Rehydrierung in 1x PBS für 5 min und in 2 M HCl für 30 min an. Die Neutralisation erfolgte mit 0,1 M Natriumborat (pH=8,0) für 9 min. Nach drei Waschschritten in PBS für jeweils 10 min wurden die Schnitte über Nacht bei 4°C mit dem BRDU-Antikörper (1:4000) inkubiert. Am Folgetag wurde nach dreimaligem Waschen in PBS für jeweils 10 min der Anti-Maus Alexa488 Antikörper für 1 h bei RT im Dunkeln auf die Schnitte gegeben. Anschließend wurden die Schnitte für 15 min in PBS gewaschen und 30 min mit Phalloidin in 2 µg/ml in Dimethylsulfoxid (DMSO) gefärbt. Phalloidin bindet an die Actin-Filamente. Nach von 3-maligem waschen von je 10 min in PBS wurden die Schnitte in 4',6-Diamidin-2-Phenylindol-(DAPI)-haltigem Eindeckmedium verbracht. Die Auswertung der BRDU positiven Zellen erfolgte in Image J.

2.15 Statistik

Alle Ergebnisse die in Graphen dargestellt sind, sind als Mittelwert ± Standard Error of the mean (SEM) angegeben. Für die wissenschaftlich übliche statistische Darstellung sind in den einzelnen Versuchen im Text die Standardabweichungen (SDV) zusätzlich angegeben. Die statistische Analyse erfolgte mit dem Student-t-test, der 1 Way ANOVA mit Bonferroni Zusatztest oder der 2 Way ANOVA mit Bonferroni Zusatztest. Unterschiede von $p<0,05$ wurden als statistisch signifikant markiert. Die Ergebnisse wurden in GraphPad Prism 6.0 bearbeitet, erstellt und analysiert.

3 Ergebnisse

3.1 Analyse der Rolle von GLP-1 beim MI

3.1.1 GLP-1-Spiegel in Patienten mit ACS

Um die Fragen zu klären, ob das inflammatorische Ereignis eines akuten MI zu einem Anstieg der GLP-1-Spiegel führt, wurde die GLP-1-Konzentration im Plasma von 158 Patienten zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach einem MI gemessen und mit einem nach Alter, Geschlecht und BMI gematchten Kontrollkollektiv ohne koronare Herzerkrankung und ohne MI (n=15) verglichen. Der mittlere BMI betrug 27,4 kg/m² bei einem durchschnittlichen Alter von 65,9 Jahren (s. Tab. 13). Um zu prüfen, ob auch im sehr akuten Stadium dem STEMI der GLP-1 und IL-6 Spiegel erhöht sind, wurde in einer aus dem Kollektiv stammenden Gruppe mit STEMI (n=24-26) der GLP-1 Spiegel sowie die IL-6 Spiegel verglichen zu einer Kontrollgruppe (n=14-15) gemessen.

Tabelle 13: Patienten der GLP-1-Messung

	Kontrollgruppe (n=15)	MI-Gruppe (n=143)	Gesamt (n=158)
Altersdurchschnitt [Jahren]	64	64	64
BMI [kg/m²]	27	27,2	27,1
Patienten **Weiblich [%]**	15 26%	143 18%	158

Die GLP-1 Konzentration war in der MI-Gruppe an den Tagen 1 und 3, nicht jedoch an Tag 2 nach dem Akutereignis im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht (um das 1,6-Fache ± 13,02 (Standartabweichung (SDV)) p=0,04 an Tag 1 (n=41), 1,5-Fache ± 10,15 (SDV) p=0,2 an Tag 2 (n=37) und um das 1,7-Fache ± 12,5 (SDV) p=0,02 an Tag 3 (n=30), jeweils im Vergleich zur Kontrollgruppe (n=15)) (Abb. 19A). Von den Patienten mit STEMI (definiert im EKG durch ST-Strecken Hebung einen akuten Myokardinfarkt) zeigte sich ein signifikant erhöhter GLP-1 (21,3 ± 10,85 (SDV)) zu (13,8 ± 8,8 (SDV)) als auch IL-6 Spiegel (4,7 ± 3,3 (SDV)) im Vergleich zur Kontrollgruppe (1,6 ± 1,1(SDV)) (Abb.19 B und C)

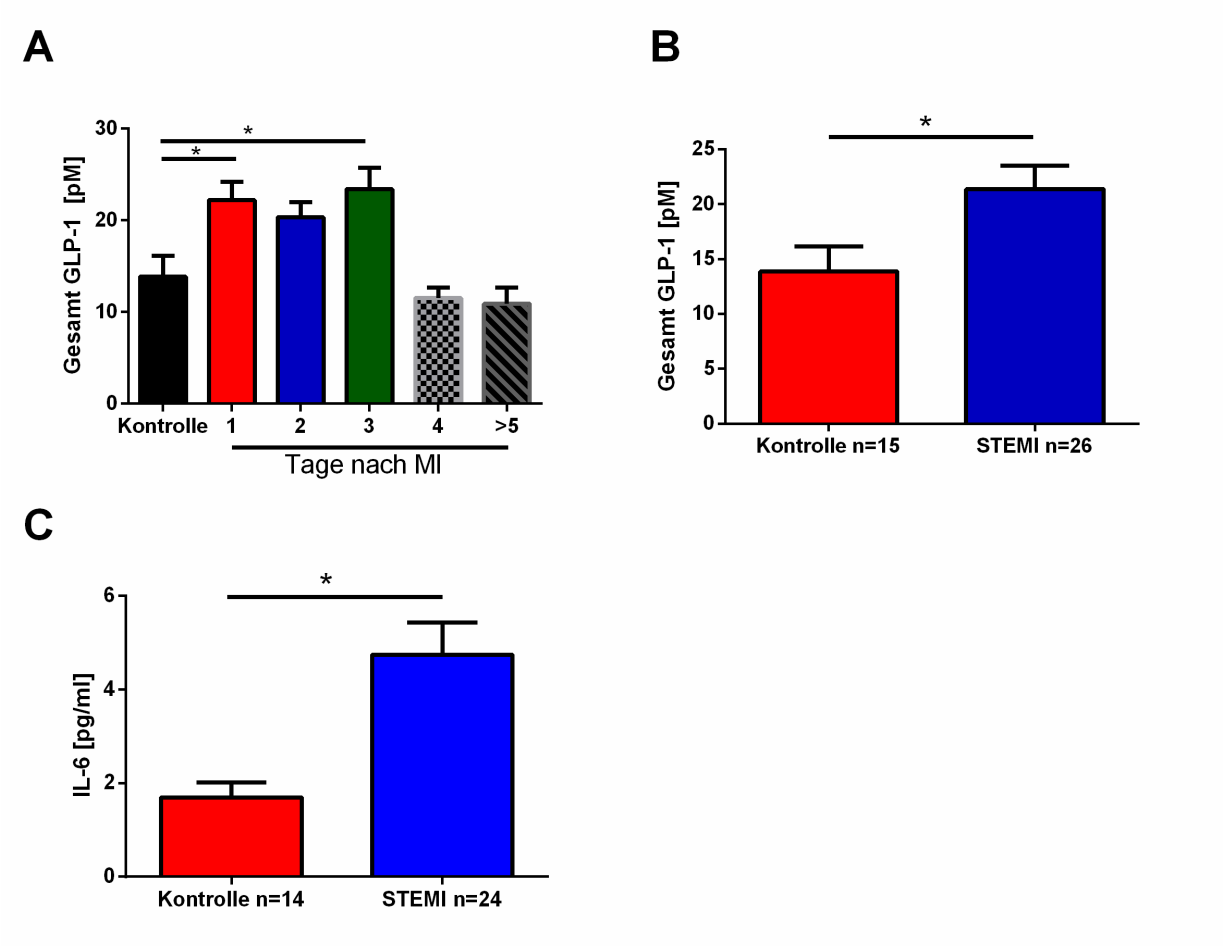


Abbildung 19: GLP-1-Spiegel und IL-6 Spiegel von MI-Patienten und Kontrollpatienten **A:** GLP-1-Plasmakonzentration nach Blutentnahme an verschiedene Tagen nach MI Tag 1 (n=41), Tag 2 (n=37 Tag 3 (n=30), Tag 4 (n=17) Tag 5 (n=18) im Vergleich zu einer Kontrolle (n=15, kein koronares Ereignis, kein MI). GLP-1 Spiegel von STEMI Patienten aus gesamter Kohorte (STEMI Patienten aus allen Tagen gepoolt) (B) und IL-6 Spiegel (C)* p<0,05, One-way ANOVA und Student T-Test.

3.1.2 GLP-1 Serumspiegel im murinen Tiermodell nach akutem MI

Um zu klären, ob die Induktion eines MI im Mausmodell ausreicht, um die GLP-1 Konzentration im Blut erhöhen, wurde in 6 Wochen alten, männlichen C57BL/6J Mäusen ein MI durch eine permanente Ligatur des RIVA induziert. Als Kontrolle dienten Sham-operierte Mäuse ohne Ligatur. Um zu untersuchen, ob durch den MI eine Inflammation der primäre GLP-1 Stimulus ist, wurden zum 6 Stunden Zeitpunkt die IL-6 Spiegel erfasst.

Nach der LAD-Ligatur kam es zu einem zeitabhängigen Anstieg der GLP-1-Konzentration, der nach 3 h signifikant um das 2,5 ± 1,3 (SDV) Fache über dem Ausgangswert lag ($p<0,05$, n=7–8). Nach 6 h war das Maximum (3,6 ± 1,4 (SDV) facher Anstieg; n=8–10, $p<0,0001$) gegenüber dem Ausgangswert erreicht. In

ähnlicher Weise ließ sich auch in der Sham-Gruppe ein Anstieg der GLP-1 Serumkonzentration nachweisen, der jedoch geringer ausgeprägt war, sodass zum 6 h Zeitpunkt die MI-gruppe eine signifikant stärkere GLP-1 Induktion aufwies (n=8–10; p<0,05) (s. Abb. 20A). Zum 6 Stunden Zeitpunkt zeigte sich außerdem ein signifikant erhöhter IL-6 Spiegel (6676 ± 4619 (SDV)) (n=9) zur Sham Kontrolle (55 ± 50 (SDV)) (n=3) (s. Abb. 20B).

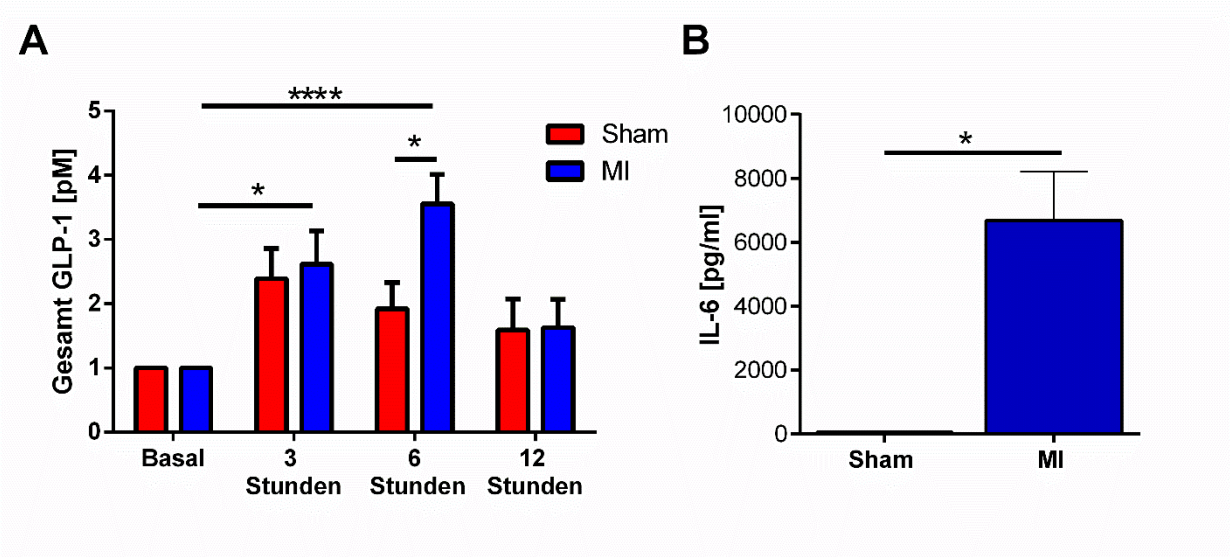


Abbildung 20: Zeitabhängiger Anstieg der Serum-GLP-1-Konzentration nach permanenter LAD-Ligatur in C57BL/6J Mäusen (A) und IL-6 Spiegel (B). Die Darstellung erfolgt für (A) normalisiert zum Ausgangswert. Statistische Auswertung 2-way ANOVA bzw. t-test (n=3–11 MW ± SEM, *p<0,05, ****p<0,0001)

3.1.3 Blutglukose- und Insulinspiegel nach akutem MI

Um zu überprüfen, ob die beobachtete GLP-1-Induktion mit einer Veränderung der Blutglukose- oder des Insulinspiegels einherging, wurden beide Parameter 3, 6 und 12 h nach der LAD-Ligatur bzw. Sham-Operation gemessen, ohne dass sich ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen nachweisen ließ (s. Abb. 21).

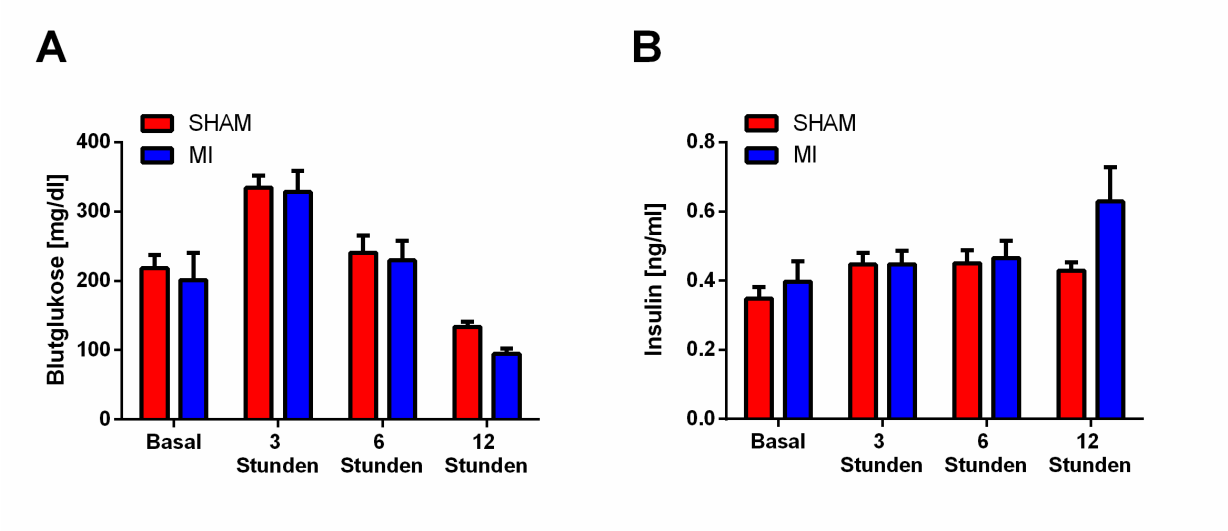


Abbildung 21: Zeitabhängige Glukose- und Insulinspiegel 3, 6 und 12 h nach MI oder Sham-Operation in C57BL/6J Mäusen. A: Blutglukose (n=4–7) **B:** Insulin (n=7–8) MW ± SEM, p=n.s. 2-Way ANOVA mit Bonferroni-Test

3.1.4 Effekt des DDP-4-Inhibitors Linagliptin auf die GLP-1 induzierten Blutglukose- und Insulinspiegel im akuten MI

Um zu überprüfen, welche funktionelle Bedeutung die Induktion von GLP-1 durch einem Myokardinfarkt hat, wurde der DPP-4 Inhibitor Linagliptin verwendet, der eine Degradation und Inaktivierung von aktivem GLP-1 verhindert.

Hierfür wurden die Mäuse über 3 d mit Linagliptin (3 mg/kg) über orale Gavage behandelt, was zum letzten Mal 1 h vor LAD-Ligatur erfolgte. Als Kontrollen dienten mit Wasser als Trägersubstanz behandelte Tiere. Um zu überprüfen, ob unter der gewählten Linagliptin-Konzentration eine suffiziente Inhibition von DPP-4 erreicht wurde, erfolgte eine Quantifizierung der DPP-4 Aktivität 6h post MI, die eine signifikante DPP-4 Inhibition zeigte (s. Abb. 22).

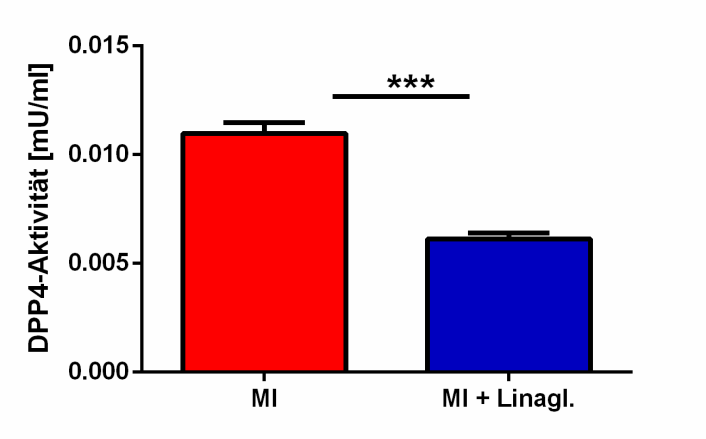


Abbildung 22: DPP-4-Aktivität in C57BL/6J Mäusen nach Linagliptin-Behandlung. DPP-4 Aktivität im Blutserum von 6 Wochen alten, männlichen C57BL/6J Mäusen nach dreitägiger Vorbehandlung mit dem DPP-4 Inhibitor Linagliptin (3 mg/kg, Mi + Linagl.) oder Wasser (MI) 6 h nach der LAD- OP. (n=3–6 MW ± SEM, Student T-Test ****p<0,0001)

Da die vorherigen Versuche gezeigt hatten, dass 6 h nach LAD-Ligatur die GLP-1-Serumspiegel ihr Maximum erreichen, fand die funktionelle Analyse unter DPP-4-Inhibition zu diesem Zeitpunkt statt. Wie Abb. 23 zeigt, ließ sich eine signifikante, 1,9-Fache ± 0,8(SDV) Induktion der aktiven GLP-1 Konzentration durch DPP-4 Inhibition 6 h nach MI im Vergleich zur Sham- und MI-Kontrollgruppe nachweisen (n=4–5). Dieser Anstieg ging mit keiner Veränderung der Insulin- oder Glukosekonzentration 6 h nach MI einher (n=14, s. Abb. 24 A/B).

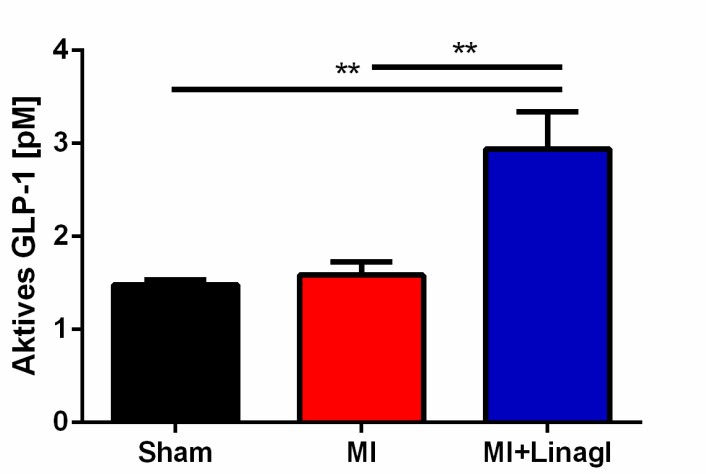


Abbildung 23: Aktiver GLP-1-Spiegel unter DPP-4 Inhibition 6 h nach LAD-Ligatur in C57BL/6J Mäusen. Linagliptin-abhängiger Anstieg der aktiven GLP-1 Spiegel um das 1,9-Fache ± 0,8 (SDV) 6 h nach MI (Linagliptin (3 mg/kg)) im Vergleich zur MI- und Sham-Kontrolle (n=4–5, MW ± SEM, 1-Way ANOVA mit Bonferroni-Test zum Vergleich von MI und MI + Linagl. sowie von MI und SHAM **p<0,01)

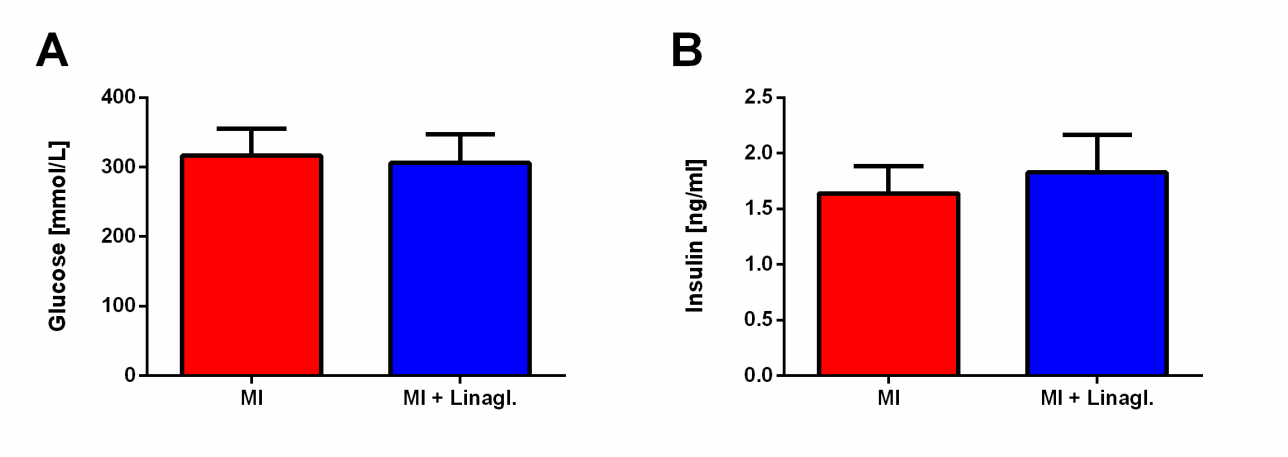


Abbildung 24: Glukose- und Insulinspiegel in C57BL/6J Mäusen nach MI mit und ohne Linagliptin-Behandlung. Glukose (n=14/Gruppe) **(A)** und Insulinmessung (n=14) **(B)** aus Blutserum von 6 Wochen alten, männlichen C57BL/6J Mäusen mit und ohne dreitägige Vorbehandlung mit dem DPP-4 Inhibitor Linagliptin (3 mg/kg) 6 h nach MI. Ergebnisse dargestellt als MW ± SEM, Student T-Test.

3.1.5 Rolle von IL-6 bei der MI-abhängigen Induktion von GLP-1

Arbeiten von Kahles et al. (Kahles et al., 2016) konnten zeigen, dass die Endotoxin-abhängige GLP-1-Induktion durch IL-6 vermittelt wird. Um zu überprüfen, ob dieser Zusammenhang auch für die MI-abhängige Induktion von GLP-1 zutrifft, wurde eine LAD-Ligatur in männlichen IL-6-KO-Mäuse und entsprechenden WT-Kontrollmäusen durchgeführt. 6 h nach der OP wurde die GLP-1-Konzentration im Blutserum bestimmt. Es zeigte sich kein Unterschied zwischen den Gruppen (Abb. 25) (n=3–5, MW ± SEM, Student T-Test).

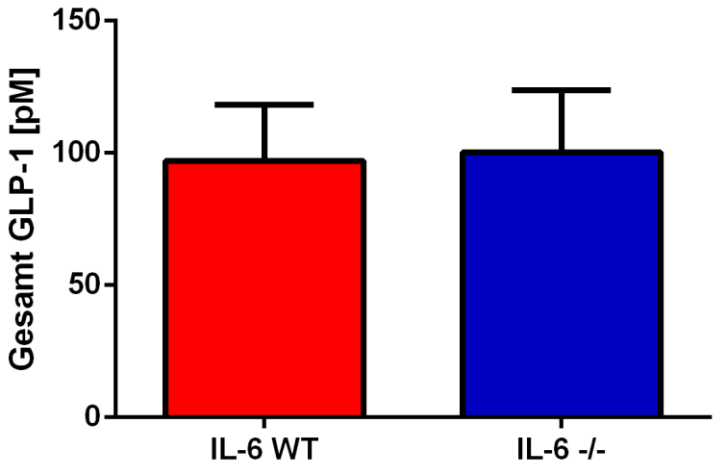


Abbildung 25: GLP-1 Spiegel 6 h nach MI in IL-6$^{-/-}$-KO- und WT-Mäusen. Daten dargestellt als MW ± SEM Student T-Test, p=n.s.)

3.1.6 Linagliptin abhängige Zunahme der LV-Kontraktilität nach LAD-Ligatur

Um zu überprüfen, ob die Aktivierung des endogenen GLP-1-Systems durch DPP-4-Inhibition zu einer Veränderung der LV-Funktion nach MI führt, wurde 6 h nach LAD-Ligatur die LV-Kontraktilität über einen Millar-Katheter mit und ohne Dobutamin-Stress bestimmt. Während durch den MI die erwartete Reduktion der LV-Kontraktilität nachgewiesen werden konnten, führte eine Vorbehandlung mit Linagliptin (3 mg/kg) zu einer signifikanten Verbesserung der kardialen Kontraktilität unter Dobutamin (1 mg/ml i.p.) Stress 6 h nach LAD-Ligatur im Vergleich zur Kontrolle ohne Linagliptin (10660 ± 1747 mmHg/s (SDV) vs. 7808 ± 1097 mmHg/s (SDV), p<0,0001, n=6–14) (Abb. 26 A). Dies ging ebenfalls mit einer signifikant besseren Relaxation (MI vs. Linagliptin p<0,05, n=6–14) (Abb. 26 B) jedoch ohne Veränderung der Herzfrequenz einher (n=6–14/Gruppe) (Abb. 26 C).

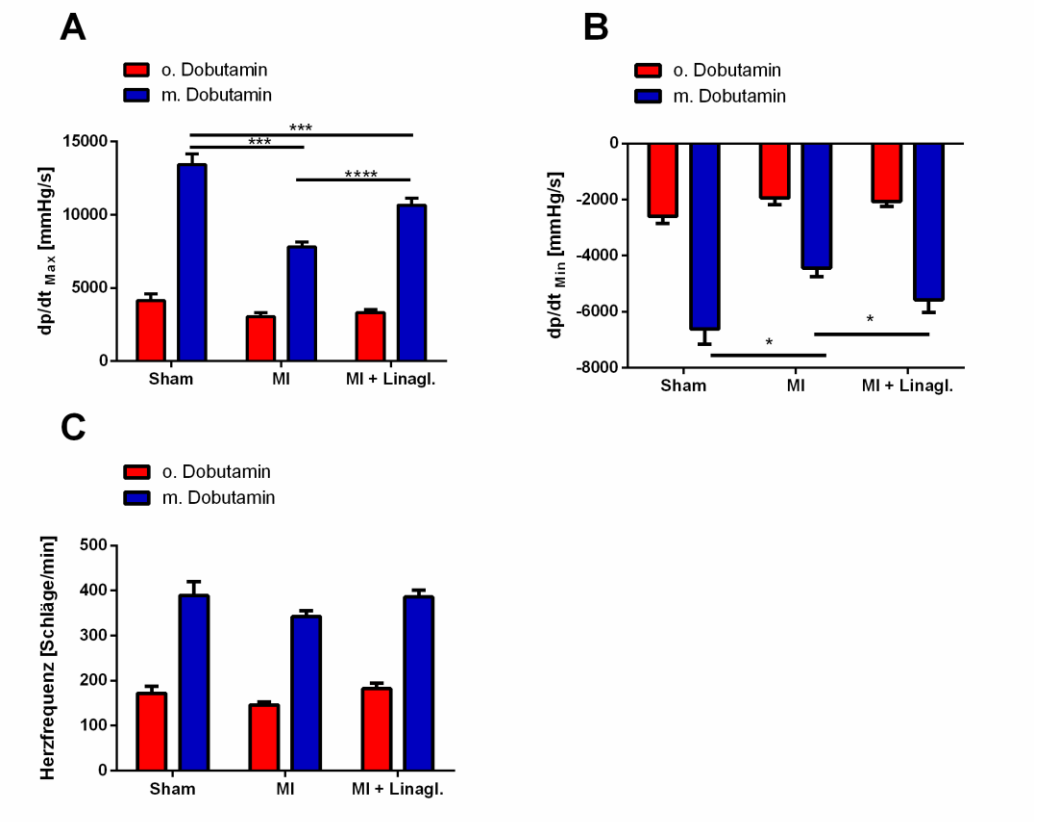


Abbildung 26: Kardiale Kontraktilität 6 h nach permanenter LAD-Ligatur ± Vorbehandlung mit dem DPP-4-Inhibitor Linagliptin. Kardiale Kontraktilität und Herzfrequenz erfasst durch Millar-Katheter mit und ohne Dobutamin-Stress in 6 Wochen alten, männlichen C57BL/6J Mäusen 6 h nach MI. **A:** Kardiale Kontraktilität als maximale Druck/Zeit-Funktion **B:** Relaxation der Herzfunktion als minimale Druck/Zeit-Funktion. **C:** Herzfrequenz. Ergebnisse dargestellt als MW ± SEM n=6–14, 2-Way ANOVA mit Bonferroni-Test, *p<0,05, ***p<0,001, ****p<0,0001)

Im Anschluss wurde untersucht, ob eine DPP-4-Inhibition die LV-Funktion auch schon zu einem früheren Zeitpunkt nach LAD-Ligatur – an dem noch keine maximale GLP-1-Induktion vorliegt, verbessert. Dazu wurde eine Kontraktilitätsmessung 3 h nach LAD-Ligatur mit vs. ohne Linagliptin-Behandlung durchgeführt. Wie in Abb. 27 dargestellt, ließ sich die LV-Kontraktilität als auch die LV-Relaxation zu diesem Zeitpunkt nicht durch eine Behandlung mit dem DPP-4 Inhibitor beeinflussen, während sich ebenfalls kein Unterschied der Herzfrequenz zeigte (n=4–5/Gruppe) (Abb. 27 A–C).

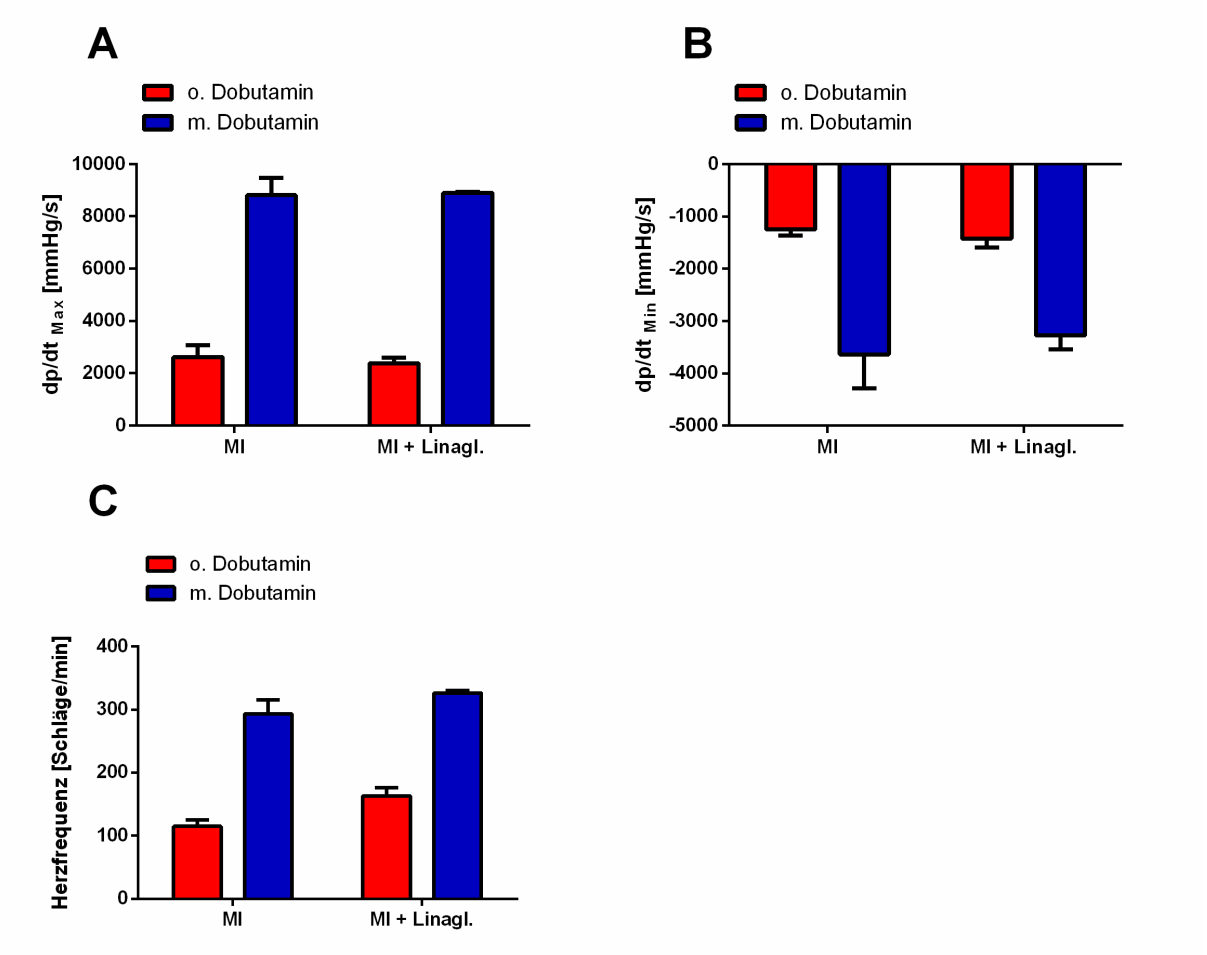


Abbildung 27: Kardiale Kontraktilität 3 h nach LAD-Ligatur ± Vorbehandlung mit dem DPP-4 Inhibitor Linagliptin. Kardiale Kontraktilität und Herzfrequenz erfasst durch Millar-Katheter mit und ohne Dobutamin-Stress in 6 Wochen alten, männlichen C57BL/6J Mäusen 3 h nach MI. **A:** Kardiale Kontraktilität als maximale Druck/Zeit-Funktion **B:** Relaxation der Herzfunktion als minimale Druck/Zeit-Funktion. **C:** Herzfrequenz. (n=4–5, MW ± SEM, 2-Way ANOVA mit Bonferroni-Test)

3.1.7 GLP-1(7-36) abhängige Zunahme der LV-Kontraktilität nach LAD-Ligatur

Um zu überprüfen, ob eine Zunahme der LV-Kontraktilität durch Applikation von GLP-1 erreicht werden kann, wurden 100 nM GLP-1 12 h und 1 h vor LAD-Ligatur durch i.p. Injektion verabreicht. Wie Abb. 28 zeigt, führte diese Behandlung sowohl 3 h als auch 6 h nach der LAD-Ligatur unter Dobutamin-Behandlung zu einer signifikanten Verbesserung der LV-Funktion (LV-Kontraktilität 3h nach LAD Ligatur in der Kontrolle 7092 ± 2142 mmHg/s (SDV) und in der GLP-1-Gruppe 9366 ± 1056 mmHg/s; n=5–7, $p<0,05$; Abb. 28 A). In ähnlicher Weise ließ sich auch eine verbesserte Relaxation unter Behandlung mit GLP-1 3h nach LAD-Ligation nachweisen (Kontrolle: -3479 ± 441 mmHg/s (SDV) vs.GLP-1-Gruppe: -4155 ± 618 mmHg/s (SDV); n=5–7, $p<0,01$; Abb. 28 B)). Diese Ergebnisse bestätigten sich auch zum 6 h Zeitpunkt nach LAD-Ligatur (Kontrolle: 7808 ± 1097 mmHg/s (SDV) vs. GLP-1: 10195 ± 1562 mmHg/s (SDV); n=11–12, $p<0,001$ für Kontraktilität; Abb. 28 D) und Kontrolle: -4442 ± 1074 mmHg/s (SDV) vs. GLP-1: -6261 ± 1792 mmHg/s (SDV); n=11–12, $p<0,01$ für Relaxation; Abb. 28 E). Diese Effekte waren unabhängig der Herzfrequenz (Abb. 28 C und F).

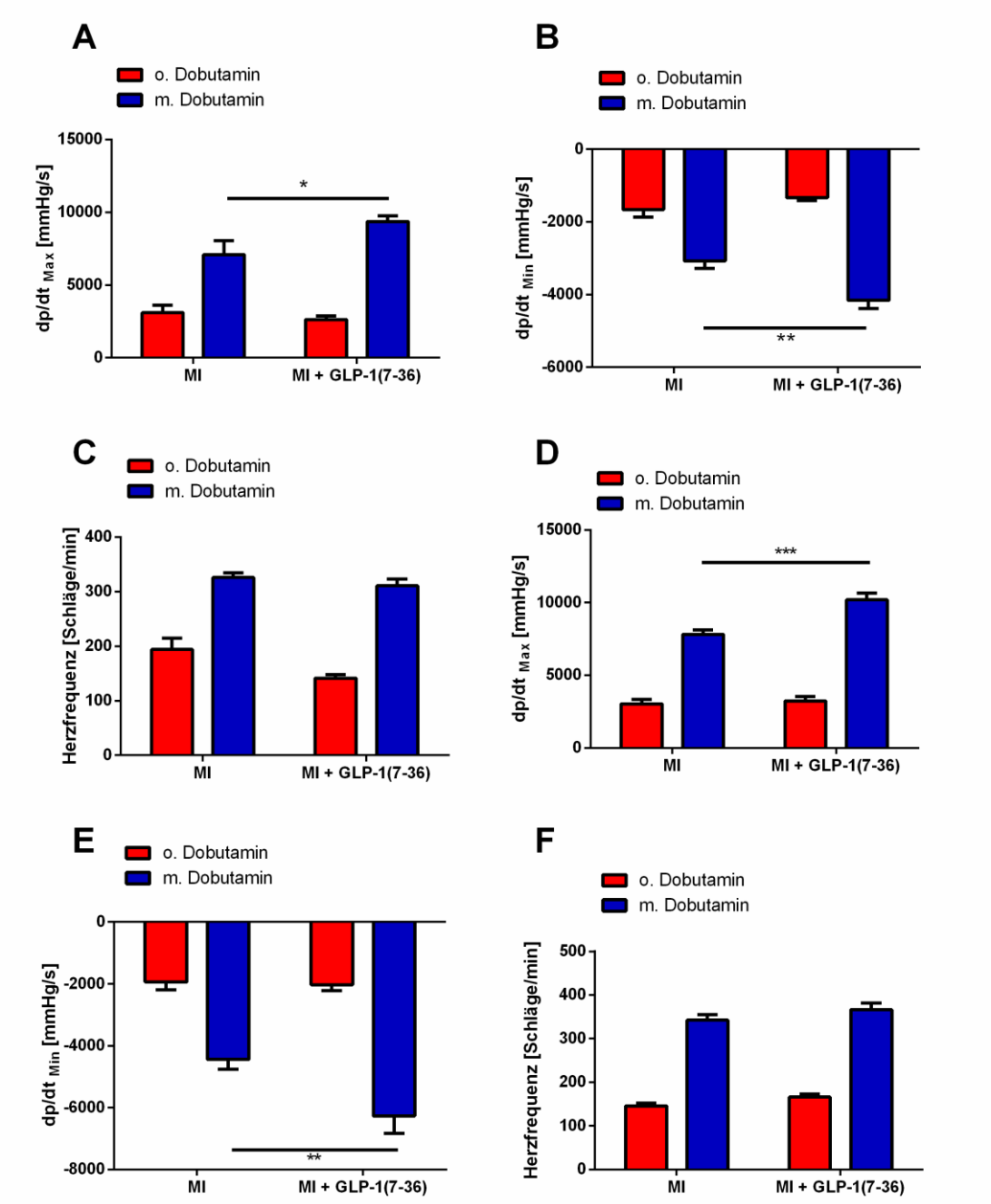


Abbildung 28: Kardiale Kontraktilität 3 h (A–C) und 6 h (D–F) nach permanenter LAD Ligatur und Vorbehandlung mit GLP-1(7-36)(100 nM/kg). Kardiale Kontraktilität, Relaxation und Herzfrequenzerfasst durch einen Millar-Katheter mit und ohne Dobutamin (1 mg/kg) in 6 Wochen alten, männlichen C57BL/6J Mäusen. **A und D:** Kardiale Kontraktilität als maximale Druck/Zeit-Funktion **B und E:** Relaxation der Herzfunktion als minimale Druck/Zeit-Funktion. **C und F:** Herzfrequenz. Daten dargestellt als MW ± SEM, 2-Way ANOVA mit Bonferroni-Test, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001)

3.1.8 Beteiligung von AMPK an der kardialen Kontraktilität

Um zu prüfen, über welche Mechanismen GLP-1 die LV-Kontraktilität verbessert, wurden verschiedene Signalwege und Proteine im nicht infarziertem Herzgewebe 6 h der LAD-Ligatur untersucht.

Nach DPP-4-Inhibition durch Linagliptin konnte eine 1,7-fache Induktion ($p<0,05$) der AMPK-Phosphorylierung und eine 3,3-fache Induktion ($p<0,001$) des Fettsäure-Transporters CD36 nachgewiesen werden. Parallel dazu kam es zu einer Suppression ($p<0,01$) der Insulin-Rezeptor nachgeschalteten Akt-Phosphorylierung und zu einer 2,4-fachen Suppression ($p<0,001$) des Glukosetransporters Glut-4 ($n=6$) (Abb. 29).

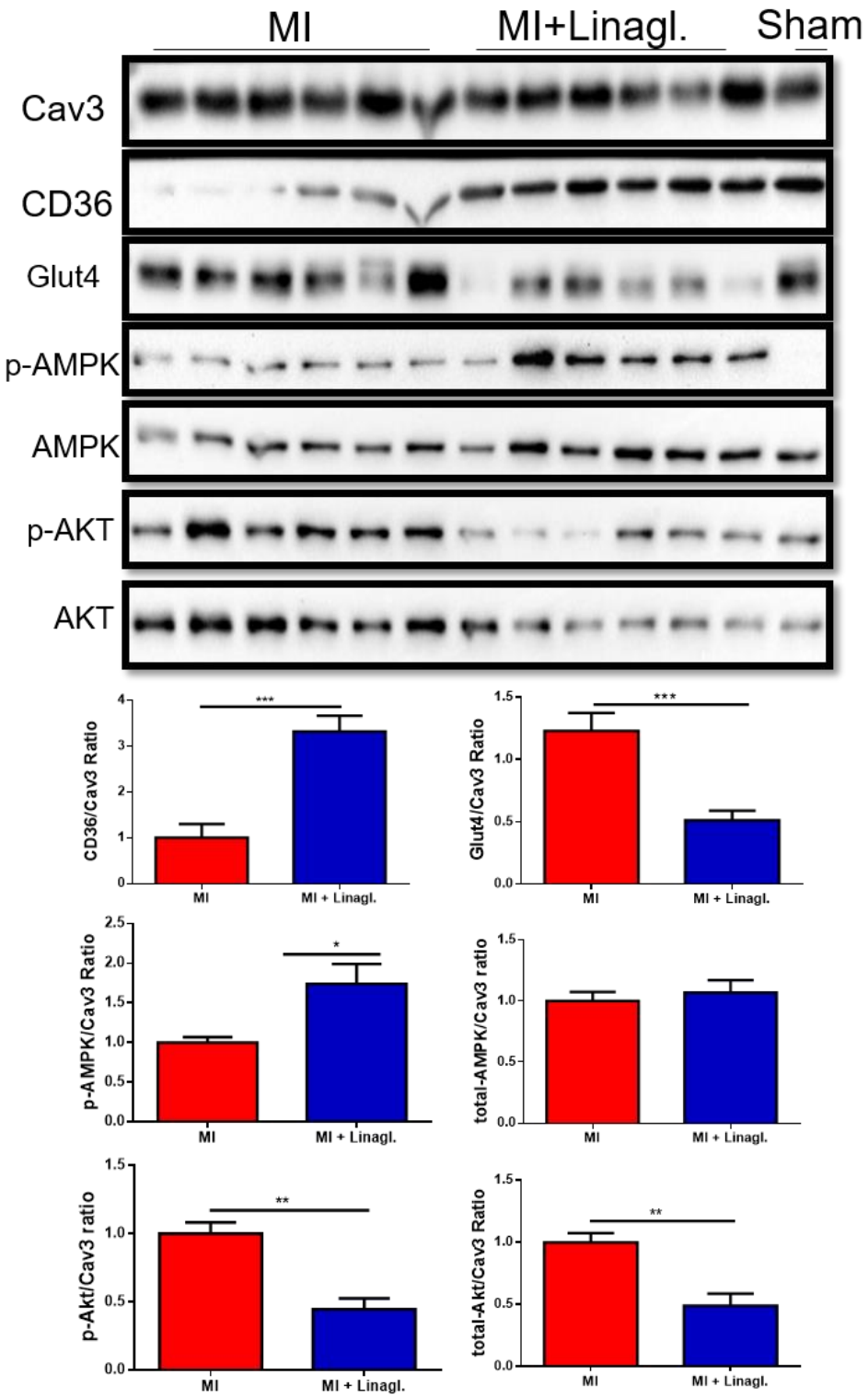


Abbildung 29: Western-Blot Analyse aus nicht infarziertem Herzgewebe 6h nach Myokardinfarkt. Nicht infarziertes Herzgewebe aus C57BL/6J Mäusen mit und ohne Vorbehandlung mit dem DPP-4 Inhibitor Linagliptin (3 mg/kg). Das Gewebe wurde 6 h nach der LAD-Ligatur entnommen. Expression von CD36, Glut-4, AMPK, p-AMPK, p-AKT und AKT im Vergleich zu einem Housekeeping-Protein (Caveolin-3, CAV3) und einer Sham-Kontrollgruppe. Auszug eines Originalblots, bearbeitet in Biorad Labview. Säulen entsprechen n=6 pro Gruppe, dargestellt MW ± SEM, 1-Way ANOVA, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001

3.1.9 GLP-1(7-36) und Linagliptin verbessern die Respiration primärer Mitochondrien aus nicht infarziertem Myokard nach LAD-Ligatur

Um die Hypothese zu überprüfen, ob die GLP-1-abhängige Induktion der LV-Kontraktilität über eine gesteigerte mitochondriale Respiration nach MI vermittelt wird, wurden primäre Mitochondrien, aus nicht-infarziertem Myokard 6h nach LAD-Ligatur isoliert.

Unter Vorbehandlung mit Linagliptin (3 mg/kg; n=7, p<0,05) oder GLP-1(7-36) (100 nM/kg; n=6–8, p<0,05) ließ sich jeweils ein signifikanter Anstieg des respiratorischen Quotienten nachweisen (Abb. 30 A/C). Dies ließ sich insbesondere auf eine gesteigerte Stadium 3-Respiration (nach Zugabe von Pyruvat, Malat und ADP) zurückführen (Abb. 30 B/D).

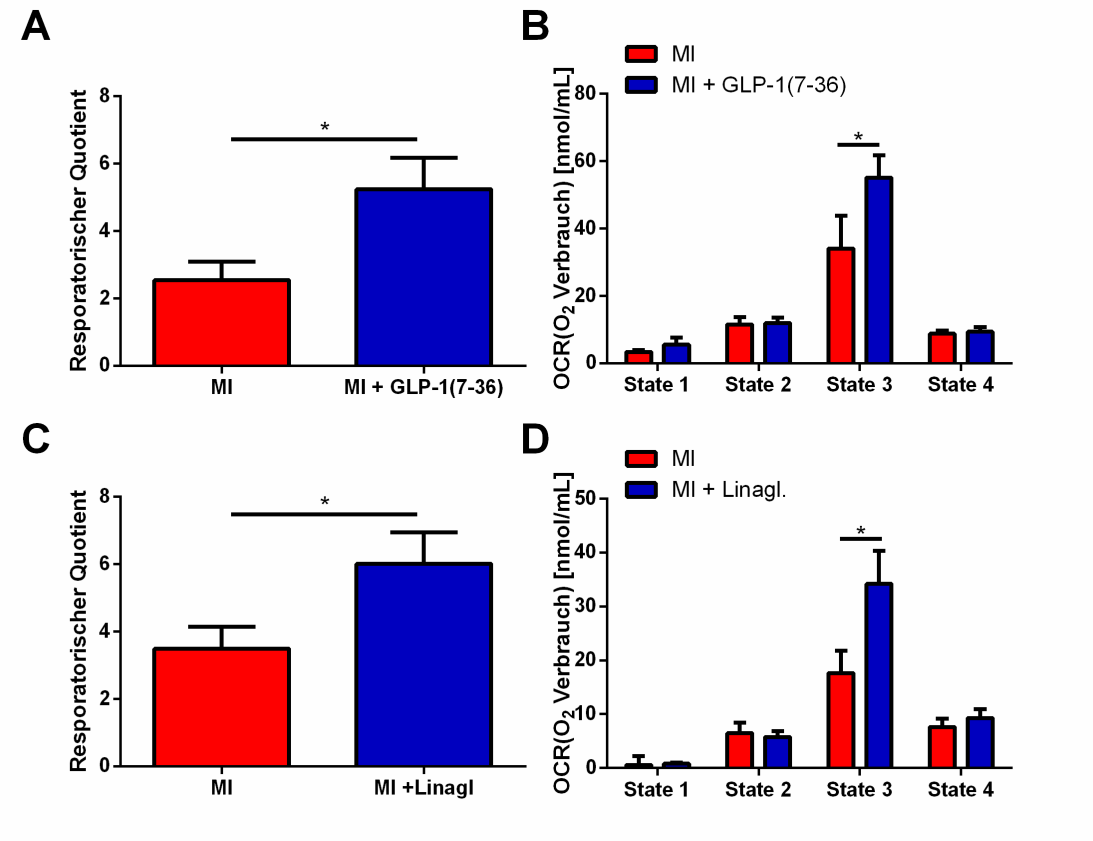


Abbildung 30: Mitochondriale Funktion (A und C) und mitochondriale Respiration ohne Substrat (State 1) nach Zugabe von Pyruvat/Malat (State 2) und zusätzlicher Zugabe von ADP (State 3) sowie Oligomycin (State 4) (B und D). Messungen von primären Mitochondrien aus nicht-infarziertem Gewebe von C57BL/6J Mäusen vorbehandelt mit GLP-1(7-36) (100 nM/kg) (A und B) oder Linagliptin (3 mg/kg) (C und D) 6 h nach permanenter LAD-Ligatur**.** State 1: Sauerstoffverbrauch der Mitochondrien allein; State 2: Sauerstoffverbrauch nach Substratzugabe (Pyruvat/Malat); State 3: maximale Respiration nach Zugabe von ADP; State 4: Inhibition der ATP-Synthase nach Oligomycin Zugabe. Daten dargestellt als MW ± SEM, Respiratorische Quotienten (A, C) Student T-Test *p<0,05, OCR (B, D) 2-Way ANOVA *p<0,05)

3.1.10 Der GLP-1R-Antagonisten Ex-9 reduziert die LV-Kontraktilität nach LAD-Ligatur

Um zu überprüfen, ob die Linagliptin-abhängige Steigerung der kardialen Kontraktilität über eine Aktivierung des GLP-1R vermitteltet wird, erhielten die Mäuse 12 h sowie unmittelbar vor der LAD-Ligatur den GLP-1R-Antagonisten Ex-9 (100 nM/kg) i.p. injiziert. Wie in Abb. 31 A gezeigt, kam es unter Ex-9 zu einer signifikanten Reduktion der kardialen Kontraktilität (dp/dt max: 6540 ± 1062 mmHg/s (SDV) im Vergleich zur MI-Kontrollgruppe 8059 ± 1001 mmHg/s (SDV) unter Dobutamin Stress (n=9–12, p<0,05). Des Weiteren zeigte sich eine signifikante Zunahme der Relaxation (dp/dt min: -3404 ± 1107 mmHg/s ebenfalls im Vergleich zur MI Kontrollgruppe -4442 ± 1074 mmHg/s (SDV) (n=7–12, p<0,05) (Abb. 31 B). Die beschriebenen Effekte waren unabhängig der Herzfrequenz (Abb. 31 C).

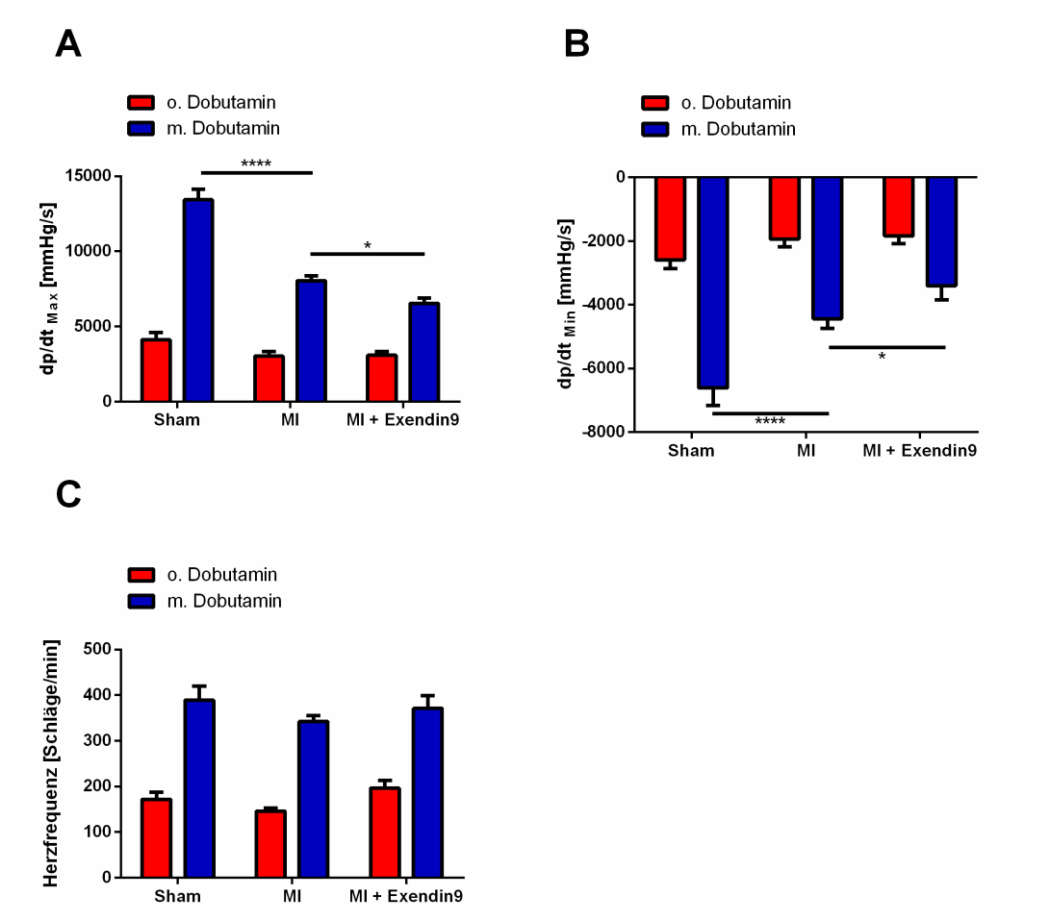


Abbildung 31: Kardiale Kontraktilität unter Antagonisierung des GLP-1R mit Exendin-9 (100nM/kg) in C57BL/6J Mäusen 6 h nach permanenter LAD Ligatur oder Sham OP. Millar-Katheter Messung mit und ohne Dobutamin (1 mg/kg) in 6 Wochen alten, männlichen C57BL/6J Mäusen **A:** Kardiale Kontraktilität als maximale Druck/Zeit-Funktion (n=9–12). **B:** Relaxation der Herzfunktion als minimale Druck/Zeit-Funktion. (n=7–12). **C:** Herzfrequenz (n=9–12). MW ± SEM, 2-Way ANOVA mit Bonferroni-Test *p<0,05, **p<0,01, ****p<0,0001)

3.1.11 Die Linagliptin-abhängige Zunahme der kardialen Kontraktilität geht durch Antagonisierung des GLP-1 Rezeptors verloren

Um zu überprüfen, ob die unter DPP-4-Inhibition beobachtete Zunahme der LV-Kontraktilität GLP-1R vermittelt ist, führten wir eine kombinierte Behandlung mit Linagliptin (3 mg/kg) und dem GLP-1R-Antagonisten Ex-9 (100 nM/kg) durch und bestimmten die LV-Kontraktilität 6h nach LAD-Ligatur. Die zusätzliche Gabe von Exendin-9 führte zu einem etwa 70%-Verlust der durch Linagliptin gewonnenen LV-Kontraktilität. Während die Linagliptin behandelte Gruppe eine signifikante Verbesserung der kardialen Kontraktilität im Vergleich zur MI-Kontrollgruppe aufwies (Linagliptin; dp/dt max: 10917 ± 1747 mmHg/s vs. Kontrolle; dp/dt_max: 7808 ± 1097 mmHg/s (SDV); n=12–14, $p<0,05$) (Abb. 32 A). Durch die kombinierte Behandlung aus Linagliptin und Exendin-9 wurde diese Verbesserung der LV-Kontraktilität signifikant abgeschwächt (8872 ± 1089 mmHg/s (SDV); n=7–14, $p<0,05$) (Abb. 32A). Die zusätzliche Gabe von Exendin-9 führe zu keiner Veränderung der Relaxation oder der Herzfrequenz (Abb. 32 B und C).

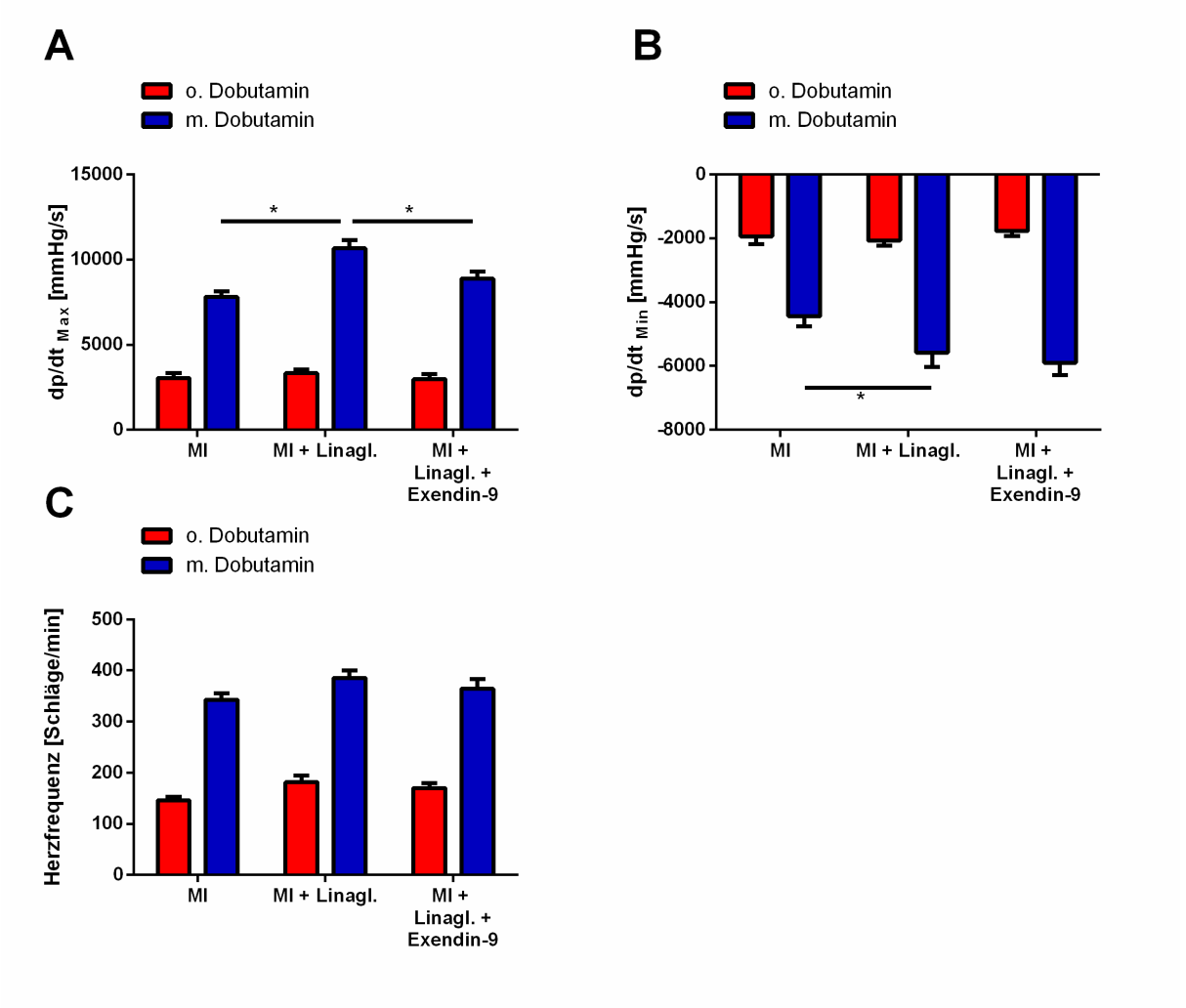


Abbildung 32: Der GLP-1R-Antagonist Ex-9 hebt die Linagliptin-abhängige Zunahme der LV-Kontraktilität 6 h nach LAD-Ligatur auf. Millar-Kathetermessung mit und ohne Dobutamin (1 mg/kg) in 6 Wochen alten, männlichen C57BL/6J Mäusen nach Vorbehandlung mit Linagliptin(3 mg/kg), Ex-9 (100 nM/kg) oder einer Kombination der beiden Substanzen. **A:** Kardiale Kontraktilität als maximale Druck/Zeit-Funktion (n=12–14) **B:** Relaxation der Herzfunktion als minimale Druck/Zeit-Funktion **C:** Herzfrequenz (n=9–14). MW ± SEM, 2-Way ANOVA mit Bonferroni-Test *p<0,05, ****p<0,0001)

3.1.12 Effekt des GLP-1R-Antagonisten Ex-9 6 h nach LAD-Ligatur auf die AMPK- und p-AMPK-Expression

Um die molekularen Mechanismen der Ex-9-Wirkung besser zu verstehen, wurde die Expression von AMPK sowie p-AMPK 6 h nach LAD-Ligatur im Western-Blot untersucht. Die Antagonisierung des GLP-1R führte zu einer 2,7-fachen Reduktion (p<0,001) von AMPK und zu einer 15-fachen Reduktion (p<0,0001) von p-AMPK (n=4)(Abb. 33).

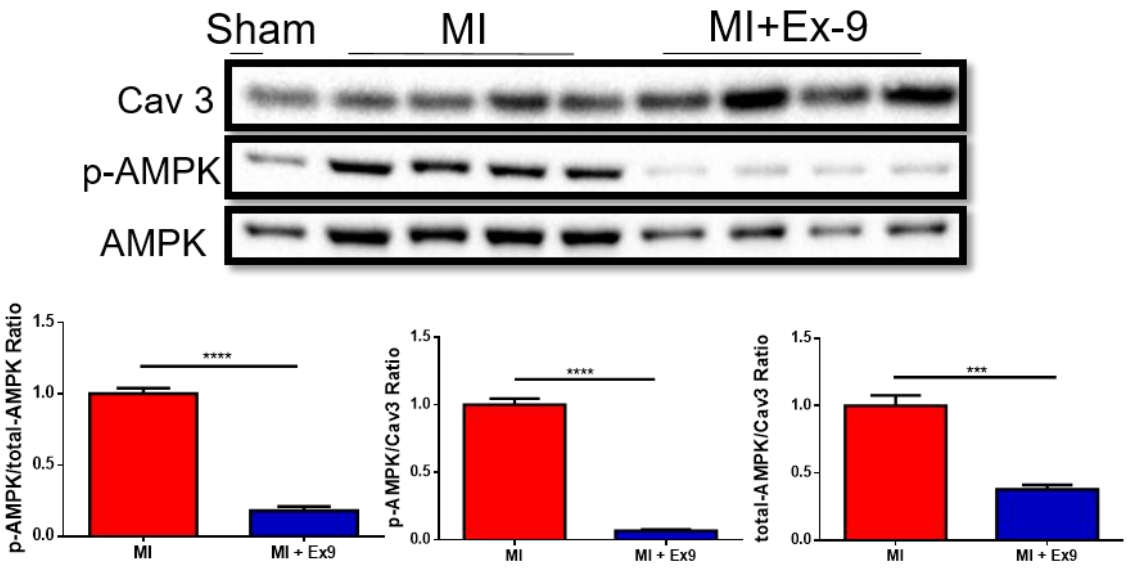


Abbildung 33: Western-Blots aus nicht infarziertem Herzgewebe nach Ex-9 Vorbehandlung. Gewebe aus C57BL/6J Mäusen nach Vorbehandlung mit dem GLP-1R-Antagonist Ex-9. Das Gewebe wurde 6 h nach der LAD-Ligatur und nach der Millar-Kathetermessung isoliert. Als Kontrolle dienten Gewebeproben von Sham-operierten Tieren. p-AMPK- und AMPK-Expression im Vergleich zur Expression des Housekeeping-Proteins (Cavelin-3, Cav3). Originalblots und densitometrisch quantifizierte Daten (n=4) MW ± SEM, 1-Way ANOVA,***p<0,001, ****p<0,0001.

3.1.13 Kardiale Kontraktilität in GLP-1-R-KO-Mäusen unter DPP-4-Inhibition

Um die Relevanz des GLP-1R für die Zunahme der kardialen Kontraktilität unter DPP-4-Inhibition zu überprüfen, wurden GLP-1R-KO-Mäuse (GLP-1R$^{-/-}$) mit Linagliptin (3 mg/kg) oder Trägersubstanz behandelt. Die GLP-1-R-KO-Mäuse zeigten keine Zunahme der LV-Kontraktilität im Vergleich zu unbehandelten GLP-1-R-KO-Mäusen und GLP-1-R-WT-Mäusen (8999 ± 2115 mmHg/s (SDV)) vs. 9552 ± 1310 mmHg/s (SDV)) vs. 9484 ± 1729 mmHg/s (SDV)) 6 h nach permanenter LAD-Ligatur mit und ohne Dobutamin-Gabe (1 mg/kg) (n=7–14) (Abb. 34 A). Weiter ließ sich keine Veränderung der Relaxation und Herzfrequenz beobachten (n=7–14) (Abb. 34 B und C).

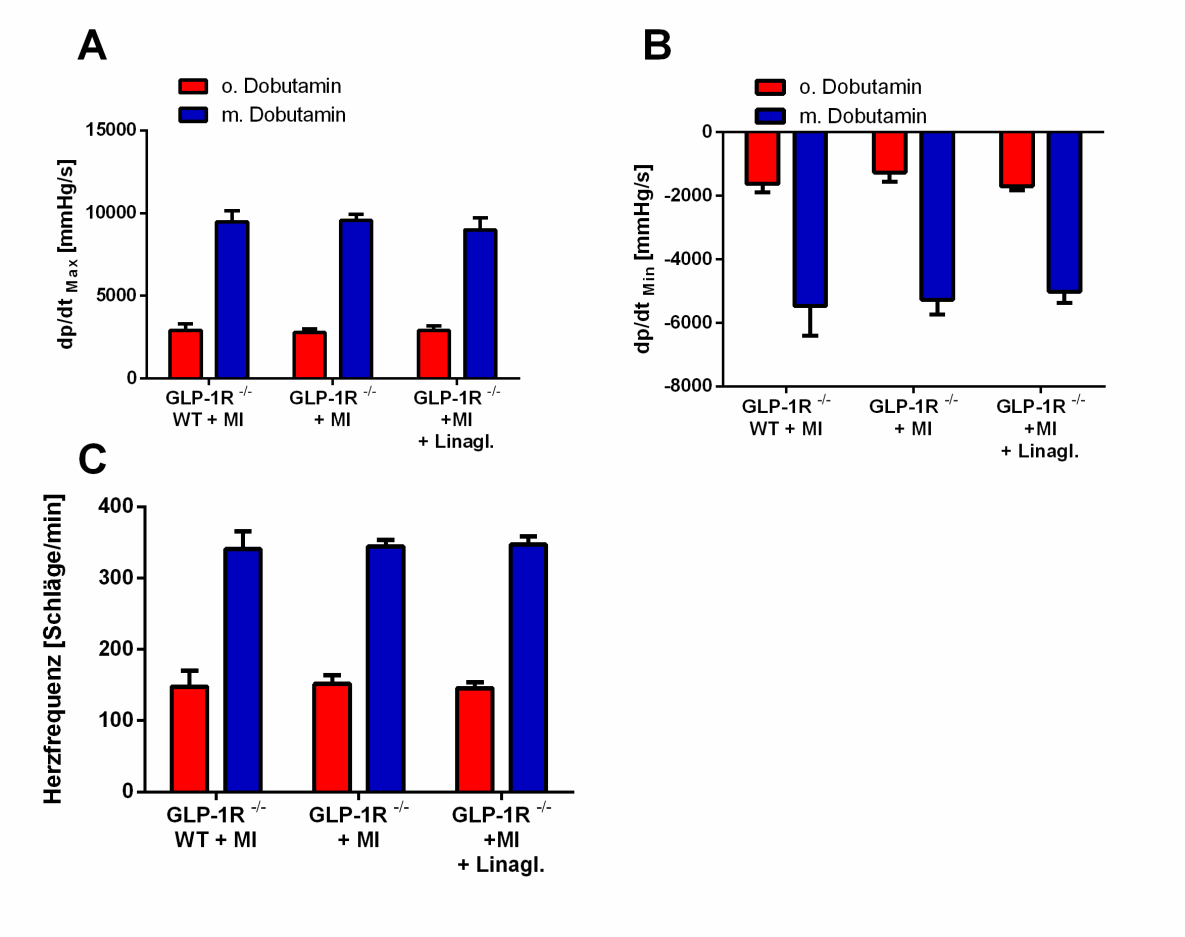


Abbildung 34: Kardiale Kontraktilität von GLP-1R$^{-/-}$- und WT-Mäusen mit und ohne Linagliptin-Behandlung nach permanenter LAD-Ligatur. Millar-Kathetermessung an 6 Wochen alten, männlichen GLP-1R$^{-/-}$-Mäusen mit und ohne Dobutamin Stress (1 mg/kg) 6 h nach LAD-Ligatur. **A:** Kardiale Kontraktilität als maximale Druck/Zeit-Funktion (n=7–13) **B:** Relaxation der Herzfunktion als minimale Druck/Zeit-Funktion. **C:** Herzfrequenz (n=8–13). Daten dargestellt als MW ± SEM, 2-Way ANOVA mit Bonferroni Test. **A:** Kardiale Kontraktilität als maximale Druck/Zeit-Funktion (n=12–14) **B:** Kardiale Relaxation als minimaler Druck/Zeit-Funktion **C:** Herzfrequenz (n=9–14). MW ± SEM, 2-Way ANOVA mit Bonferroni-Test

3.1.14 Mitochondriale Respiration von GLP-1R$^{-/-}$-Mäusen nach LAD-Ligatur

Um zu überprüfen, ob die Zunahme der mitochondrialen Respiration unter DPP-4-Inhibition vom GLP-1R abhängig ist, wurden primäre Mitochondrien aus nicht infarziertem Myokard aus GLP-1R-KO-Mäusen isoliert, die vorher mit Linagliptin (3 mg/kg) bzw. Trägersubstanz behandelt wurden. In Abwesenheit des GLP-1R ließ sich keine Zunahme der mitochondrialen Respiration unter DPP-4-Inhibition nachweisen (WT (n=6) vs. MI (n=6); p=0,54 und MI vs. MI + Linagliptin (n=5); p=0,97) (Abb. 35 A), was sich für die unterschiedlichen Stadien der Respiration bestätigte (Komplex 3 MI vs. MI + Linagliptin; p=0,16) (Abb. 35 B).

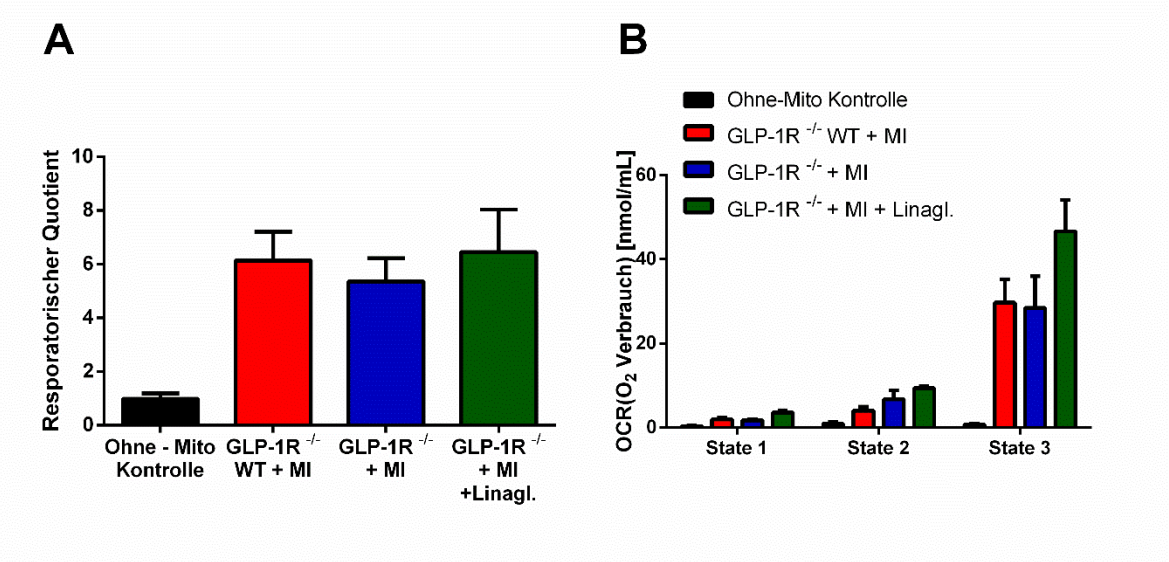


Abbildung 35: Fehlende Zunahme der kardialen mitochondrialen Respiration nach Linagliptin-Behandlung in GLP-1R$^{-/-}$-Mäusen 6 h nach LAD-Ligatur. Das nicht-infarzierte Gewebe wurde 6 h nach der LAD-Ligatur isoliert. Messung der mitochondrialen Atmung mit Oxygraph. **A:** Respiratorischer Quotient B: Sauerstoffverbrauch der einzelnen State Respiration (Komplexe) der mitochondrialen Atmung. State 1: Sauerstoffverbrauch der Mitochondrien allein; State 2: Sauerstoffverbrauch nach Substratzugabe (Pyruvat/Malat); State 3: maximale Respiration nach Zugabe von ADP; MW ± SEM, n= 5–9, 2-Way ANOVA mit Bonferroni-Test.

3.1.15 Effekt von Linagliptin auf die AMPK-Phosphorylierung in GLP-1R-KO-Mäusen

Um zu überprüfen, ob die AMPK-Aktivierung und DPP-4 Inhibition in Abwesenheit des GLP-1R ebenfalls verloren geht, wurde 6 h nach LAD-Ligatur Western-Blot-Analysen aus nicht infarziertem Gewebe durchgeführt. Es ließ sich kein Unterschied der AMPK bzw. p-AMPK Expression in Abhängigkeit der Linagliptin-Behandlung nachweisen (Abb. 36).

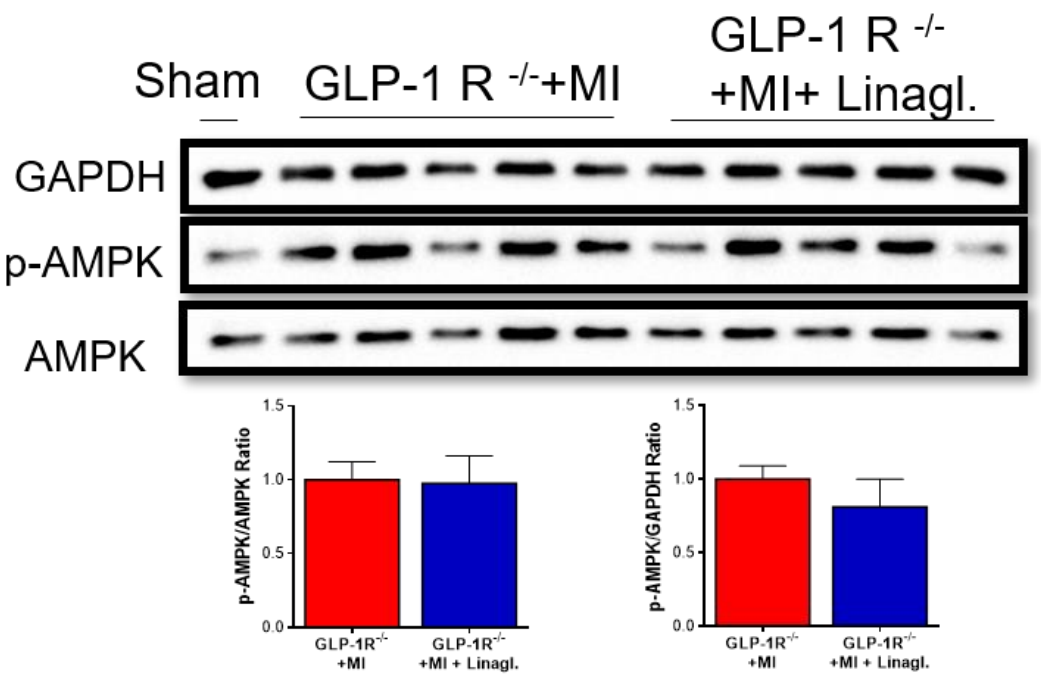


Abbildung 36: Western-Blot aus nicht infarziertem Herzgewebe von GLP-1R$^{-/-}$-Mäusen mit und ohne Linagliptin (3 mg/kg). Das nicht-infarzierte Gewebe wurde 6 h nach der LAD-Ligatur isoliert und p-AMPK- und AMPK-sowie Cav3 als Housekeeping-Protein (Cavelin-3, Cav3) analysiert. Originalblots und densitometrisch quantifizierte Daten (n=5) MW ± SEM, 1-Way ANOVA

3.1.16 Effekt der DPP-4-Inhibition auf die AMPK-abhängige Zunahme der kardialen Kontraktilität

Um zu überprüfen, ob die Zunahme der kardialen Kontraktilität unter DPP-4-Inhibition von einer AMPK-Aktivierung abhängt, wurden die Mäuse mit dem AMPK-Inhibitor Dorsomorphin (10 mg/kg) vorbehandelt. Die kardiale Kontraktilität wurde durch einen Millar-Katheter mit und ohne Behandlung mit Dobutamin (1 mg/kg) erfasst. Während die Vorbehandlung mit Dorsomorphin die LV-Kontraktilität 6 h nach der LAD-Ligatur nicht signifikant beeinflusste, ging die Zunahme der LV-Kontraktilität unter Linagliptin unter der Vorbehandlung mit Dorsomorphin verloren (n=4–6) (Abb. 37 A). Keine Unterschiede zeigten sich bei der Relaxation (Abb. 37 B) und der Herzfrequenz (Abb. 37 C) (n=4–6).

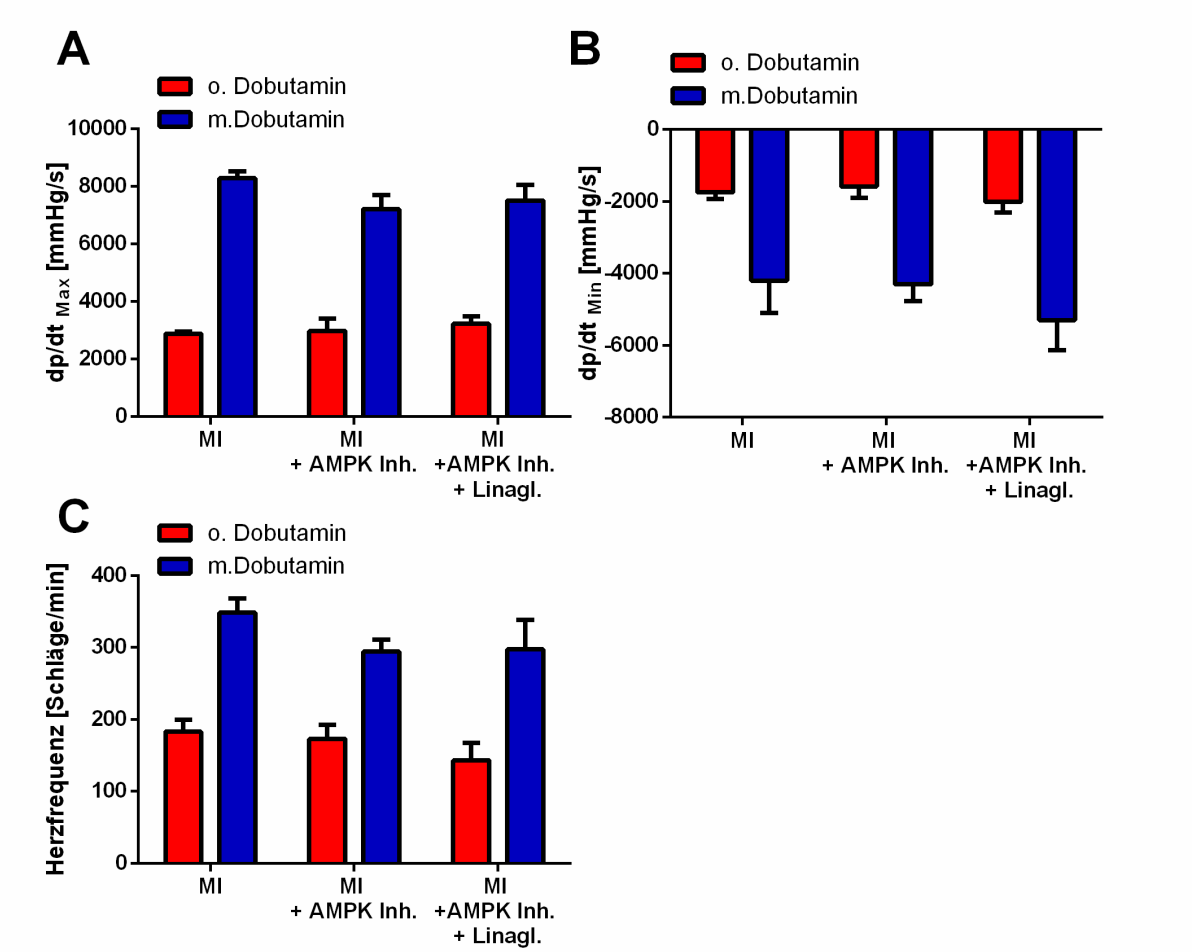


Abbildung 37: Verhinderung der Linagliptin-abhängige Zunahme der LV-Kontraktilität 6 h nach LAD-Ligatur durch eine AMPK-Inhibition Die Millar-Kathetermessung erfolgte an 6 Wochen alten, männlichen C57BL/6J Mäusen mit und ohne Dobutamin-Stress nach Vorbehandlung mit Linagliptin (3 mg/kg) und AMPK-Inhibitor Dorsomorphin (10 mg/kg). Kardiale Kontraktilität als maximale Druck/Zeit-Funktion (n=4–6) **B:** Relaxation der Herzfunktion als minimale Druck/Zeit-Funktion **C:** Herzfrequenz (n=4–6). MW ± SEM, 2-Way ANOVA mit Bonferroni-Test.

3.2 Analyse der Rolle von GLP-2 bei IBD

In dem nun folgenden Ergebnisteil wird die inflammatorische Regulation des GLP-2 und dessen Bedeutung bei IBD untersucht.

3.2.1 GLP-2-Serumkonzentration bei Patienten mit IBD

Um zu untersuchen, ob die GLP-2-Konzentration bei Patienten mit chronischen IBD erhöht ist, wurde diese bei 23 Patienten mit CU, 26 Patienten mit MC und 20 gesunden Kontrollen gemessen. Die Patienten mit CU und MC wiesen eine erhöhte entzündliche Aktivität mit Serum-Calprotectin-Werten >200 mg/kg auf. Die Charakteristika der

Patienten sind in Tab. 14 dargestellt. Limitierend ist die Aussage, dass die in diesem Versuch verwendeten Kontrollen im Altersdurschnitt niedriger sind als die Patientengruppen.

Tabelle 5: Übersicht der GLP-2 gemessenen Patienten in IBD

	Gesunde Kontrollen(n=20)	MC(n=26)	CU(n=23)
Altersdurchschnitt	27	44	39
Anzahl Patienten	20	26	23
Geschlecht	68% weiblich	52% weiblich	50% weiblich

CU-Patienten (n=23) wiesen mit 2,4 ± 2,06 (ng/ml) signifikant höhere GLP-2 Serum-Konzentrationen als gesunde Kontrollen (n=20; p= 0,0014) auf (Abb. 38).

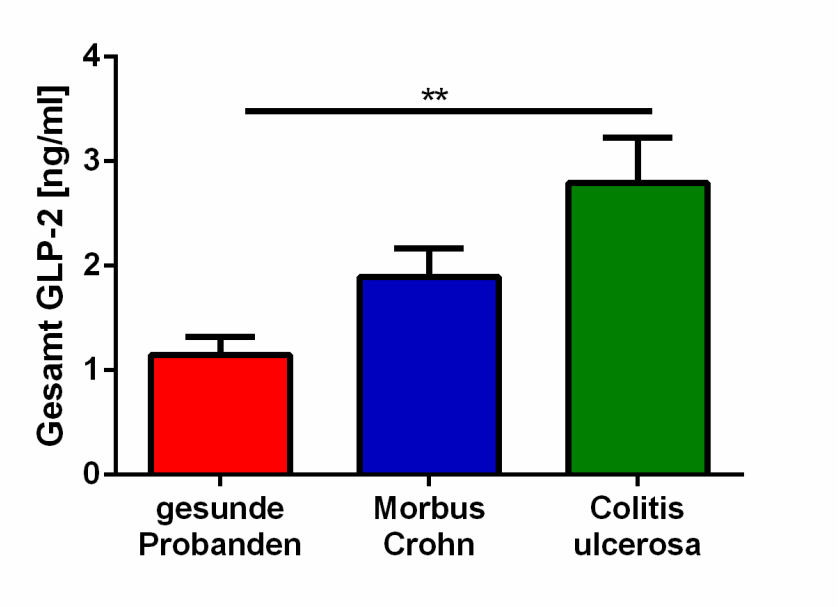


Abbildung 38: Serum GLP-2 Konzentration von Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen. Die GLP-2 Serum Konzentration ist bei CU-Patienten (n=23) nicht jedoch in MC-Patienten (n=27) im Vergleich zu gesunden Kontrollen (n=20, p<0,01) signifikant erhöht. **p<0,01 MW ± SEM 2-Way ANOVA mit Bonferroni-Test.

3.2.2 GLP-2-Serumkonzentration bei Mäusen mit IBD

Um zu überprüfen, ob eine IBD-Induktion ausreicht, um bei Mäusen einen Anstieg der GLP-2-Serumkonzentration zu induzieren, wurde das DSS-induzierte Colitismodell und das CDI-induzierte Colitismodell verwendet. In beiden Modellen ließ sich ein signifikanter Anstieg (DSS-Modell: 1,6 ± 0,36 (SDV), n=4–5, p<0,05; CDI-Modell 1,7 ±

0,4 (SDV), n=4–6, p<0,05) der Serum-GLP-2-Konzentration im Vergleich zu unbehandelten Kontrollmäusen nachweisen (s. Abb. 39 A/B).

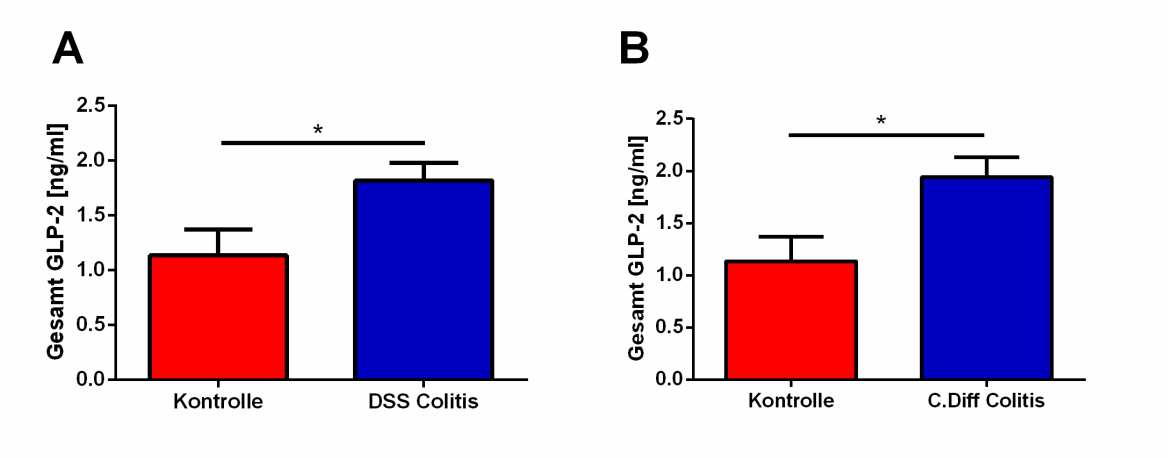


Abbildung 39: GLP-2 Serum Spiegel in experimentellen Colitismodellen in C57BL/6J Mäusen. A: DSS-Colitismodell **B:** CDI-(*Clostridium difficile infection*)-Colitismodell MW ± SEM, *p<0,05, n=4–6, Student T-Test

3.2.3 Effekt von LPS auf die Serumkonzentration von GLP-2

Um zu untersuchen, ob inflammatorische Stimuli eine Induktion von GLP-2 bewirken, wurden C57BL/6J Mäuse mit LPS behandelt. Dabei kam es zu einem dosisabhängigen Anstieg der GLP-2-Serumkonzentration (10 ng/g, 100 ng/g und 1 µg/g LPS/Körpergewicht) 120 min (n=4–6) sowie 210 (n=5–6) min nach LPS-Applikation im Vergleich zu Kontrollen, die mit der Trägersubstanz (NaCl) behandelt wurden (Abb. 40).

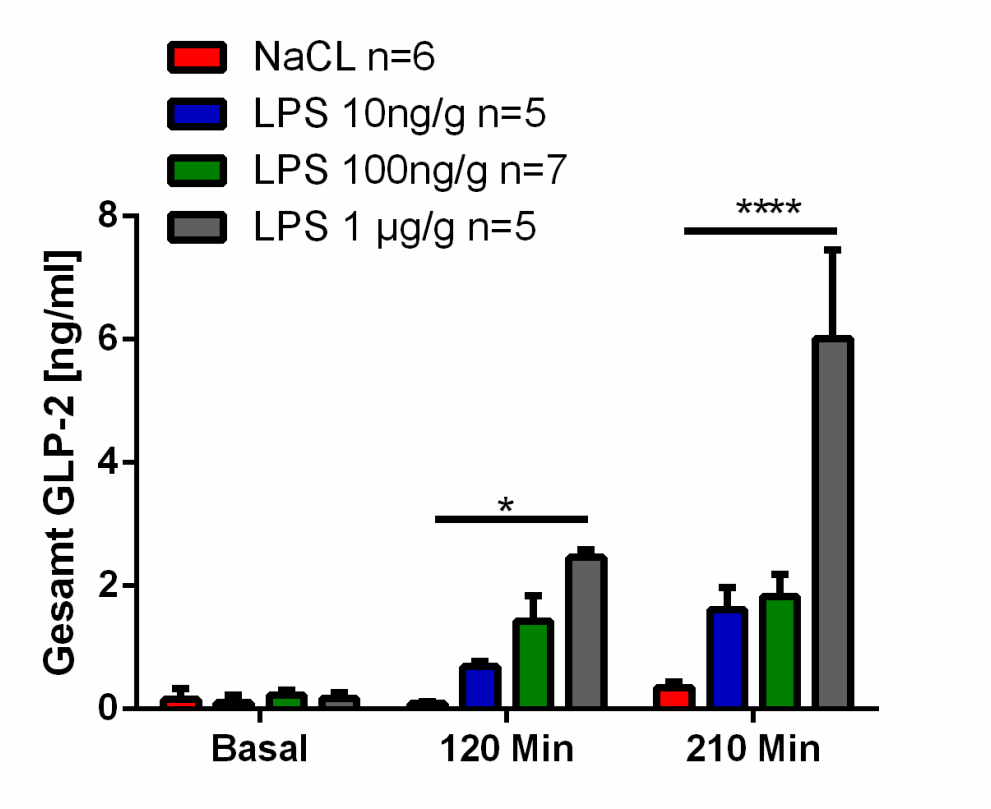


Abbildung 40: Dosisabhängiger Anstieg der GLP-2-Serumkonzentration nach LPS-Gabe. C57BL/6J Mäusen wurden mit verschiedenen LPS-Konzentrationen (10 ng/g, 100 ng/g und 1 µg/g Körpergewicht) i.p. injiziert. Die GLP-2-Konzentrationen wurden nach 120 und 210 min im Serum bestimmt. MW ± SEM, *p<0,05, ****p<0,0001, n=4–6, 2-Way ANOVA mit Bonferroni-Test.

3.2.4 GLP-2-Sekretion erfolgt aus den α-Zellen des Pankreas

Um zu überprüfen, welches Organ für die LPS-abhängige GLP-2-Produktion verantwortlich ist, wurden Prä-Proglukagon-KO-Mäusen, bei denen eine organspezifische Reaktivierung des Prä-Proglukagon in den α-Zellen des Pankreas (durch Kreuzung mit PDX1-Cre-Mäusen) (im Folgenden als Gcg pdx1RA) bezeichnet (Abb. 41A)) bzw. im Darm (durch Kreuzung mit transgenen Villin-Cre-Mäusen (Abb. 41B)) erfolgte, mit LPS (100 mg/kg) behandelt. Bei dem Versuch wurden in die oben beschriebenen Mäuse jeweils 100nM/kg LPS i.p. appliziert (NaCl Kontrolle) und nach 120 bzw. 210 min nach Applikation Blutentnahmen durchgeführt. Die Versuche wurden durch einen Kooperationspartner durchgeführt, der uns die Serumproben zur Analyse zur Verfügung stellte. Interessanter Weise konnten wir zeigen, dass die Endotoxin-abhängige Induktion der GLP-2 Serumspiegel in Mäusen mit Reaktivierung der Prä-Proglukagon-Expression im Pankreas (Abb. 41A) nicht jedoch mit Reaktivierung im Darm (GcG-Vil RA) (Abb. 41B) nachweisbar war. Dies führt zu dem Schluss, dass die

LPS-abhängige GLP-2-Induktion auf eine vermehrte GLP-2 Produktion in der pankreatischen α-Zellen zurückzuführen ist

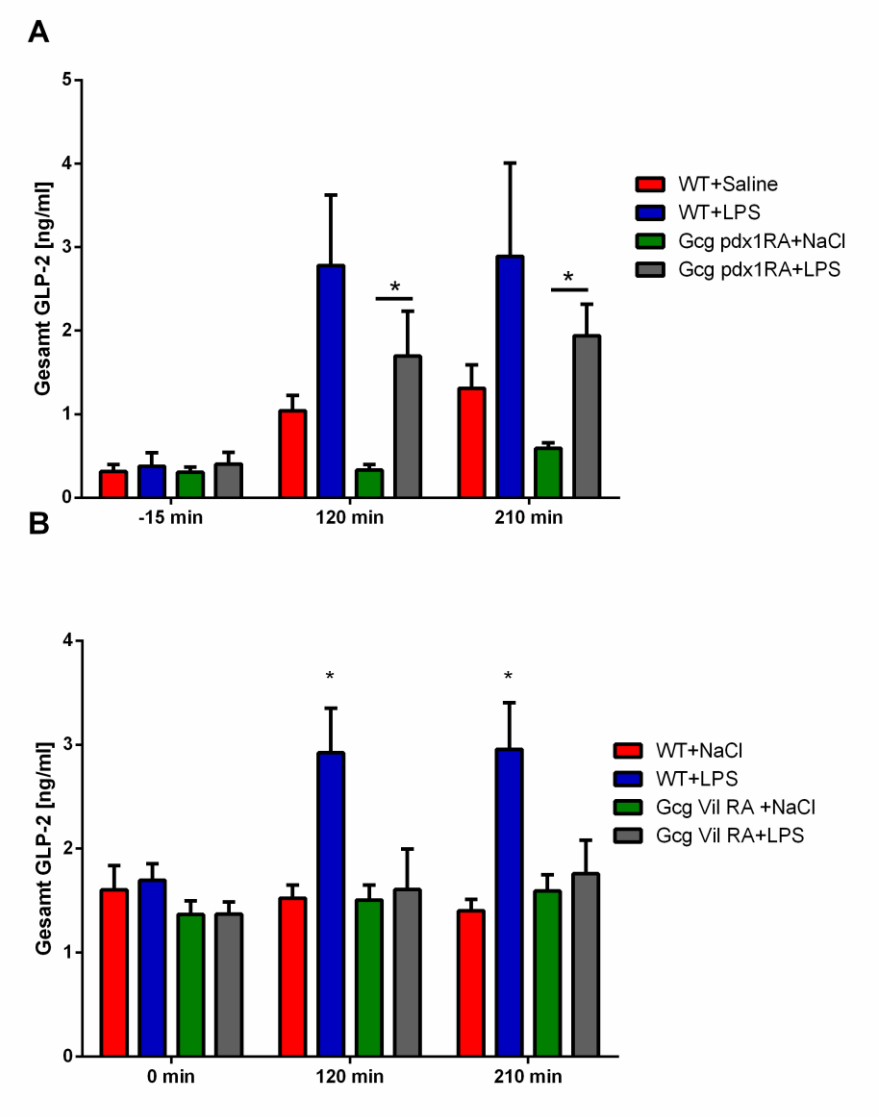


Abbildung 41: GLP-2 Messung in Prä-Proglukagon-KO Mäusen mit gewebespezifischer reaktivierten der Prä-Proglukagon Expression im Pankreas (Gcg pdx1RA) oder im Darm (Gcg Vil RA). A: GLP-2-Spiegel nach LPS- bzw. Trägersubstanz Applikation (NaCl) in Blutserum nach 120 und 210 min (100 nM/kg) (i.p.) in Prä-Proglukagon-KO-Mäusen(Gcg pdx1RA) mit Pankreas-spezifischer Reaktivierung der Prä-Proglukagon-Expression **B:** Identischer Versuch in Prä-Proglukagon Knockout Mäusen mit Darmspezifischer Reaktivierung der Prä-Proglukagon-Expression durch Kreuzung mit Villin-Cre-Mäusen (Gcg Vil RA). MW ± SEM *p<0,05, n=6, 2-Way ANOVA mit Bonferroni-Test

3.2.5 Einfluss der DPP-4 Inhibition auf den Krankheitsverlauf im DSS-Colitismodell

Um zu untersuchen, welche Bedeutung die endogene GLP-2-Sekretion für den Krankheitsverlauf im DSS-Colitis-Modell hat, wurde eine Behandlung mit dem DPP-4-

Inhibitor Linagliptin (3 mg/kg) vorgenommen, durch den eine Inaktivierung von GLP-2- verhindert wird.

Linagliptin-behandelte Tiere wiesen im Vergleich zu den Kontrollen eine geringere Gewichtsreduktion an den Tagen 5 ($p=0,03$; $n=6$) und 7 ($p<0,001$; $n=6$) (Abb. 42 A) sowie einen günstigeren Krankheitsverlauf, erfasst mit dem DAI (Items: Gewicht, Stuhlkonsistenz, Ergebnisse des Hämoccult-Tests, s. Abb. 42 B) auf. Zudem wurde eine tendenziell verminderte Myeloperoxidase-Aktivität (MPO) in isoliertem Colongewebe unter Linagliptin-Behandlung festgestellt ($n=5–6$) (Abb. 42 C). Um zu überprüfen, ob sich die Darmbarrierefunktion und -permeabilität bei einer Linagliptin-Behandlung verändert, erhielten die Tiere FITC-markierte Dextran-Partikel über eine orale Gavage. Diese wurden unter Behandlung mit Linagliptin signifikant weniger in die Zirkulation aufgenommen ($n=6$, $p<0,05$) (Abb. 42 D), was für eine verbesserte Darmbarrierefunktion spricht. Darüber hinaus erwies sich die Kolonlänge unter Behandlung mit Linagliptin signifikant erhöht ($n=5-6$, $p<0,05$) (Abb. 42 E), was Ausdruck einer erhöhten Proliferation von Darmzellen unter Behandlung mit Linagliptin sein könnte. Um den Einfluss von Linagliptin auf den Inflammationsprozess zu überprüfen, wurde die IL-6-Serumkonzentration an Tag 7 bestimmt (Multiplex-Messung durch externe Firma), die sich als signifikant reduziert erwies ($n=3–4$, $p<0,01$) (Abb. 42 F).

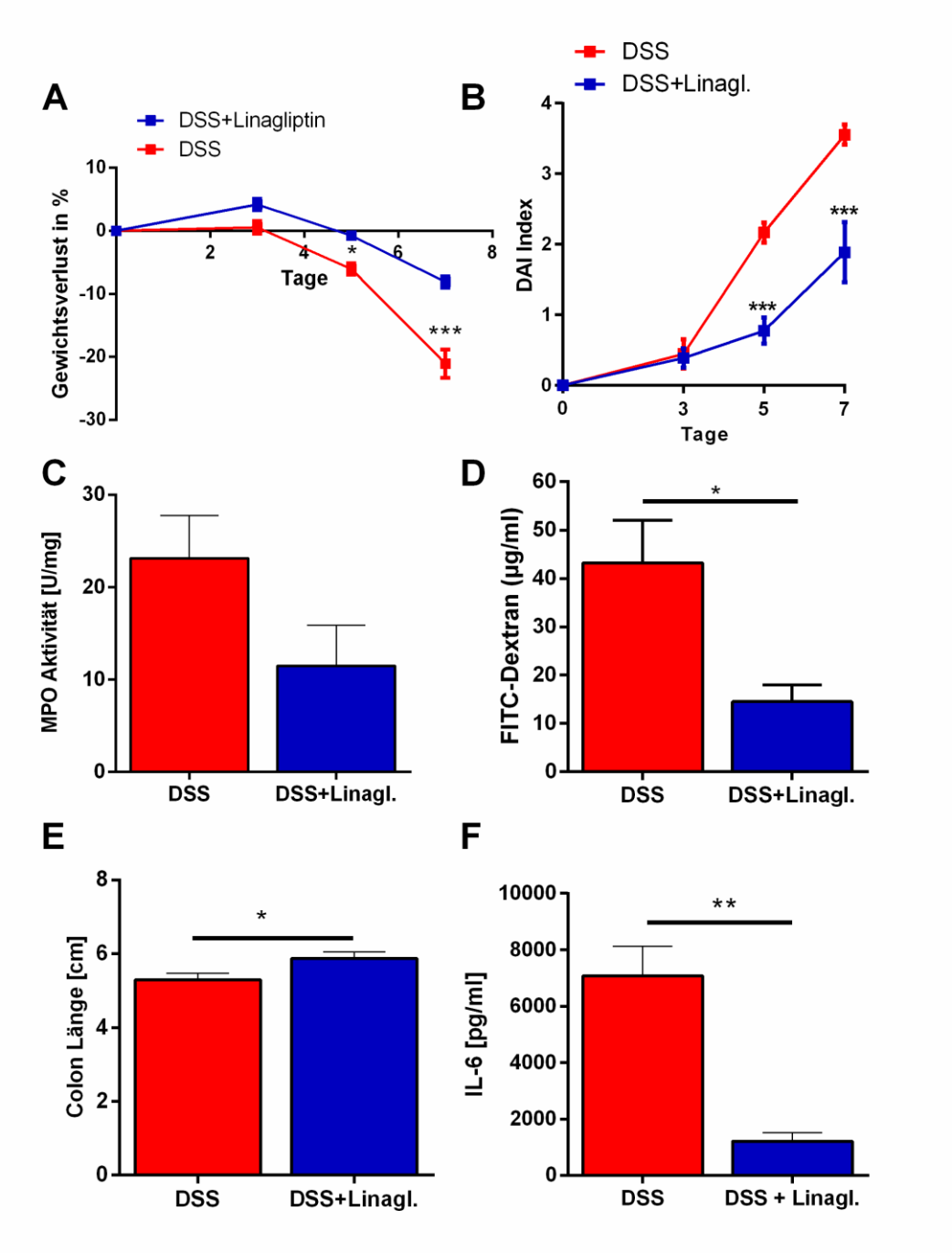


Abbildung 42: Einfluss der DPP-4-Inhibition auf den Krankheitsverlauf im DSS-Colitismodell . Weibliche C57BL/6J Mäuse wurden 7 d mit DSS (3%) mit/ohne DPP-4-Inhibitor Linagliptin (3 mg/kg) behandelt. **A:** Gewichtsverlust in % (n=6). **B:** DAI (Gewicht, Stuhlkonsistenz, Haemoccult) (n=6). **C:** Myeloperoxidase-Assay aus Colongewebe an Tag 7 **(D)** FITC-Dextran-Fluoreszenzmessung im Serum (n=6). **E:** Colonlänge (After bis Zäkum) (n=5–6). **F:** IL-6-Serumkonzentration an Tag 7 (n=3–4). MW ± SEM *p<0,05 **p<0,01, ***p<0,001 1 Way ANOVA mit Bonferroni Test und Student T-Test.

3.2.6 Einfluss der DPP-4 Inhibition auf den Krankheitsverlauf im CDI-Colitismodell

Um diese Ergebnisse in einem weiteren, inflammationsgetriebenen Colitismodell zu bestätigen, wurde die Wirkung von Linagliptin auf die CDI im Mausmodell untersucht. Hierfür wurden 10 Wochen alte, weibliche C57BL/6J Mäuse zunächst i.p. mit Clindamycin (1 mg/kg) behandelt. Anschließend erhielten die Tiere *Clostridium difficile* Sporen (300 Sporen) in PBS über eine orale Gavage. Übereinstimmend mit den Ergebnissen im DSS-Colitismodell, kam es unter Linagliptin zu einer geringeren Gewichtsreduktion (Abb. 43). Dieser Effekt war bereits nach dem 1. Tag sichtbar und setzte sich an Tag 2 und 3 fort (n=3–5/Gruppe) (Abb. 43).

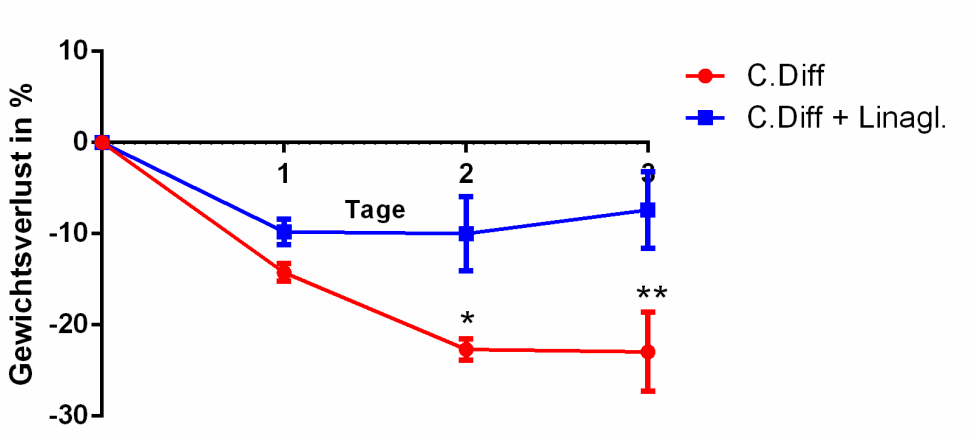


Abbildung 43: Gewichtsverlauf in 10 Wochen alten, weiblichen C57BL/6J Mäusen im CDI-Colitismodell. Antibiose mit Clindamycin 1 Tag vor Applikation von 300 *Clostridium difficile* Sporen mit oder ohne Linagliptin (3 mg/kg) -Behandlung. Daten dargestellt als prozentualer Gewichtsverlust bezogen auf das Startgewicht, n=3–5, 2-Way ANOVA mit Bonferroni–Test *p<0,05, **p<0,01

3.2.7 Einfluss von GLP-2 auf den Krankheitsverlauf *im CDI-Colitismodell*

Um zu überprüfen, ob die Wirkung von Linagliptin auf einer Aktivierung des endogenen GLP-2-Systems beruht, wurden die Mäuse mit dem GLP-2-Antagonisten GLP-2(3-33) (200 µg/kg) bzw. mit dem GLP-2-Agonist Teduglutid (200 µg/kg) im Vergleich zu Linagliptin (3mg/kg) behandelt. Die Ausprägung der Colitis wurde histologisch über einen inflammatorischen Index aus Kolonschnitten nach Theriot et al. (2011) beurteilt (Abb. 44B).

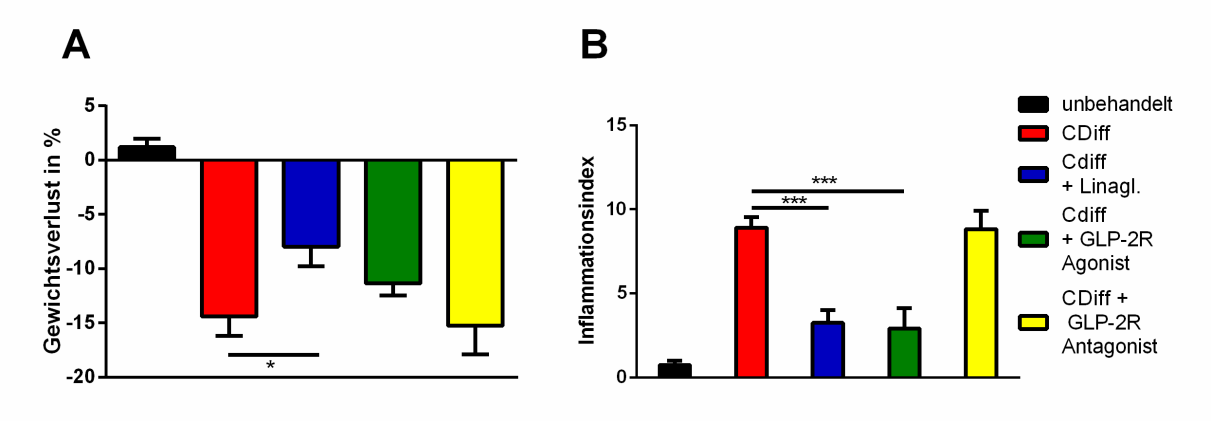


Abbildung 44: Gewichtsverlust und inflammatorischer Index in 10 Wochen alten, weiblichen C57BL/6J Mäusen im CDI-Colitismodell. Die Behandlung der Tiere erfolgte mit Linagliptin, GLP-2(3-33) als Antagonist und Teduglutid als Agonist von GLP-2 in CDI infizierten Tieren. Die Tiere wurden gegen eine unbehandelte, gesunde Kontrollgruppe verglichen **A:** Gewichtsverlust an Tag 3 der induzierten Colitis. **B**: Inflammatorischer Index (Epithelbeschaffenheit der Mukosaschicht, Krypten, Neutrophileninfiltration der Darmwand) aus H&E gefärbten histologischen Schnitten. MW ± SEM, 2-Way ANOVA mit Bonferroni-Test, *p<0,05, ***p<0,001

Unter DPP-4-Inhibition kam es zu einem signifikant reduzierten Gewichtsverlust verglichen mit der CDI-Kontrolle (n=6–11, p=0,04) (Abb. 44 A). Der GLP-2-Agonist Teduglutid (200 µg/kg) verminderte die Gewichtsreduktion tendenziell (p=0,17), während der GLP-2-Antagonist keinen Einfluss zeigte (Abb. 44 A). Nach dem inflammatorischen Index kam es unter DPP-4-Inhibition (n=6, p<0,001, Abb. 45 C) bzw. bei Gabe des GLP-2-Agonisten (n=6, p<0,001, Abb. 47 D) zu einer Reduktion der Inflammation (Abb. 44 B), während diese durch GLP-2R-Antagonisierung durch GLP-2(3-33) nicht beeinflusst wurde (Abb. 44 B, 45 E).

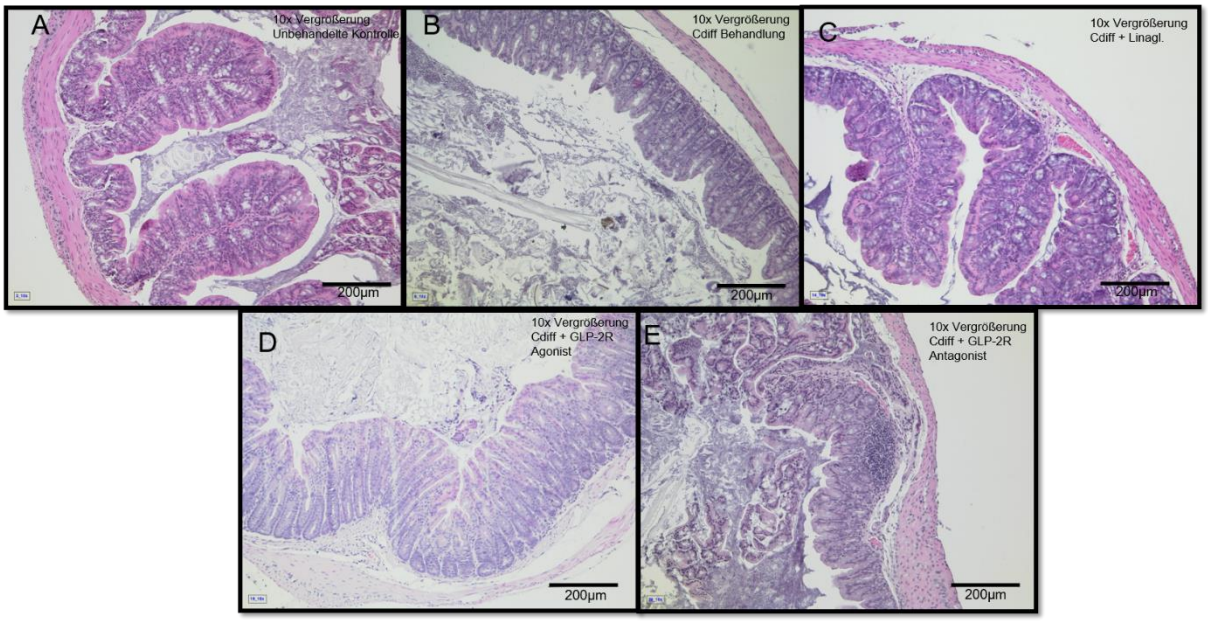


Abbildung 45: Histologische Schnitte des Colons (H&E Färbung) von 10 Wochen alten, weiblichen C57BL/6J Mäusen im CDI-Colitismodell. A: Trägersubstanz behandelte Kontrolle ohne *Clostridium difficile* Infektion (CDI). **B**: CDI. **C:** CDI + Linagliptin (3 mg/kg) **D**: CDI + GLP-2R Agonist (Teduglutid, 200 µg/kg). **E:** CDI +GLP-2R Antagonist (GLP-2(3-33), 200 µg/kg). Bilder aufgenommen in 10x Objektivvergrößerung, dargestellte Einheit beträgt 200µm.

4 Diskussion

4.1 GLP-1 im akuten MI

In der vorliegenden Studie konnten wir nachweisen, dass die GLP-1-Spiegel im Serum von MI-Patienten und Mäusen nach LAD-Ligatur transient erhöht sind. Durch die Aktivierung des GLP-1-Systems kam es zu einer Verbesserung der LV-Kontraktilität im Mausmodell, die mit einer Aktivierung des AMPK-Signalwegs und einer Induktion der mitochondrialen Respiration in nicht-infarziertem Herzgewebe einherging.

Damit wurde ein Myokardinfarkt, der ein massives inflammatorisches Ereignis darstellt, erstmals als Trigger für eine Ausschüttung des endogenen GLP-1- identifiziert. Bereits gezeigt wurde, dass auch inflammatorische Stimuli, u.a. IL-6, IL-1ß und Endotoxine, die Sekretion von GLP-1 erhöhen (Kahles et al., 2014, Nguyen et al., 2014). In einer Studie mit kritisch kranken Sepsis-Patienten war die GLP-1-Konzentration 6,9-mal höher im Vergleich zu einer Kontrollgruppe (Kahles et al., 2014). Auch perioperativer Stress erhöht die GLP-1-Konzentration (Lebherz et al., 2016), was in engem zeitlichen Zusammenhang mit der perioperativen Induktion von IL-6 steht. Durch einen MI kommt es zu einer systemischen Inflammation im gesamten Organismus, die mit einer komplexen Immunantwort einhergeht (Gentek and Hoeffel, 2017). Die inflammatorischen Reaktionen bei einem MI beinhalten eine Einwanderung von Immunzellen in den Infarktbereich, die apoptotisches und nekrotisches Gewebe abräumen und im Anschluss einen Heilungsprozess einleiten (Jennings et al., 1990, Fang et al., 2015).

Im vorliegenden MI-Tiermodell konnte die transiente Erhöhung der GLP-1 Serumspiegel nach LAD-Ligatur bestätigt werden. Die Mechanismen der GLP-1 Sekretion im akuten Myokardinfarkt sind derzeit unklar. Die Endotoxin abhängige Sekretion als einen alternativen inflammatorischen Stimulus erwies sich als IL-6 abhängig und eine IL-6-Injektion in normalen und diabetischen Mäusen erhöht die GLP-1-Serumkonzentration (Kahles et al., 2014), was sich durch eine Blockade des IL6-Signalweges inhibieren ließ (Ellingsgaard et al., 2011). Auch in der hier vorliegenden Studie kam es im Menschen und in Mäusen nach MI zu einer Induktion der IL-6 Spiegel, jedoch ließ sich kein Unterschied der GLP-1 Spiegel zwischen WT und IL-6 KO Mäusen nach LAD-Ligatur nachweisen. Dies weist daraufhin, dass die nach eine MI auftretende inflammatorische Antwort vermutliche durch eine komplexe

Interaktion zur GLP-1 Sekretion führt, die nicht alleinig IL6 abhängig ist. Daher sind weitere Studien zur Identifikation der relevanten Signalwege erforderlich.

GLP-1 ist ein wesentlicher Akteur im Rahmen der Glukose- und Insulinregulation. Eine LPS-Injektion führt über erhöhte GLP-1-Serumspiegel zu einer verbesserten Glukose-stimulierten Insulinsekretion. Dieser Effekt ist in GLP-1R$^{-/-}$ Mäusen aufgehoben (Nguyen et al., 2014). Daher wurde untersucht, ob die gesteigerte GLP-1-Serumkonzentration nach MI einen Einfluss auf die Glukose- und Insulinspiegel nach LAD-Ligatur hat, ohne einen Effekt feststellen zu können.

Bezüglich der Glukose- und Insulinregulation im Rahmen von inflammatorischen Erkrankungen wie dem MI, gibt es kontroverse Ergebnisse. In einigen Studien kam es nach einem MI zum Auftreten von Diabetes Mellitus (Norhammar et al., 2002), was mit einer schlechteren LV-Funktion des Herzens und Prognose einherging (Høfsten et al., 2009). In der vorliegenden Studie wurden die Patientensera nicht auf Glukose und Insulin untersucht, jedoch ließ sich im Mausmodell keine GLP-1-abhängige Wirkung auf Glukose- und Insulinregulation nachweisen. Dies könnte auf die verwendete Narkose im genutzten Mausmodell zurückzuführen sein. Ketamin und Xylazin haben sich als hyperglykämische Stimuli erwiesen (Saha et al., 2005). Damit übereinstimmend waren die gemessenen Glukosewerte in allen Experimenten - unabhängig von der GLP-1 Applikation - sehr hoch. Zur Klärung der Frage, welche Bedeutung endogen produziertes GLP-1 nach einem MI auf den Glukose- und Insulinmetabolismus hat, sind daher weitere Studien mit einem alternativen Narkoseprotokoll erforderlich.

In der vorliegenden Arbeit kam es nach DPP-4-Inhibition zu einer verbesserten kardialen Kontraktilität 6 h, nicht aber 3 h nach der LAD-Ligatur. Eine Gabe von exogenem GLP-1 bewirkte dagegen sowohl 3 h als auch 6 h nach der LAD-Ligatur eine erhöhte kardiale Kontraktilität. Dies lässt vermuten, dass die endogene Produktion von GLP-1 nach LAD-Ligatur notwendig ist, um die Wirkung der DPP-4 Inhibition zu vermitteln. Entscheidender Weise ließ sich die unter DPP-4 Inhibition gesteigerte kardiale Kontraktilität durch Antagonisierung des GLP-1R aufheben. Dies, deutet darauf hin, dass die kardiale Wirkung der DPP-4 Inhibition über GLP-1 vermittelt wird.

Diese Vermutung konnte unter Verwendung von GLP-1R$^{-/-}$ Mäusen bestätigt werden. GLP-1-abhängige kardioprotektive Effekte traten in verschiedenen Studien sowohl GLP-1R-abhängig als auch GLP-1R-unabhängig auf (Ban et al., 2008, Drucker, 2016). Des Weiteren wurden auch für den GLP-1 Metaboliten, der durch die DPP-4 abhängige Spaltung aus GLP-1 entsteht, kardioprotektive Effekte beschrieben (Nikolaidis et al., 2005b). Allerdings wurde in der vorliegenden Studie die akute Phase des MI 3-6h nach der LAD-Ligatur untersucht. Es ist nicht auszuschließen, dass GLP-1R unabhängige Wirkungen des GLP-1 Metaboliten zu späteren Zeitpunkten nachweisbar sind, was weiter untersucht werden muss.

In *in vitro* Studien mit HL-1-Zellen zeigte GLP-1 eine anti-apoptotische Wirkung und aktivierte Signalwege für das Überleben der Zelle (Ravassa et al., 2011). Die Langzeitgabe des GLP-1R-Agonisten Lixisenatid führte in Ratten nach Ischämie-Reperfusion zu einer reduzierten Infarktgröße und verbesserten kardialen Funktion. Dieser Effekt wurde bei Langzeitgabe von Lixisenatid unabhängig vom GLP-1R vermittelt (Wohlfart et al., 2013). Auch in einem murinen *in vivo* Langzeitmodell kam es nach Gabe eines GLP-1R-Agonisten (Liraglutid) zu einer verbesserten Überlebensrate und einer verringerten Infarktgröße sowohl im diabetischen als auch im nicht-diabetischen Milieu (Noyan-Ashraf et al., 2013). Liraglutid führte auch in einem Schweinemodell zu einer verbesserten Funktion der Kardiomyozyten und zu einer verringerten Infarktgröße (Kristensen et al., 2009). Ebenfalls im Schweinemodell bewirkte der GLP-1R-Agonist Exenatid eine verringerte Infarktgröße nach Ischämie-Reperfusion, eine gesteigerte Herzfunktion, eine verbesserte kardiale Glukoseaufnahme und eine Reduktion der Apoptose (Timmers et al., 2009). Übereinstimmend mit anderen Studien konnte hier in einem sehr akuten Modell der permanenten LAD-Ligatur gezeigt werden, dass GLP-1 kardioprotektive Eigenschaften besitzt. In weiteren Studien verkleinerte eine DPP-4-Inhibition GLP-1R und PKA-abhängig das Infarktareal (Ye et al., 2010, Birnbaum et al., 2012, Hausenloy et al., 2013).

GLP-1 besitzt auch hämodynamische Effekte und beeinflusst den Blutdruck und die Herzfrequenz (Barragan et al., 1994). Der Einfluss der Herzfrequenz auf die GLP-1-abhängige Kardioprotektion wird kontrovers diskutiert. Während einige Arbeitsgruppen die gesteigerte Herzfrequenz für den kardioprotektiven Effekt von GLP-1 verantwortlich machen (Edwards et al., 1997, Barragan et al., 1994) konnten andere

zeigen, dass es nicht in allen Modellen zu einem Anstieg der Herzfrequenz kommt (Bose et al., 2005b, Bose et al., 2005c, Yamamoto et al., 2002). Des Weiteren wird ein Anstieg der Herzfrequenz sogar als problematisch angesehen und wird nicht mit kardioprotektiven Effekten in Verbindung gebracht (AHA, 2018). Auch in der vorliegenden Arbeit hatte GLP-1 im Modell des akuten MI keinen Einfluss auf die Herzfrequenz. Es zeigte sich weder durch die Applikation von GLP-1/DPP4 noch die Antagonisierung durch Ex9 und GLP-1R-KO Mäuse ein Einfluss auf die Herzfrequenz. Dies könnte durch die gewählte Narkose bedingt sein, die in allen Tieren zu einer relevanten Bradykardie führte und hierdurch möglicher Weise die GLP-1 Wirkung blockierte. Daher bedarf es weiterer Studien, um die Rolle der Herzfrequenz bei der GLP-1-abhängigen Kardioprotektion zu evaluieren.

Insgesamt ist der Mechanismus der GLP-1-abhängigen Kardioprotektion nur begrenzt verstanden. Viele Arbeiten der vergangenen Jahre gingen von einer direkten Vermittlung über eine Aktivierung des bekannten GLP-1R auf Kardiomyozyten aus. Jedoch wird die eindeutige Lokalisation des GLP-1R kontrovers diskutiert. In einer früheren Studie wurde der GLP-1R immunhistologisch in verschiedenen Geweben, u.a. auch im Herzen nachgewiesen (Ban et al., 2008). Diese Befunde wurden jedoch aufgrund der Verwendung unspezifischer Antikörper revidiert. Spezifischere Nachweismethoden bestätigten die Lokalisation von GLP-1R in vielen Geweben und Zellen (z.B. Endothelzellen). Im Herzen konnte der GLP-1R nur in Kardiomyozyten des Atriums nicht aber des Ventrikels nachgewiesen werden (Richards et al., 2014). Durch die Nähe des Atriums zum Sinusknoten, ließe sich eine Steigerung der Herzfrequenz durch GLP-1 erklären. Dieser Zusammenhang bestätigte sich jedoch, wie oben schon erwähnt, in der hier vorliegenden Arbeit nicht. Aufgrund des Fehlens vom GLP-1R auf den Kardiomyozyten des Ventrikels ist von einer indirekten Vermittlung des GLP-1-bedingten kardioprotektiven Effektes auszugehen, was z.B. durch ein Zwischenschalten von Endothelzellen vermittelt sein könnte.

In der vorliegenden Studie kam es durch den DPP-4-Inhibitor Linagliptin zu einer Erhöhung der AMPK-Aktivität und der mitochondrialen Respiration in nicht-infarziertem Herzgewebe. Dieser Effekt könnte die Energie für die gesteigerte Kontraktilität des linken Ventrikels unter DPP-4 Inhibition liefern. Entscheidender Weise ließ sich die Linagliptin-abhängige Zunahme der LV-Kontraktilität durch AMPK-Inhibition aufheben. Frühere Studien zeigten, dass AMPK bei der GLP-1 abhängigen Kardioprotektion und

Vasoprotektion eine entscheidende Rolle spielt (Noyan-Ashraf et al., 2009, Steven et al., 2015). Wir vermuten, dass die beobachtete GLP-1 abhängige Induktion der mitochondrialen Respiration Ausdruck einer gesteigerten AMPK-Aktivierung ist. Die GLP-1-induzierte Steigerung der Aktivität der Mitochondrien ging in einer anderen Studie mit einer erhöhten Glukoseaufnahme einher (Tomas et al., 2011). Auch andere Arbeitsgruppen fanden einen Zusammenhang zwischen Herzversagen / MI und einer Dysfunktion der Mitochondrien (Sabbah et al., 1992, Lemieux et al., 2011). Schon früher wurde gezeigt, dass eine DPP-4-Inhibition GLP-1R-vermittelt zu einer gesteigerten Mitochondrien-Biogenese in Muskelzellen führt (Takada et al., 2016). Die vorliegende Arbeit belegt diesen Zusammenhang für kardiale Zellen und verknüpft diesen mit den kardioprotektiven Effekten von GLP-1. Auf molekularer Ebene kam es zu einer gesteigerten Expression des Fettsäuretransporters CD36, bei gleichzeitiger Reduktion der Akt-Phosphorylierung und der Expression des Glukosetransporters Glut-4 als Downstream-Target des Insulin-Rezeptors. Diese Expressionsänderungen deuten auf einen Wechsel des Energiestoffwechsels von einer Glukose zu einer Fettsäureverwertung in nicht-infarziertem Herzgewebe hin. Andere Arbeitsgruppen fanden dagegen eine GLP-1 abhängige Induktion der Akt-Phosphorylierung im MI (Sauve et al., 2010, Basalay et al., 2016). Die abweichenden Ergebnisse der vorliegenden Studie könnten auf den gewählten Messzeitpunkt (akutes Stadium des MI) und auf der Analyse von nicht-infarzierten Gewebe beruhen.

Zusammengefasst wurde in der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass es in der akuten Phase eines MI zu einer Induktion der GLP-1 Serumspiegel kommt. Dies führt zu einer GLP-1R-abhängigen Zunahme der kardialen Kontraktilität, was mit einer Aktivierung des AMPK-Signalweges und gesteigerter mitochondrialer Atmung in nicht infarziertem Myokardgewebe verbunden war. Die vorliegenden Daten erweitern das Verständnis für die Wirkung von GLP-1 und könnten zu neuen Therapieansätzen für Patienten mit akutem MI führen.

4.2 GLP-2 in inflammatorischen Darmerkrankungen

In der vorliegenden Arbeit konnten wir zeigen, dass GLP-2 nach Applikation von Endotoxin und in inflammatorischen Prozessen ansteigt. Dies konnten wir in Patienten mit chronischen Darmerkrankungen als auch in murinen Colitismodellen (DSS – und CDI-Colitis) bestätigen. Durch Verwendung von gewebespezifisch Präproglukagon exprimierenden Mäusen konnten wir des Weiteren zeigen, dass die Endotoxin-abhängige GLP-2 Sekretion ausschließlich den α-Zellen des Pankreas und nicht dem Darm zugeschrieben werden kann. Zum anderen konnten wir zeigen, dass die Applikation von GLP-2 den Inflammationsprozess in murinen Colitismodellen reduziert und zu einem milderen Krankheitsverlauf führt.

Derzeit ist noch nicht abschließend geklärt, welche Stimuli eine Sekretion von GLP-2 bewirken und welche Zellen hierfür verantwortlich sind. Es ist bekannt, dass GLP-2 zusammen mit GLP-1 als Reaktion auf Nahrungsaufnahme durch entero-endokrine Zellen kosezerniert wird (Brubaker et al., 1997a, Burrin et al., 2001, Estall and Drucker, 2006). In der vorliegenden Arbeit konnten wir zeigen, dass zirkulierendes GLP-2 als Reaktion auf inflammatorische Stimuli ansteigt, was in ähnlicher Weise bereits für GLP-1 beschrieben wurde (Diebold et al., 2018, Kahles et al., 2014) und entsprechend eine Kosekretion vermuten lässt. Es wurde ebenfalls gezeigt, dass die GLP-2 Spiegel sowohl im Kurzdarmsyndrom des Menschen als auch im Darm-Resektionsmodell der Maus erhöht sind (Dahly et al., 2003, Martin et al., 2005) und im Resektionsmodell der Maus eine Korrelation zwischen den GLP-2-Spiegeln und der Länge des resezierten Darmstücks besteht. Dies spricht dafür, dass die GLP-2 Induktion einen endogen protektiven Mechanismus darstellt, um den Verlust an Darmmukosa auszugleichen und auf diese Weise eine ausreichende enterale Nährstoffresorption sicherzustellen. In unserer Arbeit konnten wir einen dosisabhängigen GLP-2 Anstieg nach LPS Gabe im Mausmodell feststellen. Ob die GLP-2 Spiegel auch in Abhängigkeit der schwere des Krankheitsverlaufes im Colitis Mausmodell anteigt, muss weiter untersucht werden.

Der relevante Mechanismus der inflammationsabhängigen GLP-2-Sekretion ist nicht abschließend geklärt, wobei die Endotoxin-abhängige GLP-1 Sekretion IL6-abhängig abläuft und IL6 einen notwendigen und ausreichenden Stimulus für die Induktion von GLP-1 darstellt. Es erscheint entsprechend möglich, dass eine vergleichbare IL6-abhängige Regulation auch für GLP-2 zutrifft, was weiter untersucht werden muss.

Während als Ort der GLP-2 Produktion bisher insbesondere der Darm angegeben wurde, ergeben sich Hinweise, dass GLP-2 auch aus den Alpha-Zellen des Pankreas sezerniert wird. Um zu klären, welche Zellen für die inflammatorische GLP-2 Sekretion verantwortlich sind, haben wir konditionierte Prä-Proglukagon KO Mäuse, in denen durch eine Kreuzung mit Villin-Cre Mäusen eine Reaktivierung des Prä-Proglukagon-Gens im Darm bzw. durch Kreuzung mit PDX-1-Cre Mäusen eine Reaktivierung des Prä-Proglukagons im Pankreas erreicht wurde, mit Endotoxin als inflammatorischen Stimulus behandelt. In diesen Experimenten konnten wir feststellen, dass die inflammatorische GLP-2-Induktion ausschließlich den α-Zellen des Pankreas zuzuschreiben ist. Dies stimmt mit Untersuchungen von Khan und Kollegen überein, die in histologischen Untersuchungen GLP-2 in pankreatischen α-Zellen lokalisieren konnten (Khan, 2017 und deHeer 2007).

Des Weiteren konnten wir zeigen, dass eine Behandlung mit GLP-2 oder eine Inhibition des GLP-2-Abbaus (über eine DPP-4 Inhibition) zu einem günstigeren Krankheitsverlauf, gemessen an einem inflammatorischen Score, im murinen Colitismodell führt. Andere Arbeitsgruppen konnten bisher zeigen, dass exogen zugeführtes GLP-2 die Proliferation der Kryptzellen im Darm erhöht und den Krankheitsverlauf im DSS-Modell reduziert (L'Heureux et al., 2003). In einer anderen Studie führte pegyliertes Schweine-GLP-2 zu einer schnelleren Gewichtserholung im DSS Modell der Ratte (Qi et al., 2017) und damit zu einem besseren Krankheitsverlauf. In weiteren Arbeiten konnte in einem IBD-Modell durch Applikation von GLP-2 eine gesteigerte Überlebensrate in Mäusen mit nekrotischer Enteritis festgestellt werden (Nakame et al., 2016) und ein milderer Krankheitsverlauf durch GLP-2 im DSS-Modell gezeigt werden (Salaga et al., 2017, Wu et al., 2015). Diese Ergebnisse decken sich mit den von uns erhobenen Daten.

GLP-2 besitzt nach Nahrungsaufnahme viele verschiedene Funktionen und wirkt unter anderem anti-inflammatorisch (Sigalet et al., 2010, Sigalet et al., 2007), was wir in zwei Colitis-Modellen bestätigen konnten. Funktionell verbessert GLP-2 die Barriere-Funktion des Darms und reduziert die epitheliale Permeabilität (Benjamin et al., 2000), wodurch GLP-2 zu einer gesteigerten Nährstoffaufnahme beiträgt. Hiermit übereinstimmend konnten wir unter Verwendung eines FITC-Dextran Assay zeigen, dass die enterale Barriere-Funktion in einem der von uns verwendeten Colitismodellen durch GLP-2 verbessert wird. Des Weiteren ist bekannt, dass GLP-2 zu einer

Epithelproliferation mit Stärkung der Mukosaschicht mit verlängerten Darm-Villi führt, wodurch eine Verbesserung der Nährstoffaufnahme erreicht wird (Drucker et al., 1996, Drucker et al., 1997, Tsai et al., 1997a). Hiermit übereinstimmend konnten wir zeigen, dass es unter Behandlung mit GLP-2 zu einer Zunahme der Epithelintegrität der Mukosaschicht mit reduzierter Neutrophileninfiltration der Darmkrypten kommt. Entsprechend gehen wir davon aus, dass die inflammationsabhängige Induktion von GLP-2, über eine Proliferation der Kryptzellen mit verbesserter Morphologie der Darm-Mukosa zu einem milderen Krankheitsverlauf in dem von uns verwendeten Colitismodellen, führt. Dies konnte in ähnlicher Weise im Mausmodell der Darmresektion gezeigt werden, in dem eine gesteigerte GLP-2 Sekretion zu einer geringerer Darm-Permeabilität und verbesserten Resorption führte (Scott et al., 1998, Sigalet et al., 2007). Interessanter Weise konnte in einer Studie mit Trinitrobenzolsulfonsäure induzierter Colitis gezeigt werden, dass nur die Vorbehandlung mit GLP-2, nicht jedoch eine nachträgliche Applikation, zu einer gesteigerten Proliferation und Verbesserung der Morphologie der Mukosaschicht führt (Garrison et al., 2009). Ob die Applikation von GLP-2 oder eines DPP-4 Inhibitors in den von uns gewählten Colitis-Modellen zu einer Verbesserung des Krankheitsverlaufes bei bereits bestehenden Mukosaschaden führt, muss weiter untersucht werden und ist von großer klinischer Relevanz.

Wir konnten in unserem Modell zeigen, dass es im DSS-Colitis-Modell unter DPP-4 Inhibition zu einer geringeren MPO Aktivität und niedrigeren IL-6 Spiegel kommt. MPO spielt bei der Regulation von inflammatorischen Prozessen eine entscheidende Rolle und bindet mit einer hohen Affinität Phosphatidylserin auf apoptotischen Zellen (Martin et al., 2016). Somit weißt eine hohe MPO-Aktivität auf eine ausgeprägtere Inflammationsreaktion und einen größeren Gewebeschäden hin (Aratani, 2018, Zhang et al., 2001). Qi und Kollegen konnten ähnliches in einem DSS - Colitismodell der Ratte zeigen, in dem exogenes pegyliertes-GLP-2 zu einer Reduktion der Inflammation und TNF-α Sekretion führte (Qi et al., 2017). Dies wurde von einer anderen Arbeitsgruppe im Modell der Darmresektion in der Maus bestätigt (Tsai et al., 1997a), was mit einer Reduktion unterschiedlicher Zytokine verbunden war (Nakame et al., 2016). Wir gehen davon aus, dass die Induktion des endogenen GLP-2 zu einer anti-inflammatorischen Wirkung im Colitismodell führt.

Es bleibt weiterhin unklar, wie die molekulare Wirkung von GLP-2 vermittelt wird. Der GLP-2 Rezeptor ist bekannt und lässt sich im gastrointestinalen System insbesondere im Magen und Darm sowie dem Nervensystem nachweisen (Munroe et al., 1999, Yusta et al., 2000b). Entscheidender Weise lässt sich jedoch auf Darmepithelzellen, die insbesondere auf eine Behandlung mit GLP-2 ansprechen, keine Expression des GLP-2 Rezeptors nachweisen. Stattdessen weisen entero-endokrine Zellen des Darms, enterale Nervenzellen sowie Myofibroblasten eine Expression des GLP-2 Rezeptors auf (Orskov and Holst, 1987). Entsprechend ist davon auszugehen, dass die Wirkung auf die Epithelzellen des Darms indirekt über para- und autokrine sowie nervale Wege vermittelt wird. Diese könnte z.B. über eine Zwischenschaltung des vasoaktiven intestinalen Peptids (VIP) erfolgen, welches u.a. als Neurotransmitter wirkt. Es wurde gezeigt, dass GLP-2 zu einer Proliferationssteigerung über cAMP führt (Walsh et al., 2003) und exogen zugeführtes GLP-2 in Zellkulturversuchen über VIP als Vermittler von GLP-2 zu einer Induktion von Wachstumsfaktoren abhängig von PI3K führt (de Heuvel et al., 2012). Andere Arbeitgruppen berichten zwar auch von direkt vermittelten Wegen wie Yusta und Kollegen in Nierenzellen aus Hamstern (BHK GLP-2R) zeigen konnten, jedoch scheint aufgrund des nicht vorhandenen GLP-2 Rezeptors auf Epithelzellen des Darms eine indirekte Vermittlung, wahrscheinlicher. Wir gehen auch in unseren gezeigten Daten von einer indirekten Vermittlung aus.

Um die Bedeutung des GLP-2 Rezeptors für die Reduktion der Darm-Inflammation in unserem Modell zu untersuchen, haben wir den GLP-2 Rezeptor Antagonisten (GLP-2(3-33)) verwendet, ohne dass der Krankheitsverlauf durch diesen relevant beeinflusst wurde. Einschränkend muss hierbei festgestellt werden, das GLP-2(3-33) einen partiellen Agonisten am GLP-2 Rezeptor darstellt und diesen somit leicht aktiviert aber für aktives GLP-2 blockiert. Nur in sehr hohen physiologischen Konzentrationen wirkt GLP-2(3-33) als voller Antagonist am Rezeptor. Eine Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass es durch GLP-2(3-33) zu einer Reduktion der enteralen Zellproliferation nach Nahrungsreexposition kam (Shin et al., 2005), welches für eine ausreichenden Wirkung als Antagonist spricht. Trotzdem sind für weitere mechanistische Details die Entwicklung wirkungsvollerer GLP-2 Rezeptor Antagonisten erforderlich.

GLP-2 wird bereits erfolgreich in der Therapie des Kurzdarmsyndroms angewendet. Durch GLP-2 kommt es zu einer verbesserten Darmproliferation und Nährstoffresorption (Jeppesen et al., 2001), was zu einem milderen Krankheitsverlauf

bei Kurzdarmsyndrom führt. In der Literatur wird beschrieben, dass es in SBS Patienten zu einer verbesserten Energie Absorption und Kryptzell-Proliferation in GLP-2 behandelten Patienten kommt (J.L. Madsen and J.J. Holst and P.B. Mortensen, 2001). Zwei weitere Studien von Jeppesen und Kollegen zeigen, dass GLP-2 Agonisten die enterale Barriere-Funktion beim Menschen verbessern (Jeppesen et al., 2001b, Jeppesen et al., 2005) und die Aktivierung des GLP-2 System durch Teduglutid, zu einer gesteigerten Proliferation der Darmepithelzellen mit anti-apoptotischer Wirkung, führt (Jeppesen et al., 2005, Arda-Pirincci et al., 2012). Unter Berücksichtigung dieser funktionellen Daten besitzt die Beobachtug hoher GLP-2 Spiegel bei UC/MC Patienten große klinische Relevanz. Entsprechend erscheint es möglich, dass die Hemmung des GLP-2-Abbaus über eine DPP-4 Inhibiton eine klinische Relevanz bei chonisch entzündlicher Darmerkrankung besitzten könnte, was in klinischen Interventionsstudien untersucht werden sollte. Des weiteren sollte evaluiert werden, ob der klinische Nutzen von GLP-2 Rezeptor Agonisten auf weitere Darmerkrankungen wie chronisch entzündlichen Darmerkrankungen sowie *Clostridium difficile* Infektionen erweitert werden kann. So wäre es denkbar, dass durch GLP-2 und die damit verbundenen Eigenschaften wie eine anti-inflammatorische/anti-apoptotische Wirkung oder aber auch eine Verbesserung der Nährstoffresorption sich positiv bei Patienten mit Darmerkrankungen auswirken. Als Limitation der GLP-2 Messung klinischer IBD-Kohorten wies die Kontrollgruppe in dieser Arbeit ein geringeres Alter auf. Um die erhöhten GLP-2 Spiegel bei Patienten mit IBD zu bestätigen, wäre eine gleichaltrige Kontrollgruppe wünschenswert, um altersbedingte Unterschiede auszuschließen.

Zusammengefasst wird in dem zweiten Teil der hier vorgestellten Arbeit die inflammationsabhängige Induktion von GLP-2 bei entzündlichen Darmerkrankungen beschrieben, während GLP-2 eine günstige Wirkung auf den Krankheitsverlauf inflammatorischer Darmerkrankungen aufwies.

Der erste Teil der Arbeit charakterisiert die Induktion von GLP-1 im akuten Myokardinfarkt, was in Abhängigkeit des GLP-1 Rezeptors vermittelt wurde und zu einer zeitabhängigen Verbesserung der LV Funktion führte. Dies ging mit einer Verbesserung der Mitochondrien-Funktion der Kardiomyozyten einher. Zusammen erweitern diese Daten unser derzeitiges Verständnis des GLP-1 und GLP-2 Systems und bereiten den Weg für zukünftige Forschung und therapeutische Anwendungen von

GLP-1 basierten Therapie bei Patienten mit MI bzw. GLP-2 bei inflammatorischen Darmerkrankungen.

5 Ausblick

In der hier vorliegenden Arbeit konnten wir zeigen, dass ein MI als Stimulus ausreicht, um den endogenen GLP-1 Spiegel anzuheben. Damit verbunden ließen sich GLP-1 abhängige, kardioprotektive Effekte mit verbesserter kardialer Kontraktilität nachweisen, was über eine Induktion von AMPK und eine gesteigerte mitochondriale Respiration vermittelt wurde.

Weiterführend zu unseren hier gezeigten Ergebnissen, ist die inflammatorische Regulation der GLP-1 Sekretion im akuten humanen System klinisch höchst spannend. In der Literatur ist bereits beschrieben, dass GLP-1 im Myokardinfarkt positive Effekte mit sich bringt. Es konnte gezeigt werden, dass es durch GLP-1 Rezeptor Agonisten bei Patienten mit Diabetes und hohem kardiovaskulärem Risiko, zu einer Reduktion der kardiovaskulären Ereignisse kommt (Zimmerman et al., 2017), in STEMI Patienten nach PCI die LV Funktion verbessert wird (Nikolaidis et al., 2004) sowie die Infarktgröße bei Gabe im akuten Myokardinfakrt reduziert werden kann (Lonborg et al., 2012). Derzeit bleibt offen, wie die genaue zeitliche Kinetik der GLP-1 Sekretion beim Menschen im akuten Myokardinfarkt abläuft und welche protektiven Eigenschaften hiermit im zeitlichen Verlauf einhergehen. Wir konnten bereits in der Maus zeigen, dass die zeitliche Kinetik der GLP-1 Induktion einen Einfluss auf die protektive Wirkung einer DPP-4 Inhibition hat. Ähnliche Untersuchungen könnten im Menschen durchgeführt und eine Assoziation zwischen GLP-1 Induktion im akuten Myokardinfarkt und prognostischen Outcome, erfolgen. In Interventionsstudien sollte des weiteren die therapeutische Wirkung einer DPP-4 Inhibition oder der Applikation von GLP-1 Rezeptor Agonisten im akuten Myokardinfarkt weiter untersucht werden.

Durch Verwendung von GLP-1R $^{-/-}$ Mäusen konnten wir in dieser Arbeit die Relevanz des GLP-1R Signalweges für die kardioprotektive Wirkung von GLP-1 im akuten MI zeigen. Als ein komplementäres loos of function Modell plant unsere Arbeitsgruppe die Verwendung vom Prä-Proglukagon KO Mäusen, die nicht in der Lage sind GLP-1 herzustellen. Entsprechend gehen wir davon aus, dass DPP-4 Inhibitoren in diesen

Mäusen keine kardioprotektive Wirkung aufweisen, diese Mäuse jedoch auf eine Injektion von GLP-1 mit einer Verbesserung der LV-Funktion im akuten MI reagieren.

Als weiteren Punkt der mechanistischen Betrachtungen ist der Einfluss von AMPK zu nennen. AMPK ist ein energetischer Sensor der Zellen, der Zentral an der Regulation der GLP-1 Wirkung im akuten Myokardinfarkt beteiligt ist, wie wir durch Verwendung eines AMPK Inhibitors in dieser Arbeit zeigen konnten. Um die Relevanz des kardialen AMPK-Signalweges für die kardioprotektive Wirkung von GLP-1 spezifisch zu überprüfen, ist die Verwendung von herzspezifischen AMPK KO Mäusen geplant. Wir gehen davon aus, dass weder eine DPP-4 Inhibition noch die Injektion von GLP-1 im akuten MI zu einer Verbesserung der LV-Funktion in AMPK KO Mäusen führt.

Der AMPK-Aktivierung nachgeschaltet ist die mitochondriale Atmung. Wir konnten feststellen, dass diese durch GLP-1 gesteigert wird und somit eine mögliche Erklärung für die Verbesserung der Herzfunktion ist. Wir gehen davon aus, dass die GLP-1-abhängige AMPK-Aktivierung und mitochondriale Respiration mit einer Reduktion der ROS-Produktion einhergeht. Durch eine geringere Calcium-Konzentration der Mitochondrien kommt es u.a. zu einer Oxidation von NADPH, sodass keine ausreichende Neutralisation von reaktiven Sauerstoffspezies erfolgen kann (Kohlhaas et al., 2010, Maack et al., 2006). Um dies zu überprüfen, soll die NADP Konzentration, der ATP Verbrauch und das Calcium-Cycling in isolierten Mitochondrien untersucht werden. Wir gehen davon aus, dass es durch GLP-1 zu einer Steigerung des Calciumgehaltes der Mitochondrien kommt, welches über NADPH zu einer Reduktion von ROS beiträgt.

Hinsichtlich des hier untersuchten GLP-2-Systems bleibt die entscheidende Frage, auf welchen Zellen der GLP-2 Rezeptor lokalisiert ist und wie die Wirkung von GLP-2 im Darm vermittelt wird. In der Literatur konnte gezeigt werden, dass der GLP-2 Rezeptor sowohl im enterischen Nervensystem, entero-endokrinen Zellen und Myofibroblasten des Darms exprimiert wird. Es ließ sich jedoch keine Expression auf Epithelzellen des Darms nachweisen, die das stärkste Ansprechen auf eine GLP-2 Behandlung aufweisen (Orskov and Holst, 1987). Um dies weiter zu untersuchen, sollen gewebespezifische GLP-2 KO Mäuse zu Einsatz kommen, bei denen der GLP-2 Rezeptor spezifisch auf enterischen Nervenzellen, entero-endokrinen Zellen oder Myofibroblasten des Darms ausgeschaltet wird. Auf diese Weise kann geklärt werden,

welche Zellen für die indirekte Vermittlung der GLP-2 Wirkung auf die Epithelzellen verantwortlich sind.

Weiter sollte der therapeutische Nutzen von GLP-2 beim Menschen besser untersucht werden. Aktuell wird GLP-2 nur im Kurzdarm-Syndrom therapeutisch angewandt. GLP-2 hat durch die beschriebenen positiven Eigenschafften jedoch ein hohes Potential, auch in anderen entzündlichen Darmerkrankungen eine therapeutische Wirksamkeit zu zeigen. Eine klinische relevante Fragestellung wäre die Untersuchung des Einflusses von GLP-2 bei Patienten in chronischen oder akut entzündlichen Darmerkrankungen. Wir konnten zeigen, dass es in MC/UC Patienten zu erhöhten GLP-2 Spiegeln kommt, jedoch bleibt unklar, ob dies mit einem funktionalen Nutzen einhergeht und ob dieser z.B. durch eine DPP-4 Inhibition verstärkt werden kann.

Zusammengenommen konnte diese Arbeit wichtige Erkenntnisse für das GLP-1 und GLP-2 System aufgezeigt. In Zukünftigen Untersuchungen sollten neben einer weiteren mechanistischen Aufarbeitung der Wirkungsmechanismen der therapeutische Einsatz im Menschen genauer evaluiert werden.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich bei den nachstehenden Personen bedanken. Ohne ihre Mithilfe und Unterstützung wäre diese Dissertationen nicht möglich gewesen.

Mein Dank gilt zunächst Herrn Prof. Dr. med. Nikolaus Marx für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit in seinem Institut durchführen zu können.

Ganz besonders danken möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Michael Lehrke für die Betreuung dieser Arbeit, die freundliche Hilfe und Vorschläge, die mich immer wieder kritisch auf die Thematik blicken ließen. Weiter möchte ich mich auch für die zahlreichen Gespräche sowohl auf intellektueller als auch persönlicher Ebene bedanken; es war stets ein bereichernder und konstruktiver Austausch und ich habe unsere Dialoge stets als Ermutigung und Motivation empfunden. Vielen Dank für die wertvolle und unermüdliche Unterstützung bei der Korrektur dieser Arbeit.

Ich möchte weiter Frau Prof. Dr. phil. nat. Gabriele Pradel für die schnelle und unkomplizierte Übernahme als Zweitgutachter und für die wertvollen Kommentare und Anregungen zu meiner Arbeit danken.

Des Weiteren danke ich Prof. Dr. rer. nat. Bohrmann für die spontane Übernahme des 3. Gutachters und Drittprüfers.

Vielen Dank Herr Prof. Dr. rer. nat. Joachim Jankowski für die Übernahme des Viertprüfers.

Ferner Danke ich Dr. nat. med. Dr. med. Elisa Liehn für die Vermittlung der Operationstechniken, die für diese Arbeit notwendig waren.

Des Weiteren möchte ich mich bei allen Arbeitskollegen und Freunden aus unserem Labor für die fachliche Unterstützung und die tolle Zeit, die wir zusammen hatten, bedanken. Es war eine unvergessliche Zeit mit vielen schönen Stunden, aber auch einigen langen Laborabenden. Ich erinnere mich immer gerne an diese Zeit zurück. Ich danke euch Julia, Florian, Sebastian, Marvin, Robert, Elias, Alissa, Alena, Jolanta, Irmi und Katharina. Zusätzlich möchte ich mich auch beim Team des IMCAR bedanken, vor allem bei Roya, die mir bei histologischen Fragen stets zur Seite stand.

Last but not least möchte ich mich von ganzem Herzen bei meiner Familie bedanken. Ich danke meinen Eltern Peter und Renate für die stetige Unterstützung, den Zuspruch und die Aufmunterung, wenn es mal nicht wie geplant lief und ohne die, diese Arbeit nicht realisierbar gewesen wäre. Ich danke meinem Bruder, dass er mich stets bestärkt und an mich geglaubt hat. Besonders möchte ich auch meiner Freundin Rebecca danken. Danke für deine Unterstützung, deinen Zuspruch und deine unendliche Geduld während der Erstellung dieser Arbeit.

Curriculum Vitae

Persönlich:	
Name:	Sebastian Timo Diebold
Geburtsdatum:	25.09.1983
Geburtsort:	Heidelberg, Deutschland
Nationalität:	Deutsch

Ausbildung:	
2013-2018	Doktorand zum Abschluss Dr.rer.nat (RWTH Aachen, Institut für Kardiologie, Angiologie und Pneumologie der Uniklinik RWTH Aachen)
2010-2013	Master of Science in molekularer und angewandter Biotechnologie; RWTH Aachen. Abschlussthema: Nanostrategien zur zellulären Bildgebung und Targeting von dendritischen Zellen
2006-2010	Bachelor of Science im Studiengang Bio – und Nanotechnologie an der FH Südwestfalen. Abschlussthema: Untersuchung von nanoskaligen SiO_2-Schichten aus dem Sol Gel-Prozess auf Zellvitalität

Publikationen:

Kahles F, Meyer C, **Diebold S**, Foldenauer AC, Stöhr R, Möllmann J, Lebherz C, Findeisen HM, Marx N, Lehrke M. Glucose-dependent insulinotropic peptide secretion is induced by inflammatory stimuli in an interleukin-1-dependent manner in mice. Diabetes Obes Metab. 2016 Nov;18(11):1147-1151. doi: 10.1111/dom.12711. Epub 2016 Aug 4.

Kahles F, Meyer C, Möllmann J, **Diebold S**, Findeisen HM, Lebherz C, Trautwein C, Koch A, Tacke F, Marx N, Lehrke M. GLP-1 secretion is increased by inflammatory stimuli in an IL-6-dependent manner, leading to hyperinsulinemia and blood glucose lowering. Diabetes. 2014 Oct;63(10):3221-9. doi: 10.2337/db14-0100. Epub 2014 Jun 19.

Lehrke M, Kahles F, Makowska A, Tilstam PV, **Diebold S**, Marx J, Stöhr R, Hess K, Endorf EB, Bruemmer D, Marx N, Findeisen HM. PDE4 inhibition reduces neointima

formation and inhibits VCAM-1 expression and histone methylation in an Epac-dependent manner. J Mol Cell Cardiol. 2015 Apr; 81:23-33. doi: 10.1016/j.yjmcc.2015.01.015. Epub 2015 Jan 30.

Kahles F, Meyer C, Möllmann J, **Diebold S**, Findeisen HM, Lebherz C, Trautwein C, Koch A, Tacke F, Marx N, Lehrke M. [IL-6 dependent GLP-1 secretion during acute inflammation]. Med Klin Intensivmed Notfmed. 2015 Sep;110(6):462-4. doi: 10.1007/s00063-015-0059-2.

Sebastian Diebold, Julia Möllmann, Florian Kahles, Elias Haj-Yehia, Elisa A Liehn, Alexander Nickel, Corinna Lebherz, Christoph Maack, Nikolaus Marx, Michael Lehrke Myocardial infarction is sufficient to increase GLP-1 secretion, leading to improved left ventricular contractility and mitochondrial respiratory capacity. Diabetes Obes Metab. 2018 Jul 23. doi: 10.1111/dom.13472. **[Teile dieser Arbeit sind im genannten "Diabetes, Obesity and Metabolism, 2018" publiziert].**

Konferenzen:

Vorträge

Vortrag auf der Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie (DGK) 2017 Freie Vorträge: "Remodeling und Arrhythmien"; Glucagon like peptide 1 (GLP-1) secretion is increased in a murine model of myocardial infarction leading to improved left ventricular function and mitochondrial respiratory capacity

Vortrag auf der Jahrestagung der American Diabetes Association (ADA) 2017. Session: Mechanisms and Modulators of Cardiovascular Complications (With Edwin Bierman Award Lecture) Increased compensatory GLP-1 secretion after myocardial infarction in mice is amplified by Linagliptin and leads to improved left ventricular function and mitochondrial respiratory capacity

Finalist der Young Investigator Award Session bei der Jahrestagung 2017 (Nominierung der besten 6 Vorträge) der Deutschen Gesellschaft für Arteriosklerosеforschung (DGAF). Glucagon like peptide 1 (GLP-1) secretion is increased in a murine model of myocardial infarction leading to improved left ventricular function and mitochondrial respiratory capacity

Vortrag auf der Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie (DGK) 2016; The gut hormone Glucagon like peptide 1 (GLP-1) is increased in response to myocardial infarction and improves left ventricular function in a GLP-1 receptor dependent manner

Finalist der Young Investigator Award Session (Nominierung der besten 6 Vorträge) bei der Jahrestagung 2015 der Deutschen Gesellschaft für Arteriosklerosеforschung (DGAF). Die Sekretion des Inkretinhormons Glucagon-like Peptide 1 (GLP-1) ist im akuten Koronarsyndrom erhöht und steigert die links-ventrikuläre Herzfunktion

Posterpräsentation:

Poster-Vortrag auf der Jahrestagung der European Association for the Study of Diabetes (EASD) 2017. Event: Cardiovascular intervention in mice and men; GLP-1 secretion after myocardial infarction is amplified by Linagliptin and leads to improved left ventricular function and mitochondrial respiratory capacity

Eidesstattliche Erklärung

Ich, **Sebastian Timo Diebold**
erklärt hiermit, dass diese Dissertation und die darin dargelegten Inhalte die eigenen sind und selbstständig, als Ergebnis der eigenen originären Forschung mit bestem Wissen und Gewissen, generiert wurden.
Hiermit erkläre ich an Eides statt
1. Diese Arbeit wurde vollständig oder größtenteils in der Phase als Doktorand dieser Fakultät und Universität angefertigt;

2. Sofern irgendein Bestandteil dieser Dissertation zuvor für einen akademischen Abschluss oder eine andere Qualifikation an dieser oder einer anderen Institution verwendet wurde, wurde dies klar angezeigt;

3. Wenn immer andere eigene- oder Veröffentlichungen Dritter herangezogen wurden, wurden diese klar benannt;

4. Wenn aus anderen eigenen- oder Veröffentlichungen Dritter zitiert wurde, wurde stets die Quelle hierfür angegeben. Diese Dissertation ist vollständig meine eigene Arbeit, mit der Ausnahme solcher Zitate;

5. Alle wesentlichen Quellen von Unterstützung wurden benannt;

6. Wenn immer ein Teil dieser Dissertation auf der Zusammenarbeit mit anderen basiert, wurde von mir klar gekennzeichnet, was von anderen und was von mir selbst erarbeitet wurde;

7. Ein Teil oder Teile dieser Arbeit wurden zuvor veröffentlicht und zwar in:
Myocardial infarction is sufficient to increase GLP-1 secretion, leading to improved left ventricular contractility and mitochondrial respiratory capacity. Diabetes Obes Metab. 2018 Dec;20(12):2911-2918. doi: 10.1111/dom.13472. Epub 2018 Aug 16.

Datum:
Unterschrift : _____

Literaturverzeichnis

(CDC)., C. F. D. C. A. P. 2004. Prevalence of overweight and obesity among adults with diagnosed diabetes--United States, 1988-1994 and 1999-2002. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep,* 53**,** 1066-8.

AHA, A. H. A. 2018. *Health topics and guidelines of AHA* [Online]. Heart.org https://www.heart.org/en/health-topics: National Center of American heart assosiation. 2018].

AHMED, A. M. 2002. History of diabetes mellitus. *Saudi Med J,* 23**,** 373-8.

ALBERT, M. A. 2011. Biomarkers and Heart Disease. *Journal of Clinical Sleep Medicine : JCSM : Official Publication of the American Academy of Sleep Medicine,* 7**,** S9-S11.

ANANTHAKRISHNAN, A. N. 2015. Epidemiology and risk factors for IBD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol,* 12**,** 205-17.

ARATANI, Y. 2018. Myeloperoxidase: Its role for host defense, inflammation, and neutrophil function. *Arch Biochem Biophys,* 640**,** 47-52.

ATKINSON, M. A., EISENBARTH, G. S. & MICHELS, A. W. 2014. Type 1 diabetes. *Lancet,* 383**,** 69-82.

AUGUSTYNS, K., BAL, G., THONUS, G., BELYAEV, A., ZHANG, X. M., BOLLAERT, W., LAMBEIR, A. M., DURINX, C., GOOSSENS, F. & HAEMERS, A. 1999. The unique properties of dipeptidyl-peptidase IV (DPP IV / CD26) and the therapeutic potential of DPP IV inhibitors. *Curr Med Chem,* 6**,** 311-27.

BAGGIO, L. L. & DRUCKER, D. J. 2007. Biology of incretins: GLP-1 and GIP. *Gastroenterology,* 132**,** 2131-57.

BAHRAMI, J., YUSTA, B. & DRUCKER, D. J. 2010. ErbB activity links the glucagon-like peptide-2 receptor to refeeding-induced adaptation in the murine small bowel. *Gastroenterology,* 138**,** 2447-56.

BAN, K., HUI, S., DRUCKER, D. J. & HUSAIN, M. 2009. Cardiovascular consequences of drugs used for the treatment of diabetes: potential promise of incretin-based therapies. *J Am Soc Hypertens,* 3**,** 245-59.

BAN, K., KIM, K. H., CHO, C. K., SAUVE, M., DIAMANDIS, E. P., BACKX, P. H., DRUCKER, D. J. & HUSAIN, M. 2010. 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**,** 1520-31.

BAN, K., NOYAN-ASHRAF, M. H., HOEFER, J., BOLZ, S.-S., DRUCKER, D. J. & HUSAIN, M. 2008. 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.

BARRAGAN, J. M., RODRIGUEZ, R. E. & BLAZQUEZ, E. 1994. Changes in arterial blood pressure and heart rate induced by glucagon-like peptide-1-(7-36) amide in rats. *Am J Physiol,* 266**,** E459-66.

BARTLETT, J. G., CHANG, T. W., GURWITH, M., GORBACH, S. L. & ONDERDONK, A. B. 1978. Antibiotic-associated pseudomembranous colitis due to toxin-producing clostridia. *N Engl J Med,* 298**,** 531-4.

BASALAY, M. V., MASTITSKAYA, S., MROCHEK, A., ACKLAND, G. L., DEL ARROYO, A. G., SANCHEZ, J., SJOQUIST, P. O., PERNOW, J., GOURINE, A. V. & GOURINE, A. 2016. Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) mediates cardioprotection by remote ischaemic conditioning. *Cardiovasc Res,* 112**,** 669-676.

BAUMGART, D. C. & CARDING, S. R. 2007. Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology. *Lancet,* 369**,** 1627-40.

BAUMGART, D. C. & SANDBORN, W. J. 2007. Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies. *Lancet,* 369**,** 1641-57.

BAYER-PHARMA-AG. 2017. *Acute Coronary Syndrome* [Online]. https://www.thrombosisadviser.com/acute-coronary-syndrome/. [Accessed December 2017].

BAYLISS, W. M. & STARLING, E. H. 1902. The mechanism of pancreatic secretion. *J Physiol,* 28**,** 325-53.

BEHME, M. T., DUPRE, J. & MCDONALD, T. J. 2003. Glucagon-like peptide 1 improved glycemic control in type 1 diabetes. *BMC Endocr Disord,* 3**,** 3.

BELKAID, Y. & HAND, T. 2014. Role of the Microbiota in Immunity and inflammation. *Cell,* 157**,** 121-141.

BELL, G. I., SANCHEZ-PESCADOR, R., LAYBOURN, P. J. & NAJARIAN, R. C. 1983. Exon duplication and divergence in the human preproglucagon gene. *Nature,* 304**,** 368-71.

BENJAMIN, M. A., MCKAY, D. M., YANG, P. C., CAMERON, H. & PERDUE, M. H. 2000. Glucagon-like peptide-2 enhances intestinal epithelial barrier function of both transcellular and paracellular pathways in the mouse. *Gut,* 47**,** 112-9.

BERGWITZ, C., GARDELLA, T. J., FLANNERY, M. R., POTTS, J. T., JR., KRONENBERG, H. M., GOLDRING, S. R. & JUPPNER, H. 1996. Full activation of chimeric receptors by hybrids between parathyroid hormone and calcitonin. Evidence for a common pattern of ligand-receptor interaction. *J Biol Chem,* 271**,** 26469-72.

BEWTRA, M., KAISER, L. M., TENHAVE, T. & LEWIS, J. D. 2013. Crohn's disease and ulcerative colitis are associated with elevated standardized mortality ratios: a meta-analysis. *Inflamm Bowel Dis,* 19**,** 599-613.

BIRNBAUM, Y., CASTILLO, A. C., QIAN, J., LING, S., YE, H., PEREZ-POLO, J. R., BAJAJ, M. & YE, Y. 2012. Phosphodiesterase III inhibition increases cAMP levels and augments the infarct size limiting effect of a DPP-4 inhibitor in mice with type-2 diabetes mellitus. *Cardiovasc Drugs Ther,* 26**,** 445-56.

BJERKNES, M. & CHENG, H. 2001. Modulation of specific intestinal epithelial progenitors by enteric neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A,* 98**,** 12497-502.

BOLTON, R. P. & CULSHAW, M. A. 1986. Faecal metronidazole concentrations during oral and intravenous therapy for antibiotic associated colitis due to Clostridium difficile. *Gut,* 27**,** 1169-72.

BOOTH, C., BOOTH, D., WILLIAMSON, S., DEMCHYSHYN, L. L. & POTTEN, C. S. 2004. Teduglutide ([Gly2]GLP-2) protects small intestinal stem cells from radiation damage. *Cell Prolif,* 37**,** 385-400.

BOSE, A. K., MOCANU, M. M., CARR, R. D., BRAND, C. L. & YELLON, D. M. 2005a. Glucagon-like peptide 1 can directly protect the heart against ischemia/reperfusion injury. *Diabetes,* 54**,** 146-51.

BOSE, A. K., MOCANU, M. M., CARR, R. D., BRAND, C. L. & YELLON, D. M. 2005b. Glucagon-like Peptide 1 Can Directly Protect the Heart Against Ischemia/Reperfusion Injury. *Diabetes,* 54**,** 146-151.

BOSE, A. K., MOCANU, M. M., CARR, R. D. & YELLON, D. M. 2005c. Glucagon like peptide-1 is protective against myocardial ischemia/reperfusion injury when given either as a preconditioning mimetic or at reperfusion in an isolated rat heart model. *Cardiovasc Drugs Ther,* 19**,** 9-11.

BOUSHEY, R. P., YUSTA, B. & DRUCKER, D. J. 1999. Glucagon-like peptide 2 decreases mortality and reduces the severity of indomethacin-induced murine enteritis. *Am J Physiol,* 277**,** E937-47.

BOUSHEY, R. P., YUSTA, B. & DRUCKER, D. J. 2001. Glucagon-like peptide (GLP)-2 reduces chemotherapy-associated mortality and enhances cell survival in cells expressing a transfected GLP-2 receptor. *Cancer Res,* 61**,** 687-93.

BRITANNICA, E. 2018. *Heart Anatomy, Encyclopeadia Britannica* [Online]. https://www.britannica.com/science/heart. [Accessed 26.04.2019.

BRUBAKER, P. L. 2006. The glucagon-like peptides: pleiotropic regulators of nutrient homeostasis. *Ann N Y Acad Sci,* 1070**,** 10-26.

BRUBAKER, P. L., CRIVICI, A., IZZO, A., EHRLICH, P., TSAI, C. H. & DRUCKER, D. J. 1997a. Circulating and tissue forms of the intestinal growth factor, glucagon-like peptide-2. *Endocrinology,* 138**,** 4837-43.

BRUBAKER, P. L. & DRUCKER, D. J. 2002. Structure-function of the glucagon receptor family of G protein-coupled receptors: the glucagon, GIP, GLP-1, and GLP-2 receptors. *Receptors Channels,* 8**,** 179-88.

BRUBAKER, P. L., IZZO, A., HILL, M. & DRUCKER, D. J. 1997b. Intestinal function in mice with small bowel growth induced by glucagon-like peptide-2. *Am J Physiol,* 272**,** E1050-8.

BUJA, L. M. 2005. Myocardial ischemia and reperfusion injury. *Cardiovascular Pathology,* 14**,** 170-175.

BURCKHARDT, F., FRIEDRICH, A., BEIER, D. & ECKMANNS, T. 2008. Clostridium difficile Surveillance Trends, Saxony, Germany. *Emerging Infectious Diseases,* 14**,** 691-692.

BURISCH, J., JESS, T., MARTINATO, M. & LAKATOS, P. L. 2013. The burden of inflammatory bowel disease in Europe. *J Crohns Colitis,* 7**,** 322-37.

BURRIN, D. G., PETERSEN, Y., STOLL, B. & SANGILD, P. 2001. Glucagon-Like Peptide 2: A Nutrient-Responsive Gut Growth Factor. *The Journal of Nutrition,* 131**,** 709-712.

CALABRIA, A. C., LI, C., GALLAGHER, P. R., STANLEY, C. A. & DE LEÓN, D. D. 2012. GLP-1 Receptor Antagonist Exendin-(9-39) Elevates Fasting Blood Glucose Levels in Congenital Hyperinsulinism Owing to Inactivating Mutations in the ATP-Sensitive K(+) Channel. *Diabetes,* 61**,** 2585-2591.

CALLAHAN, P. X., MCDONALD, J. K. & ELLIS, S. 1972. Dipeptidyl aminopeptidase I: application in sequencing of peptides. *Fed Proc,* 31**,** 1105-13.

CAMPBELL, J. E. & DRUCKER, D. J. 2013. Pharmacology, physiology, and mechanisms of incretin hormone action. *Cell Metab,* 17**,** 819-37.

CANI, P. D., POSSEMIERS, S., VAN DE WIELE, T., GUIOT, Y., EVERARD, A., ROTTIER, O., GEURTS, L., NASLAIN, D., NEYRINCK, A., LAMBERT, D. M., MUCCIOLI, G. G. & DELZENNE, N. M. 2009. Changes in gut microbiota control inflammation in obese mice through a mechanism involving GLP-2-driven improvement of gut permeability. *Gut,* 58**,** 1091-103.

CHEN, X., KATCHAR, K., GOLDSMITH, J. D., NANTHAKUMAR, N., CHEKNIS, A., GERDING, D. N. & KELLY, C. P. 2008. A mouse model of Clostridium difficile-associated disease. *Gastroenterology,* 135**,** 1984-92.

CHITNIS, A. S., HOLZBAUER, S. M., BELFLOWER, R. M., WINSTON, L. G., BAMBERG, W. M., LYONS, C., FARLEY, M. M., DUMYATI, G. K., WILSON, L. E., BELDAVS, Z. G., DUNN, J. R., GOULD, L. H., MACCANNELL, D. R., GERDING, D. N., MCDONALD, L. C. & LESSA, F. C. 2013. Epidemiology of

community-associated Clostridium difficile infection, 2009 through 2011. *JAMA Intern Med,* 173**,** 1359-67.

COLLEDGE, N. R., WALKER, B. R., RALSTON, S., BRITTON, R. & DAVIDSON, S. 2010. *Davidson's principles and practice of medicine,* Edinburgh, Churchill Livingstone Elsevier.

COOPMAN, K., HUANG, Y., JOHNSTON, N., BRADLEY, S. J., WILKINSON, G. F. & WILLARS, G. B. 2010. Comparative effects of the endogenous agonist glucagon-like peptide-1 (GLP-1)-(7-36) amide and the small-molecule ago-allosteric agent "compound 2" at the GLP-1 receptor. *J Pharmacol Exp Ther,* 334**,** 795-808.

COTTONE, M., ROSSELLI, M., ORLANDO, A., OLIVA, L., PULEO, A., CAPPELLO, M., TRAINA, M., TONELLI, F. & PAGLIARO, L. 1994. Smoking habits and recurrence in Crohn's disease. *Gastroenterology,* 106**,** 643-8.

CREUTZFELDT, W. 1979. The incretin concept today. *Diabetologia,* 16**,** 75-85.

DACAMBRA, M. P., YUSTA, B., SUMNER-SMITH, M., CRIVICI, A., DRUCKER, D. J. & BRUBAKER, P. L. 2000. Structural determinants for activity of glucagon-like peptide-2. *Biochemistry,* 39**,** 8888-94.

DAHLY, E. M., GILLINGHAM, M. B., GUO, Z., MURALI, S. G., NELSON, D. W., HOLST, J. J. & NEY, D. M. 2003. Role of luminal nutrients and endogenous GLP-2 in intestinal adaptation to mid-small bowel resection. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology,* 284**,** G670-G682.

DAVIES, K. A., LONGSHAW, C. M., DAVIS, G. L., BOUZA, E., BARBUT, F., BARNA, Z., DELMEE, M., FITZPATRICK, F., IVANOVA, K., KUIJPER, E., MACOVEI, I. S., MENTULA, S., MASTRANTONIO, P., VON MULLER, L., OLEASTRO, M., PETINAKI, E., PITUCH, H., NOREN, T., NOVAKOVA, E., NYC, O., RUPNIK, M., SCHMID, D. & WILCOX, M. H. 2014. Underdiagnosis of Clostridium difficile across Europe: the European, multicentre, prospective, biannual, point-prevalence study of Clostridium difficile infection in hospitalised patients with diarrhoea (EUCLID). *Lancet Infect Dis,* 14**,** 1208-19.

DE HEER, J., PEDERSEN, J., ORSKOV, C. & HOLST, J. J. 2007. The alpha cell expresses glucagon-like peptide-2 receptors and glucagon-like peptide-2 stimulates glucagon secretion from the rat pancreas. *Diabetologia,* 50**,** 2135-42.

DE HEUVEL, E., WALLACE, L., SHARKEY, K. A. & SIGALET, D. L. 2012. Glucagon-like peptide 2 induces vasoactive intestinal polypeptide expression in enteric neurons via phophatidylinositol 3-kinase-gamma signaling. *Am J Physiol Endocrinol Metab,* 303**,** E994-1005.

DE MEESTER, I., KOROM, S., VAN DAMME, J. & SCHARPE, S. 1999. CD26, let it cut or cut it down. *Immunol Today,* 20**,** 367-75.

DE MEESTER, I., LAMBEIR, A. M., PROOST, P. & SCHARPE, S. 2003. Dipeptidyl peptidase IV substrates. An update on in vitro peptide hydrolysis by human DPPIV. *Adv Exp Med Biol,* 524**,** 3-17.

DEACON, C. F., JOHNSEN, A. H. & HOLST, J. J. 1995a. Degradation of glucagon-like peptide-1 by human plasma in vitro yields an N-terminally truncated peptide that is a major endogenous metabolite in vivo. *J Clin Endocrinol Metab,* 80**,** 952-7.

DEACON, C. F., NAUCK, M. A., TOFT-NIELSEN, M., PRIDAL, L., WILLMS, B. & HOLST, J. J. 1995b. Both subcutaneously and intravenously administered glucagon-like peptide I are rapidly degraded from the NH2-terminus in type II diabetic patients and in healthy subjects. *Diabetes,* 44**,** 1126-31.

DHANVANTARI, S., SEIDAH, N. G. & BRUBAKER, P. L. 1996. Role of prohormone convertases in the tissue-specific processing of proglucagon. *Mol Endocrinol,* 10**,** 342-55.

DIEBOLD, S., MOELLMANN, J., KAHLES, F., HAJ-YEHIA, E., LIEHN, E. A., NICKEL, A., LEBHERZ, C., MAACK, C., MARX, N. & LEHRKE, M. 2018. Myocardial infarction is sufficient to increase GLP-1 secretion, leading to improved left ventricular contractility and mitochondrial respiratory capacity. *Diabetes Obes Metab*.

DILLON, J. S., TANIZAWA, Y., WHEELER, M. B., LENG, X. H., LIGON, B. B., RABIN, D. U., YOO-WARREN, H., PERMUTT, M. A. & BOYD, A. E., 3RD 1993. Cloning and functional expression of the human glucagon-like peptide-1 (GLP-1) receptor. *Endocrinology,* 133**,** 1907-10.

DOROFEYEV, A. E., VASILENKO, I. V., RASSOKHINA, O. A. & KONDRATIUK, R. B. 2013. Mucosal Barrier in Ulcerative Colitis and Crohn’s Disease. *Gastroenterology Research and Practice,* 2013**,** 9.

DRUCKER, D. J. 2002. Biological actions and therapeutic potential of the glucagon-like peptides. *Gastroenterology,* 122**,** 531-44.

DRUCKER, DANIEL J. 2016. The Cardiovascular Biology of Glucagon-like Peptide-1. *Cell Metabolism,* 24**,** 15-30.

DRUCKER, D. J., ERLICH, P., ASA, S. L. & BRUBAKER, P. L. 1996. Induction of intestinal epithelial proliferation by glucagon-like peptide 2. *Proc Natl Acad Sci U S A,* 93**,** 7911-6.

DRUCKER, D. J., PHILIPPE, J., MOJSOV, S., CHICK, W. L. & HABENER, J. F. 1987. 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.

DRUCKER, D. J., SHI, Q., CRIVICI, A., SUMNER-SMITH, M., TAVARES, W., HILL, M., DEFOREST, L., COOPER, S. & BRUBAKER, P. L. 1997. Regulation of the biological activity of glucagon-like peptide 2 in vivo by dipeptidyl peptidase IV. *Nat Biotechnol,* 15**,** 673-7.

DRUCKER, D. J. & YUSTA, B. 2014. Physiology and pharmacology of the enteroendocrine hormone glucagon-like peptide-2. *Annu Rev Physiol,* 76**,** 561-83.

DRUCKER, D. J., YUSTA, B., BOUSHEY, R. P., DEFOREST, L. & BRUBAKER, P. L. 1999. Human [Gly2]GLP-2 reduces the severity of colonic injury in a murine model of experimental colitis. *Am J Physiol,* 276**,** G79-91.

DURINX, C., LAMBEIR, A. M., BOSMANS, E., FALMAGNE, J. B., BERGHMANS, R., HAEMERS, A., SCHARPE, S. & DE MEESTER, I. 2000. Molecular characterization of dipeptidyl peptidase activity in serum: soluble CD26/dipeptidyl peptidase IV is responsible for the release of X-Pro dipeptides. *Eur J Biochem,* 267**,** 5608-13.

EDWARDS, C. M., EDWARDS, A. V. & BLOOM, S. R. 1997. Cardiovascular and pancreatic endocrine responses to glucagon-like peptide-1(7-36) amide in the conscious calf. *Exp Physiol,* 82**,** 709-16.

ELLINGSGAARD, H., HAUSELMANN, I., SCHULER, B., HABIB, A. M., BAGGIO, L. L., MEIER, D. T., EPPLER, E., BOUZAKRI, K., WUEEST, S., MULLER, Y. D., HANSEN, A. M. K., REINECKE, M., KONRAD, D., GASSMANN, M., REIMANN, F., HALBAN, P. A., GROMADA, J., DRUCKER, D. J., GRIBBLE, F. M., EHSES, J. A. & DONATH, M. Y. 2011. Interleukin-6 enhances insulin secretion by increasing glucagon-like peptide-1 secretion from L cells and alpha cells. *Nat Med,* 17**,** 1481-1489.

ELLIOTT, R. M., MORGAN, L. M., TREDGER, J. A., DEACON, S., WRIGHT, J. & MARKS, V. 1993. Glucagon-like peptide-1 (7-36)amide and glucose-dependent insulinotropic polypeptide secretion in response to nutrient ingestion in man: acute post-prandial and 24-h secretion patterns. *J Endocrinol,* 138**,** 159-66.

ENG, J., KLEINMAN, W. A., SINGH, L., SINGH, G. & RAUFMAN, J. P. 1992. Isolation and characterization of exendin-4, an exendin-3 analogue, from Heloderma suspectum venom. Further evidence for an exendin receptor on dispersed acini from guinea pig pancreas. *J Biol Chem,* 267**,** 7402-5.

ESTALL, J. L. & DRUCKER, D. J. 2006. Glucagon-like Peptide-2. *Annu Rev Nutr,* 26**,** 391-411.

FALLER, S. 2004. *Der Körper des Menschen*, Thieme, Stuttgart; ISBN: 3133297147.

FANG, L., MOORE, X.-L., DART, A. M. & WANG, L.-M. 2015. Systemic inflammatory response following acute myocardial infarction. *Journal of Geriatric Cardiology : JGC,* 12**,** 305-312.

FLINT, A., RABEN, A., ASTRUP, A. & HOLST, J. J. 1998. Glucagon-like peptide 1 promotes satiety and suppresses energy intake in humans. *Journal of Clinical Investigation,* 101**,** 515-520.

FLINT, A., RABEN, A., ERSBOLL, A. K., HOLST, J. J. & ASTRUP, A. 2001. The effect of physiological levels of glucagon-like peptide-1 on appetite, gastric emptying, energy and substrate metabolism in obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord,* 25**,** 781-92.

FUNG, L. C., CHISHOLM, C. & GREENBERG, G. R. 1998. Glucagon-like peptide-1-(7-36) amide and peptide YY mediate intraduodenal fat-induced inhibition of acid secretion in dogs. *Endocrinology,* 139**,** 189-94.

FURMAN, B. L. 2012. The development of Byetta (exenatide) from the venom of the Gila monster as an anti-diabetic agent. *Toxicon,* 59**,** 464-71.

GAO, H., ZENG, Z., ZHANG, H., ZHOU, X., GUAN, L., DENG, W. & XU, L. 2015. The Glucagon-Like Peptide-1 Analogue Liraglutide Inhibits Oxidative Stress and Inflammatory Response in the Liver of Rats with Diet-Induced Non-alcoholic Fatty Liver Disease. *Biol Pharm Bull,* 38**,** 694-702.

GARRISON, A. P., DEKANEY, C. M., VON ALLMEN, D. C., LUND, P. K., HENNING, S. J. & HELMRATH, M. A. 2009. Early but not late administration of glucagon-like peptide-2 following ileo-cecal resection augments putative intestinal stem cell expansion. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol,* 296**,** G643-50.

GEBOES, K. & DALLE, I. 2002. Influence of treatment on morphological features of mucosal inflammation. *Gut,* 50**,** iii37-iii42.

GENTEK, R. & HOEFFEL, G. 2017. The Innate Immune Response in Myocardial Infarction, Repair, and Regeneration. *Adv Exp Med Biol,* 1003**,** 251-272.

GERDING, D. N., JOHNSON, S., RUPNIK, M. & AKTORIES, K. 2014. Clostridium difficile binary toxin CDT: Mechanism, epidemiology, and potential clinical importance. *Gut Microbes,* 5**,** 15-27.

GERSTEIN, H. C., MILLER, M. E., GENUTH, S., ISMAIL-BEIGI, F., BUSE, J. B., GOFF, D. C., JR., PROBSTFIELD, J. L., CUSHMAN, W. C., GINSBERG, H. N., BIGGER, J. T., GRIMM, R. H., JR., BYINGTON, R. P., ROSENBERG, Y. D. & FRIEDEWALD, W. T. 2011. Long-term effects of intensive glucose lowering on cardiovascular outcomes. *N Engl J Med,* 364**,** 818-28.

GHATAK, S. B., PATEL, D. S., SHANKER, N., SRIVSTAVA, A., DESHPANDE, S. S. & PANCHAL, S. J. 2010. Alogliptin: a novel molecule for improving glycemic control in type II diabetes mellitus. *Curr Diabetes Rev,* 6**,** 410-21.

GÖKE, R., FEHMANN, H. C., LINN, T., SCHMIDT, H., KRAUSE, M., ENG, J. & GÖKE, B. 1993. Exendin-4 is a high potency agonist and truncated exendin-(9-39)-amide an antagonist at the glucagon-like peptide 1-(7-36)-amide receptor of insulin-secreting beta-cells. *Journal of Biological Chemistry,* 268**,** 19650-19655.

GOLDSTEIN, E. J. C., BABAKHANI, F. & CITRON, D. M. 2012. Antimicrobial Activities of Fidaxomicin. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America,* 55**,** S143-S148.

GOLIGHTLY, L. K., DRAYNA, C. C. & MCDERMOTT, M. T. 2012. Comparative clinical pharmacokinetics of dipeptidyl peptidase-4 inhibitors. *Clin Pharmacokinet,* 51**,** 501-14.

GRAAF, C. D., DONNELLY, D., WOOTTEN, D., LAU, J., SEXTON, P. M., MILLER, L. J., AHN, J.-M., LIAO, J., FLETCHER, M. M., YANG, D., BROWN, A. J. H., ZHOU, C., DENG, J. & WANG, M.-W. 2016. Glucagon-Like Peptide-1 and Its Class B G Protein–Coupled Receptors: A Long March to Therapeutic Successes. *Pharmacological Reviews,* 68**,** 954-1013.

GREEN, J. B., BETHEL, M. A., ARMSTRONG, P. W., BUSE, J. B., ENGEL, S. S., GARG, J., JOSSE, R., KAUFMAN, K. D., KOGLIN, J., KORN, S., LACHIN, J. M., MCGUIRE, D. K., PENCINA, M. J., STANDL, E., STEIN, P. P., SURYAWANSHI, S., VAN DE WERF, F., PETERSON, E. D. & HOLMAN, R. R. 2015. Effect of Sitagliptin on Cardiovascular Outcomes in Type 2 Diabetes. *N Engl J Med,* 373**,** 232-42.

GROMADA, J., BROCK, B., SCHMITZ, O. & RORSMAN, P. 2004. Glucagon-like peptide-1: regulation of insulin secretion and therapeutic potential. *Basic Clin Pharmacol Toxicol,* 95**,** 252-62.

GRONDIN, G., HOOPER, N. M. & LEBEL, D. 1999. Specific localization of membrane dipeptidase and dipeptidyl peptidase IV in secretion granules of two different pancreatic islet cells. *J Histochem Cytochem,* 47**,** 489-98.

GRÜNEWALD, T., KIST, M., MUTTERS, R., RUF, B. R. & KERN, W. V. 2010. Clostridium-difficile-Infektion. *Dtsch med Wochenschr,* 135**,** 699-703.

GUAN, L., GONG, D., TIAN, N. & ZOU, Y. 2005. Uncoupling protein 2 involved in protection of glucagon-like peptide 2 in small intestine with ischemia-reperfusion injury in mice. *Dig Dis Sci,* 50**,** 554-60.

GUAN, X., KARPEN, H. E., STEPHENS, J., BUKOWSKI, J. T., NIU, S., ZHANG, G., STOLL, B., FINEGOLD, M. J., HOLST, J. J., HADSELL, D., NICHOLS, B. L. & BURRIN, D. G. 2006. GLP-2 receptor localizes to enteric neurons and endocrine cells expressing vasoactive peptides and mediates increased blood flow. *Gastroenterology,* 130**,** 150-64.

HADERSLEV, K. V., JEPPESEN, P. B., HARTMANN, B., THULESEN, J., SORENSEN, H. A., GRAFF, J., HANSEN, B. S., TOFTENG, F., POULSEN, S. S., MADSEN, J. L., HOLST, J. J., STAUN, M. & MORTENSEN, P. B. 2002. Short-term administration of glucagon-like peptide-2. Effects on bone mineral density and markers of bone turnover in short-bowel patients with no colon. *Scand J Gastroenterol,* 37**,** 392-8.

HARGROVE, D. M., ALAGARSAMY, S., QI, S., SRINIVASAN, K., CROSTON, G., LAPORTE, R., SUEIRAS-DIAZ, J., WISNIEWSKI, K., HARTWIG, J., WISNIEWSKA, H. T., LU, M., POSCH, A. P., SCHTEINGART, C. D. & RIVIÈRE, P. J. 2011. Pharmacological Characterization of FE 203799, a Novel Long Acting Peptide Analog of Glucagon-Like Peptide-2 (GLP-2). *Gastroenterology,* 140**,** S-293.

HARTEL-SCHENK, S., GOSSRAU, R. & REUTTER, W. 1990. Comparative immunohistochemistry and histochemistry of dipeptidyl peptidase IV in rat organs during development. *Histochem J,* 22**,** 567-78.

HARTEL, S., HANSKI, C., NEUMEIER, R., GOSSRAU, R. & REUTTER, W. 1988. Characterization of different forms of dipeptidyl peptidase IV from rat liver and hepatoma by monoclonal antibodies. *Adv Exp Med Biol,* 240**,** 207-14.

HARTMANN, B., HARR, M. B., JEPPESEN, P. B., WOJDEMANN, M., DEACON, C. F., MORTENSEN, P. B. & HOLST, J. J. 2000a. In vivo and in vitro degradation of glucagon-like peptide-2 in humans. *J Clin Endocrinol Metab,* 85**,** 2884-8.

HARTMANN, B., JOHNSEN, A. H., ORSKOV, C., ADELHORST, K., THIM, L. & HOLST, J. J. 2000b. Structure, measurement, and secretion of human glucagon-like peptide-2. *Peptides,* 21**,** 73-80.

HAUSENLOY, D. J., WHITTINGTON, H. J., WYNNE, A. M., BEGUM, S. S., THEODOROU, L., RIKSEN, N., MOCANU, M. M. & YELLON, D. M. 2013. Dipeptidyl peptidase-4 inhibitors and GLP-1 reduce myocardial infarct size in a glucose-dependent manner. *Cardiovasc Diabetol,* 12**,** 154.

HAVALE, S. H. & PAL, M. 2009. Medicinal chemistry approaches to the inhibition of dipeptidyl peptidase-4 for the treatment of type 2 diabetes. *Bioorg Med Chem,* 17**,** 1783-802.

HEGEN, M., NIEDOBITEK, G., KLEIN, C. E., STEIN, H. & FLEISCHER, B. 1990. The T cell triggering molecule Tp103 is associated with dipeptidyl aminopeptidase IV activity. *J Immunol,* 144**,** 2908-14.

HEINRICH, G., GROS, P. & HABENER, J. F. 1984. Glucagon gene sequence. Four of six exons encode separate functional domains of rat pre-proglucagon. *J Biol Chem,* 259**,** 14082-7.

HENRIKSEN, D. B., ALEXANDERSEN, P., BJARNASON, N. H., VILSBOLL, T., HARTMANN, B., HENRIKSEN, E. E., BYRJALSEN, I., KRARUP, T., HOLST, J. J. & CHRISTIANSEN, C. 2003. Role of gastrointestinal hormones in postprandial reduction of bone resorption. *J Bone Miner Res,* 18**,** 2180-9.

HENRIKSEN, D. B., ALEXANDERSEN, P., BYRJALSEN, I., HARTMANN, B., BONE, H. G., CHRISTIANSEN, C. & HOLST, J. J. 2004. Reduction of nocturnal rise in bone resorption by subcutaneous GLP-2. *Bone,* 34**,** 140-7.

HENRIKSEN, D. B., ALEXANDERSEN, P., HARTMANN, B., ADRIAN, C. L., BYRJALSEN, I., BONE, H. G., HOLST, J. J. & CHRISTIANSEN, C. 2007. Disassociation of bone resorption and formation by GLP-2: a 14-day study in healthy postmenopausal women. *Bone,* 40**,** 723-9.

HERRMANN, C., GOKE, R., RICHTER, G., FEHMANN, H. C., ARNOLD, R. & GOKE, B. 1995. Glucagon-like peptide-1 and glucose-dependent insulin-releasing polypeptide plasma levels in response to nutrients. *Digestion,* 56**,** 117-26.

HILDEBRANDT, M., REUTTER, W. & GITLIN, J. D. 1991. Tissue-specific regulation of dipeptidyl peptidase IV expression during development. *Biochem J,* 277 (Pt 2)**,** 331-4.

HOARE, S. R. 2005. Mechanisms of peptide and nonpeptide ligand binding to Class B G-protein-coupled receptors. *Drug Discov Today,* 10**,** 417-27.

HØFSTEN, D. E., LØGSTRUP, B. B., MØLLER, J. E., PELLIKKA, P. A. & EGSTRUP, K. 2009. Abnormal Glucose Metabolism in Acute Myocardial Infarction: Influence on Left Ventricular Function and Prognosis. *JACC: Cardiovascular Imaging,* 2**,** 592-599.

HOLST, J. J. 2007. The physiology of glucagon-like peptide 1. *Physiol Rev,* 87**,** 1409-39.

HOLZ, G. G., LEECH, C. A. & HABENER, J. F. 1995. Activation of a cAMP-regulated Ca(2+)-Signaling Pathway in Pancreatic β-Cells by the Insulinotropic Hormone Glucagon-like Peptide-1. *The Journal of biological chemistry,* 270**,** 17749-17757.

HOPSU-HAVU, V. K. & GLENNER, G. G. 1966. A new dipeptide naphthylamidase hydrolyzing glycyl-prolyl-beta-naphthylamide. *Histochemie,* 7**,** 197-201.

HU, F. B., MANSON, J. E., STAMPFER, M. J., COLDITZ, G., LIU, S., SOLOMON, C. G. & WILLETT, W. C. 2001. Diet, lifestyle, and the risk of type 2 diabetes mellitus in women. *N Engl J Med,* 345**,** 790-7.

HUGOT, J. P., CHAMAILLARD, M., ZOUALI, H., LESAGE, S., CEZARD, J. P., BELAICHE, J., ALMER, S., TYSK, C., O'MORAIN, C. A., GASSULL, M., BINDER, V., FINKEL, Y., CORTOT, A., MODIGLIANI, R., LAURENT-PUIG, P., GOWER-ROUSSEAU, C., MACRY, J., COLOMBEL, J. F., SAHBATOU, M. & THOMAS, G. 2001. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature,* 411**,** 599-603.

HUI, H., NOURPARVAR, A., ZHAO, X. & PERFETTI, R. 2003. Glucagon-like peptide-1 inhibits apoptosis of insulin-secreting cells via a cyclic 5'-adenosine monophosphate-dependent protein kinase A- and a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway. *Endocrinology,* 144**,** 1444-55.

HUI, H., WRIGHT, C. & PERFETTI, R. 2001. Glucagon-like peptide 1 induces differentiation of islet duodenal homeobox-1-positive pancreatic ductal cells into insulin-secreting cells. *Diabetes,* 50**,** 785-96.

HUISAMEN, B., GENIS, A., MARAIS, E. & LOCHNER, A. 2011. Pre-treatment with a DPP-4 inhibitor is infarct sparing in hearts from obese, pre-diabetic rats. *Cardiovasc Drugs Ther,* 25**,** 13-20.

HUTTENHOWER, C., KOSTIC, A. D. & XAVIER, R. J. 2014. Inflammatory bowel disease as a model for translating the microbiome. *Immunity,* 40**,** 843-54.

IAKOUBOV, R., LAUFFER, L. M., TRIVEDI, S., KIM, Y. I. & BRUBAKER, P. L. 2009. Carcinogenic effects of exogenous and endogenous glucagon-like peptide-2 in azoxymethane-treated mice. *Endocrinology,* 150**,** 4033-43.

IWAKI-EGAWA, S., WATANABE, Y., KIKUYA, Y. & FUJIMOTO, Y. 1998. Dipeptidyl peptidase IV from human serum: purification, characterization, and N-terminal amino acid sequence. *J Biochem,* 124**,** 428-33.

J.L. MADSEN AND J.J. HOLST AND P.B. MORTENSEN, P. B. J. A. B. H. A. J. T. A. J. G. A. J. L. A. B. S. H. A. F. T. A. S. S. P. A. 2001. Treatment of short bowel patients with glucagon-like peptide-2 (GLP-2), a newly discovered intestinotrophic, anti-secretory, and transit modulating peptide. *Today in Medicine. Gastroenterology,* 120**,** 806--815.

JENNINGS, R. B., MURRY, C. E., STEENBERGEN, C., JR. & REIMER, K. A. 1990. Development of cell injury in sustained acute ischemia. *Circulation,* 82**,** Ii2-12.

JEPPESEN, P. B., GILROY, R., PERTKIEWICZ, M., ALLARD, J. P., MESSING, B. & O'KEEFE, S. J. 2011. Randomised placebo-controlled trial of teduglutide in reducing parenteral nutrition and/or intravenous fluid requirements in patients with short bowel syndrome. *Gut,* 60**,** 902-14.

JEPPESEN, P. B., HARTMANN, B., THULESEN, J., GRAFF, J., LOHMANN, J., HANSEN, B. S., TOFTENG, F., POULSEN, S. S., MADSEN, J. L., HOLST, J. J. & MORTENSEN, P. B. 2001a. Glucagon-like peptide 2 improves nutrient absorption and nutritional status in short-bowel patients with no colon. *Gastroenterology,* 120**,** 806-15.

JEPPESEN, P. B., HARTMANN, B., THULESEN, J., GRAFF, J., LOHMANN, J., HANSEN, B. S., TOFTENG, F., POULSEN, S. S., MADSEN, J. L., HOLST, J.

J. & MORTENSEN, P. B. 2001b. Glucagon-like peptide 2 improves nutrient absorption and nutritional status in short-bowel patients with no colon. *Gastroenterology,* 120**,** 806-815.

JEPPESEN, P. B., PERTKIEWICZ, M., MESSING, B., IYER, K., SEIDNER, D. L., O'KEEFE S, J., FORBES, A., HEINZE, H. & JOELSSON, B. 2012. Teduglutide reduces need for parenteral support among patients with short bowel syndrome with intestinal failure. *Gastroenterology,* 143**,** 1473-1481.e3.

JEPPESEN, P. B., SANGUINETTI, E. L., BUCHMAN, A., HOWARD, L., SCOLAPIO, J. S., ZIEGLER, T. R., GREGORY, J., TAPPENDEN, K. A., HOLST, J. & MORTENSEN, P. B. 2005. Teduglutide (ALX-0600), a dipeptidyl peptidase IV resistant glucagon-like peptide 2 analogue, improves intestinal function in short bowel syndrome patients. *Gut,* 54**,** 1224-31.

JOHANSEN, O. E., NEUBACHER, D., VON EYNATTEN, M., PATEL, S. & WOERLE, H. J. 2012. Cardiovascular safety with linagliptin in patients with type 2 diabetes mellitus: a pre-specified, prospective, and adjudicated meta-analysis of a phase 3 programme. *Cardiovasc Diabetol,* 11**,** 3.

JOHNSON, L. 2013. *Gastrointestinal Physiology 8th Edition, ISBN: 0323100856*, Mosby

KAHLES, F., MEYER, C., DIEBOLD, S., FOLDENAUER, A. C., STOHR, R., MOLLMANN, J., LEBHERZ, C., FINDEISEN, H. M., MARX, N. & LEHRKE, M. 2016. Glucose-dependent insulinotropic peptide secretion is induced by inflammatory stimuli in an interleukin-1-dependent manner in mice. *Diabetes Obes Metab,* 18**,** 1147-1151.

KAHLES, F., MEYER, C., MOLLMANN, J., DIEBOLD, S., FINDEISEN, H. M., LEBHERZ, C., TRAUTWEIN, C., KOCH, A., TACKE, F., MARX, N. & LEHRKE, M. 2014. GLP-1 secretion is increased by inflammatory stimuli in an IL-6-dependent manner, leading to hyperinsulinemia and blood glucose lowering. *Diabetes,* 63**,** 3221-9.

KANG, M. Y., OH, T. J. & CHO, Y. M. 2015. Glucagon-Like Peptide-1 Increases Mitochondrial Biogenesis and Function in INS-1 Rat Insulinoma Cells. *Endocrinology and Metabolism,* 30**,** 216-220.

KATO, Y., YU, D. & SCHWARTZ, M. Z. 1999. Glucagonlike peptide-2 enhances small intestinal absorptive function and mucosal mass in vivo. *J Pediatr Surg,* 34**,** 18-20; discussion 20-1.

KAUTH, T. & METZ, J. 1987. Immunohistochemical localization of glucagon-like peptide 1. *Histochemistry,* 86**,** 509-515.

KAVIANIPOUR, M., EHLERS, M. R., MALMBERG, K., RONQUIST, G., RYDEN, L., WIKSTROM, G. & GUTNIAK, M. 2003. Glucagon-like peptide-1 (7-36) amide prevents the accumulation of pyruvate and lactate in the ischemic and non-ischemic porcine myocardium. *Peptides,* 24**,** 569-78.

KELLY, C. P. & LAMONT, J. T. 2008. Clostridium difficile--more difficult than ever. *N Engl J Med,* 359**,** 1932-40.

KENNY, A. J., BOOTH, A. G., GEORGE, S. G., INGRAM, J., KERSHAW, D., WOOD, E. J. & YOUNG, A. R. 1976. Dipeptidyl peptidase IV, a kidney brush-border serine peptidase. *Biochemical Journal,* 157**,** 169-182.

KIEFFER, T. J., MCINTOSH, C. H. & PEDERSON, R. A. 1995. Degradation of glucose-dependent insulinotropic polypeptide and truncated glucagon-like peptide 1 in vitro and in vivo by dipeptidyl peptidase IV. *Endocrinology,* 136**,** 3585-96.

KIM, M., PLATT, M. J., SHIBASAKI, T., QUAGGIN, S. E., BACKX, P. H., SEINO, S., SIMPSON, J. A. & DRUCKER, D. J. 2013. GLP-1 receptor activation and

Epac2 link atrial natriuretic peptide secretion to control of blood pressure. *Nat Med,* 19**,** 567-575.

KIVIMAKI, M., NYBERG, S. T., BATTY, G. D., FRANSSON, E. I., HEIKKILA, K., ALFREDSSON, L., BJORNER, J. B., BORRITZ, M., BURR, H., CASINI, A., CLAYS, E., DE BACQUER, D., DRAGANO, N., FERRIE, J. E., GEUSKENS, G. A., GOLDBERG, M., HAMER, M., HOOFTMAN, W. E., HOUTMAN, I. L., JOENSUU, M., JOKELA, M., KITTEL, F., KNUTSSON, A., KOSKENVUO, M., KOSKINEN, A., KOUVONEN, A., KUMARI, M., MADSEN, I. E., MARMOT, M. G., NIELSEN, M. L., NORDIN, M., OKSANEN, T., PENTTI, J., RUGULIES, R., SALO, P., SIEGRIST, J., SINGH-MANOUX, A., SUOMINEN, S. B., VAANANEN, A., VAHTERA, J., VIRTANEN, M., WESTERHOLM, P. J., WESTERLUND, H., ZINS, M., STEPTOE, A. & THEORELL, T. 2012. Job strain as a risk factor for coronary heart disease: a collaborative meta-analysis of individual participant data. *Lancet,* 380**,** 1491-7.

KOEHLER, J. A., HARPER, W., BARNARD, M., YUSTA, B. & DRUCKER, D. J. 2008. Glucagon-like peptide-2 does not modify the growth or survival of murine or human intestinal tumor cells. *Cancer Res,* 68**,** 7897-904.

KOHLHAAS, M., LIU, T., KNOPP, A., ZELLER, T., ONG, M. F., BOHM, M., O'ROURKE, B. & MAACK, C. 2010. Elevated cytosolic Na+ increases mitochondrial formation of reactive oxygen species in failing cardiac myocytes. *Circulation,* 121**,** 1606-13.

KOLK, M. V., MEYBERG, D., DEUSE, T., TANG-QUAN, K. R., ROBBINS, R. C., REICHENSPURNER, H. & SCHREPFER, S. 2009. LAD-ligation: a murine model of myocardial infarction. *J Vis Exp*.

KOSMALA, W., PRZEWLOCKA-KOSMALA, M. & MAZUREK, W. 2005. Proinflammatory cytokines and myocardial viability in patients after acute myocardial infarction. *International Journal of Cardiology,* 101**,** 449-456.

KOURIS, G. J., LIU, Q., ROSSI, H., DJURICIN, G., GATTUSO, P., NATHAN, C., WEINSTEIN, R. A. & PRINZ, R. A. 2001. The effect of glucagon-like peptide 2 on intestinal permeability and bacterial translocation in acute necrotizing pancreatitis. *Am J Surg,* 181**,** 571-5.

KREYMANN, B., WILLIAMS, G., GHATEI, M. A. & BLOOM, S. R. 1987. Glucagon-like peptide-1 7-36: a physiological incretin in man. *Lancet,* 2**,** 1300-4.

KRISTENSEN, J., MORTENSEN, U. M., SCHMIDT, M., NIELSEN, P. H., NIELSEN, T. T. & MAENG, M. 2009. Lack of cardioprotection from subcutaneously and preischemic administered liraglutide in a closed chest porcine ischemia reperfusion model. *BMC Cardiovasc Disord,* 9**,** 31.

KUGATHASAN, S. & FIOCCHI, C. 2007. Progress in basic inflammatory bowel disease research. *Semin Pediatr Surg,* 16**,** 146-53.

L'HEUREUX, M. C. & BRUBAKER, P. L. 2003. Glucagon-like peptide-2 and common therapeutics in a murine model of ulcerative colitis. *J Pharmacol Exp Ther,* 306**,** 347-54.

LAMBEIR, A. M., DURINX, C., SCHARPE, S. & DE MEESTER, I. 2003. Dipeptidyl-peptidase IV from bench to bedside: an update on structural properties, functions, and clinical aspects of the enzyme DPP IV. *Crit Rev Clin Lab Sci,* 40**,** 209-94.

LEBHERZ, C., KAHLES, F., PIOTROWSKI, K., VOGESER, M., FOLDENAUER, A. C., NASSAU, K., KILGER, E., MARX, N., PARHOFER, K. G. & LEHRKE, M. 2016. Interleukin-6 predicts inflammation-induced increase of Glucagon-like peptide-1 in humans in response to cardiac surgery with association to parameters of glucose metabolism. *Cardiovasc Diabetol,* 15**,** 21.

LEE, S. J., LEE, J., LI, K. K., HOLLAND, D., MAUGHAN, H., GUTTMAN, D. S., YUSTA, B. & DRUCKER, D. J. 2012. Disruption of the murine Glp2r impairs Paneth cell function and increases susceptibility to small bowel enteritis. *Endocrinology,* 153**,** 1141-51.

LEMIEUX, H., SEMSROTH, S., ANTRETTER, H., HOFER, D. & GNAIGER, E. 2011. Mitochondrial respiratory control and early defects of oxidative phosphorylation in the failing human heart. *Int J Biochem Cell Biol,* 43**,** 1729-38.

LIBBY, P., BORNFELDT, K. E. & TALL, A. R. 2016. Atherosclerosis: Successes, Surprises, and Future Challenges. *Circ Res,* 118**,** 531-4.

LIBBY, P., RIDKER, P. M. & MASERI, A. 2002. Inflammation and Atherosclerosis. *Circulation,* 105**,** 1135-1143.

LIBBY, P. & THEROUX, P. 2005. Pathophysiology of Coronary Artery Disease. *Circulation,* 111**,** 3481-3488.

LIEHN, E. A., POSTEA, O., CURAJ, A. & MARX, N. 2011. Repair after myocardial infarction, between fantasy and reality: the role of chemokines. *J Am Coll Cardiol,* 58**,** 2357-62.

LIM, G. E. & BRUBAKER, P. L. 2006. Glucagon-Like Peptide 1 Secretion by the L-Cell. *The View From Within,* 55**,** S70-S77.

LIU, J., WANG, H. & LI, J. 2016. Inflammation and Inflammatory Cells in Myocardial Infarction and Reperfusion Injury: A Double-Edged Sword. *Clinical Medicine Insights. Cardiology,* 10**,** 79-84.

LIU, Q., ANDERSON, C., BROYDE, A., POLIZZI, C., FERNANDEZ, R., BARON, A. & PARKES, D. G. 2010. Glucagon-like peptide-1 and the exenatide analogue AC3174 improve cardiac function, cardiac remodeling, and survival in rats with chronic heart failure. *Cardiovasc Diabetol,* 9**,** 76.

LIU, X., NELSON, D. W., HOLST, J. J. & NEY, D. M. 2006. Synergistic effect of supplemental enteral nutrients and exogenous glucagon-like peptide 2 on intestinal adaptation in a rat model of short bowel syndrome. *Am J Clin Nutr,* 84**,** 1142-50.

LONBORG, J., VEJLSTRUP, N., KELBAEK, H., BOTKER, H. E., KIM, W. Y., MATHIASEN, A. B., JORGENSEN, E., HELQVIST, S., SAUNAMAKI, K., CLEMMENSEN, P., HOLMVANG, L., THUESEN, L., KRUSELL, L. R., JENSEN, J. S., KOBER, L., TREIMAN, M., HOLST, J. J. & ENGSTROM, T. 2012. Exenatide reduces reperfusion injury in patients with ST-segment elevation myocardial infarction. *Eur Heart J,* 33**,** 1491-9.

LOO, V. G., POIRIER, L., MILLER, M. A., OUGHTON, M., LIBMAN, M. D., MICHAUD, S., BOURGAULT, A. M., NGUYEN, T., FRENETTE, C., KELLY, M., VIBIEN, A., BRASSARD, P., FENN, S., DEWAR, K., HUDSON, T. J., HORN, R., RENE, P., MONCZAK, Y. & DASCAL, A. 2005. A predominantly clonal multi-institutional outbreak of Clostridium difficile-associated diarrhea with high morbidity and mortality. *N Engl J Med,* 353**,** 2442-9.

LÜBBERT, C., JOHN, E. & MÜLLER, L. V. 2014. Clostridium-difficile-Infektion. *Dtsch Arztebl International,* 111**,** 723-731.

MAACK, C., CORTASSA, S., AON, M. A., GANESAN, A. N., LIU, T. & O'ROURKE, B. 2006. Elevated cytosolic Na+ decreases mitochondrial Ca2+ uptake during excitation-contraction coupling and impairs energetic adaptation in cardiac myocytes. *Circulation research,* 99**,** 172-182.

MADSEN, K. B., ASKOV-HANSEN, C., NAIMI, R. M., BRANDT, C. F., HARTMANN, B., HOLST, J. J., MORTENSEN, P. B. & JEPPESEN, P. B. 2013. Acute effects of continuous infusions of glucagon-like peptide (GLP)-1, GLP-2 and

the combination (GLP-1+GLP-2) on intestinal absorption in short bowel syndrome (SBS) patients. A placebo-controlled study. *Regul Pept,* 184**,** 30-9.

MANAGEMENT, D. O. Z. A. E. 2019. *Histology of Small and lage Intestine* [Online]. http://web.science.kln.ac.lk/depts/zoology/index.php?option=com_content&view=article&id=46&Itemid=46: Department of Zoology and Environmental Management. Available: http://web.science.kln.ac.lk/depts/zoology/index.php?option=com_content&view=article&id=46&Itemid=46 [Accessed 20.07.2019 2019].

MARSO, S. P., POULTER, N. R., NISSEN, S. E., NAUCK, M. A., ZINMAN, B., DANIELS, G. H., POCOCK, S., STEINBERG, W. M., BERGENSTAL, R. M., MANN, J. F., RAVN, L. S., FRANDSEN, K. B., MOSES, A. C. & BUSE, J. B. 2013. Design of the liraglutide effect and action in diabetes: evaluation of cardiovascular outcome results (LEADER) trial. *Am Heart J,* 166**,** 823-30.e5.

MARTIN, G. R., WALLACE, L. E., HARTMANN, B., HOLST, J. J., DEMCHYSHYN, L., TONEY, K. & SIGALET, D. L. 2005. Nutrient-stimulated GLP-2 release and crypt cell proliferation in experimental short bowel syndrome. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol,* 288**,** G431-8.

MARTIN, K. R., KANTARI-MIMOUN, C., YIN, M., PEDERZOLI-RIBEIL, M., ANGELOT-DELETTRE, F., CEROI, A., GRAUFFEL, C., BENHAMOU, M., REUTER, N., SAAS, P., FRACHET, P., BOULANGER, C. M. & WITKO-SARSAT, V. 2016. Proteinase 3 Is a Phosphatidylserine-binding Protein That Affects the Production and Function of Microvesicles. *The Journal of biological chemistry,* 291**,** 10476-10489.

MARX, N., ROSENSTOCK, J., KAHN, S. E., ZINMAN, B., KASTELEIN, J. J., LACHIN, J. M., ESPELAND, M. A., BLUHMKI, E., MATTHEUS, M., RYCKAERT, B., PATEL, S., JOHANSEN, O. E. & WOERLE, H. J. 2015. Design and baseline characteristics of the CARdiovascular Outcome Trial of LINAgliptin Versus Glimepiride in Type 2 Diabetes (CAROLINA(R)). *Diab Vasc Dis Res,* 12**,** 164-74.

MASON, K. L., HUFFNAGLE, G. B., NOVERR, M. C. & KAO, J. Y. 2008. Overview of gut immunology. *Adv Exp Med Biol,* 635**,** 1-14.

MAYO, K. E., MILLER, L. J., BATAILLE, D., DALLE, S., GOKE, B., THORENS, B. & DRUCKER, D. J. 2003. International Union of Pharmacology. XXXV. The glucagon receptor family. *Pharmacol Rev,* 55**,** 167-94.

MCCORMICK, L. M., KYDD, A. C., READ, P. A., RING, L. S., BOND, S. J., HOOLE, S. P. & DUTKA, D. P. 2014. Chronic dipeptidyl peptidase-4 inhibition with sitagliptin is associated with sustained protection against ischemic left ventricular dysfunction in a pilot study of patients with type 2 diabetes mellitus and coronary artery disease. *Circ Cardiovasc Imaging,* 7**,** 274-81.

MCINTOSH, C. H., DEMUTH, H. U., POSPISILIK, J. A. & PEDERSON, R. 2005. Dipeptidyl peptidase IV inhibitors: how do they work as new antidiabetic agents? *Regul Pept,* 128**,** 159-65.

MEIER, J. J. 2012. GLP-1 receptor agonists for individualized treatment of type 2 diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol,* 8**,** 728-42.

MEIER, J. J., NAUCK, M. A., KRANZ, D., HOLST, J. J., DEACON, C. F., GAECKLER, D., SCHMIDT, W. E. & GALLWITZ, B. 2004. Secretion, degradation, and elimination of glucagon-like peptide 1 and gastric inhibitory polypeptide in patients with chronic renal insufficiency and healthy control subjects. *Diabetes,* 53**,** 654-62.

MENTLEIN, R. 1999. Dipeptidyl-peptidase IV (CD26)--role in the inactivation of regulatory peptides. *Regul Pept,* 85**,** 9-24.

MENTLEIN, R., GALLWITZ, B. & SCHMIDT, W. E. 1993. Dipeptidyl-peptidase IV hydrolyses gastric inhibitory polypeptide, glucagon-like peptide-1(7-36)amide, peptide histidine methionine and is responsible for their degradation in human serum. *Eur J Biochem,* 214**,** 829-35.

MENTLEIN, R. & HEYMANN, E. 1982. Dipeptidyl peptidase IV inhibits the polymerization of fibrin monomers. *Arch Biochem Biophys,* 217**,** 748-50.

MILLER, B. A., CHEN, L. F., SEXTON, D. J. & ANDERSON, D. J. 2011. Comparison of the burdens of hospital-onset, healthcare facility-associated Clostridium difficile Infection and of healthcare-associated infection due to methicillin-resistant Staphylococcus aureus in community hospitals. *Infect Control Hosp Epidemiol,* 32**,** 387-90.

MIR-MADJLESSI, S. H., MICHENER, W. M. & FARMER, R. G. 1986. Course and prognosis of idiopathic ulcerative proctosigmoiditis in young patients. *J Pediatr Gastroenterol Nutr,* 5**,** 571-5.

MOJSOV, S., HEINRICH, G., WILSON, I. B., RAVAZZOLA, M., ORCI, L. & HABENER, J. F. 1986. Preproglucagon gene expression in pancreas and intestine diversifies at the level of post-translational processing. *J Biol Chem,* 261**,** 11880-9.

MOLODECKY, N. A., SOON, I. S., RABI, D. M., GHALI, W. A., FERRIS, M., CHERNOFF, G., BENCHIMOL, E. I., PANACCIONE, R., GHOSH, S., BARKEMA, H. W. & KAPLAN, G. G. Increasing Incidence and Prevalence of the Inflammatory Bowel Diseases With Time, Based on Systematic Review. *Gastroenterology,* 142**,** 46-54.e42.

MONAMI, M., ZANNONI, S., PALA, L., SILVERII, A., ANDREOZZI, F., SESTI, G. & MANNUCCI, E. 2017. Effects of glucagon-like peptide-1 receptor agonists on mortality and cardiovascular events: A comprehensive meta-analysis of randomized controlled trials. *Int J Cardiol,* 240**,** 414-421.

MORALES, P. E., TORRES, G., SOTOMAYOR-FLORES, C., PENA-OYARZUN, D., RIVERA-MEJIAS, P., PAREDES, F. & CHIONG, M. 2014. GLP-1 promotes mitochondrial metabolism in vascular smooth muscle cells by enhancing endoplasmic reticulum-mitochondria coupling. *Biochem Biophys Res Commun,* 446**,** 410-6.

MOZAFFARIAN, D., BENJAMIN, E. J., GO, A. S., ARNETT, D. K., BLAHA, M. J., CUSHMAN, M., DAS, S. R., DE FERRANTI, S., DESPRES, J. P., FULLERTON, H. J., HOWARD, V. J., HUFFMAN, M. D., ISASI, C. R., JIMENEZ, M. C., JUDD, S. E., KISSELA, B. M., LICHTMAN, J. H., LISABETH, L. D., LIU, S., MACKEY, R. H., MAGID, D. J., MCGUIRE, D. K., MOHLER, E. R., 3RD, MOY, C. S., MUNTNER, P., MUSSOLINO, M. E., NASIR, K., NEUMAR, R. W., NICHOL, G., PALANIAPPAN, L., PANDEY, D. K., REEVES, M. J., RODRIGUEZ, C. J., ROSAMOND, W., SORLIE, P. D., STEIN, J., TOWFIGHI, A., TURAN, T. N., VIRANI, S. S., WOO, D., YEH, R. W. & TURNER, M. B. 2016. Executive Summary: Heart Disease and Stroke Statistics--2016 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation,* 133**,** 447-54.

MULVIHILL, E. E. & DRUCKER, D. J. 2014. Pharmacology, physiology, and mechanisms of action of dipeptidyl peptidase-4 inhibitors. *Endocr Rev,* 35**,** 992-1019.

MUNROE, D. G., GUPTA, A. K., KOOSHESH, F., VYAS, T. B., RIZKALLA, G., WANG, H., DEMCHYSHYN, L., YANG, Z. J., KAMBOJ, R. K., CHEN, H., MCCALLUM, K., SUMNER-SMITH, M., DRUCKER, D. J. & CRIVICI, A. 1999.

Prototypic G protein-coupled receptor for the intestinotrophic factor glucagon-like peptide 2. *Proc Natl Acad Sci U S A,* 96**,** 1569-73.

MURTHY, COOPER, YOSHITAKE, MEYER, MEYER & MURTHY 1999. Combination therapy of pentoxifylline and TNFα monoclonal antibody in dextran sulphate-induced mouse colitis. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics,* 13**,** 251-260.

MUSCELLI, E., MARI, A., NATALI, A., ASTIARRAGA, B. D., CAMASTRA, S., FRASCERRA, S., HOLST, J. J. & FERRANNINI, E. 2006. Impact of incretin hormones on beta-cell function in subjects with normal or impaired glucose tolerance. *Am J Physiol Endocrinol Metab,* 291**,** E1144-50.

NAGAKURA, T., YASUDA, N., YAMAZAKI, K., IKUTA, H. & TANAKA, I. 2003. Enteroinsular axis of db/db mice and efficacy of dipeptidyl peptidase IV inhibition. *Metabolism,* 52**,** 81-6.

NAKAME, K., KAJI, T., MUKAI, M., SHINYAMA, S. & MATSUFUJI, H. 2016. The protective and anti-inflammatory effects of glucagon-like peptide-2 in an experimental rat model of necrotizing enterocolitis. *Peptides,* 75**,** 1-7.

NAPOLITANO, L. M., KORUDA, M. J., MEYER, A. A. & BAKER, C. C. 1996. The impact of femur fracture with associated soft tissue injury on immune function and intestinal permeability. *Shock,* 5**,** 202-7.

NAUCK, M. A. 2011. Incretin-based therapies for type 2 diabetes mellitus: properties, functions, and clinical implications. *Am J Med,* 124**,** S3-18.

NAUCK, M. A., HEIMESAAT, M. M., ORSKOV, C., HOLST, J. J., EBERT, R. & CREUTZFELDT, W. 1993. Preserved incretin activity of glucagon-like peptide 1 [7-36 amide] but not of synthetic human gastric inhibitory polypeptide in patients with type-2 diabetes mellitus. *J Clin Invest,* 91**,** 301-7.

NAUCK, M. A., WALBERG, J., VETHACKE, A., EL-OUAGHLIDI, A., SENKAL, M., HOLST, J. J., GALLWITZ, B., SCHMIDT, W. E. & SCHMIEGEL, W. 2004. Blood glucose control in healthy subject and patients receiving intravenous glucose infusion or total parenteral nutrition using glucagon-like peptide 1. *Regul Pept,* 118**,** 89-97.

NELKEN, N. A., COUGHLIN, S. R., GORDON, D. & WILCOX, J. N. 1991. Monocyte chemoattractant protein-1 in human atheromatous plaques. *J Clin Invest,* 88**,** 1121-7.

NELSON, D. W., SHARP, J. W., BROWNFIELD, M. S., RAYBOULD, H. E. & NEY, D. M. 2007. Localization and activation of glucagon-like peptide-2 receptors on vagal afferents in the rat. *Endocrinology,* 148**,** 1954-62.

NEWBY, A. C. 2000. An overview of the vascular response to injury: a tribute to the late Russell Ross. *Toxicol Lett,* 112-113**,** 519-29.

NGUYEN, A. T., MANDARD, S., DRAY, C., DECKERT, V., VALET, P., BESNARD, P., DRUCKER, D. J., LAGROST, L. & GROBER, J. 2014. Lipopolysaccharides-mediated increase in glucose-stimulated insulin secretion: involvement of the GLP-1 pathway. *Diabetes,* 63**,** 471-82.

NIH. 2016. *National institute of diabetes and digestive and kindey disease* [Online]. https://www.niddk.nih.gov/health-information/diabetes/overview/what-is-diabetes. [Accessed Dezember 2017.

NIKOLAIDIS, L. A., DOVERSPIKE, A., HENTOSZ, T., ZOURELIAS, L., SHEN, Y.-T., ELAHI, D. & SHANNON, R. P. 2005a. Glucagon-Like Peptide-1 Limits Myocardial Stunning following Brief Coronary Occlusion and Reperfusion in Conscious Canines. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics,* 312**,** 303-308.

NIKOLAIDIS, L. A., ELAHI, D., HENTOSZ, T., DOVERSPIKE, A., HUERBIN, R., ZOURELIAS, L., STOLARSKI, C., SHEN, Y. T. & SHANNON, R. P. 2004. Recombinant glucagon-like peptide-1 increases myocardial glucose uptake and improves left ventricular performance in conscious dogs with pacing-induced dilated cardiomyopathy. *Circulation,* 110**,** 955-61.

NIKOLAIDIS, L. A., ELAHI, D., SHEN, Y. T. & SHANNON, R. P. 2005b. Active metabolite of GLP-1 mediates myocardial glucose uptake and improves left ventricular performance in conscious dogs with dilated cardiomyopathy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol,* 289**,** H2401-8.

NISHIZAWA, M., NAKABAYASHI, H., KAWAI, K., ITO, T., KAWAKAMI, S., NAKAGAWA, A., NIIJIMA, A. & UCHIDA, K. 2000. The hepatic vagal reception of intraportal GLP-1 is via receptor different from the pancreatic GLP-1 receptor. *J Auton Nerv Syst,* 80**,** 14-21.

NORHAMMAR, A., TENERZ, Å., NILSSON, G., HAMSTEN, A., EFENDÍC, S., RYDÉN, L. & MALMBERG, K. 2002. Glucose metabolism in patients with acute myocardial infarction and no previous diagnosis of diabetes mellitus: a prospective study. *The Lancet,* 359**,** 2140-2144.

NOYAN-ASHRAF, M. H., MOMEN, M. A., BAN, K., SADI, A. M., ZHOU, Y. Q., RIAZI, A. M., BAGGIO, L. L., HENKELMAN, R. M., HUSAIN, M. & DRUCKER, D. J. 2009. GLP-1R agonist liraglutide activates cytoprotective pathways and improves outcomes after experimental myocardial infarction in mice. *Diabetes,* 58**,** 975-83.

NOYAN-ASHRAF, M. H., SHIKATANI, E. A., SCHUIKI, I., MUKOVOZOV, I., WU, J., LI, R.-K., VOLCHUK, A., ROBINSON, L. A., BILLIA, F., DRUCKER, D. J. & HUSAIN, M. 2013. A Glucagon-Like Peptide-1 Analog Reverses the Molecular Pathology and Cardiac Dysfunction of a Mouse Model of Obesity. *Circulation,* 127**,** 74-85.

O'GARA, P. T., KUSHNER, F. G., ASCHEIM, D. D., CASEY, D. E., JR., CHUNG, M. K., DE LEMOS, J. A., ETTINGER, S. M., FANG, J. C., FESMIRE, F. M., FRANKLIN, B. A., GRANGER, C. B., KRUMHOLZ, H. M., LINDERBAUM, J. A., MORROW, D. A., NEWBY, L. K., ORNATO, J. P., OU, N., RADFORD, M. J., TAMIS-HOLLAND, J. E., TOMMASO, C. L., TRACY, C. M., WOO, Y. J., ZHAO, D. X., ANDERSON, J. L., JACOBS, A. K., HALPERIN, J. L., ALBERT, N. M., BRINDIS, R. G., CREAGER, M. A., DEMETS, D., GUYTON, R. A., HOCHMAN, J. S., KOVACS, R. J., KUSHNER, F. G., OHMAN, E. M., STEVENSON, W. G. & YANCY, C. W. 2013. 2013 ACCF/AHA guideline for the management of ST-elevation myocardial infarction: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Circulation,* 127**,** e362-425.

OGURA, Y., BONEN, D. K., INOHARA, N., NICOLAE, D. L., CHEN, F. F., RAMOS, R., BRITTON, H., MORAN, T., KARALIUSKAS, R., DUERR, R. H., ACHKAR, J. P., BRANT, S. R., BAYLESS, T. M., KIRSCHNER, B. S., HANAUER, S. B., NUNEZ, G. & CHO, J. H. 2001. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature,* 411**,** 603-6.

OKAZAKI, T., WANG, M.-H., RAWSTHORNE, P., SARGENT, M., DATTA, L. W., SHUGART, Y. Y., BERNSTEIN, C. N. & BRANT, S. R. 2008. Contributions of IBD5, IL23R, ATG16L1, and NOD2 to Crohn's Disease Risk in a Population-Based Case-Control Study: Evidence of Gene–Gene Interactions. *Inflammatory Bowel Diseases,* 14**,** 1528-1541.

OLOKOBA, A. B., OBATERU, O. A. & OLOKOBA, L. B. 2012. Type 2 Diabetes Mellitus: A Review of Current Trends. *Oman Medical Journal,* 27**,** 269-273.

OPENSTAX 2014. *Anatomy & Physiology*, OpenStax
ORSKOV, C., BERSANI, M., JOHNSEN, A. H., HOJRUP, P. & HOLST, J. J. 1989. Complete sequences of glucagon-like peptide-1 from human and pig small intestine. *J Biol Chem,* 264**,** 12826-9.
ORSKOV, C., HARTMANN, B., POULSEN, S. S., THULESEN, J., HARE, K. J. & HOLST, J. J. 2005. GLP-2 stimulates colonic growth via KGF, released by subepithelial myofibroblasts with GLP-2 receptors. *Regul Pept,* 124**,** 105-12.
ORSKOV, C. & HOLST, J. J. 1987. Radio-immunoassays for glucagon-like peptides 1 and 2 (GLP-1 and GLP-2). *Scand J Clin Lab Invest,* 47**,** 165-74.
ORSKOV, C., RABENHOJ, L., WETTERGREN, A., KOFOD, H. & HOLST, J. J. 1994. Tissue and plasma concentrations of amidated and glycine-extended glucagon-like peptide I in humans. *Diabetes,* 43**,** 535-9.
ORSKOV, C., WETTERGREN, A. & HOLST, J. J. 1993. Biological effects and metabolic rates of glucagonlike peptide-1 7-36 amide and glucagonlike peptide-1 7-37 in healthy subjects are indistinguishable. *Diabetes,* 42**,** 658-61.
OSSUM, A., VAN DEURS, U., ENGSTROM, T., JENSEN, J. S. & TREIMAN, M. 2009. The cardioprotective and inotropic components of the postconditioning effects of GLP-1 and GLP-1(9-36)a in an isolated rat heart. *Pharmacol Res,* 60**,** 411-7.
PALCZEWSKI, K., KUMASAKA, T., HORI, T., BEHNKE, C. A., MOTOSHIMA, H., FOX, B. A., LE TRONG, I., TELLER, D. C., OKADA, T., STENKAMP, R. E., YAMAMOTO, M. & MIYANO, M. 2000. Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science,* 289**,** 739-45.
PANJWANI, N., MULVIHILL, E. E., LONGUET, C., YUSTA, B., CAMPBELL, J. E., BROWN, T. J., STREUTKER, C., HOLLAND, D., CAO, X., BAGGIO, L. L. & DRUCKER, D. J. 2013. GLP-1 Receptor Activation Indirectly Reduces Hepatic Lipid Accumulation But Does Not Attenuate Development of Atherosclerosis in Diabetic Male ApoE−/− Mice. *Endocrinology,* 154**,** 127-139.
PARTHSARATHY, V. & HOLSCHER, C. 2013. The type 2 diabetes drug liraglutide reduces chronic inflammation induced by irradiation in the mouse brain. *Eur J Pharmacol,* 700**,** 42-50.
PATEL, A., MACMAHON, S., CHALMERS, J., NEAL, B., BILLOT, L., WOODWARD, M., MARRE, M., COOPER, M., GLASZIOU, P., GROBBEE, D., HAMET, P., HARRAP, S., HELLER, S., LIU, L., MANCIA, G., MOGENSEN, C. E., PAN, C., POULTER, N., RODGERS, A., WILLIAMS, B., BOMPOINT, S., DE GALAN, B. E., JOSHI, R. & TRAVERT, F. 2008. Intensive blood glucose control and vascular outcomes in patients with type 2 diabetes. *N Engl J Med,* 358**,** 2560-72.
PATTON, T. 2009. *Mosby's Anatomy & Physiology 7th Edition,* Mosby.
PEPIN, J., VALIQUETTE, L. & COSSETTE, B. 2005. Mortality attributable to nosocomial Clostridium difficile-associated disease during an epidemic caused by a hypervirulent strain in Quebec. *Cmaj,* 173**,** 1037-42.
PERLEY, M. J. & KIPNIS, D. M. 1967. Plasma insulin responses to oral and intravenous glucose: studies in normal and diabetic sujbjects. *J Clin Invest,* 46**,** 1954-62.
PERŠE, M. & CERAR, A. 2012. Dextran Sodium Sulphate Colitis Mouse Model: Traps and Tricks. *Journal of Biomedicine and Biotechnology,* 2012**,** 718617.
PETERSON, L. W. & ARTIS, D. 2014. Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. *Nature Reviews Immunology,* 14**,** 141.
PODOLSKY, D. K. 2002. Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med,* 347**,** 417-29.

PRASAD, R., ALAVI, K. & SCHWARTZ, M. Z. 2000. Glucagonlike peptide-2 analogue enhances intestinal mucosal mass after ischemia and reperfusion. *J Pediatr Surg,* 35**,** 357-9.

PYKE, C., HELLER, R. S., KIRK, R. K., ØRSKOV, C., REEDTZ-RUNGE, S., KAASTRUP, P., HVELPLUND, A., BARDRAM, L., CALATAYUD, D. & KNUDSEN, L. B. 2014. GLP-1 Receptor Localization in Monkey and Human Tissue: Novel Distribution Revealed With Extensively Validated Monoclonal Antibody. *Endocrinology,* 155**,** 1280-1290.

PYKE, C. & KNUDSEN, L. B. 2013. The glucagon-like peptide-1 receptor--or not? *Endocrinology,* 154**,** 4-8.

QI, K.-K., LV, J.-J., WU, J. & XU, Z.-W. 2017. Therapeutic effects of different doses of polyethylene glycosylated porcine glucagon-like peptide-2 on ulcerative colitis in male rats. *BMC Gastroenterology,* 17**,** 34.

QUOYER, J., LONGUET, C., BROCA, C., LINCK, N., COSTES, S., VARIN, E., BOCKAERT, J., BERTRAND, G. & DALLE, S. 2010. GLP-1 mediates antiapoptotic effect by phosphorylating Bad through a beta-arrestin 1-mediated ERK1/2 activation in pancreatic beta-cells. *J Biol Chem,* 285**,** 1989-2002.

RAVASSA, S., ZUDAIRE, A., CARR, R. D. & DIEZ, J. 2011. Antiapoptotic effects of GLP-1 in murine HL-1 cardiomyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol,* 300**,** H1361-72.

READ, P. A., KHAN, F. Z. & DUTKA, D. P. 2012. Cardioprotection against ischaemia induced by dobutamine stress using glucagon-like peptide-1 in patients with coronary artery disease. *Heart,* 98**,** 408-13.

READ, P. A., KHAN, F. Z., HECK, P. M., HOOLE, S. P. & DUTKA, D. P. 2010. DPP-4 inhibition by sitagliptin improves the myocardial response to dobutamine stress and mitigates stunning in a pilot study of patients with coronary artery disease. *Circ Cardiovasc Imaging,* 3**,** 195-201.

REED, G. W., ROSSI, J. E. & CANNON, C. P. 2016. Acute myocardial infarction. *The Lancet,* 389**,** 197-210.

RICHARDS, P., PARKER, H. E., ADRIAENSSENS, A. E., HODGSON, J. M., CORK, S. C., TRAPP, S., GRIBBLE, F. M. & REIMANN, F. 2014. Identification and characterization of GLP-1 receptor-expressing cells using a new transgenic mouse model. *Diabetes,* 63**,** 1224-33.

ROBERGE, J. N. & BRUBAKER, P. L. 1991. Secretion of proglucagon-derived peptides in response to intestinal luminal nutrients. *Endocrinology,* 128**,** 3169-74.

ROBERT G. CARROLL, P. 2007. *Elsevier's Integrated Physiology*, Mosby.

ROCCA, A. S. & BRUBAKER, P. L. 1999. Role of the vagus nerve in mediating proximal nutrient-induced glucagon-like peptide-1 secretion. *Endocrinology,* 140**,** 1687-94.

ROGERS, B. H., CLARK, L. M. & KIRSNER, J. B. 1971. The epidemiologic and demographic characteristics of inflammatory bowel disease: an analysis of a computerized file of 1400 patients. *J Chronic Dis,* 24**,** 743-73.

RÖHRBORN, D., WRONKOWITZ, N. & ECKEL, J. 2015. DPP4 in Diabetes. *Frontiers in Immunology,* 6**,** 386.

ROLIN, B., LARSEN, M. O., GOTFREDSEN, C. F., DEACON, C. F., CARR, R. D., WILKEN, M. & KNUDSEN, L. B. 2002. The long-acting GLP-1 derivative NN2211 ameliorates glycemia and increases beta-cell mass in diabetic mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab,* 283**,** E745-52.

RUPARELIA, N., DIGBY, J. E., JEFFERSON, A., MEDWAY, D. J., NEUBAUER, S., LYGATE, C. A. & CHOUDHURY, R. P. 2013. Myocardial infarction causes

inflammation and leukocyte recruitment at remote sites in the myocardium and in the renal glomerulus. *Inflammation Research,* 62**,** 515-525.

SABBAH, H. N., SHAROV, V., RIDDLE, J. M., KONO, T., LESCH, M. & GOLDSTEIN, S. 1992. Mitochondrial abnormalities in myocardium of dogs with chronic heart failure. *J Mol Cell Cardiol,* 24**,** 1333-47.

SAHA, J. K., XIA, J., GRONDIN, J. M., ENGLE, S. K. & JAKUBOWSKI, J. A. 2005. Acute hyperglycemia induced by ketamine/xylazine anesthesia in rats: mechanisms and implications for preclinical models. *Exp Biol Med (Maywood),* 230**,** 777-84.

SALAGA, M., MOKROWIECKA, A., ZIELINSKA, M., MALECKA-PANAS, E., KORDEK, R., KAMYSZ, E. & FICHNA, J. 2017. New Peptide Inhibitor of Dipeptidyl Peptidase IV, EMDB-1 Extends the Half-Life of GLP-2 and Attenuates Colitis in Mice after Topical Administration. *J Pharmacol Exp Ther,* 363**,** 92-103.

SAUVE, M., BAN, K., MOMEN, M. A., ZHOU, Y. Q., HENKELMAN, R. M., HUSAIN, M. & DRUCKER, D. J. 2010. Genetic deletion or pharmacological inhibition of dipeptidyl peptidase-4 improves cardiovascular outcomes after myocardial infarction in mice. *Diabetes,* 59**,** 1063-73.

SAVARESE, G., PERRONE-FILARDI, P., D'AMORE, C., VITALE, C., TRIMARCO, B., PANI, L. & ROSANO, G. M. 2015. Cardiovascular effects of dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in diabetic patients: A meta-analysis. *Int J Cardiol,* 181**,** 239-44.

SCHIRRA, J., STURM, K., LEICHT, P., ARNOLD, R., GÖKE, B. & KATSCHINSKI, M. 1998. Exendin(9-39)amide is an antagonist of glucagon-like peptide-1(7-36)amide in humans. *Journal of Clinical Investigation,* 101**,** 1421-1430.

SCHWARTZ, L. K., O'KEEFE, S. J. D., FUJIOKA, K., GABE, S. M., LAMPRECHT, G., PAPE, U.-F., LI, B., YOUSSEF, N. N. & JEPPESEN, P. B. 2016. Long-Term Teduglutide for the Treatment of Patients With Intestinal Failure Associated With Short Bowel Syndrome. *Clinical and Translational Gastroenterology,* 7**,** e142.

SCIRICA, B. M., BHATT, D. L., BRAUNWALD, E., STEG, P. G., DAVIDSON, J., HIRSHBERG, B., OHMAN, P., FREDERICH, R., WIVIOTT, S. D., HOFFMAN, E. B., CAVENDER, M. A., UDELL, J. A., DESAI, N. R., MOSENZON, O., MCGUIRE, D. K., RAY, K. K., LEITER, L. A. & RAZ, I. 2013. Saxagliptin and cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes mellitus. *N Engl J Med,* 369**,** 1317-26.

SCOTT, R. B., KIRK, D., MACNAUGHTON, W. K. & MEDDINGS, J. B. 1998. GLP-2 augments the adaptive response to massive intestinal resection in rat. *Am J Physiol,* 275**,** G911-21.

SCROCCHI, L. A., BROWN, T. J., MACLUSKY, N., BRUBAKER, P. L., AUERBACH, A. B., JOYNER, A. L. & DRUCKER, D. J. 1996. Glucose intolerance but normal satiety in mice with a null mutation in the glucagon–like peptide 1 receptor gene. *Nature Medicine,* 2**,** 1254.

SERRE, V., DOLCI, W., SCHAERER, E., SCROCCHI, L., DRUCKER, D., EFRAT, S. & THORENS, B. 1998. Exendin-(9-39) is an inverse agonist of the murine glucagon-like peptide-1 receptor: implications for basal intracellular cyclic adenosine 3',5'-monophosphate levels and beta-cell glucose competence. *Endocrinology,* 139**,** 4448-54.

SHANTHI MENDIS, P. P., B. NORRVING 2011. *Global Atlas on Cardiovascular Disease Prevention and Control,* WHO, WHO.

SHIGETA, T., AOYAMA, M., BANDO, Y. K., MONJI, A., MITSUI, T., TAKATSU, M., CHENG, X.-W., OKUMURA, T., HIRASHIKI, A., NAGATA, K. & MUROHARA, T. 2012. Dipeptidyl Peptidase-4 Modulates Left Ventricular Dysfunction in Chronic Heart Failure via Angiogenesis-Dependent and -Independent Actions. *Circulation,* 126**,** 1838-1851.

SHIN, E. D., ESTALL, J. L., IZZO, A., DRUCKER, D. J. & BRUBAKER, P. L. 2005. Mucosal adaptation to enteral nutrients is dependent on the physiologic actions of glucagon-like peptide-2 in mice. *Gastroenterology,* 128**,** 1340-53.

SHIVANANDA, S., LENNARD-JONES, J., LOGAN, R., FEAR, N., PRICE, A., CARPENTER, L. & VAN BLANKENSTEIN, M. 1996. Incidence of inflammatory bowel disease across Europe: is there a difference between north and south? Results of the European Collaborative Study on Inflammatory Bowel Disease (EC-IBD). *Gut,* 39**,** 690-7.

SIGALET, D. L., WALLACE, L., DE HEUVAL, E. & SHARKEY, K. A. 2010. The effects of glucagon-like peptide 2 on enteric neurons in intestinal inflammation. *Neurogastroenterol Motil,* 22**,** 1318-e350.

SIGALET, D. L., WALLACE, L. E., HOLST, J. J., MARTIN, G. R., KAJI, T., TANAKA, H. & SHARKEY, K. A. 2007. Enteric neural pathways mediate the anti-inflammatory actions of glucagon-like peptide 2. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol,* 293**,** G211-21.

SILVERTHORN, D. U. 2019. *Human physiology: An integrated approach,* https://www.pearson.com/content/dam/one-dot-com/one-dot-com/us/en/higher-ed/en/products-services/silverthorn-7e-info/pdf/sample-chapter--ch21.pdf, Pearson/Benjamin Cummings.

SIVERTSEN, J., ROSENMEIER, J., HOLST, J. J. & VILSBOLL, T. 2012. The effect of glucagon-like peptide 1 on cardiovascular risk. *Nat Rev Cardiol,* 9**,** 209-22.

SKARBALIENE, J., PETERSEN, Y. M., CHRISTJANSEN, K. N., EBBEHOEJ, K., PEDERSEN, H. D. & THORKILDSEN, C. 2011. ZP1848, a Novel GLP-2 Agonist, Provides a Wide Window of Therapeutic Efficacy in the Experimental Crohn's Disease Model. *Gastroenterology,* 140**,** S-519.

SOKOS, G. G., BOLUKOGLU, H., GERMAN, J., HENTOSZ, T., MAGOVERN, G. J., JR., MAHER, T. D., DEAN, D. A., BAILEY, S. H., MARRONE, G., BENCKART, D. H., ELAHI, D. & SHANNON, R. P. 2007. Effect of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) on glycemic control and left ventricular function in patients undergoing coronary artery bypass grafting. *Am J Cardiol,* 100**,** 824-9.

SOKOS, G. G., NIKOLAIDIS, L. A., MANKAD, S., ELAHI, D. & SHANNON, R. P. 2006. Glucagon-Like Peptide-1 Infusion Improves Left Ventricular Ejection Fraction and Functional Status in Patients With Chronic Heart Failure. *Journal of Cardiac Failure,* 12**,** 694-699.

SOLOMON, K. 2013. The host immune response to Clostridium difficile infection. *Therapeutic Advances in Infectious Disease,* 1**,** 19-35.

SOLOMON, L., MANSOR, S., MALLON, P., DONNELLY, E., HOPER, M., LOUGHREY, M., KIRK, S. & GARDINER, K. 2010. *The dextran sulphate sodium (DSS) model of colitis: An overview*.

SONG, G., YANG, D., WANG, Y., DE GRAAF, C., ZHOU, Q., JIANG, S., LIU, K., CAI, X., DAI, A., LIN, G., LIU, D., WU, F., WU, Y., ZHAO, S., YE, L., HAN, G. W., LAU, J., WU, B., HANSON, M. A., LIU, Z. J., WANG, M. W. & STEVENS, R. C. 2017. Human GLP-1 receptor transmembrane domain structure in complex with allosteric modulators. *Nature,* 546**,** 312-315.

SONNE, D. P., ENGSTROM, T. & TREIMAN, M. 2008. Protective effects of GLP-1 analogues exendin-4 and GLP-1(9-36) amide against ischemia-reperfusion injury in rat heart. *Regul Pept,* 146**,** 243-9.

SPECIAN, R. D. & OLIVER, M. G. 1991. Functional biology of intestinal goblet cells. *Am J Physiol,* 260**,** C183-93.

STEG, P. G., JAMES, S. K., ATAR, D., BADANO, L. P., BLOMSTROM-LUNDQVIST, C., BORGER, M. A., DI MARIO, C., DICKSTEIN, K., DUCROCQ, G., FERNANDEZ-AVILES, F., GERSHLICK, A. H., GIANNUZZI, P., HALVORSEN, S., HUBER, K., JUNI, P., KASTRATI, A., KNUUTI, J., LENZEN, M. J., MAHAFFEY, K. W., VALGIMIGLI, M., VAN 'T HOF, A., WIDIMSKY, P. & ZAHGER, D. 2012. ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation. *Eur Heart J,* 33**,** 2569-619.

STEVEN, S., HAUSDING, M., KROLLER-SCHON, S., MADER, M., MIKHED, Y., STAMM, P., ZINSSIUS, E., PFEFFER, A., WELSCHOF, P., AGDAULETOVA, S., SUDOWE, S., LI, H., OELZE, M., SCHULZ, E., KLEIN, T., MUNZEL, T. & DAIBER, A. 2015. Gliptin and GLP-1 analog treatment improves survival and vascular inflammation/dysfunction in animals with lipopolysaccharide-induced endotoxemia. *Basic Res Cardiol,* 110**,** 6.

STOFFERS, D. A., KIEFFER, T. J., HUSSAIN, M. A., DRUCKER, D. J., BONNER-WEIR, S., HABENER, J. F. & EGAN, J. M. 2000. Insulinotropic glucagon-like peptide 1 agonists stimulate expression of homeodomain protein IDX-1 and increase islet size in mouse pancreas. *Diabetes,* 49**,** 741-8.

TAKADA, S., MASAKI, Y., KINUGAWA, S., MATSUMOTO, J., FURIHATA, T., MIZUSHIMA, W., KADOGUCHI, T., FUKUSHIMA, A., HOMMA, T., TAKAHASHI, M., HARASHIMA, S., MATSUSHIMA, S., YOKOTA, T., TANAKA, S., OKITA, K. & TSUTSUI, H. 2016. Dipeptidyl peptidase-4 inhibitor improved exercise capacity and mitochondrial biogenesis in mice with heart failure via activation of glucagon-like peptide-1 receptor signalling. *Cardiovasc Res,* 111**,** 338-47.

TAKAHASHI, M. 2010. Role of the SDF-1/CXCR4 system in myocardial infarction. *Circ J,* 74**,** 418-23.

TAVARES, W., DRUCKER, D. J. & BRUBAKER, P. L. 2000. Enzymatic- and renal-dependent catabolism of the intestinotropic hormone glucagon-like peptide-2 in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab,* 278**,** E134-9.

THEISS, H. D., GROSS, L., VALLASTER, M., DAVID, R., BRUNNER, S., BRENNER, C., NATHAN, P., ASSMANN, G., MUELLER-HOECKER, J., VOGESER, M., STEINBECK, G. & FRANZ, W. M. 2013. Antidiabetic gliptins in combination with G-CSF enhances myocardial function and survival after acute myocardial infarction. *Int J Cardiol,* 168**,** 3359-69.

THERIOT, C. M., KOUMPOURAS, C. C., CARLSON, P. E., BERGIN, I. I., ARONOFF, D. M. & YOUNG, V. B. 2011. Cefoperazone-treated mice as an experimental platform to assess differential virulence of Clostridium difficile strains. *Gut Microbes,* 2**,** 326-334.

THOMPSON, J. S., IYER, K. R., DIBAISE, J. K., YOUNG, R. L., BROWN, C. R. & LANGNAS, A. N. 2003. Short bowel syndrome and Crohn's disease. *J Gastrointest Surg,* 7**,** 1069-72.

THORENS, B. 1992. Expression cloning of the pancreatic beta cell receptor for the gluco-incretin hormone glucagon-like peptide 1. *Proc Natl Acad Sci U S A,* 89**,** 8641-5.

THORENS, B., PORRET, A., BUHLER, L., DENG, S. P., MOREL, P. & WIDMANN, C. 1993. Cloning and functional expression of the human islet GLP-1 receptor. Demonstration that exendin-4 is an agonist and exendin-(9-39) an antagonist of the receptor. *Diabetes,* 42**,** 1678-82.

THULESEN, J., HARTMANN, B., HARE, K. J., KISSOW, H., ORSKOV, C., HOLST, J. J. & POULSEN, S. S. 2004. Glucagon-like peptide 2 (GLP-2) accelerates the growth of colonic neoplasms in mice. *Gut,* 53**,** 1145-50.

THULESEN, J., KNUDSEN, L. B., HARTMANN, B., HASTRUP, S., KISSOW, H., JEPPESEN, P. B., ORSKOV, C., HOLST, J. J. & POULSEN, S. S. 2002. The truncated metabolite GLP-2 (3-33) interacts with the GLP-2 receptor as a partial agonist. *Regul Pept,* 103**,** 9-15.

TIMMERS, L., HENRIQUES, J. P., DE KLEIJN, D. P., DEVRIES, J. H., KEMPERMAN, H., STEENDIJK, P., VERLAAN, C. W., KERVER, M., PIEK, J. J., DOEVENDANS, P. A., PASTERKAMP, G. & HOEFER, I. E. 2009. Exenatide reduces infarct size and improves cardiac function in a porcine model of ischemia and reperfusion injury. *J Am Coll Cardiol,* 53**,** 501-10.

TOMAS, E., STANOJEVIC, V. & HABENER, J. F. 2011. GLP-1-derived nonapeptide GLP-1(28-36)amide targets to mitochondria and suppresses glucose production and oxidative stress in isolated mouse hepatocytes. *Regul Pept,* 167**,** 177-84.

TRIVEDI, S., WIBER, S. C., EL-ZIMAITY, H. M. & BRUBAKER, P. L. 2012. Glucagon-like peptide-2 increases dysplasia in rodent models of colon cancer. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol,* 302**,** G840-9.

TSAI, C. H., HILL, M., ASA, S. L., BRUBAKER, P. L. & DRUCKER, D. J. 1997a. Intestinal growth-promoting properties of glucagon-like peptide-2 in mice. *Am J Physiol,* 273**,** E77-84.

TSAI, C. H., HILL, M. & DRUCKER, D. J. 1997b. Biological determinants of intestinotrophic properties of GLP-2 in vivo. *Am J Physiol,* 272**,** G662-8.

UGLEHOLDT, R., ZHU, X., DEACON, C. F., ORSKOV, C., STEINER, D. F. & HOLST, J. J. 2004. Impaired intestinal proglucagon processing in mice lacking prohormone convertase 1. *Endocrinology,* 145**,** 1349-55.

UNDERWOOD, R., CHIRAVURI, M., LEE, H., SCHMITZ, T., KABCENELL, A. K., YARDLEY, K., HUBER, B. T. & ¶ 1999. Sequence, Purification, and Cloning of an Intracellular Serine Protease, Quiescent Cell Proline Dipeptidase. *Journal of Biological Chemistry,* 274**,** 34053-34058.

USSHER, J. R. & DRUCKER, D. J. 2012. Cardiovascular biology of the incretin system. *Endocr Rev,* 33**,** 187-215.

USSHER, J. R. & DRUCKER, D. J. 2014. Cardiovascular actions of incretin-based therapies. *Circ Res,* 114**,** 1788-803.

VAN DE WERF, F., BAX, J., BETRIU, A., BLOMSTROM-LUNDQVIST, C., CREA, F., FALK, V., FILIPPATOS, G., FOX, K., HUBER, K., KASTRATI, A., ROSENGREN, A., STEG, P. G., TUBARO, M., VERHEUGT, F., WEIDINGER, F. & WEIS, M. 2008. Management of acute myocardial infarction in patients presenting with persistent ST-segment elevation: the Task Force on the Management of ST-Segment Elevation Acute Myocardial Infarction of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J,* 29**,** 2909-45.

VEDANTAM, G., CLARK, A., CHU, M., MCQUADE, R., MALLOZZI, M. & VISWANATHAN, V. K. 2012. Clostridium difficile infection: toxins and non-toxin virulence factors, and their contributions to disease establishment and host response. *Gut Microbes,* 3**,** 121-34.

VERDICH, C., FLINT, A., GUTZWILLER, J. P., NÄSLUND, E., BEGLINGER, C., HELLSTRÖM, P. M., LONG, S. J., MORGAN, L. M., HOLST, J. J. & ASTRUP, A. 2001. A Meta-Analysis of the Effect of Glucagon-Like Peptide-1 (7–36) Amide on Ad Libitum Energy Intake in Humans. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism,* 86**,** 4382-4389.

VILSBOLL, T., KRARUP, T., DEACON, C. F., MADSBAD, S. & HOLST, J. J. 2001. Reduced postprandial concentrations of intact biologically active glucagon-like peptide 1 in type 2 diabetic patients. *Diabetes,* 50**,** 609-13.

VYAS, A. K., YANG, K. C., WOO, D., TZEKOV, A., KOVACS, A., JAY, P. Y. & HRUZ, P. W. 2011. Exenatide improves glucose homeostasis and prolongs survival in a murine model of dilated cardiomyopathy. *PLoS One,* 6**,** e17178.

WALSH, N. A., YUSTA, B., DACAMBRA, M. P., ANINI, Y., DRUCKER, D. J. & BRUBAKER, P. L. 2003. Glucagon-like peptide-2 receptor activation in the rat intestinal mucosa. *Endocrinology,* 144**,** 4385-92.

WANG, B., ZHONG, J., LIN, H., ZHAO, Z., YAN, Z., HE, H., NI, Y., LIU, D. & ZHU, Z. 2013. Blood pressure-lowering effects of GLP-1 receptor agonists exenatide and liraglutide: a meta-analysis of clinical trials. *Diabetes Obes Metab,* 15**,** 737-49.

WANG, J., TAN, G.-J., HAN, L.-N., BAI, Y.-Y., HE, M. & LIU, H.-B. 2017. Novel biomarkers for cardiovascular risk prediction. *Journal of Geriatric Cardiology : JGC,* 14**,** 135-150.

WASHIZAWA, N., GU, L. H., GU, L., OPENO, K. P., JONES, D. P. & ZIEGLER, T. R. 2004. Comparative effects of glucagon-like peptide-2 (GLP-2), growth hormone (GH), and keratinocyte growth factor (KGF) on markers of gut adaptation after massive small bowel resection in rats. *JPEN J Parenter Enteral Nutr,* 28**,** 399-409.

WETTERGREN, A., PRIDAL, L., WOJDEMANN, M. & HOLST, J. J. 1998. Amidated and non-amidated glucagon-like peptide-1 (GLP-1): non-pancreatic effects (cephalic phase acid secretion) and stability in plasma in humans. *Regul Pept,* 77**,** 83-7.

WHITE, H. D. & CHEW, D. P. 2008. Acute myocardial infarction. *Lancet,* 372**,** 570-84.

WHITE, J. W. & SAUNDERS, G. F. 1986. Structure of the human glucagon gene. *Nucleic Acids Res,* 14**,** 4719-30.

WHITE, W. B. & BAKER, W. L. 2016. Cardiovascular Effects of Incretin-Based Therapies. *Annu Rev Med,* 67**,** 245-60.

WHITE, W. B., CANNON, C. P., HELLER, S. R., NISSEN, S. E., BERGENSTAL, R. M., BAKRIS, G. L., PEREZ, A. T., FLECK, P. R., MEHTA, C. R., KUPFER, S., WILSON, C., CUSHMAN, W. C., ZANNAD, F. & INVESTIGATORS, E. 2013. Alogliptin after acute coronary syndrome in patients with type 2 diabetes. *N Engl J Med,* 369**,** 1327-35.

WHO. 2017. *Cardiovascular diseases (CVDs)* [Online]. WHO-World Health Organization. Available: https://www.who.int/cardiovascular_diseases/publications/atlas_cvd/en/ [Accessed December 2017].

WISNIEWSKI, K., SUEIRAS-DIAZ, J., JIANG, G., GALYEAN, R., LU, M., THOMPSON, D., WANG, Y. C., CROSTON, G., POSCH, A., HARGROVE, D. M., WISNIEWSKA, H., LAPORTE, R., DWYER, J. J., QI, S., SRINIVASAN, K., HARTWIG, J., FERDYAN, N., MARES, M., KRAUS, J., ALAGARSAMY, S., RIVIERE, P. J. & SCHTEINGART, C. D. 2016. Synthesis and Pharmacological

Characterization of Novel Glucagon-like Peptide-2 (GLP-2) Analogues with Low Systemic Clearance. *J Med Chem,* 59**,** 3129-39.

WOHLFART, P., LINZ, W., HUBSCHLE, T., LINZ, D., HUBER, J., HESS, S., CROWTHER, D., WERNER, U. & RUETTEN, H. 2013. Cardioprotective effects of lixisenatide in rat myocardial ischemia-reperfusion injury studies. *J Transl Med,* 11**,** 84.

WOLTERS, F. L., RUSSEL, M. G., SIJBRANDIJ, J., SCHOUTEN, L. J., ODES, S., RIIS, L., MUNKHOLM, P., BODINI, P., O'MORAIN, C., MOUZAS, I. A., TSIANOS, E., VERMEIRE, S., MONTEIRO, E., LIMONARD, C., VATN, M., FORNACIARI, G., PEREIRA, S., MOUM, B. & STOCKBRUGGER, R. W. 2006. Crohn's disease: increased mortality 10 years after diagnosis in a Europe-wide population based cohort. *Gut,* 55**,** 510-8.

WONG, N. D. 2014. Epidemiological studies of CHD and the evolution of preventive cardiology. *Nat Rev Cardiol,* 11**,** 276-89.

WOOLLARD, K. J. & GEISSMANN, F. 2010. Monocytes in atherosclerosis: subsets and functions. *Nat Rev Cardiol,* 7**,** 77-86.

WOOTTEN, D., REYNOLDS, C. A., KOOLE, C., SMITH, K. J., MOBAREC, J. C., SIMMS, J., QUON, T., COUDRAT, T., FURNESS, S. G., MILLER, L. J., CHRISTOPOULOS, A. & SEXTON, P. M. 2016a. A Hydrogen-Bonded Polar Network in the Core of the Glucagon-Like Peptide-1 Receptor Is a Fulcrum for Biased Agonism: Lessons from Class B Crystal Structures. *Mol Pharmacol,* 89**,** 335-47.

WOOTTEN, D., REYNOLDS, C. A., SMITH, K. J., MOBAREC, J. C., KOOLE, C., SAVAGE, E. E., PABREJA, K., SIMMS, J., SRIDHAR, R., FURNESS, S. G., LIU, M., THOMPSON, P. E., MILLER, L. J., CHRISTOPOULOS, A. & SEXTON, P. M. 2016b. The Extracellular Surface of the GLP-1 Receptor Is a Molecular Trigger for Biased Agonism. *Cell,* 165**,** 1632-43.

WU, J., QI, K., XU, Z. & WAN, J. 2015. Glucagon-like peptide-2-loaded microspheres as treatment for ulcerative colitis in the murine model. *J Microencapsul,* 32**,** 598-607.

WU, S., HOPPER, I., SKIBA, M. & KRUM, H. 2014. Dipeptidyl Peptidase-4 Inhibitors and Cardiovascular Outcomes: Meta-Analysis of Randomized Clinical Trials with 55,141 Participants. *Cardiovascular Therapeutics,* 32**,** 147-158.

WU, Y., YIN, X., WIJAYA, C., HUANG, M.-H. & MCCONNELL, B. 2011. *Acute Myocardial Infarction in Rats*.

XAVIER, R. J. & PODOLSKY, D. K. 2007. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature,* 448**,** 427-34.

XIAO, Q., BOUSHEY, R. P., DRUCKER, D. J. & BRUBAKER, P. L. 1999. Secretion of the intestinotropic hormone glucagon-like peptide 2 is differentially regulated by nutrients in humans. *Gastroenterology,* 117**,** 99-105.

XU, G., STOFFERS, D. A., HABENER, J. F. & BONNER-WEIR, S. 1999. Exendin-4 stimulates both beta-cell replication and neogenesis, resulting in increased beta-cell mass and improved glucose tolerance in diabetic rats. *Diabetes,* 48**,** 2270-6.

YAMAMOTO, H., LEE, C. E., MARCUS, J. N., WILLIAMS, T. D., OVERTON, J. M., LOPEZ, M. E., HOLLENBERG, A. N., BAGGIO, L., SAPER, C. B., DRUCKER, D. J. & ELMQUIST, J. K. 2002. Glucagon-like peptide-1 receptor stimulation increases blood pressure and heart rate and activates autonomic regulatory neurons. *J Clin Invest,* 110**,** 43-52.

YAMAZAKI, K., KAGAYA, T., WATANABE, M., TERAUCHI, H., IIDA, D., FUKUMOTO, H., SUZUKI, S., ARAI, T., AOKI, M., TAKASE, K., SEIKI, T.,

TSUKAHARA, K. & NAGAKAWA, J. 2013. A novel truncated glucagon-like peptide 2 (GLP-2) as a tool for analyzing GLP-2 receptor agonists. *Biomed Res,* 34**,** 129-36.

YE, Y., KEYES, K. T., ZHANG, C., PEREZ-POLO, J. R., LIN, Y. & BIRNBAUM, Y. 2010. 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-H1465.

YEADON, J. 2017. *WHICH JAX MOUSE MODEL IS BEST FOR ATHEROSCLEROSIS STUDIES: APOE OR LDLR KNOCKOUT MICE?* [Online]. https://www.jax.org/news-and-insights/jax-blog/2013/november/which-jax-mouse-model-is-best-for-atherosclerosis-studies-apoe-or-ldlr-knoc: Jackson Laboratories. [Accessed dezember 2017].

YUSTA, B., BOUSHEY, R. P. & DRUCKER, D. J. 2000a. The glucagon-like peptide-2 receptor mediates direct inhibition of cellular apoptosis via a cAMP-dependent protein kinase-independent pathway. *J Biol Chem,* 275**,** 35345-52.

YUSTA, B., ESTALL, J. & DRUCKER, D. J. 2002. Glucagon-like peptide-2 receptor activation engages bad and glycogen synthase kinase-3 in a protein kinase A-dependent manner and prevents apoptosis following inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem,* 277**,** 24896-906.

YUSTA, B., HUANG, L., MUNROE, D., WOLFF, G., FANTASKE, R., SHARMA, S., DEMCHYSHYN, L., ASA, S. L. & DRUCKER, D. J. 2000b. Enteroendocrine localization of GLP-2 receptor expression in humans and rodents. *Gastroenterology,* 119**,** 744-55.

ZARUBA, M. M., THEISS, H. D., VALLASTER, M., MEHL, U., BRUNNER, S., DAVID, R., FISCHER, R., KRIEG, L., HIRSCH, E., HUBER, B., NATHAN, P., ISRAEL, L., IMHOF, A., HERBACH, N., ASSMANN, G., WANKE, R., MUELLER-HOECKER, J., STEINBECK, G. & FRANZ, W. M. 2009. Synergy between CD26/DPP-IV inhibition and G-CSF improves cardiac function after acute myocardial infarction. *Cell Stem Cell,* 4**,** 313-23.

ZHANG, R., BRENNAN, M. L., FU, X., AVILES, R. J., PEARCE, G. L., PENN, M. S., TOPOL, E. J., SPRECHER, D. L. & HAZEN, S. L. 2001. Association between myeloperoxidase levels and risk of coronary artery disease. *Jama,* 286**,** 2136-42.

ZHAO, T., PARIKH, P., BHASHYAM, S., BOLUKOGLU, H., POORNIMA, I., SHEN, Y. T. & SHANNON, R. P. 2006. Direct effects of glucagon-like peptide-1 on myocardial contractility and glucose uptake in normal and postischemic isolated rat hearts. *J Pharmacol Exp Ther,* 317**,** 1106-13.

ZHONG, J., MAISEYEU, A., DAVIS, S. N. & RAJAGOPALAN, S. 2015a. DPP4 in Cardiometabolic Disease. *Recent Insights From the Laboratory and Clinical Trials of DPP4 Inhibition,* 116**,** 1491-1504.

ZHONG, J., MAISEYEU, A., DAVIS, S. N. & RAJAGOPALAN, S. 2015b. DPP4 in cardiometabolic disease: recent insights from the laboratory and clinical trials of DPP4 inhibition. *Circ Res,* 116**,** 1491-504.

ZHONG, J. & RAJAGOPALAN, S. 2015. Dipeptidyl Peptidase-4 Regulation of SDF-1/CXCR4 Axis: Implications for Cardiovascular Disease. *Front Immunol,* 6**,** 477.