

Wirkung und Interaktion der Wachstumsfaktoren Myostatin und IGF-1 im murinen Herzen



Dissertation

zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“
im Promotionsfach Chemie

am Fachbereich Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften
der Johannes-Gutenberg Universität
in Mainz

Nadine Biesemann

Geboren in St. Wendel

Mainz 2013

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 01.07.2013

Die vorliegende Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für Herz- und Lungenforschung, W.G. Kerckhoff-Institut in Bad Nauheim angefertigt.

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung.....	1
2. Einleitung.....	2
2.1 Anatomie, Physiologie und Pathophysiologie des Herzens	2
2.1.1 Anatomie und Physiologie des Herzens	2
2.1.2 Pathophysiologie des Herzens.....	5
2.2 Die Rolle von Wachstumsfaktoren im Herzen.....	8
2.3 Myostatin – ein Repressor des Muskelwachstums	10
2.3.1 Aufbau, proteolytische Prozessierung und Regulation von Myostatin.....	11
2.3.2 Signaltransduktion von Myostatin	13
2.3.3 Inhibierung von Myostatin zu therapeutischen Zwecken.....	15
2.3.4 Die gewebsspezifische Funktion von Myostatin im Herzen.....	16
2.4 IGF-1 – ein wichtiger Wachstumsfaktor im Skelett- und Herzmuskel.....	17
2.4.1 Signaltransduktion von IGF-1	20
2.4.2 Die gewebsspezifische Funktion von IGF-1 im Herzen.....	23
2.5 Bekannte Interaktionen von Myostatin und IGF-1.....	25
3. Material und Methoden	27
3.1 Material	27
3.1.1 Chemikalien	27
3.1.2 Gebrauchsmaterial	28
3.1.3 Laborgeräte	29
3.1.4 Kit-Systeme.....	30
3.1.5 Zellkulturmedien und Zusätze	30
3.1.6 Puffer, Medien und Lösungen	31
3.1.7 Inhibitoren, Aktivatoren und rekombinante Proteine	33
3.1.8 Oligonukleotide	33
3.1.9 Antikörper.....	34
3.1.10 Mauslinien	36
3.1.10.1 aMyHC-Cre	36
3.1.10.2 aMyHC-MCM	36
3.1.10.3 <i>Mstn</i> ^{fl/fl}	37

3.1.10.4 CAGG- <i>Mstn</i>	37
3.1.10.5 <i>Igf-1^{fl/fl}</i>	38
3.1.11 Software	38
3.2 Methoden.....	39
3.2.1 tierexperimentelle Methoden.....	39
3.2.1.1 Haltung von Mauslinien.....	39
3.2.1.2 Induktion der Cre Rekombination	39
3.2.1.3 Behandlung von Versuchstieren mit pharmakologischen Inhibitoren.....	39
3.2.1.4 physiologische Messungen.....	40
3.2.1.4.1 MRT-Messungen.....	40
3.2.1.4.2 EKG mittels Telemetrie	41
3.2.1.5 Tötung von Versuchstieren	41
3.2.1.6 Präparation von Mausherzen	41
3.2.1.7 Isolierung und Kultivierung von Kardiomyozyten	42
3.2.2 Molekularbiologische Methoden	42
3.2.2.1 Isolierung von genomischer DNA aus Mausschwanzbiopsien	42
3.2.2.2 Isolierung von RNA aus murinem Gewebe und kultivierten Kardiomyozyten.....	43
3.2.2.3 Polymerase-Kettenreaktion	43
3.2.2.3.1 Reverse Transkription zur Generierung komplementärer DNA (cDNA).....	44
3.2.2.3.2 quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR)	44
3.2.2.4 Genexpressionsanalyse mittels MicroArray	46
3.2.3 Biochemische Methoden.....	46
3.2.3.1 Isolierung von Proteinen aus murinen Herzventrikeln und Kardiomyozyten	46
3.2.3.2 Proteinbestimmung nach Lowry	46
3.2.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	47
3.2.3.4 Western Blot-Verfahren	47
3.2.3.5 Inkubation des Western Blots mit Erst- und Zweitantikörpern	48
3.2.4 Histologische Methoden	48
3.2.4.1 Anfertigen von Gefrierschnitten von Mausherzen.....	48
3.2.4.2 Hämatoxylin- und Eosin-Färbung	48
3.2.4.3 Masson-Trichrom-Färbung.....	49
3.2.4.4 β -Galaktosidase-Färbung.....	49
3.2.4.5 Lektin-Färbung (WGA) und Analyse der Kardiomyozyten-Fläche	50
3.2.4.6 Kollagen-I-Färbung	50
3.2.5 statistische Auswertung	51

4. Ergebnisse.....	52
4.1 Die gewebsautonome Funktion von Myostatin in murinen Kardiomyozyten	52
4.1.1 Evaluierung der Mausmodelle.....	52
4.1.1.1 Das <i>Mstn^{fl/fl}</i> Modell ermöglicht eine effiziente Ausschaltung der Myostatin Expression im Herzen	52
4.1.1.2 Effiziente Überexpression von Myostatin mit Hilfe des CAGG- <i>Mstn</i> Modells	53
4.1.2 Deletion von Myostatin in adulten Kardiomyozyten führt zu Herzinsuffizienz, Hypertrophie und einer gesteigerten Lethalität.....	55
4.1.3 Kardiomyozyten-spezifische Deletion von Myostatin von der Entwicklung an verschlechtert die Herzkontraktilität in adulten Mäusen	59
4.1.4 Deletion von Myostatin aktiviert das hypertrophe Genprogramm	61
4.1.5 Identifikation von AMPK als neues Zielmolekül von Myostatin.....	63
4.1.6 Die antihypertrophe Wirkung von Myostatin im Herzen wird über AMPK vermittelt	67
4.1.7 Herzinsuffizienz nach akuter Myostatin Deletion ist mit einer Runterregulation von <i>Rgs2</i> assoziiert.....	69
4.1.7.1 Myostatin hemmt den β -adrenergen und $G_{\alpha q}$ Signalweg im Herz.....	69
4.1.7.2 Myostatin beeinflusst den β -adrenergen Signalweg nicht direkt	71
4.1.7.3 Akute Deletion von Myostatin führt zu einer Herabregulierung des <i>Regulator of G protein signaling 2 (Rgs2)</i>	73
4.1.8 Myostatin Überexpression verursacht interstitielle Fibrose.....	76
4.1.8.1 Myostatin Überkompensation führt zu interstitieller Fibrose	76
4.1.8.2 Langzeit-Überexpression von Myostatin induziert interstitielle Fibrose und verschlechtert dadurch die Kontraktilität des Herzens.....	78
4.1.9 Die profibrotische Wirkung von Myostatin wird über p38 vermittelt	80
4.2 Wirkung und Interaktion der Wachstumsfaktoren Myostatin und IGF-1 in murinen Kardiomyozyten.....	83
4.2.1 Evaluierung der Mausmodelle.....	84
4.2.1.1 Effiziente Deletion von <i>Igf-1</i> in Kardiomyozyten.....	84
4.2.1.2 Erfolgreiche Deletion von Myostatin und <i>Igf-1</i> in Kardiomyozyten.....	86
4.2.2 Hohe Lethalität nach Deletion von Myostatin und <i>Igf-1</i> in adulten Kardiomyozyten	88
4.2.3 Deletion von <i>Igf-1</i> verhindert die Entstehung einer Hypertrophie nach akuter Deletion von Myostatin	91
4.2.4 Die Deletion von Myostatin und <i>Igf-1</i> von der Entwicklung an verursacht eine Herzinsuffizienz	91
4.2.5 Die kanonische IGF-1 Signaltransduktion ist nicht für die Inhibierung der Hypertrophie im induzierbaren Doppelknockout verantwortlich	93

4.2.6 AMPK Aktivierung als potentielle Ursache der Akt Phosphorylierung in aMyHC-MCM/ <i>Mstn</i> ^{fl/fl} / <i>Igf-1</i> ^{fl/fl} Herzen	94
4.2.7 Induzierbare Doppel- <i>knockouts</i> entwickeln eine schwere Ersatzfibrose.....	96
5. Diskussion.....	99
5.1 Die gewebsautonome Funktion von Myostatin im adulten Herzen	99
5.1.1 AMPK als Vermittler der Hypertrophie nach Myostatin Deletion.....	99
5.1.2 Herabregulation von Rgs2 als Ursache der Herzinsuffizienz.....	100
5.1.3 Einordnung des Herzinsuffizienz-Phänotyps in die Literatur	101
5.1.4 Ist Myostatin ein Überlebensfaktor des Herzens?	102
5.1.5 Myostatin verursacht interstitielle Fibrose	103
5.1.6 Zusammenfassung.....	104
5.1.7 Ausblick.....	105
5.2 Wirkung und Interaktion der Wachstumsfaktoren Myostatin und IGF-1 im Herzen.....	106
5.2.1 Die Regulation der Hypertrophie des Herzens durch Myostatin und IGF-1.....	107
5.2.2 Deletion von Myostatin und IGF-1 verursacht schwere Herzinsuffizienz	108
5.2.3 Schwere interstitielle und Ersatzfibrose in aMyHC-MCM/ <i>Mstn</i> ^{fl/fl} / <i>Igf-1</i> ^{fl/fl} Mäusen.....	110
5.2.4 Zusammenfassung.....	111
6. Anhang.....	112
6.1 Literaturverzeichnis	112
6.2 Abkürzungsverzeichnis	135
6.2 Abbildungsverzeichnis.....	140
6.3 Tabellenverzeichnis	142
6.4 Lebenslauf.....	143
6.5 Danksagung	144

1. Zusammenfassung

Myostatin, ein Mitglied der TGF- β Familie von Wachstumsfaktoren, ist ein potenter negativer Regulator des Skelettmuskelwachstums. Dadurch stellt die Hemmung von Myostatin einen attraktiven therapeutischen Ansatz zur Behandlung von Muskelschwund und Sarkopenie dar. Die physiologische und pathophysiologische Funktion von Myostatin im Herzen ist jedoch kaum verstanden. Dies ist umso erstaunlicher, da Myostatin nach einer Vielzahl pathologischer Zustände wie Herzinfarkten, Herzinsuffizienz oder Kardiomyopathie massiv hochreguliert ist.

Im Rahmen dieser Dissertation wurde die Funktion von Myostatin im adulten Herzen untersucht. Dazu wurden Mausmodelle, in denen Myostatin in Kardiomyozyten deletiert und überexprimiert wird, verwendet. Dabei sollte sowohl die Auswirkung einer Deletion bzw. Überexpression im adulten Tier mit Hilfe einer MerCreMer Rekombinase, als auch die Langzeitwirkung von der Entwicklung an, evaluiert werden. Dies sollte unter anderem die Frage beantworten, ob Myostatin im Herzen eine ähnlich konservierte Funktion wie in der Skelettmuskulatur besitzt und somit das Herzwachstum beeinflusst.

Ich konnte zeigen, dass die akute Deletion von Myostatin in Kardiomyozyten zu einer erhöhten Lethalität, Herzinsuffizienz und Hypertrophie führt. Dabei konnte ich eine Aktivierung der AMP-aktivierten Kinase (AMPK) als Ursache der Hypertrophie identifizieren und mit Hilfe eines AMPK Inhibitors die Entstehung der Hypertrophie nach akuter Deletion von Myostatin *in vivo* verhindern. Desweiteren konnte ich *in vivo* und *in vitro* zeigen, dass Myostatin AMPK über die TGF- β -aktivierte Kinase 1 (TAK1) und seinen kanonischen Rezeptor inhibiert. MicroArray Daten zeigten eine Unterdrückung der Expression von *Rgs2*, einem Inhibitor der G_q Signalkaskade, nach akuter Deletion von Myostatin. Eine Hochregulation des G_q Signalweges ist eine der Hauptursachen zur Entstehung von Herzinsuffizienz und konnte auch *in vivo* nach akuter Deletion von Myostatin bestätigt werden.

Desweiteren konnte ich im Rahmen dieser Dissertation zeigen, dass die kurzfristige adulte Überexpression von Myostatin, wie sie unter pathologischen Zuständen vorkommt, die Kontraktilität des Herzens leicht verbessert, während eine langfristige Überexpression zu einer interstitiellen Fibrose führt. Dabei verursacht Myostatin die interstitielle Fibrose über TAK1 und p38 *in vivo* und *in vitro*.

Im zweiten Teil der Dissertation sollte die Interaktion von Myostatin und IGF-1 im Herzen analysiert werden. Myostatin und IGF-1 sind zwei der wichtigsten gegensätzlichen Regulatoren des Muskelwachstums. Die Interaktion zwischen diesen beiden Wachstumsfaktoren *in vivo* wurde jedoch noch nicht untersucht. Mit Hilfe einer Kardiomyozyten-spezifischen Deletion von Myostatin und *Igf-1* im Herzen sollte untersucht werden, ob eine Deletion von *Igf-1* die Hypertrophie nach akuter Deletion von Myostatin verhindern kann. Desweiteren sollte dieses Mausmodell zur Identifizierung neuer Interaktionen und Regulationsmechanismen zwischen diesen beiden Wachstumsfaktoren dienen.

2. Einleitung

2.1 Anatomie, Physiologie und Pathophysiologie des Herzens

2.1.1 Anatomie und Physiologie des Herzens

Das murine Herz schlägt im Durchschnitt mit einer Herzrate von 500 Schlägen/min über eine halbe Billion mal. Dabei versorgt es den Körper mit sauerstoff- und nährstoffreichem Blut und transportiert Stoffwechsel-Endprodukte und Kohlenstoffdioxid wieder ab. Diese enorme Leistung wird durch einen komplexen Aufbau und Regulationsmechanismus ermöglicht.

Das adulte Säugetierherz besteht aus vier Kammern und ist vom Herzbeutel oder Perikard umgeben. Dabei kann man das rechte und das linke Herz jeweils in einen Vorhof oder Atrien und die Ventrikel einteilen (s. Abb. 1) ². Die Atrien werden durch das *Septum atriorum* und die Ventrikel durch das *Septum interventriculare* getrennt. Im rechten Herz trennt die Trikuspidalklappe das rechte Atrium vom rechten Ventrikel, während die Mitralklappe dieselbe Funktion im linken Herz besitzt (s. Abb. 1). Die Herzwand selbst besteht aus drei Schichten (von außen nach innen): Epikard, Myokard, Endokard. Das Myokard enthält die Herzmuskelzellen (Kardiomyozyten) und ist demzufolge für die Kontraktion des Herzens verantwortlich ².

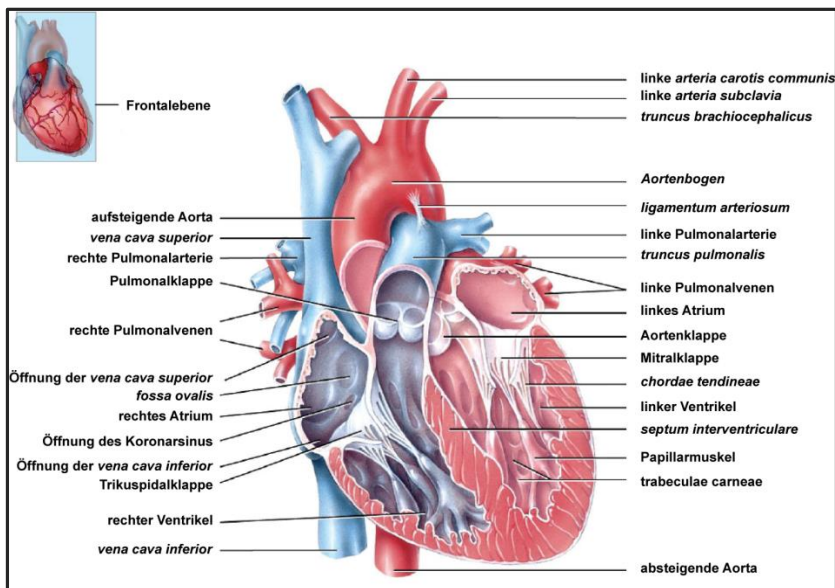


Abbildung 1: Innere Anatomie des Herzens (nach Tortora und Derrickson ²)

Schematischer Aufbau des Säugetierherzens. Das Herz besteht aus zwei Atrien und zwei Ventrikeln. Die Trennung zwischen rechtem Atrium und Ventrikel wird durch die Trikuspidalklappe, die des linken Herzens durch die Mitralklappe gewährleistet. Das rechte und linke Herz werden durch das Septum oder die Scheidewand voneinander separiert. Das deoxygenierte Blut aus dem rechten Ventrikel wird über die Pulmonalarterie zur Lunge geleitet, während das sauerstoffreiche Blut aus der Lunge über die Pulmonalvenen in das rechte Atrium gelangt. Von dort aus gelangt es über den linken Ventrikel und die Aorta in den Körperkreislauf. Die Herzwand lässt sich von außen nach innen in Epikard, Myokard und Endokard unterteilen.

Funktionell sammelt das rechte Atrium deoxygeniertes Blut aus der *Vena cava superior* und *inferior*. Dieses gelangt über die Trikuspidalklappe in den rechten Ventrikel. Das deoxygenierte Blut wird dann über den *truncus pulmonalis* in die Lunge gepumpt und mit Sauerstoff angereichert. Das

sauerstoffhaltige Blut gelangt im Anschluss von der Lunge über die *venae Pulmonales* in das rechte Atrium und wird von dort über den linken Ventrikel und die Aorta dem Körperkreislauf wieder zugeführt².

Um dies zu ermöglichen, muss das Herz eine gewaltige Pumpleistung vollbringen. Dabei lässt sich der Herzzyklus in vier Phasen unterteilen (s. Abb. 2). Zu Beginn eines Zykluses sind alle Herzklappen geschlossen. In der Entspannungsphase (Diastole) strömt Blut aus den Venen in die Vorhöfe, während sämtliche Klappen geschlossen sind (Abb. 2 türkis hinterlegt). Wenn der Vorhofdruck unterschritten wird, öffnen sich die Segelklappen (Trikuspidal- und Mitralklappe) und das Blut fließt in die Ventrikel. Diese Phase bezeichnet man als Füllungsphase und Diastole (Abb. 2 türkis hinterlegt). Während der nachfolgenden Systole kontrahiert das Myokard. Dadurch kommt es zu einem steilen Druckanstieg in den Ventrikeln (s. Abb. 2 lila hinterlegt). Sobald der intraventrikuläre Druck den Druck in den Taschenklappen übersteigt, öffnen sich die Taschenklappen und das Blut gelangt über die Schlagadern in den Kreislauf. Diese Phase gehört auch noch zur Systole und wird als Austreibungsphase bezeichnet (s. Abb. 2 lila hinterlegt)².

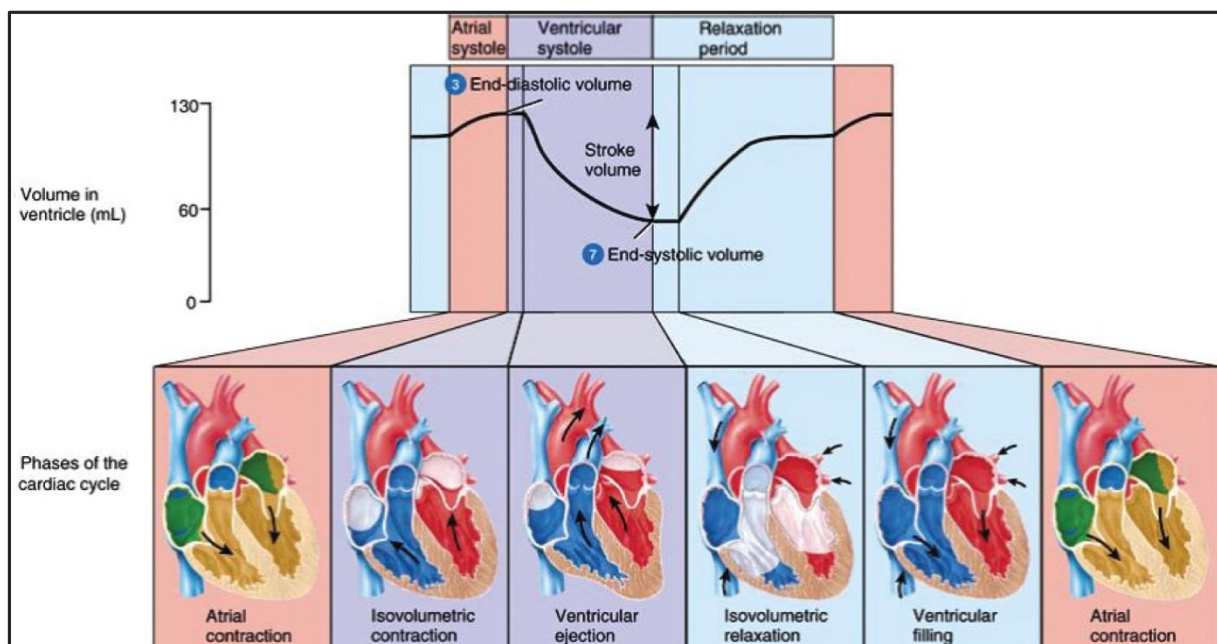


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Funktionsphasen des Herzens (nach Tortora und Derrickson²)

Schematische Darstellung der Verschiebungen im linksventrikulären Volumen während der Herzphasen (oben) sowie die dazugehörigen Herzphasen (unten). In der Entspannungsphase (türkis) strömt das Blut aus den Venen in die Vorhöfe. Nachdem sich die Segelklappen geöffnet haben, fließt das Blut in die Ventrikel (Diastole der Kammern, türkis). In der nachfolgenden Anspannungsphase (lila) kontrahieren die Ventrikel. Der dadurch entstehende Druckanstieg führt zur Öffnung der Taschenklappen. Dadurch gelangt das Blut in den Kreislauf (Austreibungsphase, lila). Jeder ventrikulären Systole geht zuerst eine Vorhofsystole voraus.

Morphologisch gesehen stellt das Herz ein komplexes Gebilde aus zellulären und azellulären Komponenten dar. So besteht das adulte murine Herz aus 56% Kardiomyozyten, 27% Fibroblasten, 7% Endothelzellen und 10% vaskulären glatten Muskelzellen³. Desweiteren enthält das Herz auch

Mast- und Immunsystem-verwandte Zellen ⁴. All diese Zelltypen und ihre Interaktionen untereinander sind von elementarer Bedeutung zur Erhaltung der elektrischen, chemischen und biomechanischen Funktion des Herzens ^{5,6}.

Strukturell sind die Kardiomyozyten in Form von Laminae angeordnet ⁷. Diese Laminae bestehen aus 2-5 Zellen dicken Kardiomyozyten-Schichten, die von einem Kollagen-Netzwerk umgeben sind ⁸ (s. Abb. 3 A, B). Die Herzmuskulatur ist analog zur Skelettmuskulatur quergestreift (s. Abb. 3 D). Jede Myofibrille wird von einem longitudinalen System des sarkoplasmatischen Retikulums umhüllt. Desweiteren stülpen sich transverse Tubuli (T-Tubuli) in die Plasmamembran ein, die eine entscheidende Rolle bei der elektromechanischen Kopplung besitzen. Im Gegensatz zum Skelettmuskel enthalten die Myofibrillen des Herzens besonders viele Mitochondrien sowie einen oder mehrere zentral liegende Kerne. Desweiteren sind die einzelnen Kardiomyozyten über Glanzstreifen miteinander verbunden.

Fibroblasten bilden den zweiten Hauptbestandteil des Herzens. Bei ihnen handelt es sich um flache spindelförmige Zellen, die keine Basalmembran besitzen ⁹ (s. Abb. 3 B). Ihre Hauptfunktion ist die Synthese und der Abbau der Extrazellulären Matrix, insbesondere der Kollagene und des Fibronektins ⁹. Dies führt zum Aufbau eines dreidimensionalen Netzwerkes, welches die Form und Funktion des Herzens gewährleistet.

Schließlich besteht das Herz auch noch aus azellulären Komponenten oder der extrazellulären Matrix. Dazu gehören interstitielle Kollagene, Proteoglykane, Glykoproteine, Cytokine, Wachstumsfaktoren und Proteasen ^{5,10}. Die extrazelluläre Matrix bildet ein Netzwerk, welches alle zellulären Strukturen umgibt und miteinander verbindet.

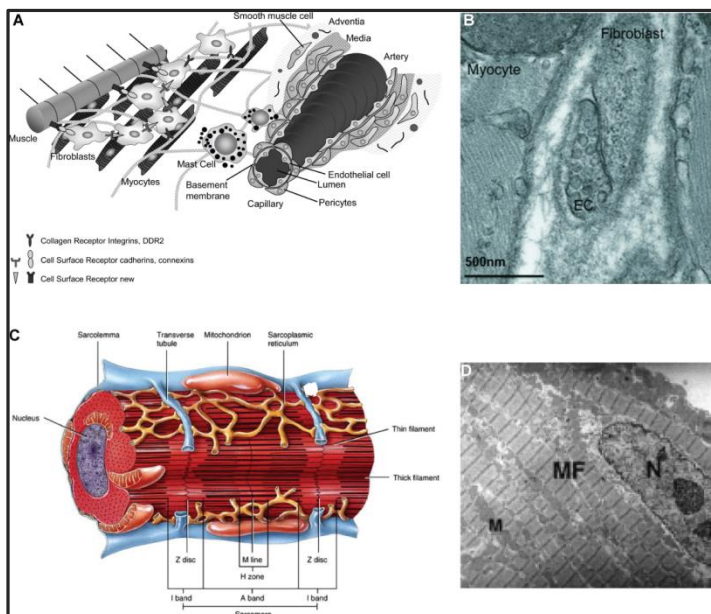


Abbildung 3: Zelltypen des Herzens

(A) Schematische Darstellung der Interaktion von Fibroblasten, extrazellulärer Matrix und Kardiomyozyten im Herzen. Fibroblasten und Mastzellen sind mit dem vaskulären System assoziiert (nach Baudino et al. ⁵) (B) Elektronenmikroskopische Aufnahme eines adulten Mausherzens, die die enge Interaktion zwischen Fibroblasten, Kardiomyozyten und Endothelzellen (EC) veranschaulicht. Maßstab: 500µm (nach Souders et al. ⁹). (C) Schematischer Aufbau einer Herzmuskelfaser (nach Tortora und Derrickson ²). (D) Elektronenmikroskopische Aufnahme von adulten Ratten-Kardiomyozyten. Diese zeigen eine Myofibrille (MF), viele Mitochondrien (M) und einen Zellkern (N). Vergrößerung: 10.000fach (nach Kang et al. ¹¹)

2.1.2 Pathophysiologie des Herzens

Das Herz ist ein dynamisches Organ, welches sich an verschiedene Umweltbedingungen anpassen kann. Während der Entwicklung oder als Antwort auf physiologische und pathologische Zustände wächst das Herz durch Hypertrophie (s. Abb. 4). Hypertrophie ist eine Vergrößerung des Herzens durch Größenzuwachs der individuellen Kardiomyozyten¹². Dabei ist hypertrophes Wachstum zunächst ein positiver kompensatorischer Prozess, der zu einer Reduktion des myokardialen Wandstress und einem verbesserten Schlagvolumen führt.

Kardiomyozyten können sich auf zwei Arten vergrößern. Dabei unterscheidet man zwischen konzentrischer und exzentrischer Hypertrophie¹³. Unter konzentrischer Hypertrophie versteht man einen Anstieg der relativen Wanddicke und der Herzmasse, wobei es zu keiner oder nur einer geringen Veränderung des Kammervolumens kommt. Sie entsteht nach Bluthochdruck und zeichnet sich durch ein paralleles Anfügen der Sarkomere und laterales Wachstum der einzelnen Kardiomyozyten aus. Somit werden die Kardiomyozyten durch konzentrische Hypertrophie dicker. Die Entstehung der Hypertrophie nach einem erhöhten Druck wird auch durch das Laplace-Gesetz verdeutlicht¹⁴:

$$K = \frac{Pr}{2d}$$

wobei K: Wandspannung, P: transmuraler Druck, r: Gefäßradius, d: Wanddicke

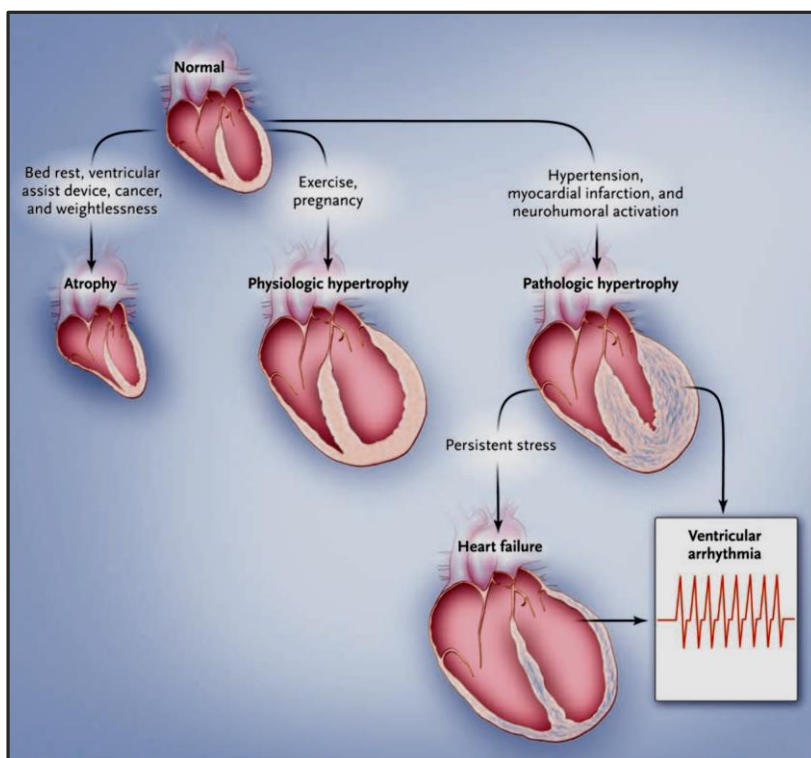
Unter exzentrischer Hypertrophie versteht man einen Anstieg der Herzmasse mit gleichzeitiger Vergrößerung des Kammervolumens. Dabei kann die relative Wanddicke normal, verkleinert oder vergrößert sein. Exzentrische Hypertrophie entsteht nach isotonischem Krafttraining oder Herzinfarkten und ist durch ein Anfügen der Sarkomere in Serie und longitudinales Zellwachstum gekennzeichnet¹⁵. Dies führt zu einer Elongation der einzelnen Kardiomyozyten. Verallgemeinert könnte man konzentrische Hypertrophie als Kennzeichen von pathologischem Wachstum und exzentrische Hypertrophie als Kennzeichen physiologischen Wachstums bezeichnen¹².

Physiologische Hypertrophie wird durch Training, Schwangerschaft und postnatales Wachstum induziert¹ (s. Abb. 4). Sie führt nicht zur Herzinsuffizienz und verschlechtert auch nicht die Funktion des Herzens^{15,16}. Deshalb wird eine physiologische Hypertrophie auch nicht von interstitieller Fibrose oder einer Reaktivierung des fetalen Genprogramms begleitet^{14,17}. Sie wird hauptsächlich durch Insulin und IGF-1 Signaltransduktion über die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) und AKT vermittelt^{12,14,18} (s. Abb. 5). Interessanterweise unterscheiden sich die Signaltransduktionswege zur Induktion von physiologischer und pathologischer Hypertrophie grundsätzlich (s. Abb. 5).

Pathologische Hypertrophie wird durch neurohumorale Aktivierung, Bluthochdruck, Adipositas und Verletzungen des Myokards verursacht. Desweiteren können auch Mutationen in Genen, die für kontraktile Proteine kodieren, zur Entstehung einer pathologischen Hypertrophie führen. Im Gegensatz zu physiologischem Wachstum, steigert die pathologische Hypertrophie das Risiko der Entwicklung von Herzinsuffizienz und Arrhythmien¹ und verursacht einen gesteigerten Zelltod durch Apoptose und Nekrose¹⁹ (s. Abb. 4). Desweiteren wird pathologische Hypertrophie mit einer Verschiebung zum glykolytischen Metabolismus, der Reaktivierung des fetalen Genprogramms^{12,14}

Disorganisation der Sarkomere, Veränderungen des Calcium Signalweges, Verlust von Kardiomyozyten und Ersatz durch Fibroblasten und systolischer Dysfunktion assoziiert ¹. Zahlreiche Signalwege sind in die Entstehung einer pathologischen Hypertrophie involviert, wobei eine Veränderung der Calcium-Homöostase einen der wichtigsten Auslöser darstellt ²⁰ (s. Abb. 5). Dabei ist die Signaltransduktion über das $G_{\alpha q}$ heterotrimeren G Protein einer der wichtigsten Aktivatoren des Calcium-Signalweges.

Das Gegenteil einer Hypertrophie ist die Atrophie (s. Abb. 4). Diese entsteht durch lange Bettruhe, oder einen ausgeprägten Gewichtsverlust ¹ (s. Abb. 4). In sämtlichen atrophischen Muskeln kommt es zur Aktivierung des Ubiquitin-Proteasom-Systems und dem Abbau von Muskelproteinen ²¹. Im Herzmuskel führt die Inhibierung von hypertrophen Signaltransduktionswegen sowie die direkte Stimulierung des Proteinabbaus zu Atrophie ²²⁻²⁴ (s. Abb. 5).



Eine pathologische Hypertrophie ist mit Dekompensation, ventrikulärer Dilatation, systolischer Dysfunktion und elektrophysiologischen Veränderungen assoziiert, die zu Herzinsuffizienz und ventrikulärer Arrhythmie führen. Durch Schwangerschaft oder Training kann sich eine physiologische Hypertrophie ausbilden. Im Gegensatz dazu führen lange Bettruhe, Krebs und Gewichtsverlust zu einer Atrophie des Herzens.

Abbildung 4: Physiologische und pathophysiologische Bedingungen im Herzen (nach Hill et al. ¹)

Pathologische Hypertrophie ist eine der Ursachen für Herzinsuffizienz (s. Abb. 4). Kardiovaskuläre Erkrankungen sind die Haupttodesursache weltweit und Herzinsuffizienz ist die am schnellsten wachsende Unterklasse im letzten Jahrzehnt ²⁵⁻²⁸. So leiden 1-2% der gesamten Bevölkerung unter Herzinsuffizienz ²⁹ und die 5-Jahres-Mortalität liegt bei fast 50% ³⁰. Unter Herzinsuffizienz versteht man die Unfähigkeit des Herzens den Körper mit der benötigten Blutmenge zu versorgen ^{12,14,31}. Dies führt zu frühzeitiger Erschöpfung, Dyspnoe, Ödemen und schließlich vorzeitigem Tod. Man unterscheidet zwischen systolischer und diastolischer Herzinsuffizienz. Bei systolischer Herzinsuffizienz ist die Kontraktilität des Herzens verschlechtert, wodurch das Schlagvolumen abnimmt. Diastolische Herzinsuffizienz wird durch eine normale Kontraktion, aber eine reduzierte Relaxation durch „Versteifung“ der Ventrikel definiert ¹⁴. Diastolische Herzinsuffizienz tritt typischerweise bei älteren Patienten, die unter Bluthochdruck leiden, auf.

Herzinsuffizienz wird durch verschiedene Erkrankungen induziert, unter anderem durch Bluthochdruck, Herzinfarkt, Ischämie, Herzklappeninsuffizienz, Stenose, Myokarditis sowie hypertrophe, dilatierte und diabetische Kardiomyopathie¹². Die therapeutischen Optionen beinhalten Diuretika, beta-Blocker, ACE-Hemmer (*Angiotensin Converting Enzyme*), Aldosteron Antagonisten, Vasodilatoren und inotrope Medikamente¹⁴. Die bei 50% liegende Sterblichkeitsrate zeigt jedoch deutlich, dass die molekularen Mechanismen, die der Herzinsuffizienz zugrunde liegen, noch besser erforscht werden müssen.

Ein wichtiges molekulares Kennzeichen der Herzinsuffizienz und der pathologischen Hypertrophie ist die Reaktivierung des fetalen Genprogramms³². Dies schließt die Expression von natriuretischen Peptiden (ANP, BNP) sowie eine Isoform-Verschiebung von sarkomeren und metabolischen Enzymen ein. Im fetalen Herzen wird der Großteil der Energie aus Kohlenhydraten gewonnen. Kurz nach der Geburt verschiebt sich die Energiegewinnung jedoch in Richtung der Fettsäuren^{33,34}. Bei Herzinsuffizienz kommt es zur Reaktivierung der fetalen metabolischen Genexpression, da der Sauerstoffverbrauch zur Energiegewinnung in der Glykolyse geringer als in der beta-Oxidation ist³⁵⁻³⁷. Die Signalwege, die zur Aktivierung der Herzinsuffizienz führen sind analog denen der pathologischen Hypertrophie (s. oben, Abb. 5). Dabei nimmt der Calcium-Signalweg eine Schlüsselrolle ein. Viele dieser Signalwege enden bei den transkriptionellen Regulatoren MEF2, NFAT und GATA4¹⁴.

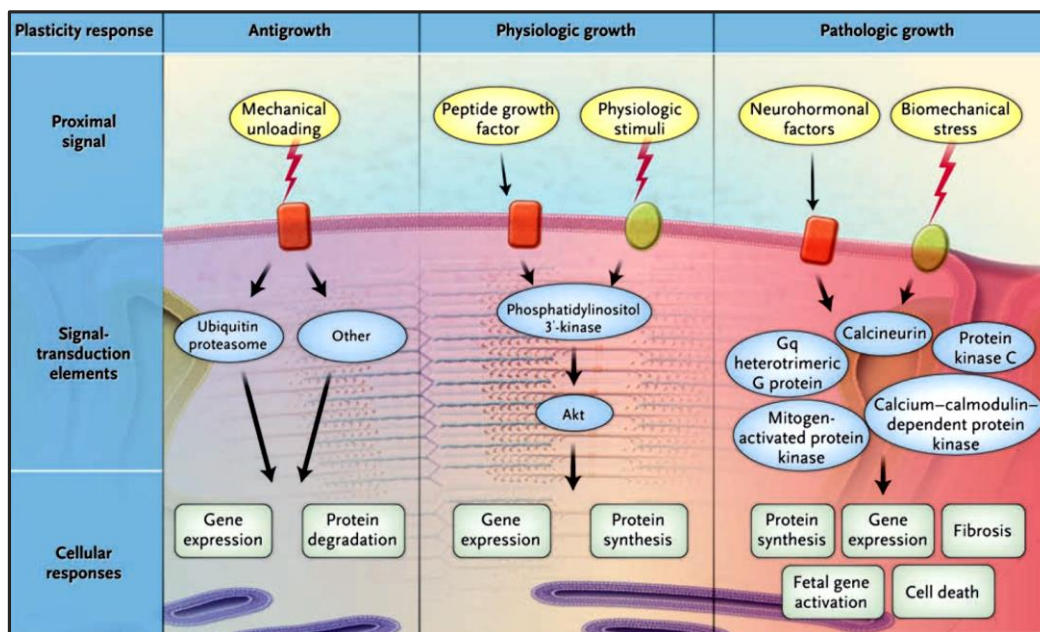


Abbildung 5: Signalwege, die physiologische und pathologische Veränderungen des Herzens verursachen (nach Hill et al.¹⁾)

Diese intrazellulären Signalwege aktivieren die Transkription von Genen, die das Wachstum und den Umbau des Herzens steuern. Trotz der Komplexität dieser Signalwege verläuft die Signaltransduktion über eine begrenzte Anzahl von Knotenpunkten – an der Zelloberfläche, im Zytoplasma und im Zellkern – und ermöglicht dadurch therapeutische Interventionen. Dabei führt eine Aktivierung des Ubiquitin-Proteasom-Systems zu einer Atrophie, während die Insulin/IGF-1 Signaltransduktion ein prominenter Aktivator des physiologischen Wachstums des Herzens ist. Einer der wichtigsten Faktoren in der Entstehung der pathologischen Hypertrophie ist der Calcium-Signalweg, der unter anderem durch das heterotrimere G-Protein G_q vermittelt wird. Ein Kennzeichen für pathologisches Wachstum stellt dabei die Reaktivierung des fetalen Genprogramms dar.

2.2 Die Rolle von Wachstumsfaktoren im Herzen

Die Aufschlüsselung der Mechanismen, denen die Entwicklung, Differenzierung und das Wachstum des Herzens zugrunde liegen, führte zur Identifizierung einer Vielzahl an Wachstumsfaktoren. Wachstumsfaktoren sind sekretierte Polypeptide, die autokrin und/oder parakrin wirken und eine Vielzahl an physiologischen Prozessen beeinflussen. Traditionell wurde Wachstumsfaktoren eine Wirkung auf die Zellproliferation und Differenzierung zugeschrieben.

Wachstumsfaktoren können aufgrund ihrer Rezeptorbindung klassifiziert werden. Dabei unterscheidet man diejenigen, die an Rezeptor-Tyrosin-Kinasen binden, wie FGF (*fibroblast growth factor*), EGF (*epidermal growth factor*), HGF (*hepatocyte growth factor*), IGF (*insulin-like growth factor*), Insulin oder VEGF (*vascular endothelial growth factor*) von denjenigen, die an Serin/Threonin-Rezeptoren binden, wie die Mitglieder der TGF- β Familie³⁸ (s. Abb. 6). Die Bindung an Rezeptor-Tyrosin-Kinasen aktiviert eine Vielzahl an Signalmolekülen, die mit Hypertrophie assoziiert sind. Dazu zählen die Proteinkinase Akt, die MAPK und ERK Kaskade³⁸ (s. Abb. 6). Im Gegensatz dazu aktiviert TGF- β unter anderem die Kollagen Expression über TAK1 und Smads³⁹. Desweiteren wird schon anhand der Nomenklatur deutlich, dass die verschiedenen Familien von Wachstumsfaktoren oft einen spezifischen Zelltyp beeinflussen.

Die TGF- β Superfamilie besteht aus TGF- β , Aktivinen, Inhibinen, GDFs (*growth and differentiation factors*) und BMPs (*bone morphogenetic proteins*). Sie beeinflussen Zellwachstum, Differenzierung, Proliferation, Migration, Adhäsion, Apoptose und die Produktion der extrazellulären Matrix^{40,41}. Sämtliche Mitglieder der Superfamilie besitzen eine Cystein-Knoten-Struktur aus mindestens 6 Cystein-Resten, die über Disulfidbrücken verbunden sind⁴², und werden in einer Präproform synthetisiert, die mehrere Prozessierungsschritte durchlaufen muss. Die, durch die proteolytische Prozessierung, aktivierten Mitglieder der TGF- β Familie binden dann an einen heteromeren Serin/Threonin-Rezeptor, wodurch sowohl Smad-abhängige als auch Smad-unabhängige Signalwege aktiviert werden⁴³.

In den letzten Jahrzehnten zeigten viele Publikationen, dass das Herz von einer Vielzahl an Wachstumsfaktoren, die dessen normales und hypertrophes Wachstum beeinflussen, reguliert wird^{44,45}. So werden Wachstumsfaktoren durch hypertrophe Stimulierung und Stresszustände in verschiedenen Zelltypen des Herzens, u.a. in Kardiomyozyten, Fibroblasten, vaskulären Zellen und Vorläuferzellen verstärkt produziert und sekretiert^{4,46-50}. Sie werden zur Aufrechterhaltung der normalen Herzfunktion benötigt und kontrollieren den pathologischen Umbau des Herzens nach Herzschädigung. Dabei modulieren sie unter anderem Apoptose, Aktivierung der Fibroblasten, Entzündungsantworten und Angiogenese^{50,51}. In Analogie dazu wurde ihre Aktivierung mit einer Vielzahl an Herzerkrankungen assoziiert, was auf eine endogene kardioprotektive Funktion hindeutet³⁸. Dabei beeinflussen Wachstumsfaktoren sowohl die Kontraktilität des Herzens, als auch die extrazelluläre Matrix. Unter pathologischen Zuständen produzieren Herzzellen beispielsweise TGF- β 1, wodurch das Herz durch Hypertrophie und Fibrose umgebaut wird⁵². Desweiteren wurde mehreren Wachstumsfaktoren, unter anderem IGF, HGF, Endothelin-1, FGF und TGF, eine protektive Wirkung gegen oxidativen Stress und Apoptose zugeschrieben⁵³. In Analogie dazu wirkt die exogene Gabe verschiedener Wachstumsfaktoren kardioprotektiv, z.B. nach akuten Ischämie-Reperfusionsschäden³⁸. Die Tatsache, dass vielen Wachstumsfaktoren eine kardioprotektive Rolle

zugewiesen wird ist besonders auch im Hinblick auf therapeutische und diagnostische Zwecke Grundlage einer Vielzahl an wissenschaftlichen und klinischen Studien.

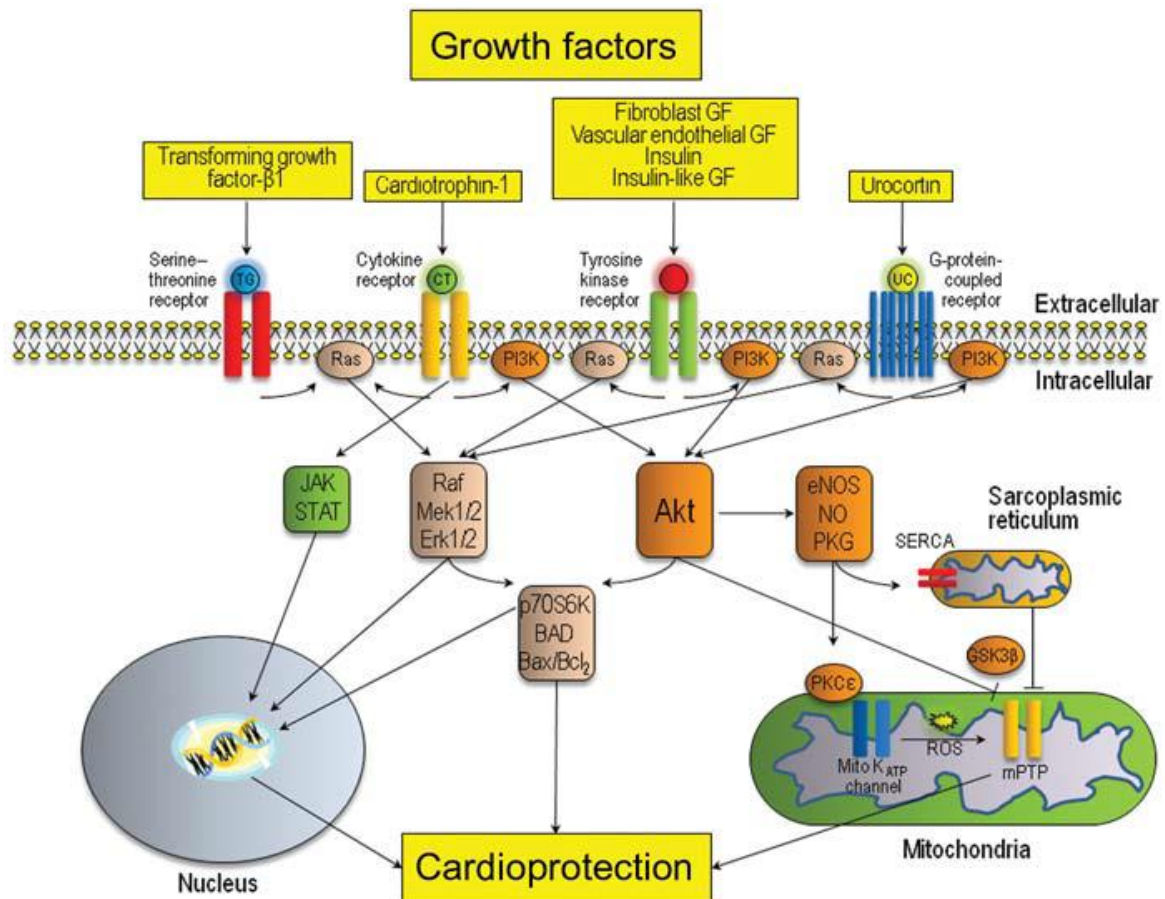


Abbildung 6: Kardioprotektive Wachstumsfaktoren und ihre Signalwege (nach Hausenloy und Yellon ³⁸)

Übersicht über die intrazellulären Signaltransduktionswege der Wachstumsfaktoren TGF-β1, Cardiotrophin-1, FGF, VEGF, Insulin, IGF und Urocortin. Deren Bindung an ihren spezifischen Rezeptor aktiviert intrazelluläre Signalkaskaden, einschließlich der Raf-Ras-Mek1/2-Erk1/2 und PI3K-Akt Kaskade sowie den RISK und JAK-STAT Signalweg und verschiedene anti-apoptotische Mechanismen.

2.3 Myostatin – ein Repressor des Muskelwachstums

Myostatin (oder GDF-8: *growth and differentiation factor 8*) ist ein Mitglied der TGF- β Superfamilie von Wachstumsfaktoren und einer der wichtigsten negativen Regulatoren des Skelettmuskelwachstums. Sein großer inhibitorischer Effekt auf Muskelhypertrophie und Hyperplasie wurde 1997 in der Maus entdeckt⁵⁴ (s. Abb. 7 C). Diese hochkonservierte Funktion von Myostatin wurde auch in anderen Spezies wie Kühen⁵⁵⁻⁵⁷ (s. Abb. 7 A), Hunden⁵⁸, Schafen⁵⁹, Zebrafisch⁶⁰, Rennpferden⁶¹ und sogar Menschen⁶² (s. Abb. 7 F) bestätigt. Desweiteren zeigen Mäuse, in denen die Myostatin Prozessierung^{63,64} oder Signaltransduktion⁶⁵ gehemmt wurde ebenfalls eine vergrößerte Muskelmasse, während die Überexpression von Myostatin zu einer dramatischen Atrophie führt^{66,67}. Dies bestätigt die zentrale Rolle von Myostatin in der Inhibierung des Skelettmuskelwachstums.

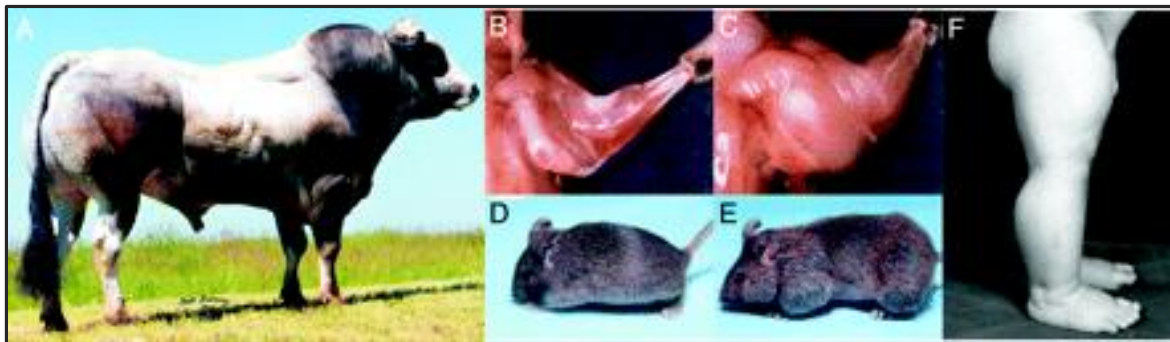


Abbildung 7: Phänotypen nach Myostatin Mutationen oder knockout (nach Rodgers et al.⁶⁸)

(A) Muskelhypertrophie in Piemonteser Rindern aufgrund einer Punktmutation im 3. Exon des bovinen Myostatin-Gens⁵⁵. (B-C) Vordere Armmuskulatur von Wildtyp (B) und konstitutiven Myostatin *knockouts*⁵⁴. (D-E) Repräsentative Wildtyp (D) und Follistatin transgene Mäuse (E)⁶⁹. (F) Beinmuskulatur eines 7 Monate alten Jungen mit einer Myostatin Null-Mutation innerhalb der Spleißdonorseite von Exon 1 des Myostatin-Gens⁶².

Eine zu Beginn der Forschung an Myostatin durchgeführte Northern Blot Analyse von verschiedenen Mausgeweben zeigte, dass Myostatin hauptsächlich in der Skelettmuskulatur und zu einem deutlich geringeren Anteil auch in Fettgewebe enthalten ist⁵⁴. Dabei ist Myostatin schon im Myotom ab P 9.5 exprimiert⁵⁴. Durch spätere RT-PCR Analysen konnte das Myostatin Transkript jedoch auch im Herzen⁷⁰ und in Brustdrüsen⁷¹ detektiert werden. Desweiteren zeigte eine genomweite Untersuchung des Mausgehirn-Transkriptomts mehrere Regionen, in denen Myostatin exprimiert wird^{72,73}. Interessanterweise ist das Expressionsmuster in Fischen und Hühnern deutlich weniger limitiert⁶⁸.

Die biologische Funktion von Myostatin ist nicht auf die Inhibierung des Skelettmuskelwachstums beschränkt. Der konstitutive Myostatin *knockout* zeigt einen geringeren Körperfettanteil und entwickelt, auch in Verpaarung mit genetischen Adipositas-Modellen, keine Fettleibigkeit^{74,75}. Desweiteren zeigen diese Mäuse eine verbesserte Insulinsensitivität, wodurch die Hemmung von Myostatin zur Behandlung von Typ II Diabetes interessant wurde^{75,76}.

Myostatin ist ein sekretiertes Hormon, das außergewöhnlich gut konserviert ist ⁵⁵. Die C-terminalen Domänen der Myostatin Proteinsequenz (das reife und aktive Myostatin Protein) sind in Menschen, Mäusen, Ratten, Schweinen, Hühnern und Truthähnen identisch. Ähnliche Sequenzen wurden auch in verschiedenen Fischen gefunden ⁶⁸. Innerhalb der GDF-Familie (*Growth and Differentiation Factor*) bildet Myostatin eine Untergruppe mit GDF-11 (s. Abb. 8). Dabei sind die Aminosäuren der carboxyterminalen Domäne von Myostatin und GDF-11 zu 90% identisch ⁷⁷.

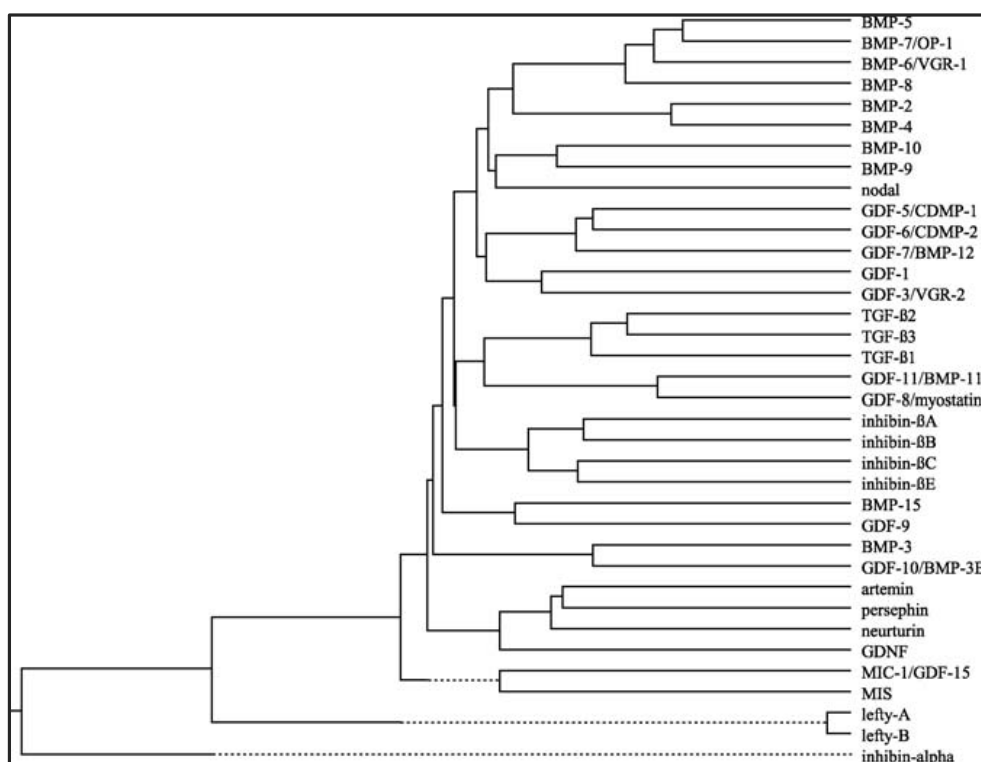


Abbildung 8: Sequenzvergleich von Mitgliedern der TGF- β Familie (nach Lee ⁷⁷)

2.3.1 Aufbau, proteolytische Prozessierung und Regulation von Myostatin

Myostatin wurde 1997 in einem *Screening* nach neuen Mitgliedern der TGF- β Superfamilie entdeckt ⁵⁴. Das Myostatin Gen liegt auf Chromosom 2 in Menschen ⁷⁸, Schimpansen, Kühen ^{56,57,79} und Schafen ⁸⁰ und auf Chromosom 1 in der Maus ⁸¹. Myostatin ist ein relativ kleines Gen (7.8 kb), welches aus drei ungefähr gleich großen Exons, die durch zwei Introns separiert werden, aufgebaut ist. Dabei kodiert Exon 3 für das reife Myostatinpeptid und die proteolytische Prozessierungsstelle in sämtlichen untersuchten Spezies ⁶⁸. Nach der Translation entsteht ein 376 Aminosäure großes Protein.

Die Proteinsequenz enthält alle Merkmale, die für Mitglieder der TGF- β Familie typisch sind. Dies schließt eine Signalsequenz für die Sekretion, proteolytische Prozessierungsstellen und eine carboxyterminale Region, die ein konserviertes Muster von neun Cysteinresten enthält, ein ⁵⁴. Dieses 376 Aminosäuren umfassende inaktive Vorläuferprotein besteht aus einer kurzen Signalsequenz,

einer N-terminalen Propeptidomäne und einer carboxyterminalen Domäne (s. Abb. 9 a) ^{54,69} und wird als Präpromyostatin bezeichnet. Dabei ist die Signalsequenz für die Prozessierung und Sekretion von Bedeutung, während die Propeptidregion die biologische Aktivität und vermutlich auch die richtige Faltung des aktiven Myostatins reguliert ⁷⁷. Die carboxyterminale Domäne bildet später das aktive Myostatin, welches vermutlich analog zu anderen Mitgliedern der TGF- β Familie eine Cystein-Knoten-Struktur ausbildet ⁷⁷.

Um das aktive Myostatin zu generieren sind zwei proteolytische Prozessierungen nötig. Im ersten Schritt wird durch Furine das 24-Aminosäuren umfassende Signalpeptid abgespalten ⁷⁷ (s. Abb. 9 a). Dabei bildet sich das sogenannte Promyostatin. Danach kommt es zur proteolytischen Prozessierung an der RSRR-Stelle ⁸² (s. Abb. 9 a). Die dafür verantwortliche Proteinase ist noch nicht identifiziert. Es könnte sich jedoch aufgrund der dibasischen Schnittstelle um PACE (*paired dibasic amino acid-cleaving enzyme*) handeln ⁷⁷. In vitro wurde gezeigt, dass PACE in der Lage ist das Myostatin Vorläuferprotein an der RSRR-Stelle zu spalten ^{69,83}. Dies führt zur Bildung einer N-terminalen auch Propeptid genannten (27,6 kDa) und einer C-terminalen Domäne (12,4 kDa) ⁷⁷ (s. Abb. 9b). Nach dieser Spaltung bilden das Propeptid und das reife Myostatin eine nicht-kovalente Bindung, die das reife Myostatin inaktiviert ^{67,69,82,83} (s. Abb. 9b). Dabei liegen sowohl das reife Myostatin allein als auch die Proform als, über Disulfid-Brücken verbundene, Dimere vor (s. Abb. 9 b). Zur Aktivierung von Myostatin muss das Propeptid N-terminal zu Aspartat 76 durch Mitglieder der BMP-1/Tolloid Metalloproteinasen gespalten werden ⁸² (s. Abb. 9 c). Dies führt dann zur Dissoziation des latenten Komplexes und zur Freisetzung des aktiven C-terminalen Dimers, welches im Folgenden als Myostatin bezeichnet wird (s. Abb. 9 c).

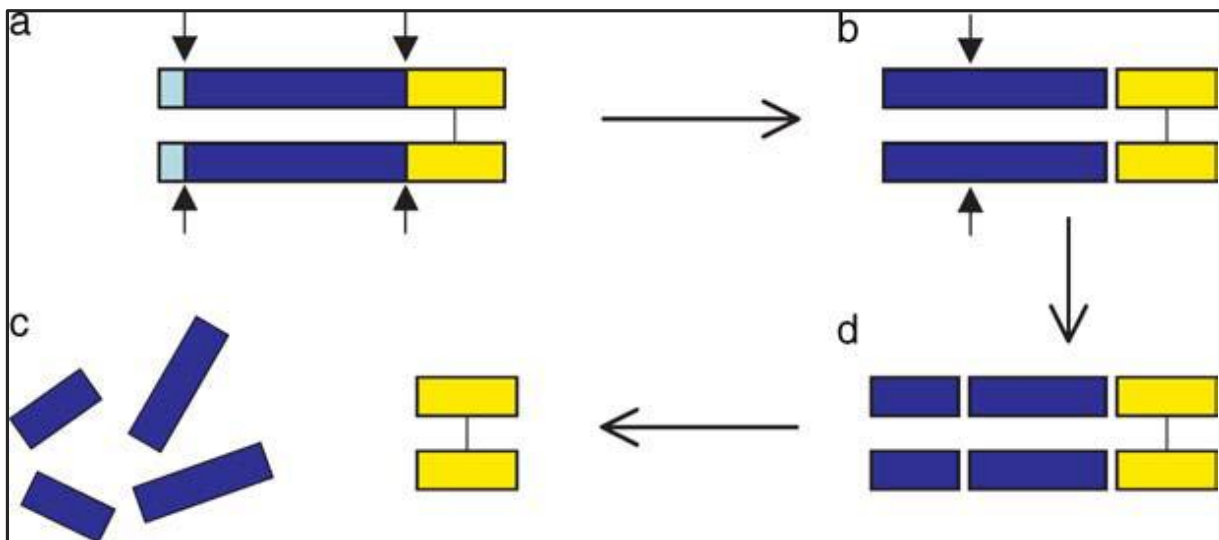


Abbildung 9: Proteolytische Prozessierung von Myostatin (nach Lee ⁷⁷)

Myostatin wird in einer Vorläuferform synthetisiert, die zwei proteolytischen Prozessierungen unterliegt. (A) Im ersten Schritt wird die N-terminale Signalsequenz (hellblau) abgespalten, danach das C-terminale Fragment, welches die Rezeptorbindende Aktivität besitzt (gelb). (B) Nach der proteolytischen Prozessierung bleiben das Propeptid (blau) und das Disulfid-verbundene C-terminale Dimer (gelb) nicht-kovalent in einem latenten Komplex gebunden. (B-D) Die Aktivierung des latenten Komplexes erfolgt durch Spaltung des Propeptids durch Mitglieder der BMP-1/Tolloid Metalloproteinasen. Dies führt zur Dissoziation des latenten Komplexes.

Myostatin wird hauptsächlich als ungespaltenes Promyostatin im Skelettmuskel sekretiert. Im Anschluss wird es mit Hilfe von LTBP-3 und kovalenter Bindung an die extrazelluläre Matrix im Skelettmuskel gehalten⁸⁴. Im Gegensatz dazu liegt Myostatin im Serum schon in latenter Form durch Bindung an sein Propeptid vor^{67,85}. Es wurde auch gezeigt, dass die Myostatin Prodomäne die Rezeptorbindung und Aktivierung von Myostatin hemmt^{69,83,86}. Desweiteren führt eine transgene Überexpression der Prodäme in der Maus zu einer Phänokopie des konstitutiven *knockouts*^{64,69}.

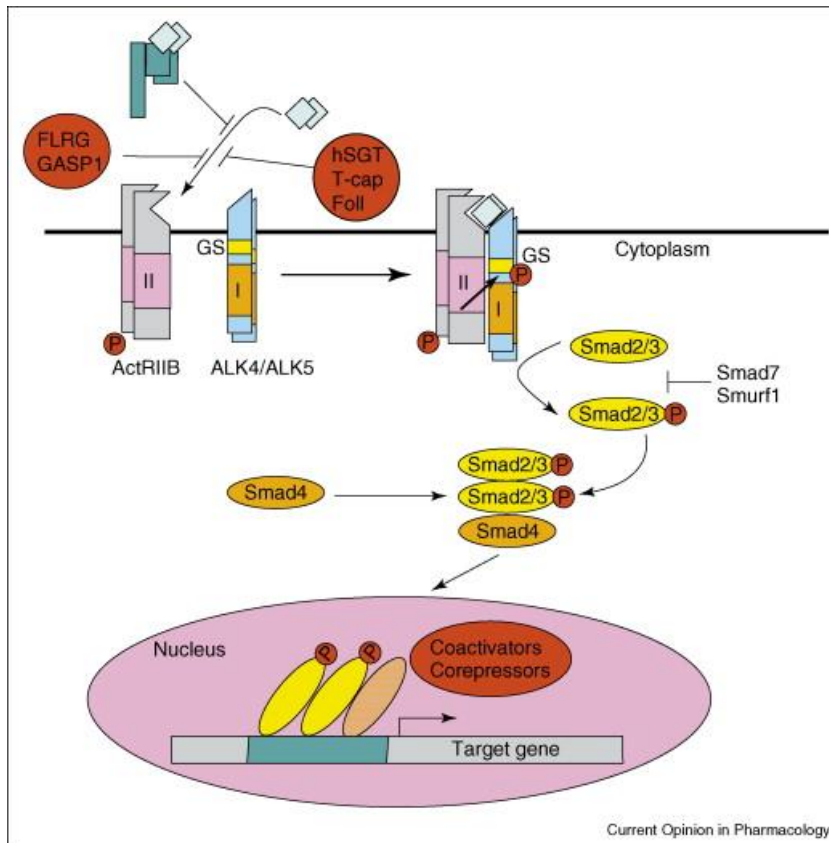
Neben dem Propeptid liegt Myostatin im Serum und der Skelettmuskulatur im Komplex mit mehreren Proteinen vor, die seine Aktivierung, Sekretion oder Rezeptorbindung inhibieren⁸⁷. Zu diesen Proteinen gehören Follistatin⁶⁹, FSTL-3⁸⁶, GASP-1⁸⁸, T-cap⁸⁹ und hSGT⁹⁰. Transgene Mäuse, die humanes Follistatin überexprimieren, phänokopieren ebenfalls den konstitutiven Myostatin *knockout*⁶⁹, während der Verlust von Follistatin zu perinatalem Tod und einer reduzierten Muskelmasse bei der Geburt führt⁹¹ (s. Abb. 7 D-E).

Die Regulierung von Myostatin kann auch durch Aktivierung oder Repression des Myostatin Promoters stattfinden. So wird die Transaktivierung von Myostatin durch den aktivierten Glukokortikoid-Rezeptor⁹² und MEF2⁹³ im Menschen und durch MyoD^{93,94} und Myf5 in Maus und Kuh stimuliert. Neuere Studien zeigen, dass auch FOXO1 und Smad2, -3 und -4 die Myostatin Expression direkt stimulieren können⁹⁵. Desweiteren enthält der Myostatin Promoter eine putative PPAR γ und NF κ B Bindestelle⁹². Eine Unterdrückung der Myostatin Expression wird durch die miRNAs miR-208a⁹⁶, miR-27a⁹⁷ und miR-499⁹⁸ ermöglicht.

2.3.2 Signaltransduktion von Myostatin

Sämtliche Mitglieder der TGF- β Familie binden an membrangebundene, heteromere Serin-Threonin-Kinase-Rezeptoren die aus zwei Typ 1 und zwei Typ 2 Rezeptoren bestehen⁹⁹. Im Falle von Myostatin bindet das aktive C-terminale Myostatin-Dimer zuerst an den Aktivin Rezeptor Typ II B (ActRIIB), welcher dann entweder mit dem Typ I Rezeptor ALK4 oder ALK5 heterodimerisiert¹⁰⁰ (s. Abb. 10). Das C-terminale Dimer bindet auch, jedoch mit einer niedrigeren Affinität, an den ActRIIA Rezeptor⁶⁹. Die Aktivierung der Rezeptoren führt zur Transphosphorylierung des Typ I Rezeptors in der intracytoplasmatischen Domäne und stimuliert dadurch dessen Serin/Threonin-Kinase Aktivität¹⁰¹. Neben Myostatin können auch Aktivin-A und GDF-11 an den ActRIIB binden. Es wurde gezeigt, dass eine transgene Überexpression einer dominant-negativen Form des ActRIIB, der die Kinase-Domäne fehlt, zu einer dem Myostatin *knockout* ähnlichen Hypermuskularität führt⁶⁹. Außerdem wurde die Spezifität zum Rezeptor durch *Crosslinking* Studien mit transient überexprimierten Rezeptoren in Zelllinien, die den Rezeptor nicht exprimieren, und Radiorezeptor Assays bestätigt^{69,100}. Der aktivierte Typ I Rezeptor (im Falle von Myostatin ALK4 oder ALK5) phosphoryliert und aktiviert dann die regulatorischen Smads Smad2 und 3^{69,100} (s. Abb. 10). Smads sind Transkriptionsfaktoren, die für die Signaltransduktion von TGF- β Liganden in den Zellkern verantwortlich sind. Dabei oligomerisieren Smad2 und 3 mit dem Co-Smad Smad4, translozieren zum Zellkern und regulieren dort die Genexpression (s. Abb. 10). Obwohl Smads selbst eine intrinsische DNA-bindende Aktivität besitzen, können sie auch mit DNA-bindenden Kofaktoren wie p300, TGIF, c-Ski und Evi-1 assoziieren¹⁰². Desweiteren können inhibitorische SMADs, im Falle von Myostatin Smad7, an den aktivierten Rezeptor binden und dadurch die Bindung und Aktivierung der regulatorischen SMADs verhindern¹⁰³.

¹⁰⁵. I-SMADs konkurrieren außerdem mit Co-SMADs um die Interaktion mit den regulatorischen Smads und verhindern dadurch die Ausbildung des zur Signaltransduktion notwendigen Smad-Komplexes ¹⁰⁶. Die Myostatin Signaltransduktion wird außerdem durch Smurf1, eine SMAD-spezifische E3 Ubiquitin Ligase, gehemmt ¹⁰⁷ (s. Abb. 10).



Inaktives Myostatin liegt im Serum oder lokal an FLRG, GASP-1, hSGT, T-Cap, Follistatin oder sein Propeptid gebunden vor. Das aktive Myostatin Dimer bindet an den Aktin Rezeptor II (ActRIIB), welcher dann den Typ I Rezeptor (ALK4 oder ALK5) rekrutiert und transphosphoryliert. Dies führt zur Aktivierung von Smad2 und Smad3. Diese oligomerisieren mit Smad4, translozieren in den Zellkern und regulieren die Genexpression. Dieser Signalweg wird durch Smad7 und Smurf1 gehemmt.

Abbildung 10: Signaltransduktion von Myostatin (nach Joulia-Ekaza et al. ⁸⁷)

In den letzten Jahren wurden mehrere neue Zielmoleküle von Myostatin entdeckt. Dabei ist jedoch in der Mehrzahl der Fälle der Mechanismus noch nicht identifiziert. So ist Myostatin *in vitro* in der Lage, die Proteinkinase B/Akt sowie mTor zu inhibieren ¹⁰⁸⁻¹¹¹. Desweiteren scheint der MAPK Signalweg in die wachstumshemmenden Effekte von Myostatin involviert zu sein ¹¹²⁻¹¹⁴.

Außerdem wurde gezeigt, dass Myostatin die Proliferation von Myoblasten und Satellitenzellen durch Hochregulation von p21 ¹¹⁵ und Hemmung von CDK2, Rb und Wnt4 inhibiert ¹¹⁶⁻¹¹⁸. Dies führt zu einer Hemmung des Übergangs von der G1 in die S-Phase des Zellzyklus. Die myogene Differenzierung wird von Myostatin durch Herunterregulation verschiedener myogener Regulatoren wie MyoD, Myogenin und Myf5 erreicht ¹¹⁹⁻¹²¹. Dies könnte die Hyperplasie im konstitutiven Myostatin *knockout* erklären.

2.3.3 Inhibierung von Myostatin zu therapeutischen Zwecken

Wie zuvor aufgeführt verursacht die Deletion von Myostatin eine dramatische Hypertrophie und Hyperplasie (s. 2.2). Dabei sind individuelle Muskeln des konstitutiven *knockouts* 200-260% größer als in Wildtypen⁵⁴ (s. Abb. 7 B, C). Außerdem ist die Regeneration der Skelettmuskulatur im konstitutiven Myostatin *knockout* nach Schädigung verbessert^{122,123}. Im Gegensatz dazu führt eine Überexpression bzw. die systemische Gabe von Myostatin direkt zu Muskelschwund^{66,67,124}. Diese Ergebnisse führten dazu, dass die pharmakologische Inhibierung von Myostatin für die Behandlung von Muskelschwund und Sarkopenie interessant wurde¹²⁵.

Muskelschwund tritt nicht nur in einer Vielzahl von Dystrophien auf, sondern auch nach Immobilität und chronischen Erkrankungen wie Niereninsuffizienz, Tumor-Kachexie und AIDS¹²⁶. Interessanterweise wurde eine Hochregulation von Myostatin in Muskeln von Patienten, die längere Zeit bettlägerig waren, in AIDS-Patienten mit Muskelschwund, Kachexie-Patienten und nach Niereninsuffizienz, detektiert^{78,127-129}. Eine Hemmung von Myostatin inhibiert auch die Entstehung von Muskelatrophie in einem Mausmodell für Krebs-Kachexie¹³⁰ und verbessert die Muskelregeneration durch Aktivierung von Satellitenzellen¹³¹. Außerdem wurde gezeigt, dass die Inhibierung der Myostatin Signaltransduktion die Skelettmuskelpathologie sowie die funktionelle Kapazität im Diaphragma von mdx Mäusen, einem Modell für Duchenne Muskeldystrophie, verbessert^{125,132-136}. Die Hemmung von Myostatin reduziert auch die Fibrose in mdx Mäusen. Jedoch wurden klassische Zeichen einer andauernden Degeneration und Regeneration, wie zentrale Zellkerne, immer noch gefunden. In konstitutiven δ -Sarkoglykan *knockouts*, einem Modell für Gliedergürteldystrophie verbesserte der Verlust der Myostatin Aktivität die Muskelmasse, Regeneration und Fibrose, jedoch leider nicht in alten Mäusen¹³⁷. Momentan wird unter anderem die Gabe eines löslichen ActRIIB Fragmentes untersucht. Dieses scheint zumindest die Muskelmasse in einem Gliedergürteldystrophie-Modell zu erhöhen¹³⁸. Auch verhindert die Hemmung des ActRIIB-Weges die Entwicklung von Muskelschwund in verschiedenen Tumormäusen¹³⁹⁻¹⁴¹. Ein anderer Ansatzpunkt ist die gentherapeutische AAV-vermittelte Gabe eines Myostatin Propeptids¹⁴²⁻¹⁴⁴, die Elektroporation mit Myostatin shRNA¹⁴⁵ und die Gabe von siRNA-haltigen Nanopartikeln¹⁴⁶. Die Verwendung eines neutralisierenden Antikörpers (Myo-029) wurde nach Phase II eingestellt (www.clinicaltrials.gov NCT00104078). Im Gegensatz zu den obigen Ergebnissen konnte die Inhibierung von Myostatin im Mausmodell einer Laminin-defizienten kongenitalen Muskeldystrophie, einer sehr schweren und lethalen Dystrophie, die Muskelpathologie nicht verbessern und führt sogar zu einer gesteigerten postnatalen Lethalität¹⁴⁷. Passend dazu zeigten Amthor et al., dass die Muskeln von konstitutiven Myostatin *knockouts* zwar größer, aber schwächer sind als die der Kontrollen¹⁴⁸.

Da die Deletion von Myostatin auch zu einer verringerten Fettmasse führt^{74,149}, scheint eine Inhibierung auch im Hinblick auf Adipositas und Typ II Diabetes interessant. Dabei zeigen erste Studien, dass eine Hemmung von Myostatin die Entstehung von Adipositas verhindern und die Insulinsensitivität und Glukosetoleranz verbessern kann^{74,150-153}.

Momentan werden 15 klinische Studien zur Inhibierung von Myostatin im Menschen in der NIH Datenbank (www.clinicaltrials.gov) aufgeführt.

2.3.4 Die gewebsspezifische Funktion von Myostatin im Herzen

Myostatin ist hauptsächlich im Skelettmuskel exprimiert, jedoch auch zu einem geringeren Anteil im Herz⁷⁰ und Fettgewebe⁵⁴. Die physiologischen und pathophysiologischen Funktionen von Myostatin im Herzen sind jedoch, im Gegensatz zur Skelettmuskulatur, noch kaum untersucht.

Myostatin wird im Herzen hauptsächlich in Purkinje-Fasern und Kardiomyozyten und zu einem geringeren Anteil auch in der glatten Muskulatur der Koronararterien exprimiert⁷⁰. Dabei exprimieren fetale Kardiomyozyten (E18) sehr wenig Myostatin. Die Expression steigt jedoch dramatisch bis zum postnatalen Tag 10 an und fällt danach wieder ab¹⁵⁴. Somit ist die Myostatin Expression negativ mit dem Kardiomyozyten-Proliferationsindex korreliert. Innerhalb des Myokards ist Myostatin im linken Ventrikel sechsmal höher exprimiert als im rechten Ventrikel¹⁵⁵.

Interessanterweise wird Myostatin nach verschiedenen pathologischen Bedingungen im Herzen wie Herzinfarkten in Schafen⁷⁰, nach verschiedenen Arten der Herzinsuffizienz in Ratten und Patienten¹⁵⁶⁻¹⁵⁹ oder mechanischer Dehnung¹⁶⁰ über einen Zeitraum von bis zu 30 Tagen hochreguliert. Außerdem handelt es sich bei Myostatin um eines der am stärksten hochregulierten Gene in Herzen von herzspezifischen Akt Überexpressionsmäusen, einem Modell für physiologische Hypertrophie¹⁶¹. Myostatin wird ebenfalls nach Kardiomyozyten Stress¹⁶², kongenitalen Herzerkrankungen¹⁶³ und chronischer alkoholischer Kardiomyopathie¹⁶⁴ aktiviert. Dies könnte auf eine Funktion von Myostatin in der Begrenzung des kompensatorischen Herzwachstums deuten.

Um die physiologische und pathophysiologische Funktion von Myostatin im Herzen zu identifizieren, wurde hauptsächlich der konstitutive Myostatin *knockout* verwendet. Überraschenderweise sind die Ergebnisse sehr unterschiedlich. So beobachteten zwei Studien keinerlei Effekt auf die Hypertrophie oder Herzfunktion in acht Wochen¹⁶⁵ und zwei Jahre¹⁶⁶ alten konstitutiven *knockouts*. Im Gegensatz dazu zeigten zwei andere Publikationen in sieben¹⁶⁷ und 13 Monate¹⁶⁸ alten konstitutiven Myostatin *knockouts* eine reduzierte Ejektionsfraktion, die Entwicklung einer exzentrischen Hypertrophie sowie Anzeichen einer dilatativen Kardiomyopathie. Aufgrund des, wegen der stark gesteigerten Muskelmasse, erhöhten Körpergewichts bezogen sie das Herzgewicht auf die Schwanzlänge über einen Zeitraum von 800 Tagen und beschrieben die Entstehung der Hypertrophie nach 100 Tagen. Artaza et al.¹⁶⁹ berichtete ebenfalls von einem erhöhten Herzgewicht in konstitutiven Myostatin *knockouts*, jedoch in sieben Wochen alten Mäusen und ohne Beeinträchtigung der Herzfunktion. Die einzige herzspezifische Deletion wurde von Heineke et al.¹⁷⁰ generiert. Dabei wurde Myostatin in der frühen Herzentwicklung unter der Kontrolle eines Nkx2.5-Cre Transgens deletiert. Diese Mäuse entwickelten keine Hypertrophie und zeigten keine Beeinträchtigung der basalen Herzfunktion.

In Mäusen, in denen Myostatin im Herzen¹⁷⁰ beziehungsweise im Herzen und Skelettmuskel^{66,169} überexprimiert wird, ist sowohl die Herzmasse als auch die Kardiomyozyten Proliferation reduziert. Desweiteren wurde keine funktionelle Beeinträchtigung beobachtet.

Vergleicht man diese gegensätzlichen Ergebnisse, auch im Hinblick auf die Verwendung von Myostatin Inhibitoren zu therapeutischen Zwecken, wird die Notwendigkeit einer Untersuchung der postnatalen Deletion und ihrer Auswirkungen auf die Herzfunktion und Hypertrophie deutlich.

2.4 IGF-1 – ein wichtiger Wachstumsfaktor im Skelett- und Herzmuskel

Im Gegensatz zu Myostatin ist IGF-1 einer der wichtigsten positiven Regulatoren des Muskel- und Knochenwachstums¹⁷¹. Desweiteren ist IGF-1 für die Entwicklung des zentralen Nervensystems und der Reproduktionsorgane wichtig. Vor über 50 Jahren wurde IGF-1 als Zielmolekül und Vermittler der Wirkung von Wachstumshormon GH (*growth hormone*) identifiziert und zuerst Sulfatierungsfaktor¹⁷², später dann Somatomedin C genannt. 5 Jahre später wurde ein Serumfaktor mit einer insulinartigen Aktivität identifiziert, der später als insulinähnlicher Wachstumsfaktor IGF-1 klassifiziert wurde und sich als identisch zu Somatomedin C herausstellte¹⁷³⁻¹⁷⁷.

Die elementare Funktion von IGF-1 wurde anhand verschiedener Mausmodelle untermauert. Dabei führt die konstitutive Deletion von *Igf-1* zu einer 50%igen Reduktion des Geburtsgewichtes (s. Abb. 11 A), wobei einige Mäuse direkt nach der Geburt sterben. Die überlebenden adulten Mäuse sind 70% kleiner, unfruchtbar und zeigen eine deutliche Unterentwicklung der Skelettmuskulatur und der Lungen (s. Abb. 11 A)¹⁷⁸⁻¹⁸¹. Dies weist Analogien zum konstitutiven *Igf-1r knockout* auf. Die Deletion des *Igf-1r* führt zu einem 55% reduzierten Geburtsgewicht und Hypoplasie der Muskeln. Dadurch ist die Muskelkraft nicht ausreichend um die Lungen aufzupumpen, wodurch die Mäuse kurz nach der Geburt sterben¹⁷⁸⁻¹⁸⁰. Der IGF-1 Mangel führt auch in Patienten zu schweren Wachstums- und Entwicklungsverzögerungen¹⁸². Entgegen der frühen Somatomedin-Hypothese verursacht eine leberspezifische Deletion, die zu einer Reduktion des Serum-*Igf-1* um 80% führt, keine Wachstums- und Entwicklungsdefizite sowie keine perinatale Lethalität¹⁸³. Dies spricht dafür, dass das hepatische IGF-1 nicht für Wachstum und Entwicklung verantwortlich ist. In Analogie zur Hypotrophie und Hypoplasie nach Deletion von *Igf-1* führt dessen Überexpression zu einem 30%igen Anstieg des Körpergewichts und einer Hypertrophie der Skelettmuskulatur¹⁸⁴⁻¹⁸⁸.

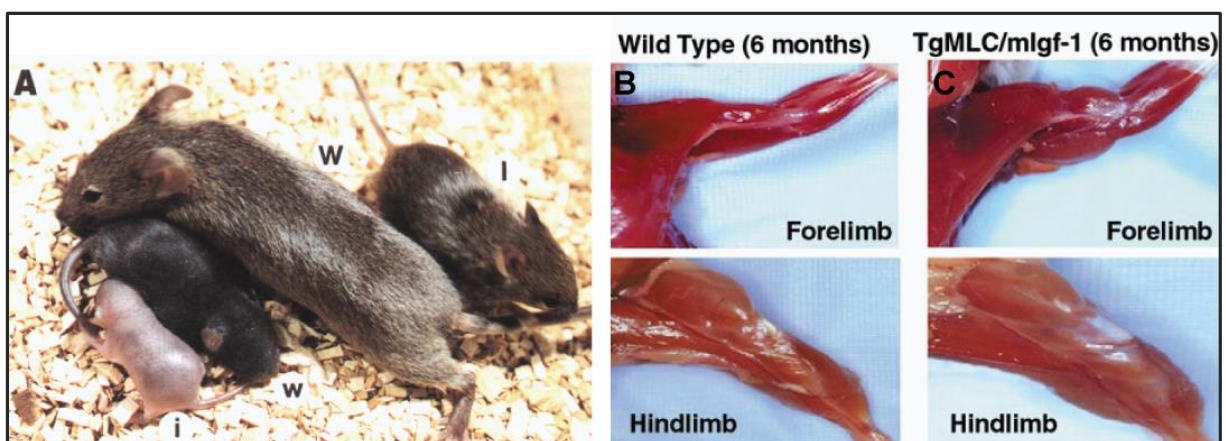


Abbildung 11: IGF-1 ein Hauptregulator des Muskel- und Knochenwachstums

(A) Darstellung eines Paares von 6 Tage und 2 Monate alten Geschwistern. w/W: Wildtyp, i/i; konstitutive *Igf-1* Mutanten¹⁷⁹. (B) Gehäutete Vorder- und Hinterlauf Muskulatur von 6 Monate alten Wildtypen (B) und muskelspezifischen *Mgf* überexprimierenden Mäusen (C)¹⁸⁹.

Das *Igf-1* (*insulin-like growth factor*) Gen ist relativ groß (größer als 70kb) und besteht aus 6 Exons, die von 5 Introns unterteilt werden (s. Abb. 12) ¹⁹⁰. In Exon 1 und Exon 2 sind mehrere Transkriptionsstartstellen enthalten. Exon 3 und 4 kodieren für das reife IGF-1 Peptid, während Exon 5 und 6 alternativ gespleißt werden können ¹⁹¹. Dabei entsteht durch Spleißen von Exon 4 zu Exon 6 systemisches *Igf-1* oder *Igf-1Ea*, welches die Hauptform darstellt und in der Leber und im Skelettmuskel produziert wird (s. Abb. 12). Desweiteren existieren im Menschen noch die *Igf1-EB* und *Igf1-EC* (oder MGF: *mechano growth factor*) Isoform. In der Maus existieren nur systemisches *Igf-1* und *Mgf*. Dabei entsteht *Mgf* durch Spleißen von Exon 4 zu Exon 5 und Exon 6 (s. Abb. 12). Den Namen verdankt *Mgf* seiner Hochregulation nach mechanischem Überdehnen ^{192,193}. *Mgf* wird hauptsächlich in der Skelett- und Herzmuskulatur exprimiert und wird um ein Vielfaches geringer exprimiert im Vergleich zu systemischem *Igf-1* ^{194,195}. Im Gegensatz zu MGF wird systemisches IGF-1 außerdem glykolysiert ¹⁹⁶. Dies schützt vor Proteolyse und erhöht dadurch die Halbwertszeit des systemischen IGF-1s. Desweiteren wird MGF auch nicht sekretiert und scheint nur lokal zu wirken ¹⁹⁷. Eine skelettmuskelspezifische Überexpression von *Mgf* steigert jedoch Muskelwachstum und Differenzierung, verhindert Muskelatrophie und verbessert die Regeneration nach Verletzungen (s. Abb. 11 B, C). Dabei ist MGF in die Aktivierung, Mobilisierung und Differenzierung von Satellitenzellen, welche eine wichtige Rolle in der Muskelregeneration spielen, involviert ^{189,198}.

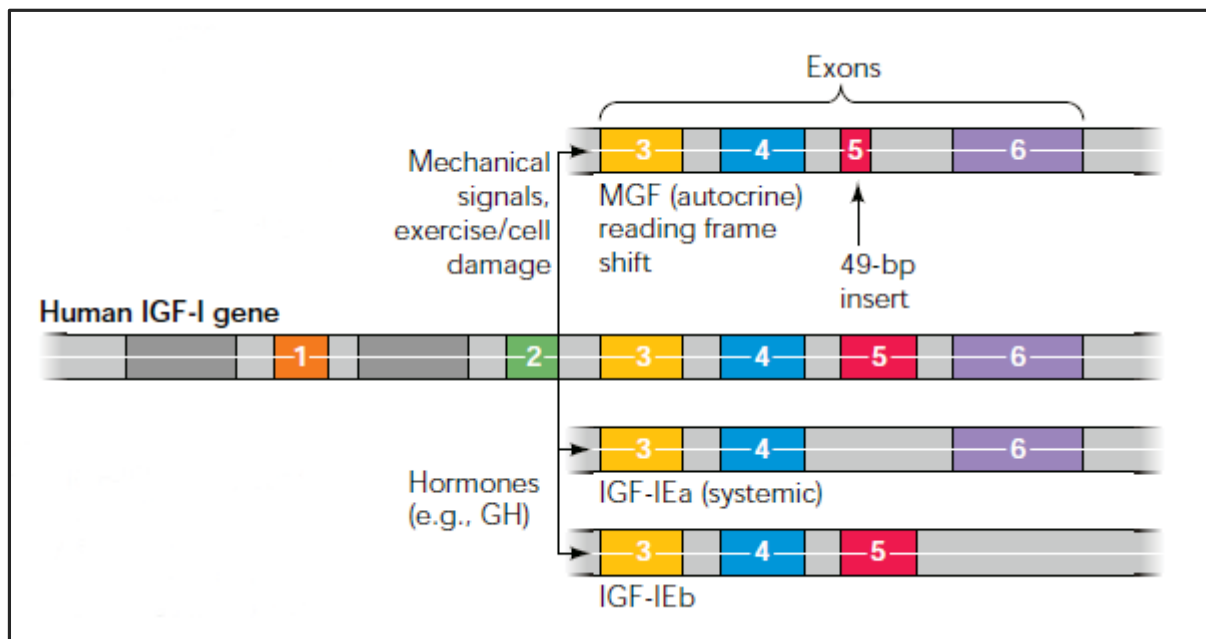


Abbildung 12: Alternatives Spleißen des *Igf-1* Gens (nach Goldspink ¹⁹⁹)

Das humane *IGF-1* Gen besteht aus sechs Exons und kann alternativ gespleißt werden. Dabei entstehen systemisches *IGF-1* (*IGF-1Ea*), *IGF-1Eb* und *MGF*. In der Maus existieren nur systemisches *Igf-1* und *Mgf*. Systemisches *IGF-1* entsteht durch Spleißen von Exon 4 zu Exon 6 und wird durch Hormone, unter anderem das Wachstumshormon GH hochreguliert. *MGF* entsteht durch Spleißen von Exon 4 zu Exon 5 und Exon 6 und wird durch mechanische Dehnung oder Zellschädigung aktiviert. Die Funktion der *IGF-1Eb* Isoform ist nicht bekannt.

Die zwei alternativen Spleißvarianten werden in zwei IGF-1 Vorläuferpeptide translatiert. Diese produzieren nach posttranslationaler Spaltung dasselbe reife IGF-1 Peptid sowie verschiedene E Peptide. Das reife IGF-1 ist ein 7,5 kDa großes Polypeptid und gehört zur Insulinfamilie. Dabei sind die

Aminosäuren von IGF-1 und Proinsulin 50% homolog²⁰⁰. Die insulin-ähnlichen Wachstumsfaktoren (*insulin-like growth factor*) IGF-1 und IGF-2 sind einkettige Polypeptide mit einer ähnlichen Sekundärstruktur mit drei α -Helices und drei Disulfidbrücken (s. Abb. 13 A, C)²⁰¹. Das reife IGF-1 Peptid besteht aus A, B, C und D Domänen. Dabei unterscheidet sich die Aminosäuresequenz des reifen Peptids durch eine Retention des C Peptids, eine kurze Verlängerung der A-Kette und das Vorhandensein von variablen C-terminalen E-Peptiden vom Insulin (s. Abb. 13 A, B)²⁰². Die hepatische IGF-1 Synthese wird hauptsächlich durch das Wachstumshormon GH, aber auch von Thyroxin, Kortisol, Östradiol und Testosteron kontrolliert^{203,204}.

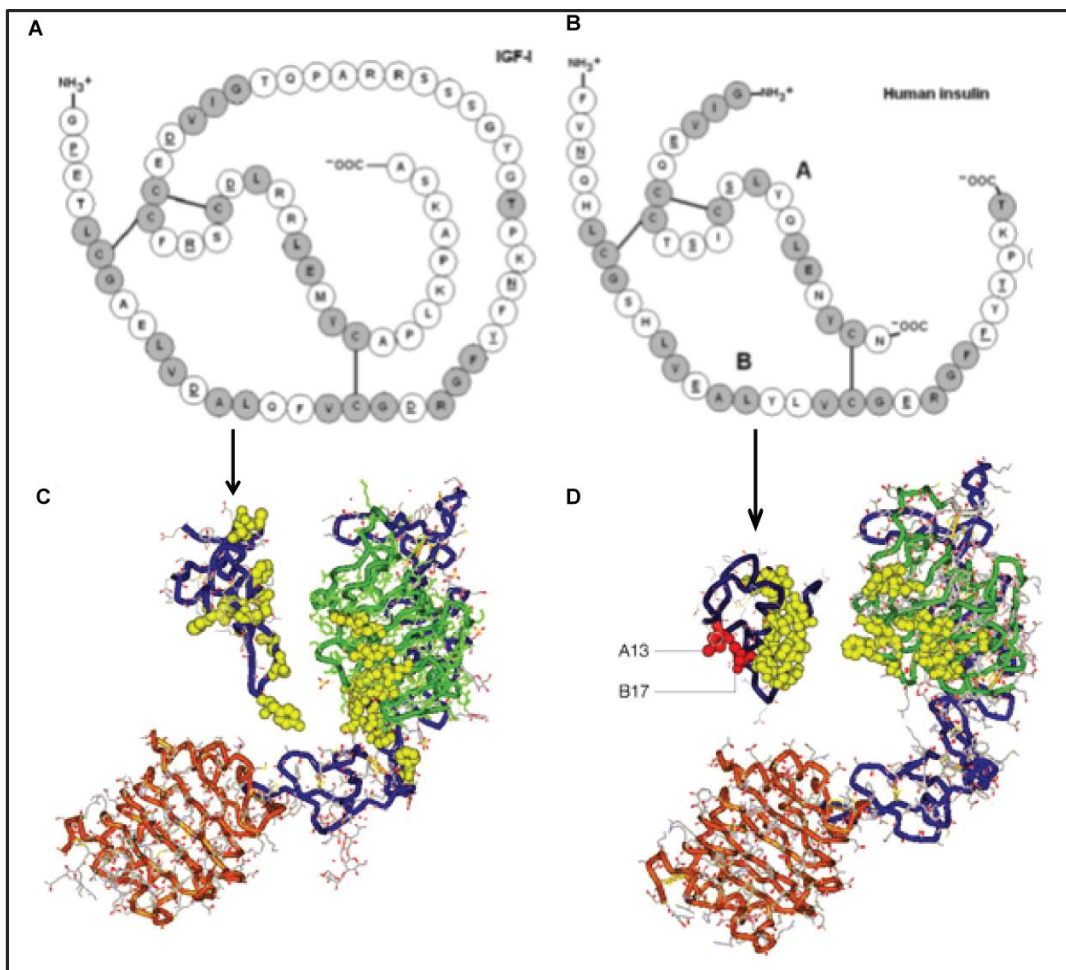


Abbildung 13: Strukturvergleich von IGF-1 und Insulin

(A-B) Aminosäuresequenz von IGF-1 (A) und humanem Insulin (B) unter Verwendung eines Ein-Buchstaben-Codes nach Rinderknecht und Humble¹⁷⁶. Die grau hinterlegten Aminosäuren sind in IGF-1 und humanem Insulin identisch. Unterstrichene Aminosäuren zeigen Reste, die in IGF-1 und nicht-humanem Insulin identisch sind. (C-D) Dreidimensionale Struktur von IGF-1 und IGF-1R (C) sowie Insulin und Insulin-Rezeptor (D) durch Röntgenkristallographie nach Meyts und Whittaker²⁰⁵.

IGF-1 wird in verschiedenen Geweben wie Leber, Skelettmuskel, Knochen, Herz, Niere, Ovarien, Testis, Pankreas, Gehirn und Lunge synthetisiert²⁰⁶. Dabei stammen 80% des sekretierten IGF-1 aus der Leber¹⁸³. IGF-1 ist ein endokrines Polypeptidhormon, wobei das extrahepatische IGF-1 auch

autokrin und parakrin wirkt²⁰⁷. Die Synthese wird nach Verletzungen^{208,209}, mechanischer Dehnung^{192,210} sowie Training²¹¹ verstärkt. Dabei stimuliert IGF-1 die Differenzierung²¹²⁻²¹⁴ und Proliferation und verändert die Transkription und Translation von Faktoren, die für das Wachstum oder die Differenzierung von Muskeln verantwortlich sind^{215,216}. So hemmt IGF-1 Myogenin und moduliert die Expression von MyoD, MEF2 und p21 zur Kontrolle der Differenzierung^{217,218}. Desweiteren hemmt IGF-1 die Expression von Atrogin-1 und MuRF-1, zwei E3-Ubiquitin-Ligasen²¹⁹, die in die Entstehung von Atrophie involviert sind.

Die Halbwertszeit von IGF-1 und die Interaktion mit dem IGF-1R wird durch eine Familie von sechs hochaffinen sekretorischen IGF bindenden Proteinen (IGFBP1-6) sowie mehreren IGFBP verwandten Proteinen reguliert^{220,221}. 99% des zirkulierenden IGF-1s liegen im Komplex mit IGFBPs vor, wobei 75-80% an IGFBP3 gebunden sind^{222,223}. Der IGF-1-IGFBP3 Komplex bindet an ein drittes Protein ALS (acid labile subunit). Dies verlängert die Halbwertszeit von IGF-1 auf 16 Stunden im Gegensatz zu 15 Minuten bei freiem IGF-1^{207,224,225}. Außerdem ist dieser Komplex nicht membrangängig und kann den IGF-1R nicht aktivieren²⁰². Die Freisetzung des IGF-1 aus dem ternären Komplex erfolgt mit Hilfe einer Protease, wodurch IGF-1 dann an den IGF-1R binden und die Signaltransduktionskette aktivieren kann (s. 2.3.1).

2.4.1 Signaltransduktion von IGF-1

Die Wirkung von IGF-1 wird hauptsächlich durch Bindung an den Typ I IGF Rezeptor (IGF-1R) vermittelt²²⁶. IGF-2 und Insulin können auch an den IGF-1 Rezeptor binden, jedoch mit 6- und 100-fach niedrigerer Affinität²²⁷. Der IGF-1 Rezeptor ist eine heterotetramere Rezeptor-Tyrosinkinase aus zwei membrandurchspannenden α -Untereinheiten und zwei intrazellulären β -Untereinheiten. Die α -Untereinheiten enthalten die cysteinreichen Bindungsstellen für IGF-1 und sind durch Disulfidbrücken verbunden. Desweiteren sind zwischen den α - und β -Untereinheiten ebenfalls Disulfidbindungen vorhanden²²⁸. Die β -Untereinheiten bestehen aus einer Transmembrandomäne, einer ATP-Bindestelle und einer Tyrosinkinase-Domäne, die für die Signaltransduktion essentiell ist (s. Abb. 13 C). In Zellen, in denen sowohl der Insulin- als auch der IGF-1 Rezeptor exprimiert wird, können die Prorezeptoren Hetero- und Homodimere bilden, wodurch IR-IGF-1R Hybride sowie die klassischen Rezeptoren entstehen²²⁹⁻²³¹. Diese Hybridrezeptoren binden sowohl Insulin als auch IGF-1²³².

Die Bindung von IGF-1 führt zu einer konformationellen Änderung des IGF-1 Rezeptors und aktiviert dessen intrinsische Tyrosinkinase. Die dadurch induzierte Autophosphorylierung der intrazellulären Tyrosinreste führt zur Phosphorylierung verschiedener zytoplasmatischer Adaptorproteine, unter anderem des Insulin Rezeptor Substrates (IRS) sowie der SHC Proteine (*Src homology 2 domain-containing protein*)^{202,233}. Dabei reguliert IRS-1 hauptsächlich das somatische Zellwachstum und ist für die Wirkung von IGF-1 auf die Skelettmuskulatur und das Fettgewebe verantwortlich^{234,235}, während IRS-2 hauptsächlich die Insulin Signaltransduktion vermittelt und für die IGF-1 Aktivität in der Leber, im Gehirn und im Pankreas zuständig ist²³⁶.

Die Mehrzahl der biologischen Effekte von IGF-1 auf das Zellwachstum, die Differenzierung, Proliferation und das Überleben wird durch die IGF-1R Signaltransduktionskaskade vermittelt²²⁰. Die

IGF-1 Signaltransduktion wird dabei über den PI3K-Signalweg sowie den RAS-RAF-MAPK-Signalweg vermittelt ^{237,238} (s. Abb. 14, 15).

Im PI3K-Signalweg rekrutiert und aktiviert phosphoryliertes IRS die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) über die zwei SH2-Domänen der regulatorischen p85 Untereinheit der PI3K, wodurch membranassoziierte phosphorylierte Inosole synthetisiert werden ²³⁹. Diese rekrutieren und aktivieren die Phosphoinositol-abhängige Kinase PDK, welche für die Phosphorylierung und Aktivierung anderer Kinasen, wie AKT und p70RSK, verantwortlich ist ^{240,241}. Die AKT Phosphorylierung steigert die Proteinsynthese durch Aktivierung von mTOR und p70S6K und vermittelt die antiapoptische Wirkung von IGF-1 durch Phosphorylierung und Inaktivierung von proapoptischen Initiatoren wie BAD sowie von Effektorproteinen wie Kaspasen ²⁴². Somit wird über den PI3K-Signalweg eine Vielzahl der Effekte von IGF-1, wie die Stimulierung des Glukosetransports, die Glykogensynthese, Proteinsynthese, Mitogenese, Hemmung der Apoptose und Regulierung der Gentranskription vermittelt ²⁴³. Desweiteren reduziert IGF-1 über die PI3K-Signalkaskade auch die proteasomale Degradation. IGF-1 hemmt über den PI3K-AKT-FOXO-Weg die Transkription der E3-Ubiquitin-Ligasen MuRF-1 und Atrogen-1 und verhindert dadurch die Entstehung einer Muskelatrophie ²⁴⁴⁻²⁴⁶. Dabei führt die Aktivierung von AKT zu einer Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors FOXO, wodurch FOXO aus dem Zellkern ins Zytoplasma relokalisiert. Dadurch kann die Genexpression der E3-Ubiquitin-Ligasen MuRF-1 und Atrogen-1 nicht mehr induziert werden ²⁴⁵.

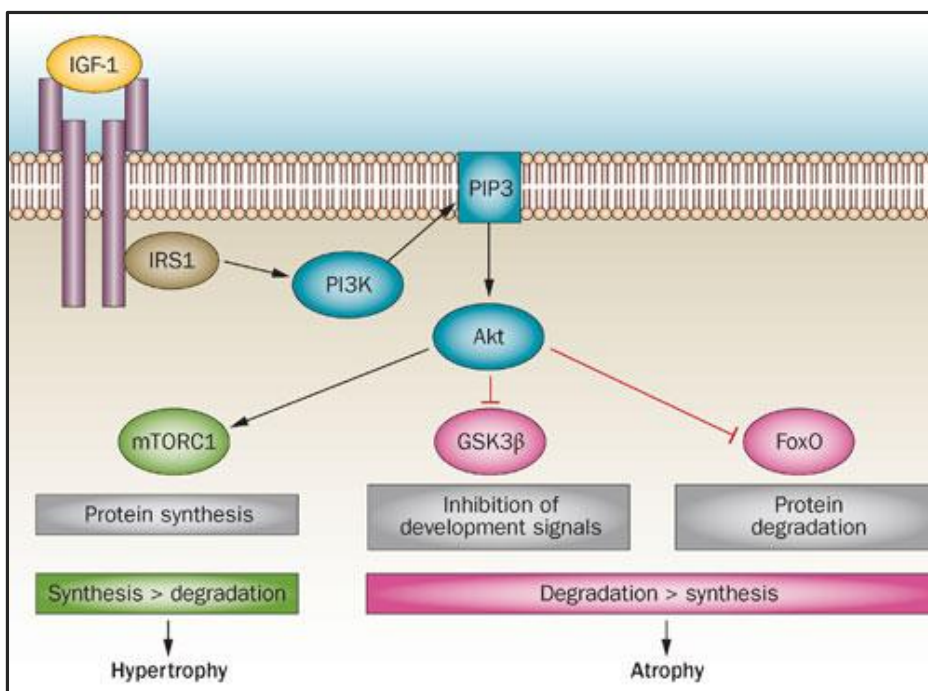


Abbildung 14: Regulierung der Muskelmasse durch den IGF-1 Signalweg (nach Hanaoka et al. ²⁴⁷)

Die Bindung von IGF-1 an den IGF-1 Rezeptor aktiviert den PI3K-AKT-Signalweg und führt dadurch zur Phosphorylierung von mTOR, GSK3β sowie FOXO. Die Proteinsynthese und Muskelmasse steigt durch Aktivierung der Proteinsynthese über mTORC1 und Hemmung von GSK3β und FOXO vermittelter proteasomaler Degradation.

Außerdem ist der RAS-RAF-MAPK-Weg für eine Vielzahl der mitogenen und transkriptionellen Effekte von IGF-1 verantwortlich. Im ersten Schritt erfolgt die Rekrutierung des Guaninnukleotidaustauschfaktors SOS an IRS-1 über die SH2 Domäne des Adaptorproteins GRB2²³⁸. Dies aktiviert das G-Protein RAS, welches daraufhin die Serinkinase RAF und die ERK-Kaskade aktiviert, wodurch die Zellproliferation aktiviert wird²⁴⁸. Die IGF-1R Aktivierung ist auch in die Stimulierung der Jun Kinasen JNK1 und JNK2²⁴⁹ sowie der p38 MAP Kinase^{250,251} involviert. Zielmoleküle des MAPK-Weges sind unter anderem die ribosomale S6 Kinase, MAPKAP, Phospholipase A2 und verschiedene Transkriptionsfaktoren²⁵² (s. Abb. 15).

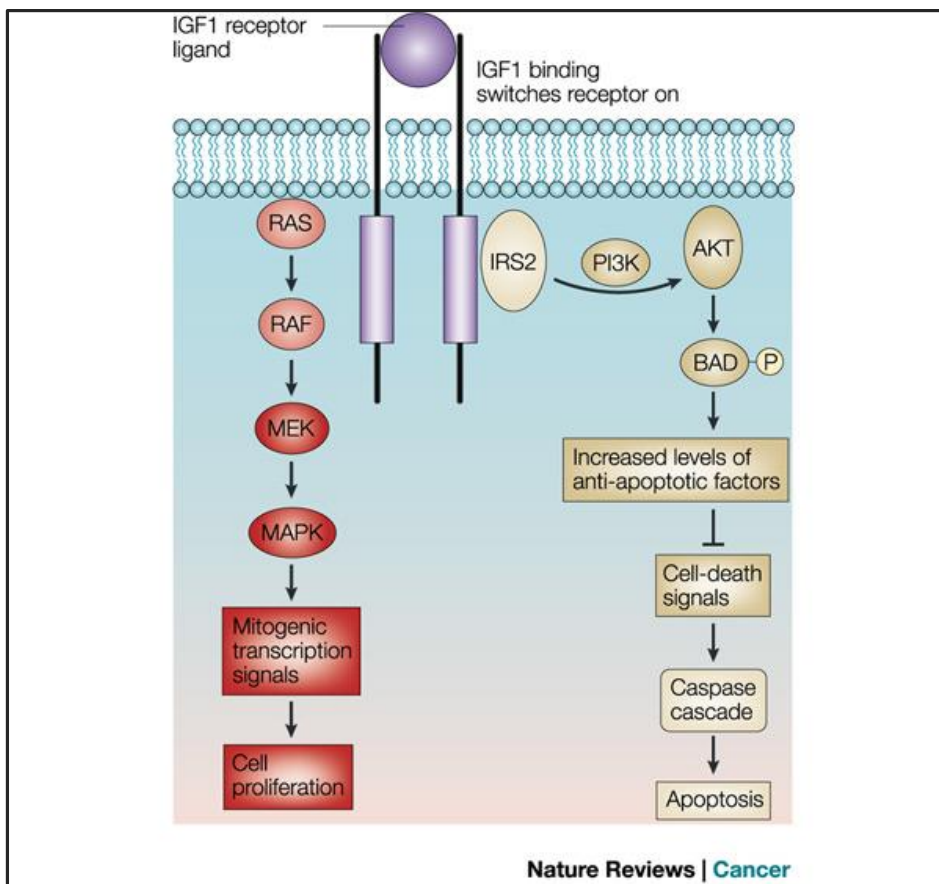


Abbildung 15: Schematische Darstellung des IGF-1 Signalweges (nach Bok und Small²⁵³)

Die Bindung von IGF-1 an den IGF-1R aktiviert sowohl den PI3K-, als auch den RAS-MAPK-Signalweg. Die Aktivierung der PI3K-AKT-Signaltransduktion führt unter anderem zu einem Anstieg der antiapoptischen Faktoren BCL2 und BCL-X_L. Die Aktivierung des RAS-MAPK-Weges induziert mitogene Transkriptionsfaktoren und verursacht dadurch die Wirkung von IGF-1 auf die Proliferation.

Nach der Ligandenbindung und Aktivierung wird der IGF-1R durch endozytotische Internalisierung runterreguliert²⁵⁴. Eine chronische Aktivierung wird desweiteren durch Markierung von IRS-1 zum proteasomalen Abbau durch die S6K und AKT^{255,256} reguliert.

2.4.2 Die gewebsspezifische Funktion von IGF-1 im Herzen

Physiologische Hypertrophie des Herzens ist mit einer Aktivierung des IGF-1/PI3K-Signalweges assoziiert (s. Abb. 5). So ist IGF-1 im Herzen von professionellen Athleten²⁵⁷ und im Serum von Menschen und Tieren nach Sport erhöht^{258,259}. Außerdem ist die Expression von IGF-1 im Herzen zu Beginn einer Vielzahl an Erkrankungen wie hypertropher Kardiomyopathie²⁶⁰, hypertensiver Kardiomyopathie^{261,262} und ischämischer Kardiomyopathie²⁶³ erhöht. Deshalb wird vermutet, dass IGF-1 in das *Remodeling* des Herzens involviert ist. Desweiteren steigern niedrige IGF-1 Konzentrationen in Patienten das Risiko einer Herzerkrankung und korrelieren mit einer höheren Mortalität²⁶⁴⁻²⁷⁰. Patienten die unter dem Laron-Syndrom, ein durch GH-Insensitivität verursachter IGF-1 Mangel, leiden, sterben früher, haben kleinere Herzen und eine verschlechterte Kontraktilität^{271,272}.

In vitro verursacht IGF-1 durch Aktivierung der Transkription und Translation muskelspezifischer Gene Hypertrophie^{273,274}. Desweiteren führt die Gabe von IGF-1 in Mäusen und Ratten zu einer Hypertrophie des Herzens sowie einer gesteigerten Proteinsynthese^{275,276} und verringert die Entstehung von Apoptose und Nekrose nach einer induzierten Ischämie des Herzens²⁷⁷⁻²⁷⁹. Außerdem verbessert die IGF-1 Gabe auch den Glukose- und Proteinmetabolismus und verhindert die Entwicklung einer diabetischen Kardiomyopathie^{280,281}.

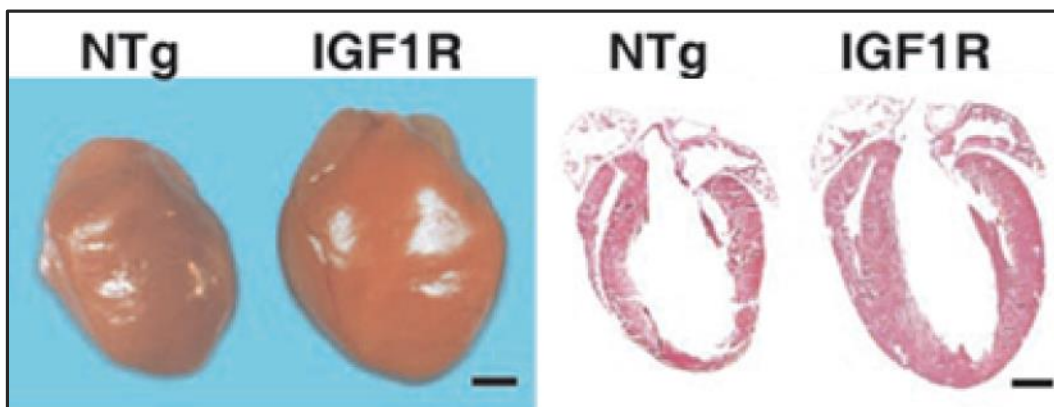


Abbildung 16: morphologische Analyse von transgenen *Igf-1r* überexprimierenden Mäusen (nach McMullen et al.²⁸²)

Morphologische Analyse von non-transgenen Kontrollen (NTg) und *Igf-1r* überexprimierenden Mäusen (IGF1R) im Alter von 3 Monaten. Maßstab: 1mm.

Der Einfluss einer Überexpression von *Igf-1* auf die Herzfunktion wurde anhand mehrerer Mausmodelle untersucht. Reiss et al. generierte transgene Mäuse, in denen das humane *IGF-1* in Kardiomyozyten unter der Kontrolle des α MyHC-Promoters überexprimiert wurde²⁸³. Diese Mäuse hatten größere Herzen aufgrund von Hyperplasie und keinerlei Beeinträchtigung der Herzfunktion. In einem zweiten Modell wurde *Igf-1* im Herzen und der Skelettmuskulatur mit Hilfe des Acta1 Promoters überexprimiert²⁸⁴. Diese Mäuse zeigten eine physiologische Hypertrophie des Herzens sowie eine verbesserte systolische Funktion bis zu einem Alter von 10 Wochen. Diese verschlechterte

sich jedoch im Alter von 52 Wochen und die Mäuse entwickelten eine pathologische Hypertrophie. Desweiteren ist eine Kardiomyozyten-spezifische Überexpression von *Igf-1* antiapoptotisch ²⁸⁵, während die heterozygote konstitutive Deletion von *Igf-1* eine verstärkte Apoptose nach induziertem Herzinfarkt zeigt ²⁸⁶. Eine Kardiomyozyten-spezifische Überexpression des humanen IGF-1 Rezeptors führte ebenfalls zu einer physiologischen Hypertrophie und verbesserten systolischen Funktion, sogar in alten Mäusen ²⁸². Der Beweis, dass die physiologische Hypertrophie über die Phosphatidylinositol-3 Kinase (PI3K) vermittelt wird, konnte mit Hilfe von transgenen Mäusen mit einer gesteigerten oder verringerten PI3K Aktivität erbracht werden ^{287,288}.

Somit führt die Aktivierung des IGF-1-PI3K-Signalweges unter basalen Bedingungen zu einer konservierten oder verbesserten Herzfunktion ^{282,283,287}. Die Überexpression von IGF-1 bzw. PI3K verbessert jedoch auch die Herzfunktion und die Entwicklung einer Apoptose oder Fibrose nach verschiedenen induzierten Erkrankungen wie dilatativer Kardiomyopathie ^{289,290}, dekompensierter exzentrischer Hypertrophie ²⁹¹, diabetischer Kardiomyopathie ²⁹², Herzinfarkt ²⁹³, linksventrikulärer Hypertonie, Diabetes-induzierter Herzdysfunktion ²⁹⁴, pathologischer Hypertrophie ²⁹⁰ oder der altersbedingten Verschlechterung der Herzfunktion ²⁹⁵. Dies wird einerseits durch die antiapoptotische Wirkung von AKT ²⁹⁶⁻²⁹⁸, andererseits durch die Hemmung von Signalmolekülen, die pathologische Hypertrophie induzieren ²⁹⁰ gewährleistet. Desweiteren wirkt IGF-1 positiv inotrop ^{290,299}, antifibrotisch und verhindert sogar die Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies ³⁰⁰. Die Gabe von IGF-1 auf isolierte Kardiomyozyten von Herzinsuffizienz-Tiermodellen oder Patienten verbessert deren Kontraktilität ^{301,302}, vermutlich aufgrund einer verbesserten Calcium-Mobilisierung ³⁰³⁻³⁰⁵. So verhindert die Verwendung von L-Typ Calciumkanalblockern oder PKC-Inhibitoren den positiven inotropen Effekt von IGF-1 ³⁰⁶. In Analogie dazu wurde eine Verschlechterung der Kontraktilität des Herzens in leberspezifischen *Igf-1 knockouts* beobachtet ³⁰⁷.

Außerdem scheint die MGF Isoform in die Regeneration involviert zu sein. So wird die *Mgf* Expression im Herzen direkt nach einer Schädigung wie beispielsweise Herzinfarkten stark hochreguliert ³⁰⁸. Die Behandlung mit MGF verbessert die Ejektionsfraktion und verringert die Narbenbildung nach Herzinfarkten ^{309,310}. Außerdem führt die transgene Überexpression von *Mgf* in Kardiomyozyten zu einer leichten Hypertrophie sowie einer verbesserten Regeneration mit nur minimaler Narbenbildung und verbesserter Kontraktilität nach Herzinfarkt und Cardiotoxin-Injektion ^{311,312}.

IGF-1 beeinflusst außerdem die Vasodilation der Koronargefäße. So kann der IGF-1 Signalweg die Expression von VEGF und Angiopoietin-2 ^{313,314} induzieren sowie die Freisetzung von NO verursachen ³¹⁵.

Offensichtlich ist IGF-1 ein wichtiger Überlebensfaktor mit pleiotropen Funktionen im Herzen. IGF-1 besitzt eine antiapoptotische, antifibrotische, positiv inotrope, vasodilatorische, proangiogene Wirkung, induziert physiologische Hypertrophie und stimuliert die Regeneration. Trotz dieser positiven Effekte auf die Herzfunktion führt eine unkontrollierte Aktivierung des IGF-1-PI3K Weges zu unkontrolliertem Zellwachstum und damit Krebs.

2.5 Bekannte Interaktionen von Myostatin und IGF-1

Myostatin und IGF-1 sind zwei gegensätzliche Hauptregulatoren des Muskelwachstums. So führt die Hemmung von Myostatin zu Muskelhypertrophie und Hyperplasie^{54,68}, wohingegen die Überexpression von *Igf-1* Hypertrophie verursacht¹⁸⁴. Dies legte die Vermutung nahe, dass sich die Signalwege dieser beiden Hauptregulatoren kreuzen. In der Mehrzahl der Publikationen, die dieser Frage auf den Grund gingen, wurde dies in der Skelettmuskulatur bzw. in Myoblasten untersucht.

So zeigten McFarlane et al., dass Myostatin Kachexie durch Aktivierung des Ubiquitin-Proteasom-Systems über FOXO1 induziert und damit die Wirkung von IGF-1 auf den PI3K-AKT-Signalweg antagonisiert¹²⁴. Eine Stimulierung von C2C12 Zellen mit Myostatin hemmte die Phosphorylierung der IGF-1 Zielmoleküle AKT und FOXO1 (s. Abb. 17)¹²⁴. Dies führte zu einer Hochregulation der Atrophie-induzierenden Gene *Murf-1* und *Atrogin-1* (s. Abb. 17). Desweiteren wurde von Trendelenburg et al. ebenfalls in C2C12 Zellen der Beweis erbracht, dass die Inhibierung von AKT durch Myostatin auch die Proteinsynthese über mTOR und die p70S6 Kinase inhibiert und durch Zugabe von IGF-1 reversibel ist (s. Abb. 17)¹¹⁰. Jedoch wurde die von McFarlane beobachtete Hochregulation von *Murf-1* und *Atrogin-1* in dieser Studie nicht beobachtet. In Übereinstimmung mit den *in vitro* Daten wurde auch eine verstärkte AKT Phosphorylierung in Muskeln von konstitutiven Myostatin *knockouts* sowie eine Dephosphorylierung von AKT und Inhibierung des mTOR-p70S6K-Proteinsyntheseweges in Muskeln von Myostatin-überexprimierenden Ratten beobachtet^{108,316,317}. Beide Studien widerlegten jedoch auch die von McFarlane beschriebene Wirkung auf *Murf-1* und *Atrogin-1*. Desweiteren hemmt Myostatin den Zellzyklus *in vitro* in der G1-Phase über AKT, GSK-3 β und die dadurch aktivierte Degradation von Cyclin D1³¹⁸. Dies ist unabhängig von SMAD3 und wird durch Zugabe von IGF-1 oder Aktivierung von AKT verhindert.

Aber auch IGF-1 selbst induziert die Expression von Myostatin^{318,319}. Ebenso steigert die Expression einer konstitutiv aktiven Form von FOXO1 die Myostatin Expression und Aktivität in differenzierten C2C12 Myotuben⁹⁵. Desweiteren ist bekannt, dass SMAD3 und SMAD4 in der Skelettmuskulatur mit FOXO Proteinen interagieren können. Vor kurzem wurde gezeigt, dass IGF-1 die Transkription von Myostatin über den NFAT Transkriptionsfaktor und einen IP3/Calcium-abhängigen Mechanismus reguliert³²⁰.

Erste Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen Myostatin und IGF-1 im Herzen lieferte Cook et al.¹⁶¹. Sie zeigten, dass Myostatin eines der am stärksten hochregulierten Gene in *Akt* überexprimierenden Herzen darstellte. In Herzen von konstitutiven Myostatin *knockouts* wurde keine Veränderung in der IGF-1 Genexpression oder Serumkonzentration³²¹ festgestellt, jedoch eine Herunterregulation des IGF-1 Rezeptors^{322,323}. Die bisher einzige Studie, die einen mechanistischen Zusammenhang von Myostatin und IGF-1 im Herzen untersuchte, wurde von Shyu et al. in neonatalen Rattenkardiomyozyten durchgeführt¹⁶⁰. Die Autoren zeigten, dass der IGF-1 Signalweg direkt die Expression von Myostatin über p38 und MEF2 reguliert.

Diese Daten sprechen dafür, dass Myostatin und IGF-1 sowohl auf der Signaltransduktionsebene als auch transkriptionell wechselwirken. Desweiteren wird offensichtlich, dass zwar einzelne Knotenpunkte wie die Proteinkinase AKT bekannt sind, die genauen Signalwege und Wechselwirkungen jedoch noch weiterer Studien bedürfen.

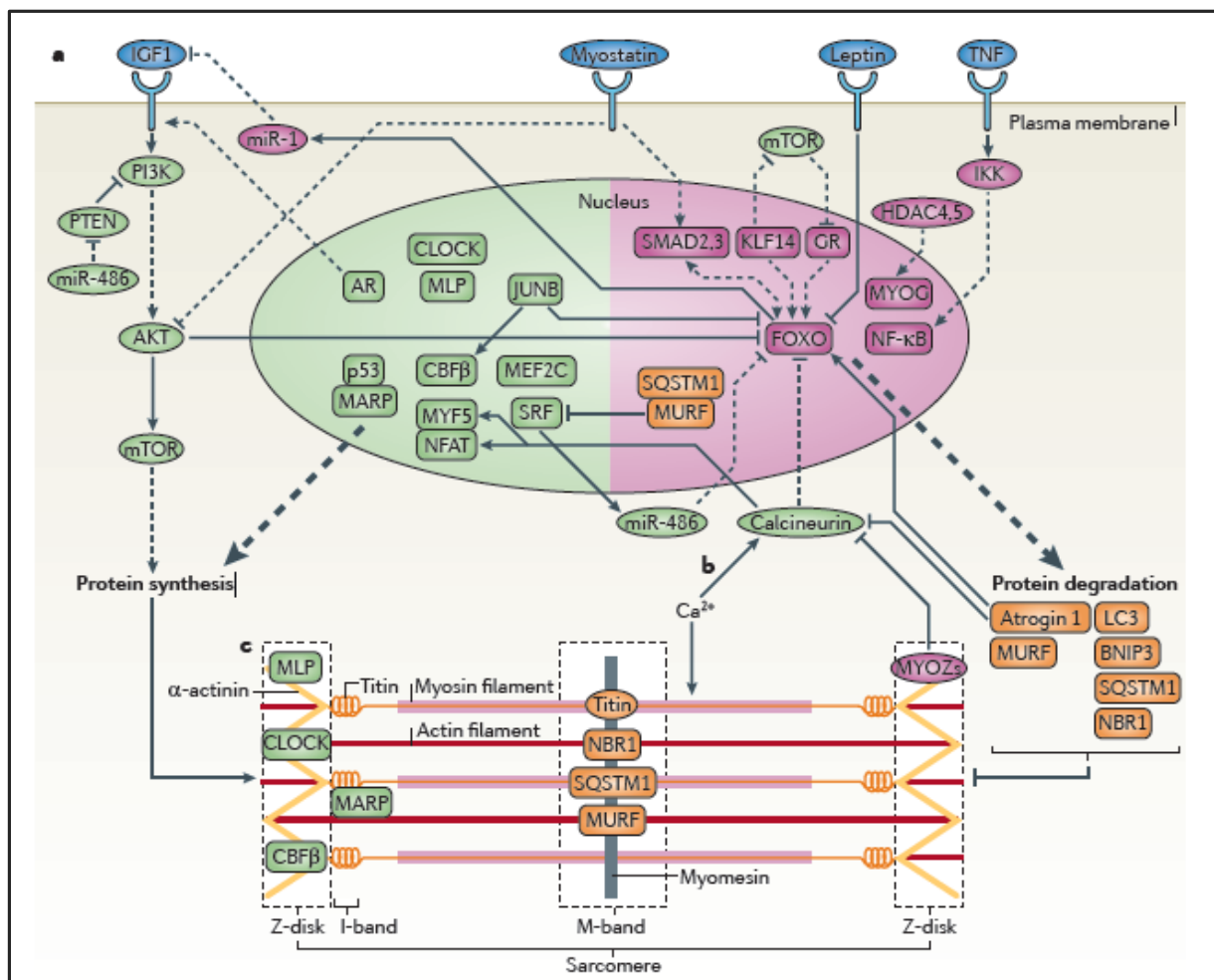


Abbildung 17: Interaktionen von Myostatin und IGF-1 in der Skelettmuskulatur (nach Braun und Gautel ³²⁴)

Die anabole Regulation der Proteinsynthese über IGF-1 und die PI3K-AKT-Signalkaskade unterdrückt die Degradation durch FOXO Proteine. FOXOs sind katabole Transkriptionsfaktoren, die die Transkription von Atrogenen (orange) wie Atrogin-1, *Murf-1* und anderen regulieren. Dieser Signalweg wird unter anderem durch eine FOXO-vermittelte Expression von miR-1, die IGF-1 unter atrophischen Bedingungen unterdrückt, noch verstärkt. Myostatin zählt zu den katabolen Regulatoren. Der Myostatin und IGF-1 Signalweg interagiert hauptsächlich am Nexus AKT, wodurch auch der mTOR-Proteinsyntheseweg sowie die Degradation durch FOXOs reguliert werden.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure (MES)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Agarose	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Aprotinin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
BenchMark™ Proteinstandard	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Benzamidin Hydrochlorid	Calbiochem GmbH, Bad Soden
Bis(2-hydroxyethyl)amino tris(hydroxymethyl)methan (Bis-Tris)	Fluka Chemie GmbH, Buchs
Bovines Serum-Albumin (BSA)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Dimethylformamid (DMF)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
1,4-Dithiothreitol (DTT)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Dinatriumphosphat	Merck, Darmstadt
dNTPs	Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ethylenglykoltetraessigsäure (EGTA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Entelan®	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ethanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Glutaraldehyd	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Glyzerin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Hämatoxylin Gill Nr. 3	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Heparin	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Isopropanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Isotonische NaCl-Lösung 0,9%	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Kaliumchlorid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Ketamin 10%	CEVA Sante Animale, Düsseldorf
Leupeptin	Calbiochem GmbH, Bad Soden
Magermilchpulver	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Magnesiumchlorid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Methanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Miglyol® 812	Caesar&Loretz GmbH, Hilden
Mowiol 4-88	Fluka Chemie GmbH, Buchs
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumdesoxycholat	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe

Natriumfluorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Natriumvanadat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
N-Bis(2-hydroxyethyl)glycin (Bicin)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
NP-40	Fluka Chemie GmbH, Buchs
Paraformaldehyd (PFA)	Fluka Chemie GmbH, Buchs
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ponceau S	Fluka Chemie GmbH, Buchs
Rimadyl®	Pfizer Inc. (geliefert aus Apotheke)
RNAasin® Plus RNase Inhibitor	Promega Corporation, Fitchburg, USA
Tamoxifen	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Tissue-Tek® OCT™ Compound (Einfriermedium)	Sakura Finetek, Alphen aan den Rijn, Niederlande
Tricin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
TRIZOL Reagenz®	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Tween-20	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
X-Gal	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Xylazin 2 %	CEVA Sante Animale, Düsseldorf

3.1.2 Gebrauchsmaterial

Tabelle 2: Verwendete Gebrauchsmaterialien

Material	Hersteller
96-Loch-Platten	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Deckgläser	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Einbettförmchen	Sakura Finetek, Alphen aan den Rijn, Niederlande
Filter (Whatman-)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Gestopfte Pipettenspitzen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Glasgeräte	Schott AG, Mainz
Petrischalen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Pipettenspitzen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Proteinmembran (Protran Nitrozellulose Membran, BA85)	Whatman Inc., New Jersey, USA
Reaktionsgefäße (0,2ml, 1,5ml, 2ml)	Sarstedt AG & Co., Nürmbrecht
Reaktionsgefäße (15ml und 50ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
SDS Gele (NuPAGE® Novex®)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Stahlkügelchen	RETSCH GmbH, Haan
Spritze mit Kanüle	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Super Frost Ultra Plus	Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA
Super Signal West™ Femto	Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA
Zellkulturschalen (3cm, 6cm)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zellschaber	Sarstedt AG & Co., Nürmbrecht

3.1.3 Laborgeräte

Tabelle 3: Verwendete Laborgeräte

Gerät	Typ	Hersteller
Analysenwaage	Ohaus Pioneer™ PA214C	Ohaus Corporation, Pine Brook, USA
Brutschrank für Zellkultur	HERAcell® 150	Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA
Gelapparatur (für Agarosegele)	PerfectBlue Gelsystem	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Gelapparatur (für SDS-Gele)	XCell SureLock® Mini-Cell	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Heiz-Thermomixer	HLC HTMR-133	HLC by DITABIS AG, Pforzheim
Kryotom	Leica CM3050	Leica Microsystems Vertrieb GmbH, Bensheim
Kühlzentrifugen	Eppendorf 5417R	Eppendorf AG, Hamburg
Mehrfachdispenser	HandyStep®	BRAND GmbH + Co KG, Wertheim
Mikroplatten-Reader	FLUOstar®	BMG Labtech GmbH, Ortenberg
MRT	7.0 T Bruker Pharmascan 70/16	Bruker, Ettlingen
Mikroskope	Axiophot 2	Carl Zeiss Jena GmbH, Jena
	Konfokales Mikroskop (TCS SP2)	Leica Microsystems Vertrieb GmbH, Bensheim
	Z1 Fluoreszenzmikroskop	Carl Zeiss Jena GmbH, Jena
PCR-Maschinen	Thermocycler	SenzoQuest Biomedizinische Elektronik GmbH, Göttingen
	Eppendorf Mastercycler EP Gradient S	Eppendorf AG, Hamburg
	DNA Engine Tetrad® 2	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
	iCycler iQ Multicolor Real Time PCR Maschine	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Perfusionssystem für Isolierung von Kardiomyozyten		Eigenbau
pH-Meter	Five Easy™ pH	Mettler-Toledo GmbH, Gießen
Pipet-Boy	Pipet-Aid XP	Drummond Scientific Company, Broomall, USA
Pipetten	Gilson Pipetman®	Gilson Inc., Middleton, USA
Power-Supply	Consort E802	Consort bvba, Turnhout, Belgien
Schüttler	GFL-3006	GFL –Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel
Schwingmühle	RETSCH Schwingmühle MM 301	RETSCH GmbH, Haan
		Thermo Fisher Scientific,

Spektralphotometer	Nanodrop 2000/2000c	Rockford,USA
Sterilbank	HERAsafe®	Heraeus Instruments, Hanau
Telemetrische Transmitter	TA10EA-F20	Data Sciences International (DSI), St. Paul, USA
Tankblotapparatur	XCell II™ Western Blot Module	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Ultraschall-Homogenisator	SONOPULS HD 2070/2200	Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Berlin
VersaDoc™ Image System	VersaDoc™ 3000	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Vortexer	VF2	Janke & Kunkel, Staufen
Waage	Sartorius LC 4800P	Sartorius AG, Göttingen
Wasser-Aufbereitungsanlage	MilliQ Plus Water System	Millipore GmbH, Schwalbach/Ts
Zentrifugen	Eppendorf 5417C	Eppendorf AG, Hamburg

3.1.4 Kit-Systeme

Tabelle 4: Verwendete Kit-Systeme

Kit-System	Hersteller
Absolut™ SYBR® Green Fluorescein Mix	Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA
DC™ Protein Kit	BioRad Laboratories GmbH, München
Masson-Trichrom	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Superscript® II Reverse Transcriptase	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

3.1.5 Zellkulturmedien und Zusätze

Tabelle 5: Verwendete Zellkulturmedien und Zusätze

Zellkulturmedien und Zusätze	Hersteller
Fötale Kälberserum (FCS)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Gibco Medium 199 mit Earle's Salzen und wenig Natriumbicarbonat	Life technologies Corporation, Darmstadt
HEPES	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Insulin, Transferrin, Natriumselenit Mediumzusatz	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Kreatinin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
L-Carnitin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Penicillin/Streptomycin	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Taurin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

3.1.6 Puffer, Medien und Lösungen

Sämtliche Lösungen wurden, soweit nicht anders angegeben, mit aufgereinigtem Wasser der Qualitätsstufe „aqua bidest“ angesetzt.

Tabelle 6: Verwendete Puffer, Medien und Lösungen

Puffer, Lösungen und Medien	Zusammensetzung
5x SDS-Probenpuffer	66mM Tris-HCl (pH 6,8) 2% SDS 27% Glycerin
Kulturmedium für Kardiomyozyten	Medium 199 Earle's Salze mit wenig Natriumbicarbonat 5mM Kreatinin 2mM L-Carnitin 5mM Taurin 25mM HEPES 1% Penicillin/Streptomycin 10% FCS 1% Insulin, Transferrin, Natriumselenit Zusatz
Kardiomyozyten-Waschpuffer	20ml 1M Tris HCl pH 7,5 1ml 0,5M EDTA 15ml 5M NaCl pH 7,4 einstellen
Lösungen für β-Galaktosidase-Färbung	
Fixierlösung	0,2% Glutaraldehyd 2mM MgCl ₂ 5mM EGTA (pH 7,5) In SPP Puffer
SPP Puffer	77,4ml 1M Na ₂ HPO ₄ 22,6ml 1M NaH ₂ PO ₄ In 1l Milli-Q-Wasser, pH 7,4
Waschlösung	2mM MgCl ₂ 0,01% Natriumdesoxycholat 0,02% NP-40 In SPP-Puffer
2% X-Gal-Lösung	20mg/ml X-Gal in Dimethylformamid
X-Gal Färbelösung	5mM K ₃ FeCN ₆ 5mM K ₄ FeCN ₆ 0,1% X-Gal In Waschlösung
Ketamin/Xylazin	625 μ l 2% Xylazin 125 μ l 10% Ketamin

	Auf 10ml mit isotonischer NaCl-Lösung (0,9%) verdünnen
MES SDS Laufpuffer	50mM MES 50mM Tris-HCl 0,1% SDS 1mM EDTA pH 7,3
Mowiol	2,4g Mowiol 4-88 6g Glycerin 6ml Milli-Q-Wasser 12ml Tris-HCl (pH 8,5)
Paraformaldehyd in PBS (4% PFA)	40mg/ml Paraformaldehyd in 1x PBS
Phosphate-Buffered Saline (PBS 1x)	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 4,3 mM Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O 1,4 mM KH ₂ PO ₄
Protein Extraktionspuffer	0,1M Tris-HCl (pH 8,0) 10% SDS 1M EDTA
Proteinase-/Phosphatase-Inhibitoren Mischung	4µg/ml Aprotinin 500µg/ml Benzamidin 4µg/ml Leupeptin 1mM Natriumvanadat 20mM Natriumfluorid 2mM PMSF
Tamoxifen	40mg/ml in Miglyol® 812
TBS/T	20mM Tris 140mM NaCl 0,1% Tween-20
TENS Lyse-Puffer	50mM Tris-HCl (pH 8,0) 100mM EDTA 100mM NaCl 1% SDS
Transferpuffer für Western Blot	12,5mM Bicin 12,5mM Bis-Tris 0,8mM EDTA 20% Methanol
Tris-Acetat-Puffer (TAE-Puffer)	50mM Tricin 50mM Tris 0,1% SDS pH 8,24

3.1.7 Inhibitoren, Aktivatoren und rekombinante Proteine

Tabelle 7: Verwendete Inhibitoren, Aktivatoren und rekombinante Proteine

Inhibitoren und Aktivatoren	Substrat	Hersteller
(5Z)-7-Oxozeanol	TGF- β -aktivierte Kinase 1 (TAK1)	Tocris Bioscience, Bristol, UK
Atenolol	β 1-Adrenorezeptor	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Compound C Dihydrochlorid	AMP-aktivierte Kinase (AMPK)	Tocris Bioscience, Bristol, UK
Isoprenalin	β 1- und β 2-Adrenorezeptor	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Myostatin (rekombinant, Maus/Mensch/Ratte)		R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA
SB203580	p38	Merck, Darmstadt
SB505124	TGF- β Typ I Rezeptoren ALK4,5,7	Tocris Bioscience, Bristol, UK

3.1.8 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden von den Firmen Invitrogen GmbH (Karlsruhe) und Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim) bezogen. Für quantitative Real-time PCR wurden Exon-überspannende Primer ausgewählt.

Tabelle 8: Verwendete Oligonukleotide für Genotypisierungen

Gen	Primer-Name	Sequenz 5'→3'	Annealing Temperatur
MCM	MCM int 784s	CAACATGAAATGCAAGAACG	55°C
	MCM int 1200as	GGAAACCATTTCCGGTTATTC	
aMyHC-Cre	MHC Prom s	CAGGCACTTTACATGGAGTCTCTG	55°C
	MHC63-Cre	AGGCTAAGTGCCTTCTCTACAC	
Igf-1	Igf-Neo s	AAACCACACTGCTCGACATTG	56°C
	Igf Exo s	AGTGATAGGTCACAAAGTTCC	
	Igf-1 intro 4s	CACTAAGGAGTCTGTAATTTGGACC	
LacZ	LacZ s	TTACGATGCGCCCATCTACAC	55°C
	LacZ as	TTACCCGTAGGTAGTCACGCA	
Myostatin	8 Intro s	AGTGAGTCAGTCATAGGACAAGAC	54°C
	8 Intro as	CCAGACTGTATATCCCAAGTTC	
Myostatin	8 Intro as	CCAGACTGTATATCCCAAGTTC	54°C
	8 Prom s1	GGTGAAACTTTGATCTTGC	
Myostatin (Transgen)	Gdf8 Ex1 359s	AAGACAATTCTGCCAAGAGC	55°C
	Gdf8 Ex2 166as	ATGGTTTGATGAGTCTAGG	
Rosa26	ROSA-FA	AAAGTCGCTCTGAGTTGTTAT	57°C
	ROSA-RF	GGAGCGGAGAAATGGATATG	
	Rosa-SpliAC	CATCAAGGAAACCCTGGACTACTG	

Tabelle 9: Verwendete Oligonukleotide für quantitative Real-time PCR

Gen	Primer-Name	Sequenz 5' →3'	Annealing Temperatur
Acta1	Acta1 for Acta1 rev	CCGACCCCGTCACCAGGGTG ATCCAACACGAT GCCGGTG	60°C
Anp	Anp for Anp rev	GGATTTCAAGAACCTGCTAG TGCTTTTCAAGAGGGCAGAT	57°C
aMyhc	aMyhc for aMyhc rev	GCCCAGTACCTCCGAAAGTC GCCTTAACATACTCCTCCTTGTC	60°C
Arp	Arp for Arp rev	AAGCGCGTCTGGCATTGTCT CCGCAGGGGCAGCAGTGGT	55°C
Bnp	Bnp for Bnp rev	GCAATTCAAGATGCAGAAGC AAGAGACCCAGGCAGAGTCA	57°C
bMyHC	bMyhc for bMyhc rev	GCCAACACCAACCTGTCCAAGTTC TGCAAAGGCTCCAGGTCTGAGGGC	57°C
Col1a1	Col1a1 for Col1a1 rev	ACATGTTTCAGCTTTGTGGACC TAGGCCATTGTGTATGCAGC	55°C
Igf-1	New Pan Igf-1 Ex3 +116s	ATGCTCTTCAGTTCGTGTGTG	55°C
(Pan-Igf-1)	New Pan Igf-1 Ex4+158 as	GAGTCTTGGGCATGTCAGTG	
Igf-1 (Mgf)	Mgf Ex5a +12s New Igf-1 Ex6 +236as	CGACAAACAAGAAAACGAAGC TCCTAAAGACGATGTTGGAATG	55°C
Igf-1 (systemisch)	New Igf-1 systemic -10+15s New Igf-1 Ex6 +236as	GACTCAGAAGGAAGTACATTTGAAG TCCTAAAGACGATGTTGGAATG	55°C
Myostatin	Gdf8 Ex1 359s Gdf8 Ex2 166as	AAGACAACCTTCTGCCAAGAGC ATGGGTTTGATGAGTCTCAGG	55°C
Pecam	Pecam for Pecam rev	AGGGGACCAGCTGCACATAGG AGGCCGTTCTCTTGAGCTCTT	55°C
Rgs2	New Rgs2 for New Rgs2 rev	AGGATTGGAAGACCCGTTTGAGC CATCAAATGCTTCTGCCAGAGC	55°C

Für die reverse Transkription wurden Oligo(dT)₁₅ Primer der Promega Corporation (Fitchburg, USA) verwendet.

3.1.9 Antikörper

Tabelle 10: Verwendete Erstantikörper

Antigen	Spezies, Eigenschaften	Verdünnung	Hersteller
p-Acetyl-CoA Carboxylase (Ser79)	Kaninchen, polyklonal	WB: 1:1000 in 5% BSA in TBS/T	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, USA
p-AKT (Ser473)	Kaninchen, polyklonal	WB: 1:1000 in 5% BSA in TBS/T	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, USA
ANP	Kaninchen, polyklonal	WB: 1:1000 in 5% BSA in TBS/T	EMD Millipore Corporation, Billerica, USA
p-AMPK-α (Thr182)	Kaninchen, polyklonal	WB: 1:1000 in 5% BSA in TBS/T	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, USA

AMPK-α	Kaninchen, polyklonal	WB: 1:1000 in 5% BSA in TBS/T	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, USA
α-Tubulin	Maus, monoklonal	WB: 1:1000 in 5% BSA in TBS/T	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Calcineurin A	Kaninchen, polyklonal	WB: 1:1000 in 5% BSA in TBS/T	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, USA
p-CAMKII (Thr286)	Kaninchen, polyklonal	WB: 1:500 in 5% BSA in TBS/T	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, USA
Collagen-I	Kaninchen, polyklonal, Biotin-konjugiert	IF: 1:100 in PBS über Nacht	Rockland Immunochemicals Inc., Gilbertsville, USA
DAPI		IF: 1:1000 in PBS 3min	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
p-FOXO1/3 (Thr24/32)	Kaninchen, polyklonal	WB: 1:500 in 5% BSA in TBS/T	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, USA
p-Glykogen Synthase (Ser641)	Kaninchen, polyklonal	WB: 1:1000 in 5% BSA in TBS/T	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, USA
p-HSP27 (Ser82)	Kaninchen, polyklonal	WB: 1:1000 in 5% BSA in TBS/T	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, USA
p-IRS-1 (Ser302)	Kaninchen, polyklonal	WB: 1:1000 in 5% BSA in TBS/T	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, USA
Lektin von <i>Triticum vulgare</i> (WGA)	TRITC-konjugiert	IF: 1:100 über Nacht	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
MEF2A	Kaninchen, polyklonal	WB: 1:1000 in 5% BSA in TBS/T	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, USA
p-MKK3/6 (Ser189/207)	Kaninchen, polyklonal	WB: 1:1000 in 5% BSA in TBS/T	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, USA
p-mTOR (Ser2448)	Kaninchen, polyklonal	WB: 1:1000 in 5% BSA in TBS/T	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, USA
p38	Kaninchen, polyklonal	WB: 1:1000 in 5% BSA in TBS/T	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, USA
p-p38 (Thr180/Tyr182)	Kaninchen, polyklonal	WB: 1:1000 in 5% BSA in TBS/T	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, USA
Phalloidin	TRITC-konjugiert	IF: 1:1000 in PBS 1h	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
p-Phospholamban (Ser16)	Ziege, polyklonal	WB: 1:1000 in 5% BSA in TBS/T	Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, USA
p-PKA C (Thr197)	Kaninchen, polyklonal	WB: 1:1000 in 5% BSA in TBS/T	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, USA
p-PKC-α/β2 (Thr638/641)	Kaninchen, polyklonal	WB: 1:1000 in 5% BSA in TBS/T	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, USA
p-PKD/PKC-μ (Ser744/748)	Kaninchen, polyklonal	WB: 1:1000 in 5% BSA in TBS/T	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, USA
RALA	Maus, monoklonal	WB: 1:1000 in 5% BSA in TBS/T	BD Medical-Pharmaceutical Systems, Franklin Lakes, USA
RGS2	Kaninchen, polyklonal	WB: 1:100 in 5% BSA in TBS/T	Abcam, Cambridge, UK
p-SMAD3 (Ser423/425)	Kaninchen, monoklonal	WB: 1:1000 in 5% Milchpulver in TBS/T	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, USA
p-S6 (Ser235/236)	Kaninchen,	WB: 1:1000 in 5%	Cell Signaling Technology,

	monoklonal	Milchpulver in TBS/T	Inc., Danvers, USA
p-TAK1 (Thr187)	Kaninchen, polyklonal	1:250 in 5% Milchpulver in TBS/T	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, USA
p-Troponin I (Herz) (Ser23/24)	Kaninchen, polyklonal	WB: 1:1000 in 5% BSA in TBS/T	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, USA

WB: Western Blot; IF: Immunfluoreszenz

Tabelle 11: Verwendete Sekundärantikörper

Sekundärantikörper	Spezies, Eigenschaften	Verdünnung	Hersteller
HRP	Kaninchen, Meerretich- Peroxidase-gekoppelt	WB: 1:1000 in 3% Milchpulver in TBS/T	Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA
HRP	Maus, Meerretich- Peroxidase-gekoppelt	WB: 1:1000 in 3% Milchpulver in TBS/T	Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA
HRP	Ziege, Meerretich- Peroxidase-gekoppelt	WB: 1:1000 in 3% Milchpulver in TBS/T	Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA
Streptavidin	Cy2-gekoppelt	IF: 1:100 in PBS 1h	BIOTREND Chemikalien GmbH, Köln

3.1.10 Mauslinien

3.1.10.1 aMyHC-Cre

Die aMyHC-Cre Mauslinie exprimiert das Cre Rekombinase Gen unter der Kontrolle des endogenen Kardiomyozyten-spezifischen *aMyHC*-Promoters³²⁵. Durch Verpaarung der aMyHC-Cre Mauslinie mit Mauslinien, in denen Gene oder Gensequenzen durch loxP-Elemente flankiert sind, wird ein Kardiomyozyten-spezifisches Ausschalten dieser Gene erreicht.

3.1.10.2 aMyHC-MCM

Diese transgene Mauslinie exprimiert eine Tamoxifen-induzierbare Cre Rekombinase, die von zwei mutierten Östrogenrezeptor-Ligand-Bindungsstellen flankiert wird (MerCreMer, Mer= *mutated estrogen receptor binding domain*)³²⁶. Die Cre Rekombinase befindet sich unter der Kontrolle des Kardiomyozyten-spezifischen aMyHC-Promoters. Die Mutation an Aminosäure 525 des Östrogenrezeptors führt zu einer Insensitivität gegenüber des natürlichen Liganden 17 β -Östradiol und erlaubt eine Aktivierung durch den Östrogen-Antagonisten Tamoxifen. Die Möglichkeit der temporären Deletion eines Gens mit Hilfe der MCM-Mauslinie basiert darauf, dass der Östrogenrezeptor in Abwesenheit eines Liganden von Hitzeschockproteinen gebunden ist, die seine Translokation in den Zellkern verhindern. Durch Tamoxifengabe wird das MCM Konstrukt freigesetzt und transloziert in den Zellkern. Dies führt zur Exzision der geflochtenen Gensequenz. Die Verpaarung einer Mauslinie, in der Gene oder Gensequenzen gefloxt sind, mit der aMyHC-MCM Mauslinie, ermöglicht demnach eine Tamoxifen-induzierbare Kardiomyozyten-spezifische Deletion des gewünschten Gens.

3.1.10.3 *Mstn*^{fl/fl}

Die *Mstn*^{fl/fl} Mauslinie wurde von generiert. Dabei wurden Exon1 und 2 des murinen Myostatin Gens durch loxP-Elemente flankiert. Zwischen Exon 2 und 3 wurde eine Neomycin-Phosphotransferase cDNA unter der Kontrolle eines PGK Promoterelements (PGK-Neo), flankiert von FRT Elementen, inseriert (s. Abb. 18). Dies ermöglichte eine G418-Selektion der positiven ES-Zellklone. Die homologe Rekombination in ES Zellen wurde durch Southern Blotting bestätigt. Im Anschluss wurden die positiven ES-Zellklone zur Generierung chimärer Mäuse durch Blastozysten-Injektion verwendet. Die heterozygoten Nachkommen wurden mit einer Mauslinie, die die Flp Rekombinase exprimiert³²⁷ verpaart. Dies führte zur Exzision der Selektionskassette. Zur Auskreuzung des Flp-Rekombinase Transgens wurde die resultierende Mauslinie mit C57Bl6/J Mäusen verpaart, wodurch Nachkommen generiert wurden, die nur das *Mstn*^{fl/fl}-Allel tragen. Diese Mauslinie wurde im C57Bl6/J-Hintergrund gehalten. Zur Generierung von Kardiomyozyten-spezifischen und Tamoxifen-abhängigen *knockouts*, wurden *Mstn*^{fl/fl} Mäuse mit aMyHC-Cre (aMyHC-Cre/*Mstn*^{fl/fl}) und aMyHC-MCM (aMyHC-MCM/*Mstn*^{fl/fl}) Mäusen verpaart.

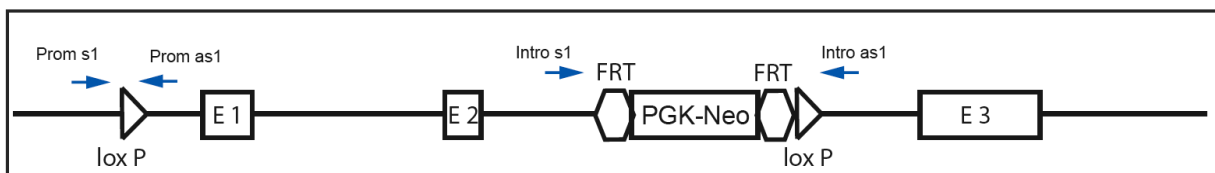


Abbildung 18: Schematische Darstellung des *Mstn*^{fl/fl} Konstrukts

3.1.10.4 CAGG-*Mstn*

Die CAGG-*Mstn* Mauslinie wurde von zur konditionalen Überexpression von Myostatin generiert. Dazu wurde eine IRES2-EGFP-Kassette (Clontech) mit 5'XhoI-3'NotI ausgeschnitten und in pBluescript kloniert. Im Anschluss wurde die gesamte cDNA-Sequenz des murinen Myostatin Gens, flankiert von einer 5'BglII und einer 3'SalI Schnittstelle, stromaufwärts von der IRES-EGFP-Kassette kloniert. Das *Mstn*-IRES2-EGFP-Fragment wurde unter Verwendung der BglII und NotI Schnittstellen in den pCALL Vektor³²⁸ kloniert. Dieser enthält ein βgeo (lacZ/neoR Fusion) Gen, welches von loxP-Elementen flankiert ist, unter der Kontrolle des CAGG-Promoters. Stromabwärts des βGeo befindet sich eine dreifache SV40 Poly-A-Sequenz (s. Abb. 19). Das *Mstn*-IRES2-EGFP Konstrukt wird nur transkribiert, wenn die Cre Rekombinase aktiv ist. Das finale Konstrukt wurde in ES-Zellen elektroporiert und mit G418 selektiert. Nach einer β-Galaktosidase-Färbung wurden positive Klone expandiert, mit einem Plasmid, das eine Cre Rekombinase exprimiert, elektroporiert und die EGFP Expression überprüft. Zur Selektionierung von ES-Zellklonen, die nur eine einfache Integration des Transgens ins Genom besitzen, wurden die vorher doppelt positiven ES-Zellklone einem Southern Blot unterzogen. Ein stark und ein moderat exprimierender Klon wurden in Blastozysten injiziert um chimäre Mäuse zu generieren. Die heterozygoten Nachkommen wurden zur Erhaltung in C57Bl6/J zurückgekreuzt. Zur Generierung von Kardiomyozyten-spezifischen und

Tamoxifen-abhängigen Transgenen, wurden CAGG-*Mstn* Mäuse mit aMyHC-Cre (aMyHC-Cre/CAGG-*Mstn*) und aMyHC-MCM (aMyHC-MCM/CAGG-*Mstn*) Mäusen verpaart.

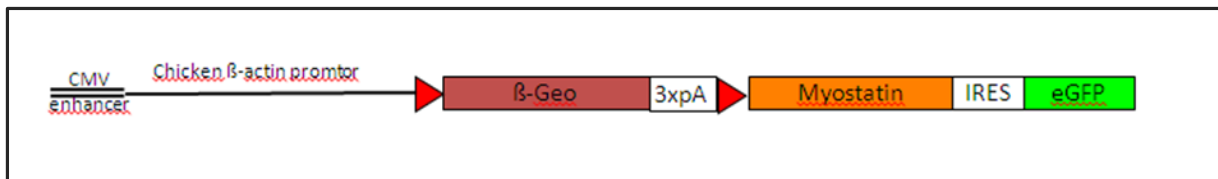


Abbildung 19: Schematische Darstellung des CAGG-*Mstn* Konstrukts

3.1.10.5 *Igf-1^{fl/fl}*

Zur Generierung der *Igf-1^{fl/fl}* Mauslinie wurden loxP-Elemente in Exon 3 und hinter Exon 4 des murinen *Igf-1* Genlokus inseriert ³²⁹. Durch Verpaarung der *Igf-1^{fl/fl}* Mauslinie mit aMyHC-Cre (aMyHC-Cre/*Igf-1^{fl/fl}*) und aMyHC-MCM (aMyHC-MCM/*Igf-1^{fl/fl}*) wird eine Deletion von *Igf-1* in Kardiomyozyten erreicht. Desweiteren wurden aMyHC-Cre/*Igf-1^{fl/fl}* und aMyHC-MCM/*Igf-1^{fl/fl}* Mäuse mit *Mstn^{fl/fl}* Mäusen zur Generierung eines Kardiomyozyten-spezifischen Doppel-*knockouts* (aMyHC-Cre/*Mstn^{fl/fl}*/*Igf-1^{fl/fl}* bzw. aMyHC-MCM/*Mstn^{fl/fl}*/*Igf-1^{fl/fl}*) verpaart.

3.1.11 Software

Tabelle 12: Verwendete Software

Software	Hersteller
ADInstruments Labchart 7.02	ADInstruments, Sydney, Australia
Arraystar 5.0	DNASTAR, Inc., Madison, USA
AxioVision® 4.8	Carl Zeiss Imaging Solutions GmbH, Jena
Bruker Paravision 5.1	Bruker, Ettlingen
Dataquest A.R.T.™ Systems	Data Sciences International (DSI), St. Paul, USA
GraphPad Prism®	GraphPad Software Inc., San Diego, USA
Adobe® Illustrator® CS5	Adobe Systems Incorporated, San Jose, USA
ImageJ	National Institutes of Health, Bethesda, USA
Imaris 5	Bitplane AG, Zürich, Schweiz
Office 2007	Microsoft Corporation, Redmond, USA
QMassMR	Medis medical imaging systems, Leiden, Niederlande
Quantity One	BioRad Laboratories GmbH, München

3.2 Methoden

3.2.1 tierexperimentelle Methoden

3.2.1.1 Haltung von Mauslinien

Die verwendeten Mauslinien wurden in Plastik Käfigen auf Streu gehalten. Sie erhielten Trockenfutter und Wasser nach Belieben. Es wurde ein strikter Tag- und Nachtzyklus von jeweils 12 Stunden eingehalten. Die Mäuse wurden im Alter von zwei bis drei Wochen mit einer Ohrmarkierung gekennzeichnet. In diesem Alter wurde auch eine Schwanzbiopsie zur Gewinnung von genomischer DNA durchgeführt. Alle Arbeiten mit den Versuchstieren hielten sich an die geltenden Richtlinien der Tierschutzkommission.

3.2.1.2 Induktion der Cre Rekombination

Die Cre Rekombination in sämtlichen geflochten Mauslinien, die mit aMyHC-MCM verpaart wurden, wurde durch intraperitoneale Injektion von Tamoxifen (100µl/40g Maus, Konzentration 40mg/ml) über einen Zeitraum von fünf Tagen erreicht. Diese Menge ist ausreichend, um die geflochten Gene bzw. Gensequenzen in adulten Kardiomyozyten zu deletieren. Um Seiteneffekte von Tamoxifen auszuschließen wurde aMyHC-MCM Versuchstieren als Kontrollgruppe ebenfalls Tamoxifen injiziert. Es wurden jeweils Männchen im Alter von 3 Monaten verwendet.

3.2.1.3 Behandlung von Versuchstieren mit pharmakologischen Inhibitoren

Zur Überprüfung ob biochemisch veränderte Signalwege verantwortlich für den Phänotyp in aMyHC-MCM/*Mstn*^{fl/fl} Mäusen sind, wurden pharmakologische Inhibitoren verwendet.

Atenolol, ein selektiver β1-Adrenorezeptorblocker, wurde in einer Konzentration von 0.1g/l im Trinkwasser über einen Zeitraum von 10 Tagen verabreicht. Die Konzentration wurde anhand von Literaturangaben angelehnt³³⁰. In den ersten fünf Tagen wurden aMyHC-MCM Kontrolltiere und aMyHC-MCM/*Mstn*^{fl/fl} Mäuse mit Tamoxifen behandelt, um die Deletion von Myostatin in adulten Kardiomyozyten zu induzieren (s. 3.2.1.2). Sowohl die Herzfunktion von aMyHC-MCM Kontrolltieren als auch von aMyHC-MCM/*Mstn*^{fl/fl} Mäusen wurde vor und nach Behandlung mit Atenolol durch MRT-Messung überprüft (s. 3.2.1.4.1).

Compound C, ein selektiver, reversibler und ATP-kompetitiver Inhibitor der AMP-aktivierten Kinase (AMPK) wurde als Hydrochlorid in einer Konzentration von 20mg/kg in isotonischer Natriumchlorid-Lösung intraperitoneal injiziert. Dies wurde jeden zweiten Tag über einen Zeitraum von zehn Tagen durchgeführt. Diese Verabreichungsform wurde an Literaturangaben angelehnt³³¹. Parallel zur Verabreichung von Compound C, wurde aMyHC-MCM Kontrolltieren und aMyHC-MCM/*Mstn*^{fl/fl} Mäusen in den ersten fünf Tagen Tamoxifen injiziert (s. 3.2.1.2). Die Herzfunktion der Versuchstiere

wurden ebenfalls vor und nach Compound C Gabe und Induktion der Myostatin Deletion durch MRT-Messung untersucht (s. 3.2.1.4.1).

3.2.1.4 physiologische Messungen

3.2.1.4.1 MRT-Messungen

Die Magnetresonanztomographie ist ein hochentwickeltes nicht-invasives Bildgebungsverfahren. Es beruht auf dem Kernspin der Protonen im Wasser verschiedener Gewebe. Durch Induktion eines Magnetfelds wird eine longitudinale Magnetisierung der Kernspins erreicht. Das kurzzeitige Anlegen von Radiowellen einer bestimmten Resonanzfrequenz mit Hilfe dreier Gradienten führt zur Auslenkung des Kernspins, der daraufhin um die Feldrichtung des statischen Magnetfeldes präzediert. Nach dem Abschalten der Radiowellen richten sich die Kernspins zur Wiederherstellung ihres thermodynamischen Gleichgewichts wieder zum Magnetfeld aus. Diese Relaxation ist abhängig von der Protonendichte, der longitudinalen (T1) und transversalen (T2) Relaxationszeit und somit in verschiedenen Geweben unterschiedlich. Während der Relaxation wird ein Radiofrequenzsignal generiert, welches mit einer Spule gemessen wird. Mit Hilfe der Fourier-Transformation wird danach ein 2-dimensionales Bild generiert.

MRT-Messungen wurden mit einem 7.0T (300MHz für ¹H) Kernspintomographen (Bruker Pharmascan 70/16, Bruker, Ettlingen) mit einem 300mT/m Gradientensystem mit einer Öffnung von 9cm durchgeführt. Während der Messung wurde die Maus auf einer speziellen Haltevorrichtung fixiert und die Anästhesie mit 1,5 bis 2,0 % Isofluran in 0,5 l/min Luft und 0,5 l/min Sauerstoff über eine Inhalationsmaske aufrechterhalten. Die Körpertemperatur wurde mit einem thermostatisch regulierten Wasserflusssystem bei 37°C gehalten. Als Sende- und Empfangsspule kam ein zirkular polarisierter *birdcage*-Resonator (Eigenbau) mit einem Innendurchmesser von 2,5cm zum Einsatz. Zur Lokalisation und Bildgebung wurde eine FLASH (*F*ast *L*ow *A*ngle *S*hot)-Sequenz (Repetitionszeit TR=6,02ms; Echozeit TE=1,6ms; Messfeld=2,20x2,20cm; Schichtdicke=1,0mm; Matrix=128x128; Repetitionen=100) verwendet. Anstelle der klassischen Methoden der Triggerung des EKG- und Atemsignals, wurde die sogenannte *self-gating* Methode IntraGate™ (Bruker, Ettlingen) verwendet³³². Diese bestimmt aus einer jeder Bildzeile im k-Raum vorgeschalteten Navigatorecho die Herzphase. Die Bildebene wurde unter Verwendung von *scout images*, die den Zwei- und Vierkammerblick des Herzes zeigen festgelegt. Im Anschluss erfolgte eine Akquisition im Kurzschnitt, orthogonal zum Septum in beiden *scouts*. Mehrere benachbarte Kurzschnitte, bestehend aus mindestens 6 Schichten zur Abdeckung des linken Ventrikels und 10 Schichten zur Abdeckung des rechten und linken Ventrikels wurden gemessen und ausgewertet. Die Auswertung der Herzfunktion wurde mit Hilfe der Software QmassMR (Medis medical imaging systems, Leiden, Niederlande) durchgeführt. Dabei wurde in jeder Schicht der Kurzschnitt der Endsystole und Enddiastole verwendet.

3.2.1.4.2 EKG mittels Telemetrie

Zur Analyse der elektrischen Aktivitäten des Herzens mittels EKG im Zeitraum vor und nach der Induktion der Myostatin Deletion im adulten Herzen, wurden EKG-Transmitter in aMyHC-MCM und aMyHC-MCM/*Mstn*^{fl/fl} Mäuse durch implantiert. Dies erlaubt die Analyse der Versuchstiere über einen längeren Zeitraum ohne Beeinträchtigung der Tiere durch Fixierung oder Narkose. Den Versuchstieren wurden dazu unter Ketamin/Xylazin-Anästhesie telemetrische Transmitter TA10EA-F20 (Data Sciences International (DSI), St. Paul, USA) nach Protokoll der zugehörigen Firma (DSI) implantiert. Dabei wurde der Bauchraum des Tieres geöffnet und der Transmitter zunächst lose auf den Darm gelegt. Die Elektroden wurden durch die Bauchdecke geführt und zwischen Haut und Körperwand in Richtung des Kopfes geführt. Die positive Elektrode wurde links lateral des *processus xiphoideus* unter der Haut befestigt. Die negative Elektrode wurde am *musculus pectoralis major* fixiert. Der Transmitter wurde an der Bauchdecke vernäht. 8 Tage nach der Operation wurde mit der Aufnahme der EKG-Daten begonnen. Die Daten wurden alle 30min für 5min bei einer Aufnahme rate von 1kHz mit Hilfe der Software Dataquest A.R.T Acquisition 4.0 aufgenommen. Ab Tag 4 der EKG-Messung wurden die Versuchstiere mit Tamoxifen über einen Zeitraum von fünf aufeinanderfolgenden Tagen behandelt. Die EKG-Daten wurden mit Hilfe der Software ADInstruments Labchart 7.02 ausgewertet. Dabei wurden jeweils 2 Messpunkte tagsüber und zwei Messpunkte nachts ausgewertet und gemittelt.

3.2.1.5 Tötung von Versuchstieren

Zur Entnahme des Herzens wurde den Versuchstieren 150µl Heparin intraperitoneal injiziert. Nach Tötung durch zervikale Dislokation mit anschließender Durchtrennung des Diaphragmas erfolgte die Entnahme des Herzens.

3.2.1.6 Präparation von Mausherzen

Die Versuchstiere wurden wie in 3.2.1.5 beschrieben getötet. Dabei wurde das gesamte Herz aus der Maus entfernt. Nach Waschen des Herzens in eiskaltem PBS wurden die Atrien entfernt. Ein etwa 2mm großer Bereich in der Mitte der Ventrikel wurde mit einem Skalpell entfernt und für Gefrierschnitte (s. 3.2.4.1) in Tissue-Tek® OCT™ Einfriermedium ohne vorherige Fixierung eingebettet. Im Anschluss wurde der eingebettete Teil in, mit Flüssig-Stickstoff gekühlten, Isopentan eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C aufbewahrt. Der Apex und die Basis wurden vermischt, mit Skalpellen zerkleinert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Im Anschluss erfolgte die Lagerung bei -80°C, bis sie für RNA- oder Proteinisolation verwendet wurden (s. 3.2.2.2 und 3.2.3.1).

3.2.1.7 Isolierung und Kultivierung von Kardiomyozyten

Die Isolierung von Kardiomyozyten und Nicht-Kardiomyozyten wurde von Marion Wiesnet nach einem Protokoll von O'Connell³³³ mit kleineren Abweichungen durchgeführt. Dabei wurde das Herz wie in 3.2.1.6 beschrieben aus dem Versuchstier entnommen. Im Anschluss wurde die Aorta mit einem Perfusionssystem unter Verwendung von Calcium-freiem Puffer kanüliert. Die Kardiomyozyten wurden durch eine Kollagenase-basierende enzymatische Lösung dissoziiert. Nach dem enzymatischen Verdau wurden die Atrien und die Aorta entfernt und die Ventrikel dissoziiert. Nachdem die Kardiomyozyten sich abgesetzt hatten, wurde der Überstand entfernt und bei 300rpm 1min zentrifugiert. Das entstandene Pellet enthält Kardiomyozyten und wurde mit der Kardiomyozytenfraktion vereinigt. Der Kardiomyozytenfraktion wurde wieder Calcium zugeführt. Nach einer erneuten Zentrifugation bei 300rpm für 1min, wurde der Überstand wiederum entfernt und mit dem vorherigen Überstand vereinigt. Die Überstandsfraktion wurde bei 1200rpm für 3min zentrifugiert. Das dabei entstandene Pellet enthält Nicht-Kardiomyozyten. Beide Pellets wurden entweder direkt für die Isolierung von RNA (s. 3.2.2.2) verwendet, oder bei -80°C gelagert.

Um Stimulierungsexperimente *in vitro* in Kardiomyozyten durchzuführen, wurde Wildtyp-Kardiomyozyten, nach deren Isolierung, wieder Calcium zugeführt um isolierte, ruhende, stäbchenförmige Kardiomyozyten zu erhalten. Sie wurden im Kardiomyozyten-Kulturmedium (s. 3.1.6) über Nacht bei 37°C inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Stimulierung mit verschiedenen rekombinanten Proteinen, pharmakologischen Aktivatoren und Inhibitoren (s. 3.1.7). Dazu wurde die jeweilige Substanz für den angegebenen Zeitraum in das Kardiomyozyten-Kulturmedium gegeben und die Inkubation der Kardiomyozyten bei 37°C fortgesetzt. Es wurden immer Kardiomyozyten aus einem Wildtyp-Herz für alle verschiedenen Stimulierungsbedingungen verwendet, um eine möglichst hohe Vergleichbarkeit zu gewährleisten. Jeder Stimulierungsversuch wurde mindestens dreimal mit verschiedenen Wildtypen wiederholt. Im Anschluss an die Stimulierung wurde das Medium entfernt und die Zellen wurden mit Kardiomyozyten-Waschpuffer (s. 3.1.6) gewaschen. Sollten die Kardiomyozyten zur Proteingewinnung dienen, wurden sie mit Protein Extraktionspuffer inklusive Proteinase/Phosphatase-Inhibitoren (s. 3.1.6) lysiert und im Anschluss mit der Proteinisolation fortgefahren (s. 3.2.3.1). Für die Gewinnung von RNA wurden die Kardiomyozyten in 1ml Trizol aufgenommen und mit einem Zellschaber von der Zellkulturschale gelöst. Danach wurde entweder mit der RNA-Isolierung fortgefahren (s. 3.2.2.2) oder die Proben wurden bei -80°C gelagert.

3.2.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.2.1 Isolierung von genomischer DNA aus Mausschwanzbiopsien

Zur Isolierung von genomischer DNA aus murinen Schwanzbiopsien wurden etwa 0,5cm große murine Schwanzbiopsien über Nacht in 500µl TENS-Puffer inklusive 10µl Proteinase K bei 55°C unter Schütteln lysiert. Nach Fällung der genomischen DNA mit Hilfe von Isopropanol und einem Waschschriff mit 70%igem Ethanol wurde die DNA getrocknet. Das erhaltene DNA-Pellet wurde in 300µl MilliQ-Wasser unter Schütteln bei 55°C gelöst. Für nachfolgende Genotypisierungs-PCRs wurde jeweils ein µl dieser DNA-Lösung eingesetzt.

3.2.2.2 Isolierung von RNA aus murinem Gewebe und kultivierten Kardiomyozyten

Die RNA-Isolierung aus murinem Gewebe und kultivierten Kardiomyozyten wurde mit Hilfe des Trizol® Reagenz nach Protokoll von Invitrogen durchgeführt. Dies ist eine Modifikation des Protokolls der sauren Guanidiniumthiocyanat-Phenol/Chloroform Extraktion von Chomczynski und Sacchi ³³⁴. Guanidiniumthiocyanat, ein chaotropes Salz, lysiert hierbei die Zellen und inaktiviert RNAsen. Durch den niedrigen pH-Wert des gepufferten Phenols (pH um 4) löst sich die RNA im Wässrigen, während die DNA nicht mehr löslich ist.

Murines Gewebe wurde nach Zugabe von 1ml Trizol und einem Stahlkugelchen 5min bei 30Hz in der Schwingmühle (Schwingmühle MM 301, Retsch GmbH) homogenisiert und im Anschluss nach Protokoll weiterverarbeitet. Kardiomyozyten wurden direkt nach der Stimulierung in 1ml Trizol aufgenommen (s. 3.2.1.7) und ebenfalls nach Protokoll verarbeitet. Das entstandene RNA-Pellet wurde in 20µl DEPC-Wasser aufgenommen. Im Anschluss wurde die Konzentration und Qualität der RNA mittels NanoDrop 2000/2000c Spektralphotometer bestimmt. Der Absorptionsquotient von 260/280nm diente dabei der Qualitätskontrolle der RNA und sollte bei 2,0 liegen.

3.2.2.3 Polymerase-Kettenreaktion

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR = *Polymerase Chain Reaction*) können DNA-Fragmente exponentiell amplifiziert werden. Zur Genotypisierung von Versuchstieren wurde eine hitzestabile Taq DNA-Polymerase ³³⁵ in folgendem Ansatz verwendet:

Tabelle 13: Reaktionsansatz für eine Genotypisierungs-PCR

0,5µl	Taq DNA Polymerase
2,5µl	10x Taq-Puffer
1µl	Magnesiumchlorid (50mM)
0,5µl	dNTP Mix (10mM, aus 10mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
0,5µl (jeweils)	Vorwärts- und Rückwärts-Oligonukleotid (10µM)
18,5µl	Wasser
1µl	Genomische DNA
25µl	Gesamtvolumen

Der Reaktionsansatz wurde auf Eis pipettiert. Die PCR-Reaktionen wurden in den PCR-Maschinen der Firmen Sensoquest, Eppendorf und Bio-Rad (s. 3.1.3) durchgeführt. In Abhängigkeit von der Länge des gewünschten DNA-Fragments und der Schmelztemperatur der Oligonukleotide, wurde folgendes Programm verwendet:

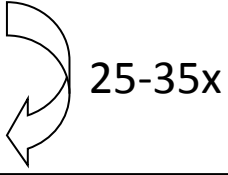
5min	95°C	Denaturierung	
0,5-1min	95°C	Denaturierung	
0,5-1min	x°C	Hybridisierung	
0,5-1min	72°C	Elongation	
5min	72°C	Elongation	

Abbildung 20: Repräsentatives Programm einer Genotypisierungs-PCR

Da die Schmelztemperatur der Oligonukleotide von der Länge des gewünschten DNA-Fragments und dessen GC-Gehalt abhängt, lässt sich die Hybridisierungstemperatur annähernd nach folgender Formel bestimmen:

$$\text{Hybridisierungstemperatur} = 4x(\text{G+C}) + 2x(\text{A+T}) - 5^\circ\text{C}$$

Hierbei stehen G, C, A und T für die Nukleinbasen. Die für Genotypisierungen verwendeten Oligonukleotide und Hybridisierungstemperaturen sind in Tabelle 8 aufgeführt.

3.2.2.3.1 Reverse Transkription zur Generierung komplementärer DNA (cDNA)

Nach Isolierung der RNA aus murinem Gewebe und kultivierten Kardiomyozyten, wurde mit der cDNA-Synthese fortgefahren. Dazu wurde 1µg RNA mit Hilfe von SuperScriptII® Reverser Transkriptase (Invitrogen), Oligo(dt)₁₅ Primern und RNAsin® Plus (RNase Inhibitor, Promega) entsprechend des Protokolls von Invitrogen revers transkribiert. Das Gesamtvolumen wurde im Anschluss der reversen Transkription mit DEPC-Wasser auf 40µl erhöht. Die erhaltene cDNA wurde danach für quantitative Real-Time-PCRs (qRT-PCR, s. 3.2.2.3.2) verwendet.

3.2.2.3.2 quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR)

Im Anschluss an die erfolgreiche cDNA-Synthese, wurde die mRNA-Expression verschiedener Gene mit Hilfe der quantitativen Real-Time-PCR (qRT-PCR) untersucht. Dabei wurde der Absolut™ SYBR® Green Fluoreszein Mix (Thermo Scientific) verwendet. Bei Sybr Green handelt es sich um einen Cyanin-Farbstoff, der in doppelsträngige DNA interkaliert. Sybr Green selbst besitzt nur eine sehr geringe intrinsische Fluoreszenz. Die Interkalation von SybrGreen in doppelsträngige DNA erhöht die Fluoreszenz des Chromophors um das über 1000-fache. Nach Anregung mit ultraviolettem Licht erfolgt eine Emission bei einer Wellenlänge von 521nm. Da mit zunehmender Menge an doppelsträngiger DNA proportional mehr SybrGreen interkalieren kann, korreliert die Fluoreszenz-Intensität direkt mit der Menge an doppelsträngiger DNA. Die qRT-PCR wurde mit der iCycler iQ Multicolor Real Time PCR Maschine (Bio-Rad, München) in Triplikaten durchgeführt. *Arp* (*acidic ribosomal protein*) diente dabei als interner Standard. Im Anschluss an die qRT-PCR wurde eine

Schmelzkurvenanalyse zur Analyse der Reinheit des PCR-Produktes durchgeführt. Da die Schmelztemperatur von DNA von ihrer Länge und ihrem GC-Gehalt abhängt, ermöglicht die Schmelzkurvenanalyse die Detektion unspezifischer PCR-Produkte, wie beispielsweise Oligonukleotid-Dimere. Die Differenzierung zwischen unspezifischen Produkten und dem gewünschten Produkt ist dadurch möglich, dass durch das Aufschmelzen der doppelsträngigen DNA SYBR® Green wieder freigesetzt wird, wodurch die Fluoreszenzemission abnimmt. Der größte Nachteil dieser Methode ist, dass im Falle der Bildung unspezifischer Produkte, keine quantitative Auswertung mehr möglich ist. Es wurden – in Abhängigkeit der Schmelztemperaturen der gewählten Oligonukleotide (s. Tabelle 9) – folgende Ansätze und PCR-Programme durchgeführt:

Tabelle 14: Reaktionsansatz für eine qRT-PCR

12,5µl	Sybr® Green Mix
1µl (jeweils)	Vorwärts- und Rückwärts-Oligonukleotid (2,5µM)
8,5µl	Wasser
10µl	cDNA (1:100 verdünnt)
25µl	Gesamtvolumen


15min	95°C	Denaturierung	 50x
30s	95°C	Denaturierung	
30s	x°C	Hybridisierung	
30s	72°C	Elongation	
10s	50°C	Schmelzkurvenanalyse (100 Zyklen) (Erhöhung um 0,5°C je Zyklus)	

Abbildung 21: Repräsentatives Programm für eine qRT-PCR

Die qRT-PCR-Schritte, in denen die Fluoreszenzemission detektiert wurde, sind in Abbildung 21 grün hinterlegt. Die Auswertung erfolgte mit der $\Delta\Delta C_T$ -Methode. Der C_T -Wert wurde als Zyklenzahl, bei der die PCR-Amplifizierung einen Schwellenwert übersteigt, definiert. Der C_T -Wert des zu untersuchenden Gens wurde auf den C_T -Wert der endogenen Referenz (*Arp*) normiert. Dies geschah unter der Annahme, dass die endogene Referenz in verschiedenen Proben identisch ist. Die relative Menge an der zu untersuchenden mRNA wurde mit Hilfe der folgenden Formel bestimmt:

$$2^{-\Delta\Delta C_T} \quad \text{wobei } \Delta\Delta C_T = [C_{T, \text{Gen X}} - C_{T, \text{Arp}}]_{\text{Mutante}} - [C_{T, \text{Gen X}} - C_{T, \text{Arp}}]_{\text{Kontrolle}}$$

Für Kontrolltiere ist $\Delta\Delta C_T=0$ und $2^{-\Delta\Delta C_T}=1$. Für Mutanten gibt der Wert von $2^{-\Delta\Delta C_T}$ die x-fache Änderung der Genexpression im Vergleich zur Kontrolle an.

3.2.2.4 Genexpressionsanalyse mittels MicroArray

Zur Analyse von Veränderungen der mRNA-Expression in Herzventrikeln von aMyHC-MCM/*Mstn*^{fl/fl} Mäusen 10 Tage nach Induktion des knockouts, wurden Affymetrix Mouse Gene 1.0 ST Arrays von der hausinternen Servicegruppe um durchgeführt. Als Kontrolltiere dienten ebenfalls 10 Tage vorher mit Tamoxifen behandelte aMyHC-MCM Mäuse. Nach Extraktion der RNA (s. 3.2.2.2), wurde deren Qualität mit dem Agilent 2100 Bioanalyser mit Hilfe des RNA 6000 Nano-Kits überprüft. Die Proben wurden anhand des Protokolls „*WT terminal labeling and hybridization for use with Ambion WT expression kit*“ behandelt und mit den Affymetrix Mouse Gene 1.0 ST Arrays hybridisiert. Die Rohdaten wurden mit der Affymetrix Expressionskonsole unter Verwendung des RMA Analyse-Algorithmus analysiert. Die statistische Auswertung wurde mit Hilfe der Arraystar 5.0. Software durchgeführt. Die Array-Daten wurden unter ArrayExpress (Zugangsnummer: E-MEXP-3744) hinterlegt.

3.2.3 Biochemische Methoden

3.2.3.1 Isolierung von Proteinen aus murinen Herzventrikeln und Kardiomyozyten

Zur Isolierung von Proteinen aus murinen Herzventrikeln wurden die bei -80°C gelagerten Herzventrikel (s. 3.2.1.6) in einen auf Trockeneis vorgekühlten Mörser überführt. Im Anschluss wurde unter Verwendung von Flüssig-Stickstoff das Herzgewebe mit einem Pistill zu einem feinen Pulver verarbeitet. Dieses wurde in ein 1,5ml Reaktionsgefäß überführt und mit 100µl Protein Extraktionspuffer inklusive Protease/Phosphatase-Inhibitoren (s. 3.1.6) überschichtet. Bei kultivierten Kardiomyozyten wurde nach der jeweiligen Stimulation das Kulturmedium abgesaugt. Im Anschluss erfolgte ein Waschschriff mit Kardiomyozyten-Waschpuffer (s. 3.1.6). Die Kardiomyozyten wurden ebenfalls mit 100µl Protein Extraktionspuffer inklusive Protease/Phosphatase-Inhibitoren lysiert und von der Zellkulturschale abgelöst. Die weitere Vorgehensweise ist für murines Gewebe und kultivierte Kardiomyozyten identisch. Der Aufschluss der Zellen erfolgte mit Hilfe eines Ultraschall-Homogenisators (Amplitude 20% für 10s), wobei durch kurze Inkubationszeiten auf Eis ein Überhitzen der Lysate vermieden wurde. Nach einer Zentrifugation des Lysats bei 14000g über 5min und 4°C, wurde der Überstand abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Im Anschluss wurde der Proteingehalt mit Hilfe der Lowry-Methode (s. 3.2.3.2) bestimmt.

3.2.3.2 Proteinbestimmung nach Lowry

Zur Bestimmung des Proteingehalts der aus Herzventrikeln und Kardiomyozyten isolierten Proteine, wurde das DCTM Protein Kit (Bio-Rad, München) verwendet. Dies basiert auf der Lowry Methode³³⁶. Dabei wird im ersten Schritt, einer Biuret-Reaktion, eine basische Kupferlösung zum Protein zugegeben. Das Kupfer bildet mit den Stickstoffatomen der Peptidbindung einen Komplex und wird dadurch zu Cu⁺ reduziert. Durch Zugabe des gelben Folin-Ciocalteau-Reagenz (Phosphomolybdat und Phosphowolframat-Mischung) wird Cu⁺ zu Cu³⁺ oxidiert, während das Folin-Reagenz zu Molybdänblau reduziert wird. Die Extinktion des gebildeten Molybdänblau kann bei einer Wellenlänge von 750nm

detektiert werden. Zur Proteinbestimmung wurde eine Standardreihe mit einem Protein bekannter Konzentration (Rinderserumalbumin, BSA, s. Tabelle 15) durchgeführt.

Tabelle 15: Standardreihe zur Proteinbestimmung nach Lowry

BSA Standard (20mg/ml) in μl	Extraktionspuffer in μl	Milli-Q Wasser in μl	Konzentration in $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
0	2	10	0
1	2	9	2
2	2	8	4
5	2	5	10
10	2	0	20

Die Standardreihe sowie die zu bestimmenden Lysate wurden in Duplikaten in einer 96-Loch-Platte angesetzt. Dabei wurden im Allgemeinen $2\mu\text{l}$ Proteinlysate eingesetzt. Die Extinktion wurde mit Hilfe des FluoStar[®] Mikroplatten-Readers (BMG) detektiert und ausgewertet. Im Anschluss wurde mit Hilfe von 5x SDS-Probenpuffer (s. 3.1.6), $4\mu\text{l}$ 1M DTT und $2\mu\text{l}$ Bromphenolblau eine Konzentration von $2\mu\text{g}/\mu\text{l}$ eingestellt (Gesamtvolumen $100\mu\text{l}$). Dabei diente DTT der Reduktion der Disulfidbrücken. SDS im 5x SDS-Probenpuffer zerstört die hydrophoben Wechselwirkungen der Proteine und überträgt durch seine Bindung an diese seine hohe negative Ladung auf sie. Im Anschluss wurden die Lysate bei 95°C für 5min denaturiert und bis zur weiteren Verwendung in der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (s. 3.2.3.3) bei -20°C gelagert.

3.2.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine nach ihrer Molekülmasse erfolgte mit Hilfe von NuPAGE Novex Bis-Tris Gelen (4-12%, Invitrogen). Diese wurden in einer XCell SureLock[®] Gelelektrophoresekammer (Invitrogen) fixiert und 1x MES-Puffer (s. 3.1.6) zugegeben. Es wurden in der Regel $10\text{-}20\mu\text{g}$ Proteinlysate (s. 3.2.3.2) sowie der BenchMark[™] Proteinstandard (Invitrogen) aufgetragen. Die Auftrennung der Proben wurde bei $120\text{-}200\text{ V}$ durchgeführt. Im Anschluss wurden die Proteine per Tankblot-Verfahren auf eine Nitrozellulosemembran (s. 3.2.3.4) übertragen.

3.2.3.4 Western Blot-Verfahren

Zur Übertragung der durch die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine (s. 3.2.3.3) auf eine Nitrozellulosemembran wurde ein Western Blot durchgeführt. Dabei wurde das SDS-Polyacrylamidgel inklusive einer Nitrozellulosemembran in die XCell II[™] Tankblot-Apparatur (Invitrogen) mit Transferpuffer gesetzt. Dabei muss die Nitrozellulosemembran auf der Seite der Anode liegen. Zur Transferierung der Proteine wurde zwei Stunden eine Spannung von 30V angelegt. Die Proteine binden dabei durch hydrophobe Wechselwirkungen an die Nitrozellulosemembran. Der

erfolgreiche Proteintransfer wurde mit einer Ponceau S Färbung überprüft. Bei Ponceau S handelt es sich um einen roten Azofarbstoff, der reversibel an Proteine binden kann.

3.2.3.5 Inkubation des Western Blots mit Erst- und Zweitantikörpern

Im Anschluss an den Proteintransfer (s. 3.2.3.4) wurde die Nitrozellulosemembran eine Stunde mit 5% Milchpulver in TBS/T (s. 3.1.6) geblockt. Dadurch wurde verhindert, dass unspezifische Bindungen des Erst- und Zweitantikörpers an die Membran entstehen. Nach dem einstündigen Blocken der Nitrozellulosemembran wurde diese dreimal je 5min mit TBS/T gewaschen. Im Anschluss wurde der Erstantikörper in der entsprechenden Verdünnung (s. Tabelle 10) zugegeben und der Blot über Nacht bei 4°C in der Antikörper-Lösung auf dem Kipp-Schüttler inkubiert. Am folgenden Tag wurde der Erstantikörper abgenommen und die Membran dreimal 5min mit TBS/T gewaschen um ungebundenen Erstantikörper zu entfernen. Im Anschluss wurde die Membran mit dem zugehörigen Zweitantikörper in der jeweiligen Verdünnung (s. Tabelle 11) eine Stunde inkubiert. Nach einem erneuten dreimaligen Waschschrift wurde die Membran mit dem Super Signal West Femto™ Substrat (Thermo Fisher Scientific) inkubiert. Die an den Zweitantikörper gekoppelte Meerettich-Peroxidase katalysiert die Oxidation von Luminol mit Hilfe von Wasserstoffperoxid (beides ist im Super Signal West Femto™ Substrat enthalten). Die emittierte Chemilumineszenz wurde mit Hilfe einer CCD-Kamera (VersaDoc™ 3000, Bio-Rad, s. 3.1.3) detektiert. Die Proteinbanden wurden mit Hilfe der Software Quantity One (Bio-Rad) ausgewertet.

3.2.4 Histologische Methoden

3.2.4.1 Anfertigen von Gefrierschnitten von Mausherzen

Nach Einbetten des mittleren Bereichs der murinen Ventrikel in Tissue-Tek® OCT™ Medium (s. 3.2.1.6) wurden diese bis zur Anfertigung von Gefrierschnitten bei -80°C gelagert. Gefrierschnitte wurden mit Hilfe des Leica CM3050 Kryotoms (s. 3.1.3) angefertigt. Dabei wurde für Gefrierschnitte von Mausherzen eine Blocktemperatur von -20 bis -22°C verwendet. Die 10µm dicken Gefrierschnitte wurden auf SuperFrost Plus Adhäsions-Objektträger (s. 3.1.2) aufgenommen und kurz bei Raumtemperatur getrocknet. Im Anschluss wurden sie feuchtigkeitsgeschützt bei -20°C oder -80°C, bis zur weiteren Verwendung für histologische oder immunologische Färbungen, aufbewahrt.

3.2.4.2 Hämatoxylin- und Eosin-Färbung

Bei der HE-Färbung (Hämatoxylin- und Eosin-Färbung) handelt es sich um die Standardfärbung in der Histologie. Dabei wurde Hämatoxylin Gill Nr. 3 (Sigma-Aldrich, Steinheim) für die blaue Kernfärbung verwendet. Hierbei handelt es sich um einen positiv geladenen Aluminium-Hämatein-Komplex, der die negativ geladenen Phosphatgruppen der DNA im Zellkern bindet. Mit Eosin, einem sauren Xanthenfarbstoff, wird das Zytoplasma rot gefärbt. Für die HE-Färbung wurden die bei -20°C oder -80°C gelagerten Herz-Gefrierschnitte aufgetaut und direkt in eiskaltem Aceton 5min fixiert. Im

Anschluss wurden die Gefrierschnitte 30min bei Raumtemperatur getrocknet. Alle folgenden Schritte fanden bei Raumtemperatur statt. Zuerst wurden die Gefrierschnitte dreimal in Milli-Q Wasser getaucht. Im Anschluss erfolgte eine zehnmütige Färbung der Kerne mit Hämatoxylin Gill Nr. 3. Durch Erhöhen des pH-Wertes mit Hilfe von fließendem Leitungswasser (10min) färben sich die Zellkerne blau-violett. Nach einem dreimaligen Eintauchen der Gefrierschnitte in Milli-Q-Wasser, wurden sie 2-5min in Eosin gefärbt. Um die Eosinfärbung zu fixieren und die Gefrierschnitte zu entwässern, wurden sie zweimal kurz in 96% Ethanol getaucht. Danach erfolgten zwei zweiminütige Waschschrte in 100% Ethanol, gefolgt von zwei zehnmütigen Klärschritten in Xylol. Die HE-gefärbten Herzsnitte wurden mit Entelan® eingedeckelt und mit dem Axiophot 2 Mikroskop (Carl Zeiss, s.3.1.3) mikroskopiert.

3.2.4.3 Masson-Trichrom-Färbung

Die Trichrom-Färbung dient zur Untersuchung von Fibrosen im Herz oder Muskel. Dabei werden Kollagene in der extrazellulären Matrix mit Anilinblau angefärbt. Desweiteren werden die Zellkerne mit Hämatoxylin schwarz und in Herz-Gefrierschnitten die Kardiomyozyten durch Biebrich Scarlet-Säurefuchsin rot gefärbt. Dabei färbt Biebrich Scarlet-Säurefuchsin zuerst auch die extrazelluläre Matrix rot. Die anschließende Verwendung von Phosphowolframsäure und Phosphomolybdänsäure führt zur Diffusion des roten Farbstoffs aus den Kollagenfasern und damit zur Entfärbung. Im Anschluss können die Kollagenfasern mit Anilinblau gefärbt werden. Zu Beginn der Trichromfärbung wurden die Herzgefrierschnitte unfixiert 30min bei Raumtemperatur aufgetaut. Nach einem zweiminütigen Waschschrte in Milli-Q-Wasser, wurde analog Protokoll des Herstellers fortgeföhren (Sigma-Aldrich). Die gefärbten Herzsnitte wurden mit Entelan® eingedeckelt und mit dem Axiophot 2 Mikroskop (Carl Zeiss, s. 3.1.3) mikroskopiert.

3.2.4.4 β -Galaktosidase-Färbung

Mit Hilfe der β -Galaktosidase-Färbung kann die Rekombination in *lacZ* transgenen Geweben überprüft werden. Das *lacZ*-Gen kodiert für das Enzym β -Galaktosidase. Dieses hydrolysiert 5-Bromo-4-chloro-3-indoxyl- β -D-galactosid oder X-Gal zu Galaktose und 5-Brom-4-Chloro-3-indoxyl. 5-Bromo-4-Chloro-3-indoxyl wird dann vom Luftsauerstoff zu tiefblauem 5,5'-Dibrom-4,4'-Dichlor-indigo oxidiert (s. Abbildung 22).

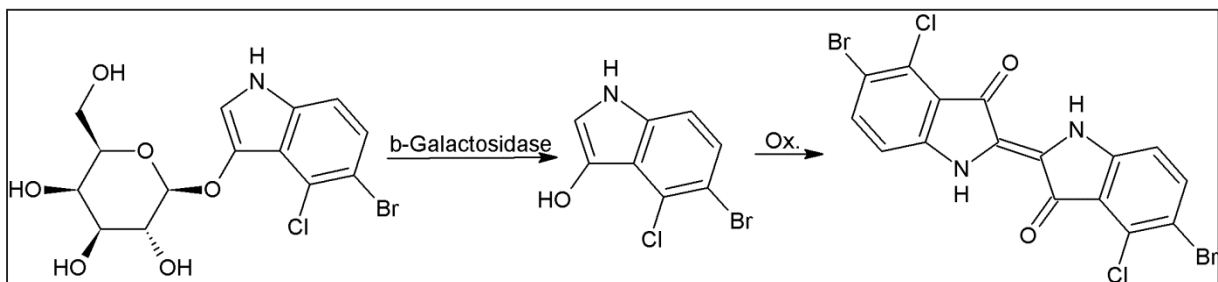


Abbildung 22: Mechanismus der β -Galaktosidase-Färbung

Zur β -Galaktosidase-Färbung von Gefrierschnitten wurden diese kurz bei Raumtemperatur getrocknet und 5min in PBS gewaschen. Nach einer zehnmütigen Fixierung in X-Gal-Fixierlösung (s. 3.1.6) wurden sie dreimal mit LacZ-Waschlösung (s. 3.1.6) gewaschen. Im Anschluss wurden sie über Nacht bei 37°C in X-Gal Färbelösung (s. 3.1.6) unter Lichtausschluss inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen mit PBS, wurden die Gefrierschnitte mit Mowiol (s. 3.1.6) eingedeckelt und mit dem Axiophot 2 Mikroskop (Carl Zeiss, s. 3.1.3) mikroskopiert.

3.2.4.5 Lektin-Färbung (WGA) und Analyse der Kardiomyozyten-Fläche

Zur Bestimmung der Kardiomyozyten-Größe wurde eine Lektin-Färbung durchgeführt. Dazu wurde ein TRITC-markiertes Lektin aus *Triticum vulgare* (Sigma-Aldrich) verwendet. Dieses bindet an Sialinsäure und N-Acetylglucosamin, welche u.a. in der Zellmembran bzw. der extrazellulären Matrix lokalisiert sind. Zur WGA-Färbung wurden Gefrierschnitte kurz bei Raumtemperatur getrocknet und im Anschluss mit 4% PFA 5min fixiert. Danach wurden sie dreimal drei Minuten mit PBS gewaschen. Die Immunfärbung mit TRITC-markiertem Lektin erfolgte bei 4°C über Nacht in einer 1:100-Verdünnung. Nach einem erneuten dreimaligen Waschschrift, wurden die Herzschnitte mit Mowiol eingedeckelt. Zur Mikroskopie wurde das Z1 Fluoreszenzmikroskop (Carl Zeiss, s. 3.1.3) verwendet.

Um die Kardiomyozyten-Fläche auszuwerten wurden vier verschiedene Bereiche (20x Bilder) je Versuchstier mikroskopiert (n=3 je Genotyp und Zeitpunkt). Zur Auswertung wurde die „analyze particles“ Funktion der Software ImageJ (NIH) verwendet.

3.2.4.6 Kollagen-I-Färbung

Zur Verifizierung der Ergebnisse der Trichrom-Färbung wurde eine Kollagen-I-Färbung durchgeführt. Dazu wurden frische Gefrierschnitte 10min in einer Mischung aus 80% Aceton und 20% Methanol fixiert und anschließend getrocknet. Nach dreimaligem dreiminütigen Waschen in PBS, wurden sie über Nacht mit einem Biotin-konjugierten Kollagen-I-Antikörper (Rockland) bei 4°C inkubiert. Nach einem erneuten Waschschrift erfolgte eine Inkubation mit einem Streptavidin-gebundenen Cy2-Zweitantikörper (Biotrend, 1:100, 1h). Gefrierschnitte ohne Erstantikörper wurden als Negativkontrolle verwendet. Nach mehrmaligem Waschen zur Entfernung ungebundenen Zweitantikörpers, wurden die Kardiomyozyten mit TRITC-gekoppeltem Phalloidin 30min bei einer Verdünnung von 1:1000 inkubiert. Im Anschluss wurde eine Kernfärbung mit DAPI (1:1000 3min) durchgeführt und die Herzschnitte wurden mit Mowiol eingedeckelt. Die gefärbten Schnitte wurden mit dem Leica SP2 konfokalen Mikroskop (Leica, s. 3.1.3) mikroskopiert. Dabei wurde ein 40x Planapo-Objektiv (Leica) verwendet. Ein Teil der konfokalen Mikroskopie sowie die Quantifizierung des Kollagen-I-Gehaltes wurde von Dr. Sawa Kostin durchgeführt. Dabei wurde der Kollagen-I-Gehalt mit Hilfe der Quantifizierungs und VoxelShop Funktionen der Imaris 5 Software (Bitplane) sowie der ImageJ Software (NIH) quantifiziert. Es wurden 10 verschiedene Bereiche je Versuchstier (n=3 pro Genotyp und Zeitpunkt) ausgewertet.

3.2.5 statistische Auswertung

Die Daten wurden als Mittelwert \pm Standardfehler angegeben. Die statistische Auswertung erfolgte mit der GraphPad Prism Software Version 5.0 (GraphPad Software, San Diego). Zwei Gruppen wurden mit einem Student's t-test, 3 oder mehr Gruppen mit einem einfaktoriellem Anova und Bonferroni-Test verglichen. Überlebenskurven wurden mit dem Mantel-Cox-Test ausgewertet. Werte von $p < 0.05$ wurden als statistisch signifikant betrachtet.

4. Ergebnisse

4.1 Die gewebsautonome Funktion von Myostatin in murinen Kardiomyozyten

Myostatin ist ein effektiver negativer Regulator des Skelettmuskelwachstums⁷⁷. Dadurch wird die Inhibierung von Myostatin zur Behandlung von Muskeldystrophien, Kachexie und Sarkopenie therapeutisch interessant¹²⁵. Die physiologischen und pathophysiologischen Funktionen von Myostatin in anderen Organen als der Skelettmuskulatur, wie beispielsweise im Herzen oder Fettgewebe⁷⁷, wurden jedoch kaum untersucht. Dies ist umso erstaunlicher, da Myostatin unter verschiedenen pathologischen Bedingungen wie z.B. Herzinfarkt⁷⁰ oder Herzinsuffizienz^{157,158,337} stark hochreguliert ist. Um die Funktion und den molekularen Mechanismus von Myostatin im adulten Herzen zu untersuchen, haben wir Mausmodelle zur Kardiomyozyten-spezifischen Deletion und Überexpression von Myostatin etabliert.

4.1.1 Evaluierung der Mausmodelle

4.1.1.1 Das *Mstn*^{fl/fl} Modell ermöglicht eine effiziente Ausschaltung der Myostatin Expression im Herzen

Zur Untersuchung der Funktion und des Mechanismus von Myostatin im adulten Herzen wurden zwei Mausmodelle verwendet.

Mit Hilfe einer Verpaarung der *Mstn*^{fl/fl} (s. 3.1.10.2) mit einer aMyHC-MCM-Mauslinie (s. 3.1.10.3), wurde eine Tamoxifen-induzierbare Deletion von Myostatin im adulten murinen Herzen ermöglicht (aMyHC-MCM/*Mstn*^{fl/fl}). Mit diesem Modell ist es möglich, den direkten Einfluss einer Myostatin Deletion auf das adulte Herz zu untersuchen und neue Signalwege zu identifizieren. Dadurch, dass die Deletion im adulten Tier stattfindet, könnten andere Kompensationsmechanismen als bei einer Deletion während der Entwicklung stattfinden. Dies wäre auch im Hinblick auf die Gabe von Myostatin-Inhibitoren zur Behandlung von Muskelschwund von Bedeutung. Zur Evaluierung dieses Mausmodells wurde die mRNA-Expression von Myostatin 10 Tage und 6 Wochen nach der ersten Tamoxifengabe (s. 3.2.1.2) in Kardiomyozyten mit Hilfe einer qRT-PCR (s. 3.2.2.3.2) überprüft. Als Kontrolltiere wurden ebenfalls Tamoxifen-behandelte aMyHC-MCM Mäuse verwendet, um unspezifische Effekte von Tamoxifen auszuschließen. Es wurden jeweils Männchen im Alter von 3 Monaten verwendet. Die Induktion der Myostatin Deletion führte zu einer Reduktion der Myostatin Expression in Kardiomyozyten von mehr als 80% nach 10 Tagen (s. Abb. 23A). Diese Reduktion wurde auch noch 6 Wochen nach Tamoxifengabe beobachtet. Vor Tamoxifengabe wurde kein Unterschied in der Myostatin Expression zwischen aMyHC-MCM und aMyHC-MCM/*Mstn*^{fl/fl} Mäusen festgestellt (s. Abb. 23A).

Zur Untersuchung der Langzeitwirkung einer Deletion von Myostatin in Kardiomyozyten wurden *Mstn*^{fl/fl} (s. 3.1.20.3) mit aMyHC-Cre (s. 3.1.10.1) Mäusen verpaart (aMyHC-Cre/*Mstn*^{fl/fl}). Dabei wird Myostatin in Kardiomyozyten zwischen E7.5 und E8^{338,339} deletiert. Es wurden Männchen im Alter von 4,5 Monaten verwendet. Dies ist vergleichbar mit dem induzierbaren *knockout* 6 Wochen nach Tamoxifengabe. Da der konstitutive *knockout* von Myostatin zu Skelettmuskelhypertrophie und Hyperplasie⁵⁴ führt, können wir mit dem aMyHC-Cre-*Mstn*^{fl/fl} Mausmodell evaluieren, ob Myostatin im Herzen eine analoge Funktion wahrnimmt. Zur Evaluierung der Effizienz der Myostatin Deletion wurde eine qRT-PCR (s. 3.2.2.3.2) mit cDNA von Herzventrikeln, Kardiomyozyten und Nicht-Kardiomyozyten (s. 3.2.1.7) durchgeführt. Als Kontrolltiere wurden aMyHC-Cre Mäuse verwendet. Dabei wurde eine signifikante Reduktion der Myostatin Expression in Herzventrikeln (81,5%) und Kardiomyozyten (94,6%) festgestellt (s. Abb. 23B).

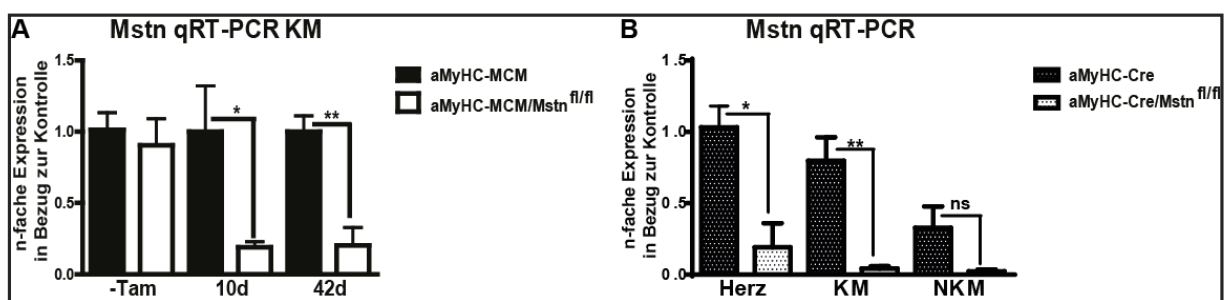


Abbildung 23: Effiziente Ausschaltung der Myostatin Expression in Kardiomyozyten

(A) Quantitative Myostatin (*Mstn*) RT-PCR von aMyHC-MCM und aMyHC-MCM/*Mstn*^{fl/fl} Kardiomyozyten (KM) vor, 10 Tage und 6 Wochen nach Tamoxifenadministration (3 unabhängige Experimente, $n \geq 3$). *Arp* diente als endogene Referenz. (B) quantitative Myostatin (*Mstn*) RT-PCR von aMyHC-Cre und aMyHC-Cre/*Mstn*^{fl/fl} Herzventrikeln, Kardiomyozyten (KM) und Nicht-Kardiomyozyten (NKM) in adulten Mäusen (3 unabhängige Experimente, $n \geq 3$). *Arp* wurde zur Normierung verwendet. Dargestellt sind Mittelwert \pm SEM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, ns: nicht signifikant

4.1.1.2 Effiziente Überexpression von Myostatin mit Hilfe des CAGG-*Mstn* Modells

Die Auswirkungen einer kurz- und langfristigen Überexpression von Myostatin in Kardiomyozyten wurden ebenfalls anhand zweier Mausmodelle untersucht.

Dies beruht darauf, dass die Hochregulation von Myostatin nach pathophysiologischen Bedingungen wie einem Herzinfarkt auf einen Zeitraum von 30 Tagen beschränkt ist³³⁷. Um die direkte Wirkung einer Überexpression von Myostatin im adulten Herzen, die diesen Zustand widerspiegelt, zu untersuchen, wurden CAGG-*Mstn* (s. 3.1.10.4) mit aMyHC-MCM (s. 3.1.10.2) Mäusen verpaart (aMyHC-MCM/CAGG-*Mstn*). Dies ermöglicht eine Kardiomyozyten-spezifische Überexpression von Myostatin nach Tamoxifengabe. Zur Evaluierung der aMyHC-MCM/CAGG-*Mstn* Mauslinie wurde die mRNA-Expression von Myostatin 6 Wochen nach der ersten Tamoxifengabe (s. 3.2.1.2) mit einer qRT-PCR (s. 3.2.2.3.2) in Herzventrikeln, Kardiomyozyten und Nicht-Kardiomyozyten überprüft. Als Kontrollmäuse wurden wiederum Tamoxifen-behandelte aMyHC-MCM Mäuse verwendet. Die Induktion der Myostatin-Überexpression führt zu einem Anstieg der Myostatin Expression in

Herzventrikeln (2,4fach) und in Kardiomyozyten (7,6fach) im Vergleich zur aMyHC-MCM Kontrolle (s. Abb. 25A). Der leichte Anstieg in Nicht-Kardiomyozyten kann darauf beruhen, dass die Population einen geringen Anteil an Kardiomyozyten enthält. Um die Reinheit der jeweiligen Fraktionen zu überprüfen, wurde eine qRT-PCR mit Markern für Kardiomyozyten (*aMyhc*), Endothelzellen (*Pecam*) und Fibroblasten (Kollagen I) durchgeführt (s. Abb. 24A-C). Daraus wird ersichtlich, dass in der Kardiomyozytenfraktion hauptsächlich Kardiomyozyten vorhanden sind (s. Abb. 24A), während Endothelzellen und Fibroblasten in der Nicht-Kardiomyozytenfraktion überwiegen (s. Abb. 24B-C). Außerdem konnte gezeigt werden, dass auch in der Nicht-Kardiomyozytenfraktion ein geringer Anteil an Kardiomyozyten enthalten ist, der vermutlich für den leichten Anstieg der Myostatin-Expression (s. Abb. 25A) verantwortlich ist.

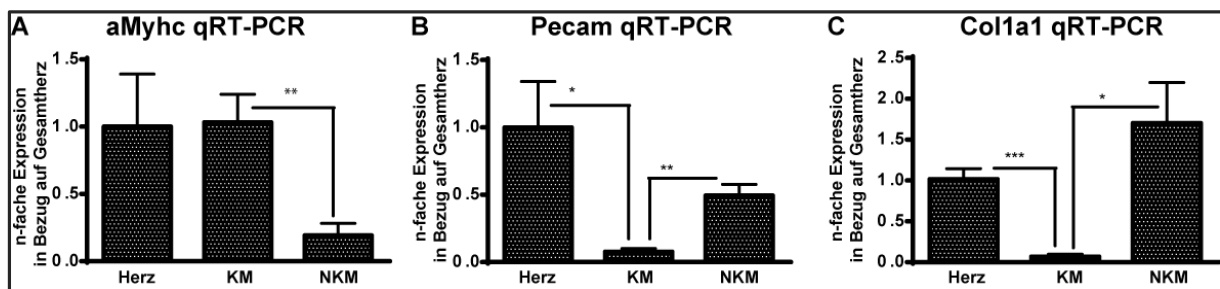


Abbildung 24: Hoher Reinheitsgrad der Kardiomyozytenfraktion

Zur Überprüfung der Reinheit der Kardiomyozyten- und Nicht-Kardiomyozytenfraktion wurde cDNA von Herzventrikeln, Kardiomyozyten (KM) und Nicht-Kardiomyozyten (NKM) von aMyHC-Cre Mäusen verwendet. Es wurden jeweils 3 unabhängige Experimente mit $n \geq 3$ durchgeführt. *Arp* wurde zur Normierung verwendet. (A) Quantitative *a-Myosin heavy chain* (*aMyhc*) PCR. (B) Quantitative *Pecam* qRT-PCR. (C) Quantitative Kollagen I (*Col1a1*) qRT-PCR. Dargestellt sind Mittelwert \pm SEM. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001

Wie schon beschrieben handelt es sich bei der Hochregulation von Myostatin nach pathophysiologischen Bedingungen im Herz um einen kurzfristigen Effekt³³⁷. Um zu untersuchen, ob eine langfristige Überexpression von Myostatin einen positiven Einfluss auf die Herzfunktion besitzt oder, ähnlich wie in der Skelettmuskulatur zu einer Fibrose^{123,134,340-343} führt, wurden CAGG-*Mstn* (s. 3.1.10.4) Mäuse mit aMyHC-Cre (s. 3.1.10.1) Mäusen verpaart (aMyHC-Cre/CAGG-*Mstn*). Es wurden, analog zum konditionalen *knockout*, Männchen im Alter von 4,5 Monaten verwendet. Zur Kontrolle des Mausmodells wurde wiederum eine qRT-PCR (s. 3.2.2.3.2) mit cDNA von Herzventrikeln, Kardiomyozyten und Nicht-Kardiomyozyten (s. 3.2.1.7) durchgeführt. aMyHC-Cre Mäuse dienen als Kontrolltiere. Die Myostatin Expression ist in Herzventrikeln und Kardiomyozyten massiv (99-fach in Herzventrikeln und 106-fach in Kardiomyozyten) hochreguliert (s. Abb. 25B). Der geringere Anstieg in Nicht-Kardiomyozyten könnte wiederum durch eine Verunreinigung mit Kardiomyozyten zustande gekommen sein (s. Abb. 24A).

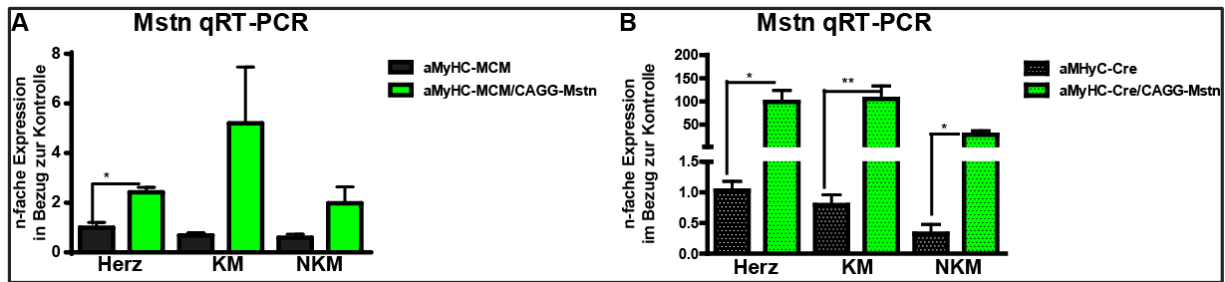


Abbildung 25: Effiziente Überexpression von Myostatin im adulten Herzen

(A) Quantitative Myostatin (*Mstn*) RT-PCR von aMyHC-MCM und aMyHC-MCM/CAGG-*Mstn* Herzventrikeln, Kardiomyozyten (KM) und Nicht-Kardiomyozyten (NKM) 6 Wochen nach Tamoxifenadministration (3 unabhängige Experimente, $n \geq 2$). *Arp* wurde zur Normierung verwendet. (B) Quantitative Myostatin (*Mstn*) RT-PCR von aMyHC-Cre und aMyHC-Cre/CAGG-*Mstn* Herzventrikeln, Kardiomyozyten (KM) und Nicht-Kardiomyozyten (NKM) in adulten Mäusen (3 unabhängige Experimente, $n \geq 3$). Dargestellt sind Mittelwert \pm SEM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

4.1.2 Deletion von Myostatin in adulten Kardiomyozyten führt zu Herzinsuffizienz, Hypertrophie und einer gesteigerten Lethalität

Zu unserer Überraschung starben 26.5% der aMyHC-MCM/*Mstn*^{fl/fl} Mäuse 10 Tage nach Beginn der Myostatin Deletion, während Tamoxifen-behandelte Kontrolltiere (aMyHC-MCM) und eine Tamoxifen-induzierbare Überexpression von Myostatin (aMyHC-MCM/CAGG-*Mstn*) keinen Einfluss auf die Lethalität hatten (s. Abb. 26).

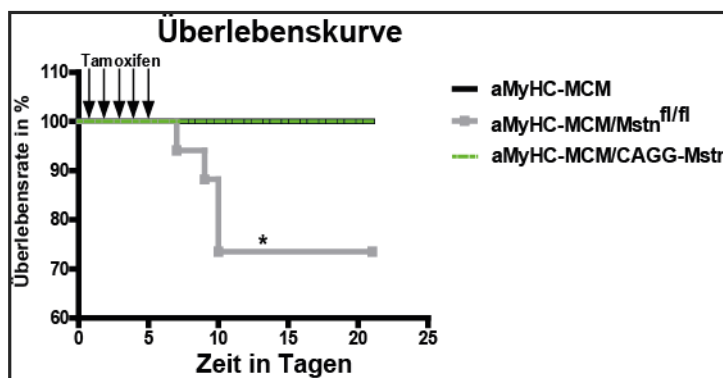


Abbildung 26: Akute Deletion von Myostatin in adulten Kardiomyozyten führt zu einer gesteigerten Lethalität

Überlebenskurve von aMyHC-MCM ($n=15$), aMyHC-MCM/*Mstn*^{fl/fl} ($n=34$) und aMyHC-MCM/CAGG-*Mstn* ($n=8$) Mäusen nach Tamoxifenadministration. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Mantel-Cox-Test. * $P < 0.05$

Um herauszufinden ob eine Dysfunktion des Herzens Ursache der gesteigerten Lethalität ist, wurde die Herzfunktion mit Hilfe von MRT-Messungen (s. 3.2.1.4.1) untersucht. Diese ergaben eine normale Herzfunktion in Tamoxifen-behandelten aMyHC-MCM Kontrolltieren (s. Tab. 16). Desweiteren wurde vor Tamoxifenadministration kein Unterschied in den Herzparametern festgestellt (s. Tab. 16, Abb. 27 A-C). 10 Tage nach der Deletion von Myostatin in Kardiomyozyten entwickelten die Mäuse eine schwere Herzinsuffizienz. Dies wird an einer mehr als 50% reduzierten Ejektionsfraktion, einem verringerten Schlagvolumen und einem Anstieg des endsystolischen Volumens deutlich (s. Tab. 16, Abb. 27 A,B). Desweiteren kam es zu einem Anstieg der linksventrikulären Masse in der Enddiastole

und der linksventrikulären Wanddicke, beides Parameter einer Hypertrophie (s. Tab. 16). Wir erwarteten, dass sich die Herzinsuffizienz mit der Zeit verschlimmern würde und analysierten dieselben Mäuse im MRT 6 Wochen nach Tamoxifengabe. Überraschenderweise verbesserte sich die Herzfunktion nach 6 Wochen so stark, dass es zu einer völligen Wiederherstellung der Herzkontraktilität kam (s. Tab. 16).

Tabelle 16: Akute Deletion von Myostatin verursacht Herzinsuffizienz

Mausmodell und Tage nach Tamoxifengabe	EF in μ l	SV in μ l	LV Masse ES in mg	LV Masse ED in mg	EDV in μ l	ESV in μ l	LV Wand-Dicke ED in μ l	Gewicht in g
aMyHC-MCM								
-Tam	52 \pm 2.6	37.7 \pm 2.1	74.2 \pm 3.7	64.5 \pm 2.2	72.4 \pm 1.7	34.7 \pm 1.9	714.7 \pm 45.2	26 \pm 0.8
10d	47 \pm 3.4	34.7 \pm 2.8	74.9 \pm 4.2	63.1 \pm 2.8	74.4 \pm 2.9	39.3 \pm 3.1	697.3 \pm 23.1	26.2 \pm 0.5
6w	54 \pm 1.8	39.1 \pm 1.5	79.1 \pm 3.9	66.6 \pm 3.3	72.3 \pm 1.2	33.2 \pm 1.3	715.4 \pm 26.7	27.3 \pm 0.6
aMyHC-MCM/ Mstn^{fl/fl}								
-Tam	61 \pm 1.4	40.3 \pm 1.6	74.3 \pm 3.1	62.9 \pm 2.4	66.5 \pm 2.3	26.2 \pm 1.3	701 \pm 20.2	27.5 \pm 1.1
10d	23 \pm 2.9 $\Delta\Delta\Delta$ (0d), ****	18.6 \pm 2.2 $\Delta\Delta\Delta$ (0d), ***	75 \pm 4.4	72.8 \pm 3.9 Δ (0d), *	74.2 \pm 3.5	59.6 \pm 3.8 $\Delta\Delta\Delta$ (0d), ***	782.6 \pm 23.6 Δ (0d), *	26.9 \pm 0.9
6w	60 \pm 3.5 $\Delta\Delta\Delta$ (10d)	41.8 \pm 2 $\Delta\Delta\Delta$ (10d)	82.8 \pm 5.5	69.6 \pm 4.4	69.7 \pm 1.9	27.8 \pm 2.9 $\Delta\Delta\Delta$ (10d)	779.5 \pm 32	29.8 \pm 1.0
aMyHC-MCM/ CAGG-Mstn								
-Tam	55 \pm 2	37.3 \pm 1.4	71.5 \pm 2.2	61.5 \pm 1.1	68 \pm 1.8	30.6 \pm 1.9	692 \pm 8.6	28.3 \pm 0.5
10d	54.9 \pm 2	38.4 \pm 1.3	75.3 \pm 3.8	67.8 \pm 3.7	70 \pm 3.4	32.4 \pm 3.0	746.3 \pm 37.5	29 \pm 0.5
6w	54.6 \pm 2	40.2 \pm 1.7	70.3 \pm 2.1	58.9 \pm 2.5	74.1 \pm 3.6	33.9 \pm 3.0	635 \pm 16.1 *	28.5 \pm 0.8

MRT-Auswertung von aMyHC-MCM, aMyHC-MCM/Mstn^{fl/fl} und aMyHC-MCM/CAGG-Mstn Mäusen vor, 10 Tage und 6 Wochen nach Tamoxifengabe. Es wurden Männchen im Alter von 3 Monaten verwendet (n \geq 7). Dargestellt sind Mittelwert \pm SEM. EF: Ejektionsfraktion; SV: Schlagvolumen; LV Masse ES: linksventrikuläre Masse in der Endsystole; LV Masse ED: linksventrikuläre Masse in der Enddiastole; EDV: enddiastolisches Volumen; ESV: endsystolisches Volumen; LV Wanddicke ED: linksventrikuläre Wanddicke in der Enddiastole. Signifikante Werte wurden rot markiert. *P<0.05, ***P<0.001, ****P<0.0001 in Bezug auf die zugehörige aMyHC-MCM Kontrolle. Δ P<0.05, $\Delta\Delta$ P<0.001, $\Delta\Delta\Delta$ P<0.0001 in Bezug auf aMyHC-MCM/Mstn^{fl/fl} zum angegebenen Zeitpunkt.

Um zu überprüfen, ob der Anstieg der linksventrikulären Wanddicke und linksventrikulären Masse durch eine Hypertrophie der Kardiomyozyten bedingt ist, wurden Gefrierschnitte (s. 3.2.4.1) von aMyHC-MCM und aMyHC-MCM/Mstn^{fl/fl} einer Lektinfärbung (s. 3.2.4.5) unterzogen. Die quantitative Auswertung der Kardiomyozyten Fläche ergab, dass der Anstieg der linksventrikulären Wanddicke 10 Tage nach Deletion von Myostatin, durch einen 30% Anstieg der Kardiomyozyten Fläche verursacht wurde (s. Abb. 27D-F).

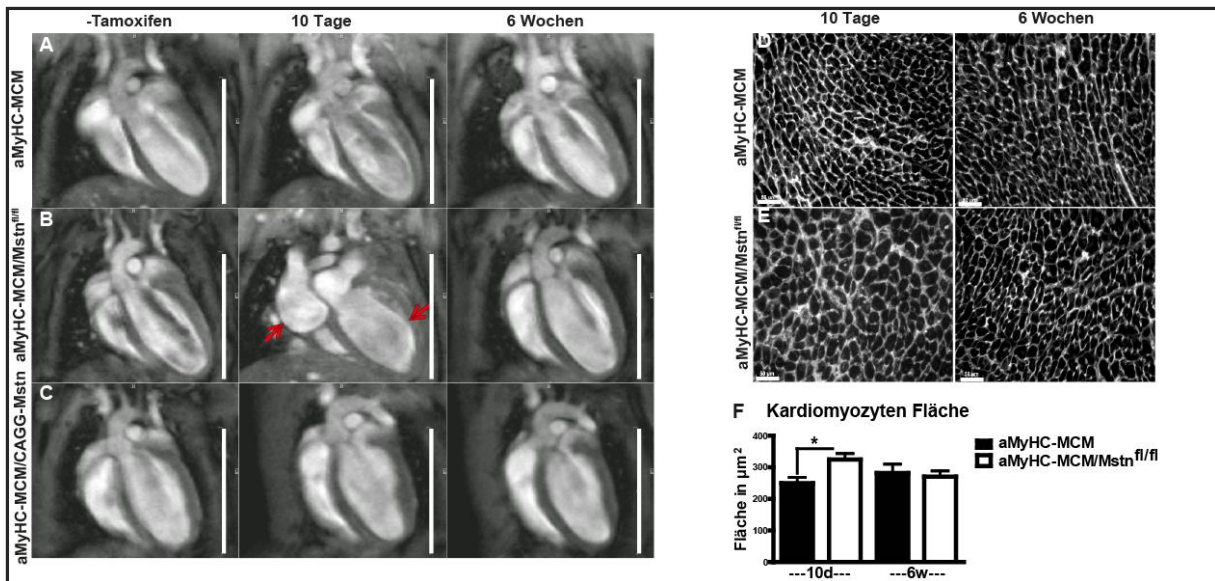


Abbildung 27: Akute Deletion von Myostatin in adulten Kardiomyozyten führt zu Herzinsuffizienz und ventrikulärer Hypertrophy

(A-C) Repräsentative MRT Vierkammerblicke von aMyHC-MCM (A), aMyHC-MCM/*Mstn*^{fl/fl} (B) und aMyHC-MCM/CAGG-*Mstn* (C) Mäusen vor, 10 Tage und 6 Wochen nach Tamoxifengabe. Die roten Pfeile zeigen ein dilatiertes rechtes Atrium und einen dilatierten linken Ventrikel. Maßstab: 10mm. (D-E) WGA-Färbung von aMyHC-MCM (D) und aMyHC-MCM/*Mstn*^{fl/fl} (E) Herzventrikeln 10 Tage und 6 Wochen nach Tamoxifengabe. Maßstab: 50 μm . (F) Auswertung der Kardiomyozyten Fläche. Es wurden 4 verschiedene Bereiche des Herzens ausgewertet und der Mittelwert gebildet (n=3). Dargestellt sind Mittelwert \pm SEM. *P<0.05

Im Vierkammerblick (s. Abb. 27B) wird deutlich, dass die akute Deletion von Myostatin in Kardiomyozyten zur Dilation des linken Ventrikels sowie zur Dilatation und Fibrose (s. Abb. 28A) des rechten Atriums führt. Um die Entwicklung der Herzinsuffizienz und die Ursache der stark dilatierten und fibrotischen rechten Atrien zu untersuchen, implantierten wir EKG Transmitter (s. 3.2.1.4.2) in aMyHC-MCM und aMyHC-MCM/*Mstn*^{fl/fl} Mäuse und zeichneten ihr EKG vor und nach Tamoxifengabe auf. Die EKGs der Kontrollen und der aMyHC-MCM/*Mstn*^{fl/fl} Mäuse unterschieden sich nicht vor Tamoxifengabe (s. Abb. 28C-F). 3 Tage nach der ersten Tamoxifengabe zur Induktion der Deletion von Myostatin in Kardiomyozyten begann sich das PR Intervall dramatisch zu verlängern. Es erreichte ein Maximum von 64ms nach 5 Tagen (37ms vor Tamoxifeninjektion, Abb. 28B, C). Dies deutet auf schwere atrioventrikuläre Erregungsstörungen hin. Diese könnte die Ursache der schweren atrialen Fibrose sein. Desweiteren entwickelten die aMyHC-MCM/*Mstn*^{fl/fl} Mäuse nach Tamoxifengabe einen verlängerten QRS Komplex und eine leicht reduzierte Herzfrequenz (s. Abb. 28D, E). Diese Parameter wurden durch Tamoxifengabe in aMyHC-MCM Kontrollen nicht verändert. Wir fanden keine Hinweise auf das Vorliegen von Arrhythmien oder atriale Fibrillation nach akuter Deletion von Myostatin.

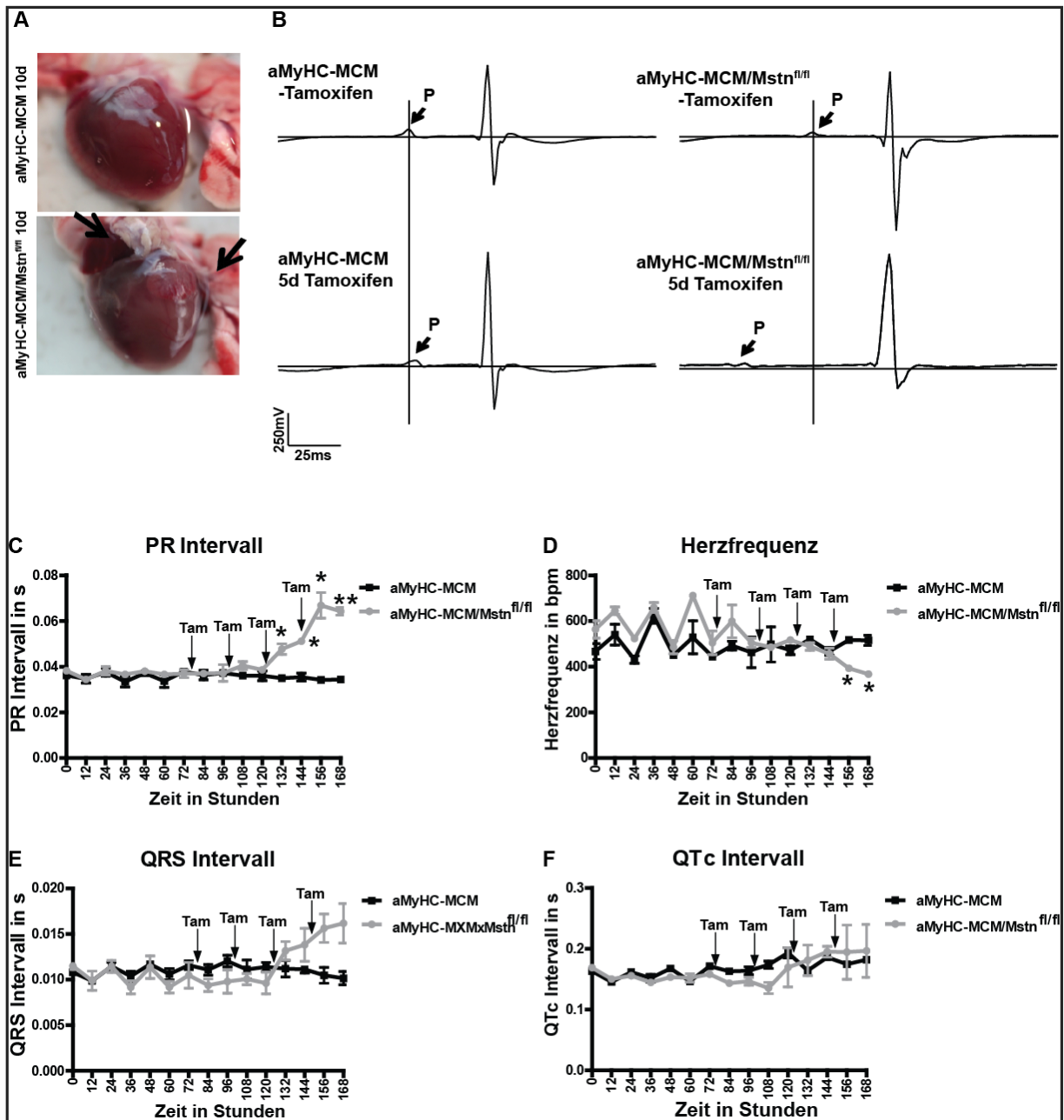


Abbildung 28: Akute Deletion von Myostatin führt zu einer verschlechterten atrioventrikulären Erregungsleitung und atrialer Fibrose

(A) Repräsentative Bilder von aMyHC-MCM und aMyHC-MCM/*Mstn*^{fl/fl} Herzen 10 Tage nach Tamoxifenadministration. Die Pfeile deuten auf dilatierte und fibrotische Atrien. (B) Repräsentative EKGs von aMyHC-MCM und aMyHC-MCM/*Mstn*^{fl/fl} Mäusen vor und 5 Tage nach der ersten Tamoxifengabe. Es wurden EKGs zur selben Zeit und mit einer ähnlichen Herzfrequenz verwendet. (C-F) Telemetrische Aufnahmen des PR Intervalls (C), der Herzfrequenz (D), des QRS Intervalls (E) und des QT_c Intervalls (F) in aMyHC-MCM und aMyHC-MCM/*Mstn*^{fl/fl} Mäusen vor und nach Tamoxifengabe (n=2). Jeder dargestellte Datenpunkt ist der Mittelwert von zwei ausgewerteten Zeitpunkten im Abstand von einer Stunde. Dargestellt sind Mittelwert ±SEM. *P<0.05, **P<0.01

Um zu untersuchen, ob die verschlechterte Kontraktilität und Hypertrophie nach akuter Myostatin Deletion ein direkter Effekt von Myostatin ist, etablierten wir ein Mausmodell zur induzierbaren Überexpression von Myostatin in Kardiomyozyten (aMyHC-MCM/CAGG-*Mstn*). Diese Mäuse zeigen die Tendenz zu einer verbesserten Kontraktilität 10 Tage nach Tamoxifengabe sowie eine verringerte linksventrikuläre Wanddicke nach 6 Wochen (s. Tab. 16, Abb. 27C). Dies spricht dafür, dass Myostatin einen direkten Einfluss auf die Kontraktilität und Hypertrophie besitzt. Außerdem scheint eine kurzzeitige Überexpression von Myostatin in Kardiomyozyten, wie sie unter pathologischen Bedingungen beobachtet wurde³³⁷, einen positiven Einfluss auf die Herzfunktion auszuüben.

4.1.3 Kardiomyozyten-spezifische Deletion von Myostatin von der Entwicklung an verschlechtert die Herzkontraktilität in adulten Mäusen

Die akute Deletion von Myostatin in adulten Kardiomyozyten verursacht eine schwere Herzinsuffizienz (s. 4.1.2). Dies warf die Frage auf, ob eine konstitutive Deletion von Myostatin in Kardiomyozyten von der Entwicklung an, zu einem ähnlichen Phänotyp führt. Um dies zu untersuchen, etablierten wir ein Mausmodell, in dem Myostatin von der embryonalen Entwicklung an, durch Verwendung einer Cre Rekombinase unter der Kontrolle der aMyHC-Promoterregion, deletiert wird (aMyHC-Cre/*Mstn*^{fl/fl}). Überraschenderweise zeigten diese Mäuse auch eine reduzierte Überlebensrate im Alter von 4-5 Monaten (s. Abb. 29). Wir können einen negativen Einfluss der aMyHC-Cre Rekombinase ausschließen, da diese Mäuse keine Verschlechterung in der Herzfunktion zeigten und nicht vorzeitig starben (s. Abb. 29, Tab. 17).

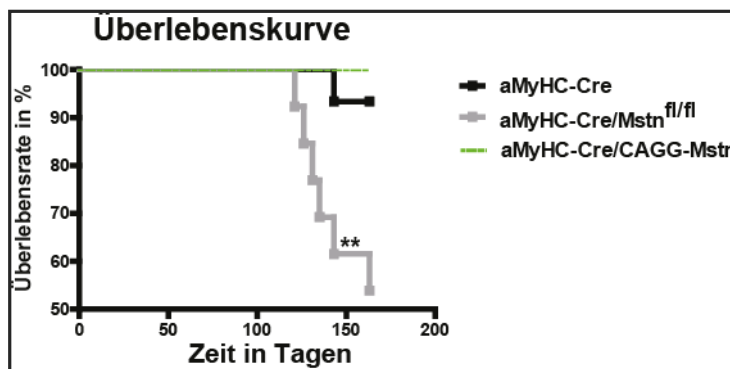


Abbildung 29: Kardiomyozyten-spezifische Deletion von Myostatin verringert die Überlebensrate

Überlebenskurve von aMyHC-Cre (n=15), aMyHC-Cre/*Mstn*^{fl/fl} (n=13) und aMyHC-Cre/CAGG-*Mstn* (n=19) Mäusen. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Mantel-Cox-Test. ** P<0.01

Da bei der Auswertung der MRT-Daten des induzierbaren knockouts auch der rechte Ventrikel beeinträchtigt erschien, wurde die Anzahl der Schichten bei der MRT-Messung der konditionalen Mausmodelle erhöht, um eine Auswertung des rechten Ventrikels zu ermöglichen. Die MRT-Messung ergab, dass auch die Deletion von Myostatin in Kardiomyozyten von der Entwicklung an zu einem dilatierten linken Ventrikel (s. Abb. 30A) und einer links- und rechtsventrikulären systolischen Dysfunktion führt (s. Tab. 17), wenn auch in einem geringeren Schweregrad im Vergleich zur akuten Deletion in adulten Kardiomyozyten (s. Tab. 16). Im Gegensatz zur akuten Deletion wurde keinerlei

Effekt auf die linksventrikuläre Masse, Wanddicke oder Kardiomyozyten Fläche (s. Tab. 17, Abb. 30B) festgestellt. Dies schließt die Entwicklung einer Hypertrophie des Herzens aus. Vermutlich wird der Verlust von Myostatin von der Entwicklung an, von Familienmitgliedern zumindest partiell kompensiert. Desweiteren wurde auch keine Dilatation oder Fibrose der Atrien festgestellt (s. Abb. 30A).

Tabelle 17: Deletion von Myostatin in Kardiomyozyten führt zu linksventrikulärer Dysfunktion

	aMyHC-Cre	CAGG-Mstn	aMyHC-Cre/ Mstn ^{fl/fl}	aMyHC-Cre/ CAGG-Mstn	
linker Ventrikel	EF in %	49.4±1.5	53.1±4.3	33.5±6.8 *	
	SV in µl	41.9±2.2	44.2±1.2	26.9±4.9 **	
	LV Masse ES in mg	86.2±2.1	85.5±1.3	82.9±6.5	
	LV Masse ED in mg	76.8±2.6	79.2±2.8	82.5±6.7	
	EDV in µl	84.7±3.4	84±4.6	95±12.6	
	ESV in µl	42.8±2	39.7±5.6	72.8±16.8 *	
	LV Wanddicke ED in µl	705.7±20	745.5±38.9	691.3±31.8	667.6±9 Δ
	EF in %	43.3±2.3	46.4±1.8	32.1±4.7 *	44.7±2.1
rechter Ventrikel	SV in µl	31.3±1.7	29.7±2.7	23.1±3.4 *	31.2±2.6
	EDV in µl	72.9±3.4	64.1±6.1	75.5±6	69.4±3.6
	ESV in µl	41.6±2.9	34.4±3.8	52.4±7.1	37.7±1.9
	Körpergewicht in g	27.7±0.7	28.8±1.3	30±1.1	28.2±0.7

MRT-Auswertung von aMyHC-Cre, CAGG-Mstn, aMyHC-Cre/Mstn^{fl/fl} und aMyHC-Cre/CAGG-Mstn Mäusen. Es wurden Männchen im Alter von 4,5 Monaten verwendet (n=3 CAGG-Mstn, n≥9 aMyHC-Cre, aMyHC-Cre/Mstn^{fl/fl} und aMyHC-Cre/CAGG-Mstn). Dargestellt sind Mittelwert ±SEM. EF: Ejektionsfraktion; SV: Schlagvolumen; LV Masse ES: linksventrikuläre Masse in der Endsystole; LV Masse ED: linksventrikuläre Masse in der Enddiastole; EDV: enddiastolisches Volumen; ESV: endsystolisches Volumen; LV Wanddicke ED: linksventrikuläre Wanddicke in der Enddiastole. Signifikante Werte wurden rot markiert. *P<0.05, **P<0.01 in Bezug auf die aMyHC-Cre Kontrolle; Δ P<0.05 in Bezug auf CAGG-Mstn Kontrolle.

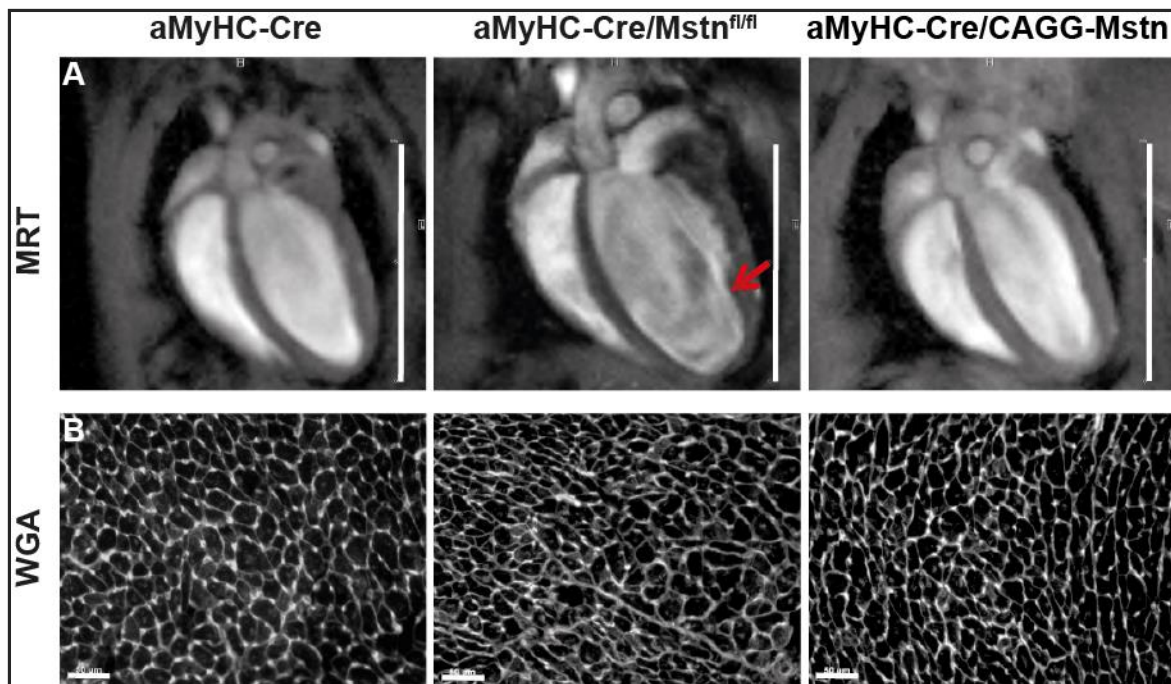


Abbildung 30: Deletion von Myostatin in Kardiomyozyten führt zu linksventrikulärer Dysfunktion

(A) Repräsentative MRT Vierkammerblicke von aMyHC-Cre, aMyHC-Cre/Mstn^{fl/fl} und aMyHC-Cre/CAGG-Mstn Mäusen. Es wurden Männchen im Alter von 4,5 Monaten verwendet. Maßstab: 10mm. (B) Repräsentative WGA-Färbung (20x) von aMyHC-Cre, aMyHC-Cre/Mstn^{fl/fl} und aMyHC-Cre/CAGG-Mstn midventrikulären Herzgefrierschnitten. Maßstab: 50µm.

Ähnlich zu dem induzierbaren Überexpressionsmodell zeigt die Kardiomyozyten-spezifische Überexpression von Myostatin von der Entwicklung an (aMyHC-Cre/CAGG-Mstn) keinen Herzphänotyp im Alter von 4,5 Monaten (s. Tab. 17, Abb. 30). Die Überexpression von Myostatin führt jedoch in beiden Fällen zu einer verringerten linksventrikulären Wanddicke (s. Tab. 16, 17). Dies deutet darauf hin, dass die antihypertrophe Wirkung von Myostatin in der Skelettmuskulatur auch im Herzen konserviert ist.

4.1.4 Deletion von Myostatin aktiviert das hypertrophe Genprogramm

Wie schon gezeigt (s. 4.1.2, 4.1.3) führt die Kardiomyozyten-spezifische Deletion von Myostatin zu Herzinsuffizienz. Die Entwicklung einer Herzinsuffizienz ist mit einer Vielzahl molekularer Effekte während des ventrikulären *Remodelings* assoziiert. Einer dieser Marker ist die Re-Expression des fetalen oder hypertrophen Genprogramms. Diese Gene sind im physiologischen Zustand in adulten Herzventrikeln kaum exprimiert und werden unter pathologischen Bedingungen reaktiviert. Um den Herzinsuffizienz-Phänotyp zu untermauern, überprüften wir die Expression des hypertrophen Genprogramms nach der Deletion von Myostatin. Wir konnten zeigen, dass 10 Tage nach der akuten Deletion von Myostatin (aMyHC-MCM/Mstn^{fl/fl}) die Expression von *Anp* und *Bnp*, zweier wichtiger Marker des hypertrophen Genprogramms, in den Herzventrikeln erhöht war (s. Abb. 31A). Als Kontrollen wurden jeweils Herzventrikel von Tamoxifen-behandelten aMyHC-MCM Mäusen verwendet. Desweiteren beobachteten wir eine stark angestiegene ANP Proteinexpression 10 Tage

nach Induktion des *knockouts*, welche nach 6 Wochen wieder auf ein basales Niveau zurückgegangen war (s. Abb. 31B). Dies korreliert mit der im MRT beobachteten Wiederherstellung der Kontraktilität nach 6 Wochen (s. Tab. 16). Die Deletion von Myostatin in Kardiomyozyten von der Entwicklung an (aMyHC-Cre/*Mstn*^{fl/fl}), führte zu einer ähnlichen Expression von hypertrophen Genen sowie einem Anstieg der ANP Proteinexpression (s. Abb. 31C, D).

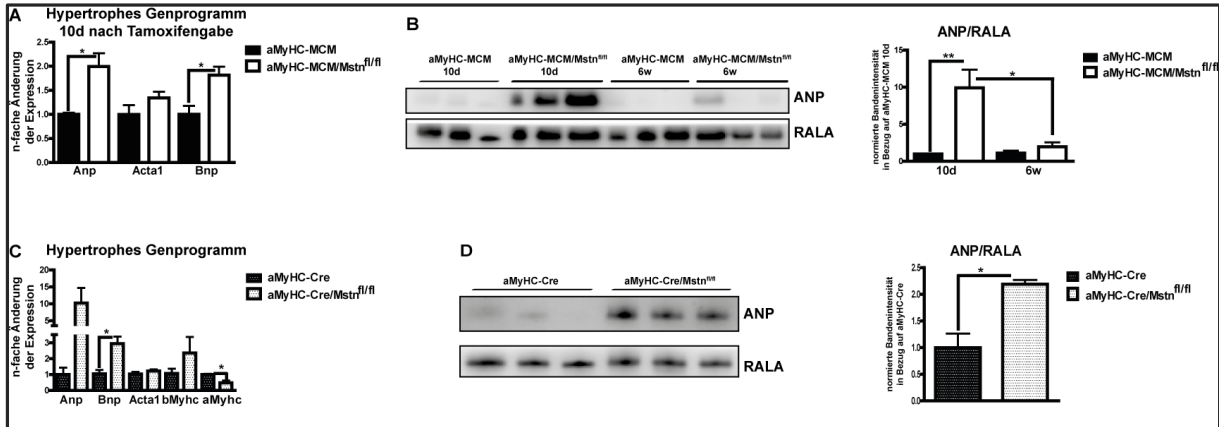


Abbildung 31: Deletion von Myostatin aktiviert das hypertrophe Genprogramm

(A) Quantitative *Anp*, *Acta1* und *Bnp* RT-PCR in aMyHC-MCM und aMyHC-MCM/*Mstn*^{fl/fl} Herzventrikeln 10 Tage nach Tamoxifenadministration (3 unabhängige Experimente, n≥3). *Arp* wurde zur Normierung verwendet. (B) Western Blot und Quantifizierung der ANP Bandenintensität in Bezug zu RALA von aMyHC-MCM und aMyHC-MCM/*Mstn*^{fl/fl} Herzen (3 unabhängige Experimente, n≥3). (C) Quantitative *Anp*, *Bnp*, *Acta1*, *bMyhc* und *aMyhc* RT-PCR in aMyHC-Cre und aMyHC-Cre/*Mstn*^{fl/fl} Herzventrikeln (3 unabhängige Experimente, n≥3). *Arp* wurde als endogene Referenz verwendet. (D) Western Blot und Quantifizierung der ANP Bandenintensität in Bezug auf RALA von aMyHC-Cre und aMyHC-Cre/*Mstn*^{fl/fl} Herzen (3 unabhängige Experimente, n≥3). Dargestellt sind Mittelwert ±SEM. *P<0.05, **P<0.01

Wir konnten diese Daten mit Hilfe einer MicroArray-Analyse mit cDNA von aMyHC-MCM und aMyHC-MCM/*Mstn*^{fl/fl} Herzventrikeln 10 Tage nach Tamoxifengabe verifizieren. Dabei fanden wir eine veränderte Genexpression von mehreren, typischerweise unter pathologischen Bedingungen deregulierten, Genen wie z.B. *Gdf15* und *Myh7* (s. Abb. 32A). Diese Daten bestätigen die Schwere der Herzinsuffizienz nach akuter Deletion von Myostatin in Kardiomyozyten, die auch durch die reduzierte Überlebensrate (s. Abb. 26) und verschlechterte Kontraktilität (s. Tab. 16) betont wird. Desweiteren wurde überprüft, dass die Herzinsuffizienz nicht durch überkompensierende Mitglieder der TGF-β Familie, beispielsweise *TGFb1* selbst, verursacht wird (s. Abb. 32B).

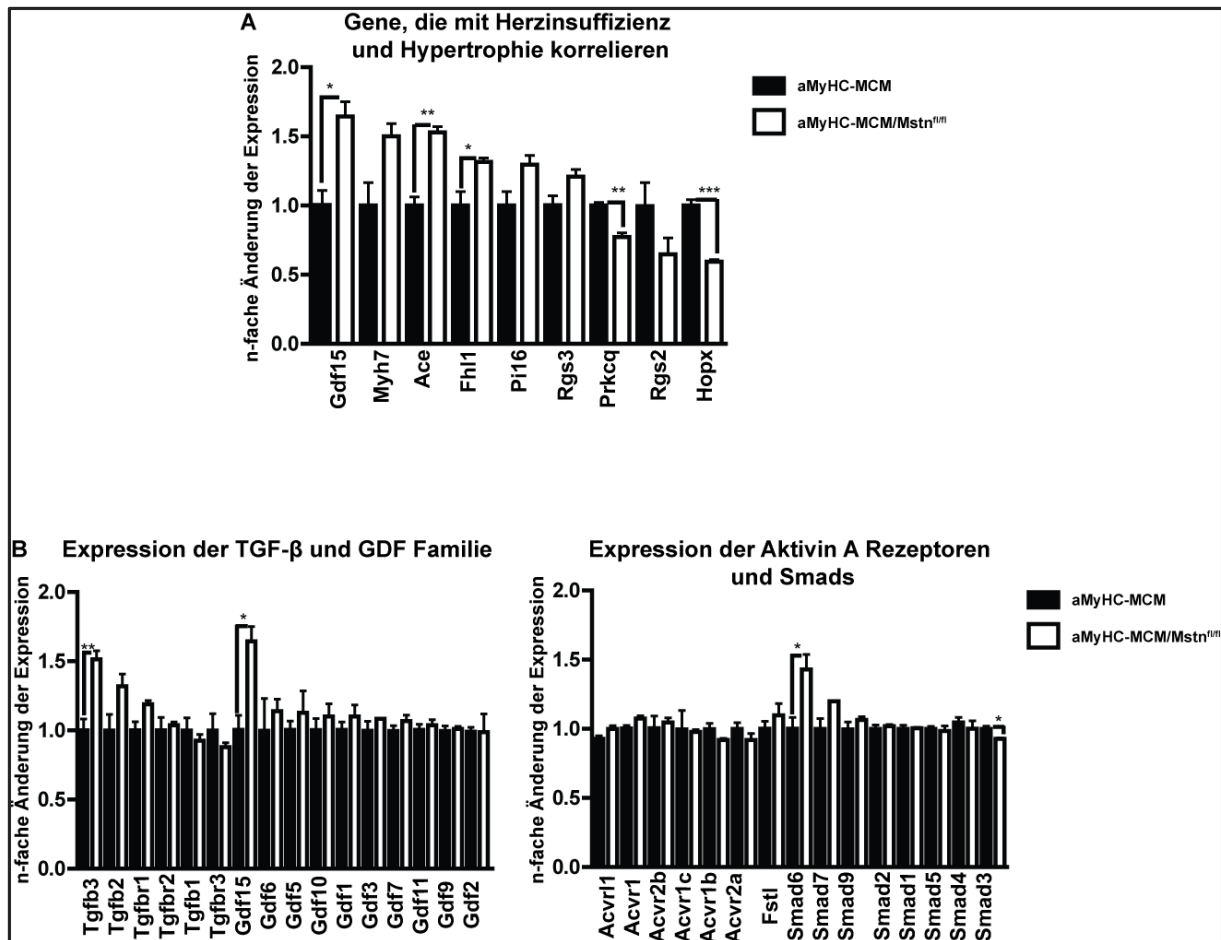


Abbildung 32: Akute Deletion von Myostatin aktiviert Gene, die mit Herzinsuffizienz und Hypertrophie korreliert sind

MicroArray-Analyse von aMyHC-MCM und aMyHC-MCM/*Mstn*^{fl/fl} ventrikulären Proben (n=3) in Bezug auf die Expression von Genen, die mit Herzinsuffizienz und Hypertrophie in Zusammenhang stehen (A), sowie auf Mitglieder der *Tgfb*/*Gdf*-Familie (B). Dargestellt sind Mittelwert \pm SEM. *P<0.05, **P<0.01

4.1.5 Identifikation von AMPK als neues Zielmolekül von Myostatin

Die MicroArray-Analyse ergab neben der Deregulation von Genen, die mit pathologischen Veränderungen im Herzen korreliert sind (s. Abb. 32), auch eine starke Inhibierung von Genen, die eine wichtige Rolle in der Fettsäureoxidation spielen (s. Tab. 18). Desweiteren führt die akute Deletion von Myostatin zur Hemmung von Genen, die in den Citratcyclus, die Glukoneogenese (Fruktose-1,6-Bisphosphatase) und wie oben schon beschrieben die Fettsäureoxidation involviert sind (s. Tab. 18). Desweiteren wird nach akuter Myostatin-Deletion die Expression des Schlüsselenzyms der Cholesterin-Biosynthese, 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA Reduktase, inhibiert (s. Tab. 18). Durch das Ausschalten von Myostatin in Kardiomyozyten werden dadurch energieverbrauchende Signalwege gehemmt und das so genannte fetale metabolische Programm reaktiviert. Dies passiert typischerweise in Folge von Herzinsuffizienz und Hypertrophie^{35,37,344}. Während der Entwicklung ändert sich die Substratpräferenz zur ATP-Gewinnung von Glukose und Laktat im fetalen Herz hin zu Lipiden im adulten Herz. Dabei ist im adulten Herz unter aeroben Bedingungen die β -Oxidation für 90% der ATP-Gewinnung zuständig, während der Anteil der

Glykolyse sich auf 10% beschränkt ³⁴⁵. Die Reaktivierung des fetalen metabolischen Programms oder das metabolische *Remodeling* beschreibt deshalb die Änderung der Substratpräferenz zur stärkeren Verwendung der Glykolyse, was den Zustand im fetalen Herzen widerspiegelt. Die Hochregulation der Leber-Isoform der Carnitin Palmitoyl Transferase (s. Tab. 18) ist ein weiteres Indiz für die Reaktivierung des fetalen metabolischen Programms, da diese nur im fetalen Herz hochexprimiert ist und nach pathologischen Zuständen reaktiviert wird ³⁴⁶.

Tabelle 18: Akute Deletion von Myostatin reaktiviert das fetale metabolische Programm

	Gen	Gen-Name	Ratio	p-Wert
Fettsäure-oxidation	Acsl6	acyl-CoA synthetase long-chain family member 6	0.65	0.0096
	Mut	methylmalonyl-Coenzyme A mutase	0.80	0.0935
	Acsl3	acyl-CoA synthetase long-chain family member 3	0.80	0.0328
	Acsl4	acyl-CoA synthetase long-chain family member 4	0.82	0.0925
	Cpt1a	carnitine palmitoyltransferase 1a, liver	1.20	0.0032
oxidative Phosphorylierung	Cox17	cytochrome oxidase, subunit XVII assembly protein homolog (yeast)	0.79	0.0594
	Atp5l	ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit g	0.79	0.0452
	Ndufb10	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex, 10	0.82	0.0807
Gluconeogenese	Fbp2	fructose biphosphatase 2	0.66	0.0283
Citratcyclus	Did	dihydroliipoamide dehydrogenase	0.83	0.0875
	Suca2	succinate-Coenzyme A ligase, ADP-forming, beta subunit	0.75	0.0342
GLUT1	Slc2a1	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 1	0.79	0.0455
Cholesterol biosynthese	Hmgcs1	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 1	0.76	0.0619
	Fdft1	farnesyl diphosphate farnesyl transferase 1	0.79	0.0828

MicroArray-Analyse von aMyHC-MCM und aMyHC-MCM/*Mstn*^{fl/fl} Herzventrikeln (n=3) 10 Tage nach Tamoxifenadministration. Gezeigt wurden deregulierte Gene, die eine wichtige Funktion im Metabolismus des Herzens übernehmen. Runterregulierte Gene sind rot und gelb, hochregulierte grün dargestellt. Ein p-Wert <0.05 wurde als statistisch signifikant betrachtet.

Desweiteren existieren direktere Kontrollmechanismen wie die Aktivierung der AMP-aktivierten Proteinkinase (AMPK). AMPK ist ein metabolisches Schlüsselenzym und wird nach verschiedenen pathologischen Bedingungen, wie Ischämie des Herzens ^{347,348}, Hypertrophie ³⁴⁹ oder linksventrikulärer druckinduzierter Hypertrophie ^{350,351} aktiviert. Kürzlich beschrieben Zhang et al. ³⁵² eine Aktivierung von AMPK in der Skelettmuskulatur, im weißen Fettgewebe und der Leber von konstitutiven Myostatin *knockouts*. Da AMPK auch eine Schlüsselfunktion in der Regulation der Energiehomöostase des Herzens spielt, untersuchten wir, ob die akute Deletion von Myostatin einen Einfluss auf AMPK ausübt. Interessanterweise führte die Inaktivierung von Myostatin in adulten Kardiomyozyten von aMyHC-MCM/*Mstn*^{fl/fl} Mäusen 10 Tage nach Tamoxifengabe, zu einer 1.9fach gesteigerten Phosphorylierung und damit Aktivierung der AMPK (s. Abb. 33A). Desweiteren hat die akute Deletion von Myostatin auch signifikanten Einfluss auf direkte Zielmoleküle von AMPK, wie die Acetyl-CoA-Carboxylase und Glykogen Synthase, die durch AMPK phosphoryliert und dabei inhibiert werden (s. Abb. 33A). Die Proteinexpression von Pan-AMPK wurde jedoch durch das akute Ausschalten von Myostatin nicht verändert. Somit scheint Myostatin den AMPK Signalweg zu inhibieren.

Um zu untersuchen, ob dies ein direkter Effekt von Myostatin selbst oder eine Antwort auf die Herzinsuffizienz ist, analysierten wir den AMPK Signalweg in aMyHC-Cre/CAGG-*Mstn* Mäusen, in denen Myostatin von der Entwicklung an überexprimiert ist. Dabei stellten wir fest, dass sowohl die Phosphorylierung von AMPK, als auch von ihrem Zielmolekül Acetyl-CoA Carboxylase durch die Überexpression von Myostatin inhibiert wird (s. Abb. 33B). Dies spricht für einen direkten Einfluss von Myostatin auf den AMPK Signalweg.

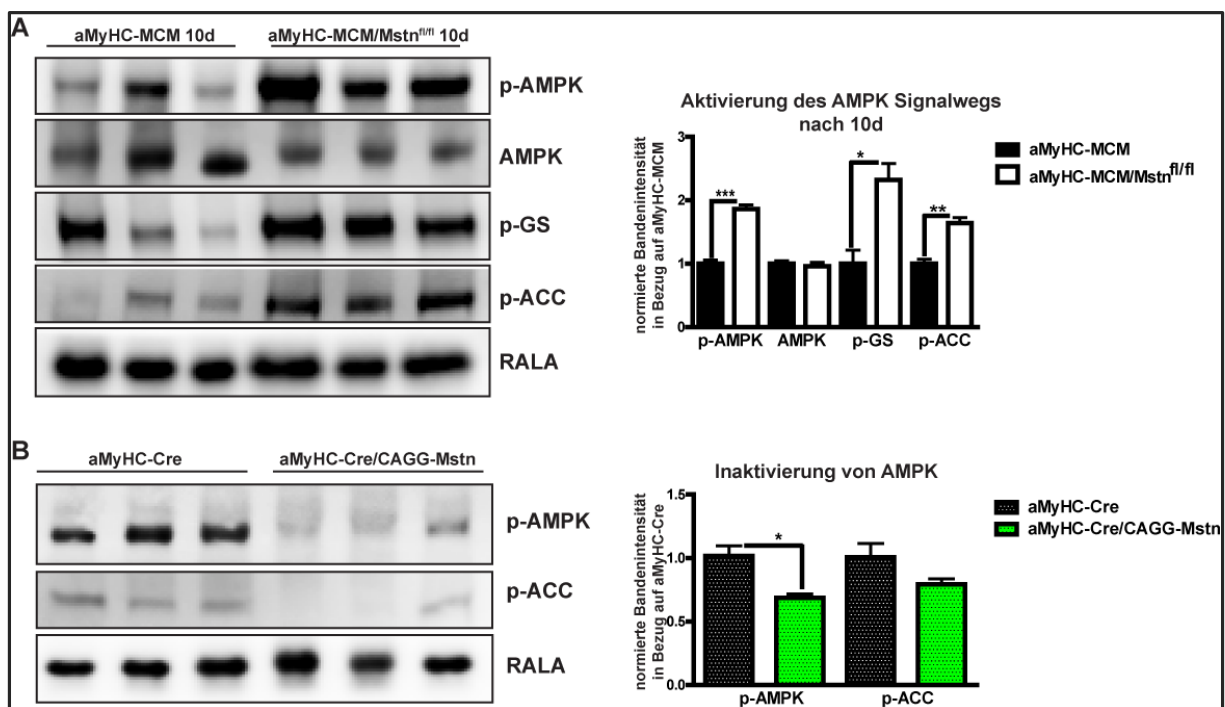


Abbildung 33: Myostatin inhibiert den AMPK Signalweg

(A) Western Blot und Quantifizierung der Expression von p-AMPK- α (Thr172), AMPK- α , p-Glykogen Synthase (p-GS, Ser641) und p-Acetyl-CoA-Carboxylase (p-ACC, Ser79) in aMyHC-MCM und aMyHC-MCM/*Mstn*^{fl/fl} Herzlysaten 10 Tage nach Tamoxifenadministration (3 unabhängige Experimente, n \geq 3). RALA wurde zur Normierung verwendet. (B) Western Blot und Quantifizierung der p-AMPK (Thr172) und p-Acetyl-CoA-Carboxylase (p-ACC, Ser79) Bandenintensität in Bezug zu RALA in aMyHC-Cre und aMyHC-Cre/CAGG-*Mstn* Herzlysaten von 4,5 Monate alten Männchen (3 unabhängige Experimente, n \geq 3). Dargestellt sind Mittelwert \pm SEM. *P<0.05; **P<0.01;***P<0.001.

Um zu beweisen, dass AMPK ein direktes Zielmolekül von Myostatin ist, stimulierten wir isolierte adulte ventrikuläre Mauskardiomyozyten (s. 3.2.1.7) über einen Zeitraum von 10min mit rekombinantem Myostatin. Die starke Hemmung der AMPK Phosphorylierung nach Myostatin-Stimulierung zeigt (s. Abb. 34), dass es sich bei AMPK um ein neues, direktes inhibitorisches Zielmolekül von Myostatin handelt.

Um den Signalweg über den Myostatin AMPK hemmt zu identifizieren, inhibierten wir die TGF- β 1-aktivierte Kinase 1 (TAK1), eine Serin/Threonin Kinase, die die Signaltransduktion von Myostatin und TGF- β 1 vermittelt, mit (5Z)-7-Oxozeanol in adulten murinen Kardiomyozyten. TAK1 ist neben SMAD2/3 der Hauptvermittler der Myostatin-Signaltransduktion ⁷⁷. Um die Wirkung des TAK1-Inhibitors zu überprüfen, wurde die p38 Phosphorylierung mit Hilfe eines Western Blots überprüft.

Bei p38 handelt es sich um ein direktes Zielmolekül der TGF- β 1-aktivierten Kinase. Nach einer 30-minütigen Behandlung der adulten murinen Kardiomyozyten mit (5Z)-7-Oxozeanol kam es zu einer Reduktion in der p38 Phosphorylierung (s. Abb. 34A). Wichtiger ist jedoch, dass der hemmende Effekt von Myostatin auf die AMPK Aktivität nach Vorinkubation der Kardiomyozyten mit (5Z)-7-Oxozeanol stark zurückgeht (s. Abb. 34A). Daraus schließen wir, dass die inhibitorische Wirkung von Myostatin auf die AMPK Aktivität durch TAK1 vermittelt wird.

Die Myostatin Signaltransduktionskaskade wird durch Bindung des aktiven C-terminalen Dimers an die Aktivinrezeptoren ACTRIIB und ACTRIIA als Typ-II-Rezeptoren und an ALK4 und ALK5 als Typ-I-Rezeptoren vermittelt ⁷⁷. Um zu beweisen, dass Myostatin seine inhibitorische Wirkung auf AMPK über seine Rezeptoren ausübt, behandelten wir adulte murine ventrikuläre Kardiomyozyten mit einem ALK4/5/7 Inhibitor (SB 505124). Die Vorbehandlung mit SB 505124 hemmte die Wirkung von Myostatin auf sein kanonisches Zielmolekül p-SMAD3 (s. Abb. 34B) und kehrte die inhibitorische Wirkung von Myostatin auf die AMPK Aktivität um (s. Abb. 34B). Unserem Wissen nach handelt es sich hierbei auch um die erste Studie, die eine Verbindung zwischen den ALK-Rezeptoren und AMPK feststellt. Wir schließen, dass Myostatin AMPK über seine kanonischen Rezeptoren ALK4/5 und die Serin/Threonin-Kinase TAK1 inhibiert.

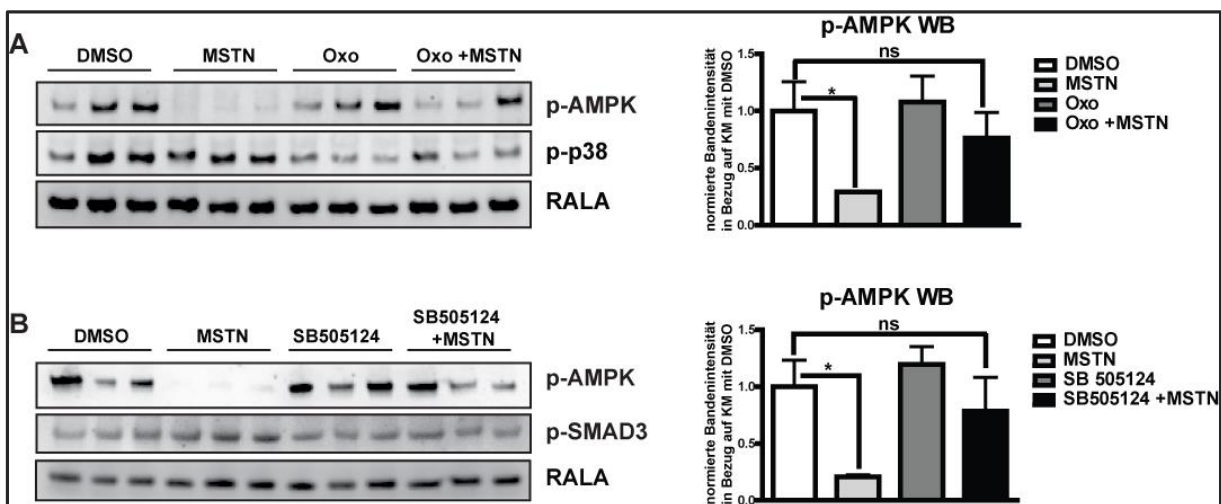


Abbildung 34: Myostatin hemmt AMPK über ALK4/5 und TAK1

(A) Adulte ventrikuläre Mauskardiomyozyten wurden mit 30ng/ml Myostatin (MSTN) über einen Zeitraum von 10min, 5 μ M (5Z)-7-Oxozeanol (TAK1-Inhibitor) für 40min und 5 μ M (5Z)-7-Oxozeanol gefolgt von einer Myostatingabe für 10min stimuliert. Western Blot und Quantifizierung der Expression von p-AMPK- α (Thr172) und p-p38 (Thr180/Tyr182) in Bezug auf RALA (3 unabhängige Experimente, n=3). (B) Adulte murine isolierte Kardiomyozyten wurden mit 30ng/ml rekombinantem Myostatin über einen Zeitraum von 10min, 1 μ M SB505124 (ALK4/5/7 Inhibitor) für 40min und 1 μ M SB505124 gefolgt von einer 10-minütigen Myostatingabe stimuliert. P-AMPK- α (Thr172) und p-SMAD3 (Ser423/425) Western Blot und Quantifizierung der Bandenintensität. RALA wurde zur Normierung verwendet. Dargestellt sind Mittelwert \pm SEM. *P<0.05, ns: nicht signifikant.

4.1.6 Die antihypertrophe Wirkung von Myostatin im Herzen wird über AMPK vermittelt

Die oben beschriebenen Ergebnisse (s. 4.1.5) legten nahe, dass Myostatin durch Hemmung der AMPK Aktivität in adulten Kardiomyozyten deren metabolischen Status konserviert und die Entwicklung einer Hypertrophie des Herzens hemmt. Um diese Hypothese zu beweisen, behandelten wir aMyHC-MCM und aMyHC-MCM/*Mstn*^{fl/fl} Mäuse parallel zur Tamoxifengabe mit einem AMPK-Inhibitor (Compound C, s. 3.2.1.3) und analysierten sie 10 Tage nach der ersten Tamoxifenadministration mit Hilfe des MRTs. Die MRT-Auswertung ergab, dass die Hemmung der AMPK *in vivo* die Hypertrophie des Herzens nach akuter Myostatin Deletion komplett normalisierte. Dies wurde anhand einer Reduktion der linksventrikulären Masse und linksventrikulären Wanddicke deutlich (s. Abb. 35A, B). Desweiteren wurde die Reaktivierung des hypertrophen Genprogramms, hier durch eine quantitative RT-PCR der *Anp* und *Bnp* Expression gezeigt (s. Abb. 35E, F), durch Hemmung der AMPK vollständig geblockt. Dies verifiziert, dass Myostatin seine antihypertrophe Wirkung im Herzen über AMPK vermittelt. Obwohl die Behandlung mit Compound C auch die Kontraktilität des Herzens in aMyHC-MCM Kontrolltieren reduziert, wird die Differenz im Schlagvolumen und endsystolischen Volumen zwischen aMyHC-MCM und aMyHC-MCM/*Mstn*^{fl/fl} Mäusen normalisiert (s. Abb. 35C, D). Nichtsdestotrotz bezweifeln wir aufgrund des negativen Einflusses der AMPK Hemmung auf die Kontraktilität des Herzens, dass dieser Signalweg auch für die Herzinsuffizienz nach akuter Myostatin Deletion verantwortlich ist.

Zusammenfassend konnten wir zeigen, dass Myostatin AMPK über seine kanonischen ALK4/5 Rezeptoren und die Serin/Threonin-Kinase TAK1 hemmt (s. Abb. 36). Dies führt nach akuter Myostatin Deletion in Kardiomyozyten zu einer Inaktivierung der AMPK Zielmoleküle Acetyl-CoA-Carboxylase und Glykogen Synthase und einer Reaktivierung des fetalen metabolischen Programms (s. Abb. 36). Desweiteren konnten wir *in vivo* beweisen, dass die Hypertrophie nach akuter Myostatin Deletion durch AMPK vermittelt wird (s. Abb. 36).

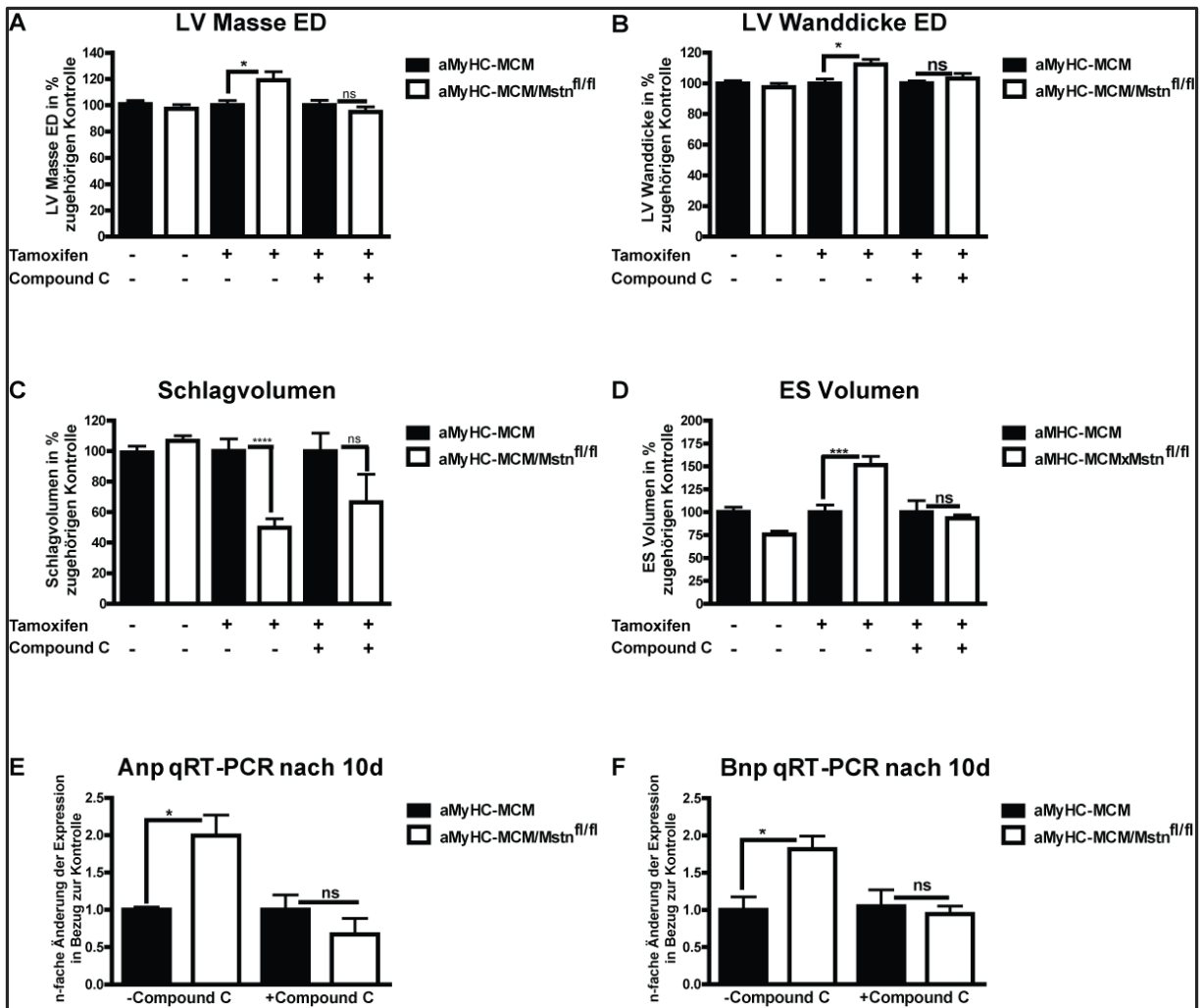


Abbildung 35: AMPK-Inhibitor Compound C verhindert Hypertrophie nach akuter Myostatin Deletion *in vivo*

aMyHC-MCM und aMyHC-MCM/*Mstn*^{fl/fl} Mäuse wurden mit Tamoxifen und mit oder ohne den AMPK-Inhibitor Compound C (20mg/kg, jeden zweiten Tag über einen Zeitraum von 10 Tagen) behandelt. (A-D) MRT-Auswertung von aMyHC-MCM und aMyHC-MCM/*Mstn*^{fl/fl} Herzen vor Tamoxifengabe sowie 10 Tage nach der ersten Tamoxifengabe mit und ohne Compound C (n≥7 ohne Compound C, n=3 mit Compound C). (A) MRT-Auswertung der linksventrikulären Masse in der Enddiastole (LV Masse ED). (B) MRT-Analyse der linksventrikulären Wanddicke in der Enddiastole (LV Wanddicke ED). (C) MRT-Auswertung des Schlagvolumens. (D) MRT-Analyse des endsystolischen Volumens. (E) Quantitative *Anp* RT-PCR von aMyHC-MCM und aMyHC-MCM/*Mstn*^{fl/fl} Herzen 10 Tage nach Tamoxifenadministration mit und ohne Compound C-Behandlung (3 unabhängige Experimente, n≥3). *Arp* diente als endogene Referenz. (F) Quantitative *Bnp* RT-PCR von aMyHC-MCM und aMyHC-MCM/*Mstn*^{fl/fl} Herzen 10 Tage nach Tamoxifengabe, mit und ohne Compound C-Behandlung (3 unabhängige Experimente, n≥3). *Arp* wurde zur Normierung verwendet. Dargestellt sind Mittelwert ±SEM. *P<0.05, ***P<0.001, ns: nicht signifikant.

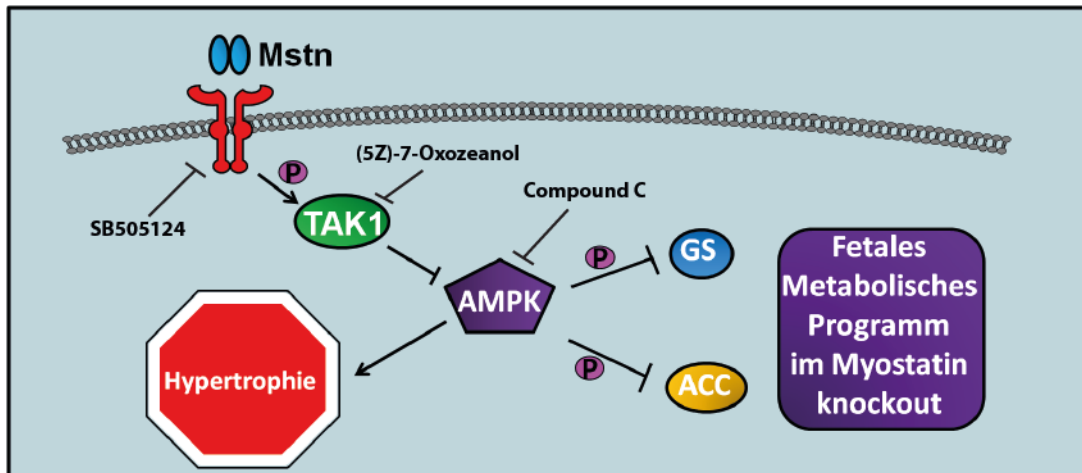


Abbildung 36: Modell des Signalmechanismus

Myostatin (Mstn) hemmt die AMPK Aktivität über seinen Rezeptor und TAK1. AMPK inhibiert daraufhin ihre Zielmoleküle Glykogen Synthase (GS) und Acetyl-CoA Carboxylase (ACC). Dadurch führt die akute Deletion von Myostatin in Kardiomyozyten zu einer Reaktivierung des fetalen metabolischen Programms. Außerdem wird die antihypertrophe Wirkung von Myostatin über AMPK vermittelt. Die verwendeten pharmakologischen Inhibitoren SB505124, (5Z)-7-Oxozeanol und Compound C wurden eingezeichnet.

4.1.7 Herzinsuffizienz nach akuter Myostatin Deletion ist mit einer Runterregulation von Rgs2 assoziiert

4.1.7.1 Myostatin hemmt den β -adrenergen und $G_{\alpha q}$ Signalweg im Herz

Im Anschluss wollten wir untersuchen welche Signalwege für die Herzinsuffizienz nach akuter Myostatin Deletion verantwortlich sind. Die Kontraktilität des Herzens wird hauptsächlich von Calcium und cAMP Signalwegen kontrolliert. Eine Aktivierung der cAMP-abhängigen Proteinkinase A (PKA) und der Calcium/Calmodulin-abhängigen Kinase II (CAMKII) ist eine bekannte Ursache von Herzinsuffizienz und pathologischer Hypertrophie des Herzens^{353,354}. 10 Tage nach Induktion der Myostatin Deletion in Kardiomyozyten beobachteten wir eine Aktivierung der PKA sowie ihres direkten Zielmoleküls CAMKII (s. Abb. 37A). Die Proteinexpression der PKA selbst war nicht verändert (s. Abb. 37A). Es ist bekannt, dass eine Aktivierung der Proteinkinase A zu einem Anstieg des intrazellulären Calciumspiegels führt. Deshalb überprüften wir, ob typische Calcium Signalwege auch vom Verlust von Myostatin beeinflusst werden. Tatsächlich kam es nach akuter Myostatin Deletion zu einer verstärkten PKC- α/β II Phosphorylierung und damit auch Aktivierung (s. Abb. 37B). Eine gesteigerte PKC- α Aktivität führt zur Hypokontraktilität des Herzens³⁵⁵. Desweiteren ist die Phosphorylierung des direkten PKC Zielmoleküls Proteinkinase D (PKD) verstärkt (Abb. 37B). Wir identifizierten auch eine Hochregulation von Calcineurin, welches eine zentrale Rolle bei der Entstehung der pathologischen Hypertrophie spielt^{356,357}. CAMKII, PKD und Calcineurin können ihrerseits MEF2A aktivieren. Eine Aktivierung von MEF2A führt zu einer mechanischen Dysfunktion des Herzens³⁵⁸ und konnte auch nach akuter Deletion von Myostatin gezeigt werden (s. Abb. 37B). All diese Signalwege sind ausschließlich 10 Tage nach akuter Deletion von Myostatin aktiviert. Nach 6

Wochen, wenn die Herzkontraktilität wiederhergestellt ist (s. Tab. 16) sind diese, mit Herzinsuffizienz und pathologischer Hypertrophie korrelierten, Signalwege in aMyHC-MCM/*Mstn*^{fl/fl} Herzen nicht mehr hochreguliert (s. Abb. 38).

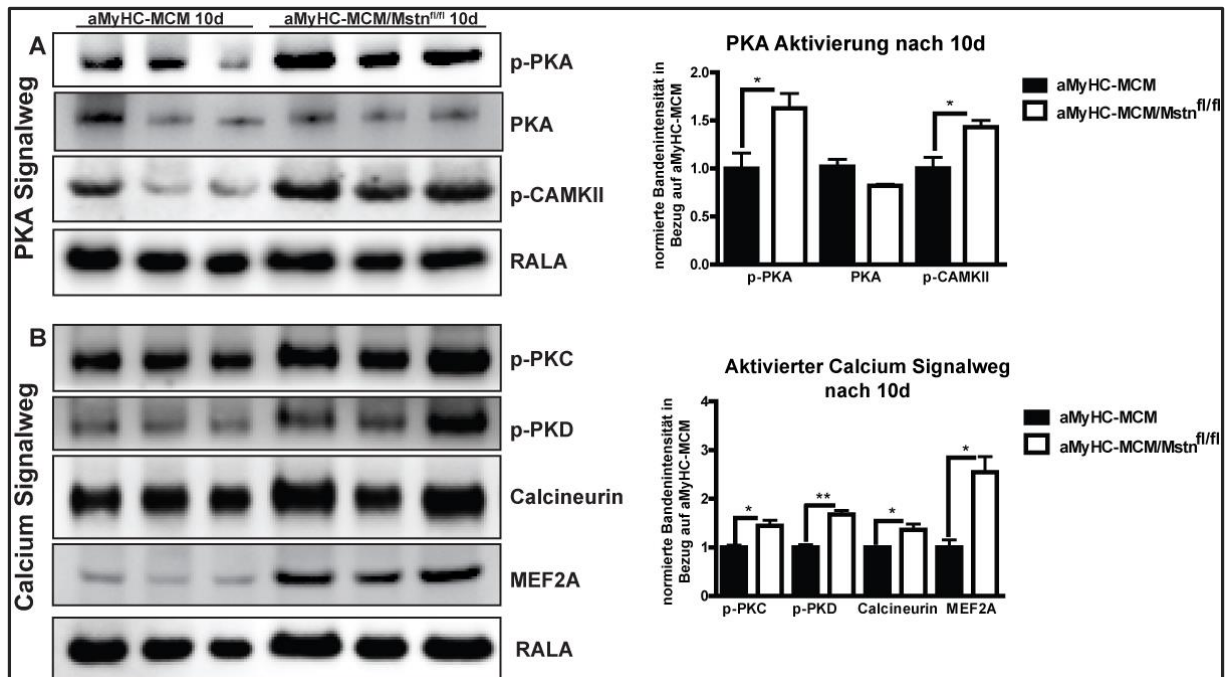


Abbildung 37: Akute Deletion von Myostatin in adulten Kardiomyozyten aktiviert den $G_{\alpha q}$ und β -adrenergen Signalweg

(A) Western Blot und Quantifizierung der Expression von p-PKA C (Thr197), PKA und p-CAMKII (Thr286) in aMyHC-MCM und aMyHC-MCM/*Mstn*^{fl/fl} Herzlysaten 10 Tage nach Tamoxifenadministration (3 unabhängige Experimente, $n \geq 3$). RALA wurde zur Normierung verwendet. (B) Western Blot und Quantifizierung der Bandenintensität von p-PKC- α/β II (Thr638/641), p-PKD (Ser744/748), Calcineurin und MEF2A in aMyHC-MCM und aMyHC-MCM/*Mstn*^{fl/fl} Herzlysaten 10 Tage nach Tamoxifengabe (3 unabhängige Experimente, $n \geq 3$). RALA diente wiederum der Normierung. Dargestellt sind Mittelwert \pm SEM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Interessanterweise wurde gezeigt, dass eine verstärkte PKC- α -Aktivität zu Herzinsuffizienz und einer verschlechterten Kontraktilität des Herzens führt. Dies legt nahe, dass die verschlechterte Kontraktilität nach akuter Deletion von Myostatin in adulten Herzen durch eine verstärkte PKC- α Phosphorylierung vermittelt wird. Um dies zu validieren, untersuchten wir die Veränderung dieser Signalwege mit Hilfe unseres Myostatin-Überexpressions Modells (aMyHC-Cre/CAGG-*Mstn*). Wir konnten zeigen, dass die Überexpression von Myostatin in Kardiomyozyten zu einer Reduktion der PKA, PKC- α/β II und Phospholamban Phosphorylierung (an Ser16, der Hauptphosphorylierungsstelle von PKA) führt (s. Abb. 39). Myostatin scheint somit einen direkten Einfluss auf die β -adrenergen und $G_{\alpha q}$ Signalwege zu besitzen.

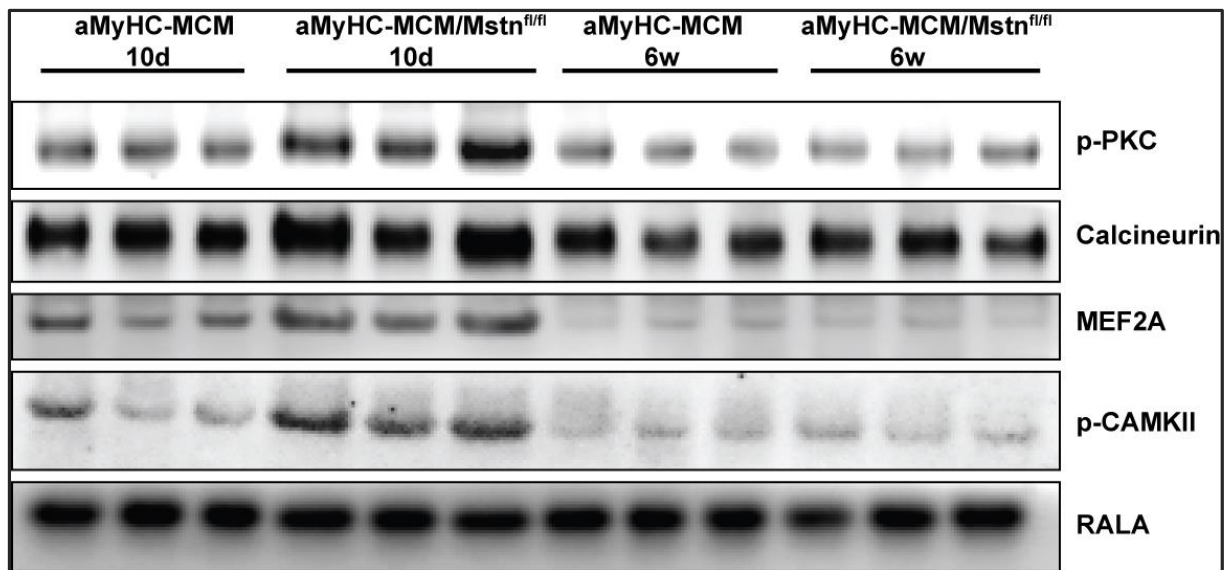


Abbildung 38: β -adrenerge und $G_{\alpha q}$ Signalwege sind nur 10 Tage nach akuter Myostatin Deletion aktiviert

Repräsentativer Western Blot der Expression von p-PKC- α/β II (Thr638/641), Calcineurin, MEF2A, p-CAMKII (Thr286) und RALA in aMyHC-MCM und aMyHC-MCM/Mstn^{fl/fl} Herzlysaten 10 Tage und 6 Wochen nach Tamoxifenadministration. RALA diente zur Überprüfung der aufgetragenen Proteinmenge.

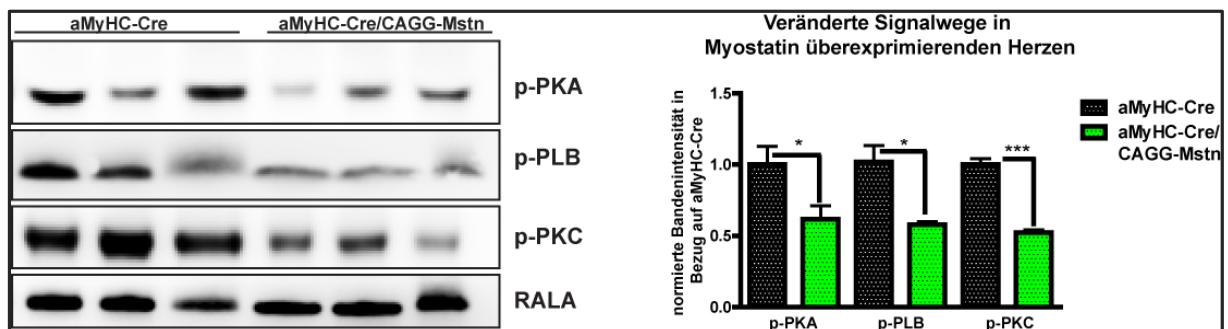


Abbildung 39: Myostatin hemmt den β -adrenergen und $G_{\alpha q}$ Signalweg

Western Blot und Quantifizierung der Expression von p-PKA C (Thr197), p-Phospholamban (Ser16) und p-PKC- α/β II (Thr638/641) in aMyHC-Cre und aMyHC-Cre/CAGG-Mstn Herzlysaten (3 unabhängige Experimente, $n \geq 3$). Dargestellt sind Mittelwert \pm SEM. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$.

4.1.7.2 Myostatin beeinflusst den β -adrenergen Signalweg nicht direkt

Wir konnten zeigen, dass eine akute Deletion von Myostatin die Proteinkinase A (PKA) aktiviert (s. Abb. 37A), während die Überexpression von Myostatin zu einer reduzierten Phosphorylierung und damit Inaktivierung führt (s. Abb. 39). Um herauszufinden ob es sich hierbei um einen neuen Signaltransduktionsmechanismus von Myostatin handelt, wurden isolierte murine ventrikuläre Kardiomyozyten mit Isoprenalin, einem Aktivator der β -adrenergen Rezeptoren, Myostatin und beiden Substanzen stimuliert. Überraschenderweise zeigte die Stimulierung mit Myostatin zu verschiedenen Zeitpunkten keinerlei Einfluss auf die PKA-abhängige Phosphorylierung von

Phospholamban und der herzspezifischen Isoform von Troponin I (s. Abb. 40A, B). Isoprenalin selbst führte durch Aktivierung der β -adrenergen Rezeptoren zu einem starken Anstieg der Phospholamban- und Troponin I-Phosphorylierung (s. Abb. 40A, B). Desweiteren wurde diese starke Aktivierung durch Myostatin – welches nach unseren *in vivo* Daten den β -adrenergen Signalweg inhibieren sollte – nicht reduziert (s. Abb. 40A, B). Somit scheint es sich bei der *in vivo* beobachteten Wirkung Myostatin's auf den β -adrenergen Signalweg um einen Sekundäreffekt zu handeln.

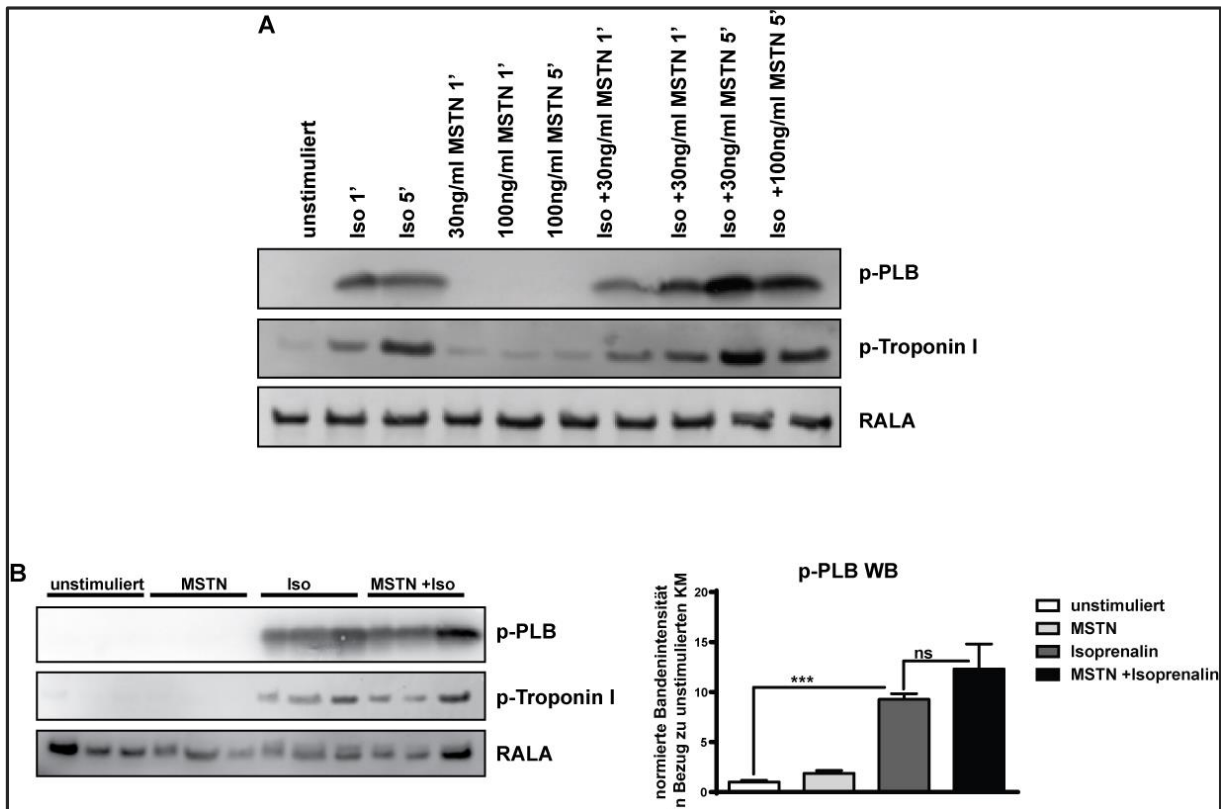


Abbildung 40: Myostatin beeinflusst die β -adrenerge Signaltransduktion nicht direkt

(A) Adulte ventrikuläre Mauskardiomyozyten wurden mit verschiedenen Konzentrationen von Myostatin (30ng/ml bzw. 100ng/ml) über einen Zeitraum von 1min und 5min, 1 μ M Isoprenalin für 1min und 5min, sowie Kombinationen von Myostatin und Isoprenalin stimuliert. Western Blot der Expression von p-Phospholamban (p-PLB, Ser16) und p-Troponin I (Herzisoform, Ser23/24). RALA diente der Überprüfung der geladenen Proteinmenge. (B) Adulte isolierte murine Kardiomyozyten wurden mit 30ng/ml Myostatin für 40min, 1 μ M Isoprenalin für 10min und 30ng/ml Myostatin (30min), gefolgt von einer 10-minütigen Isoprenalin (1 μ M) Zugabe, stimuliert. Western Blot von p-Phospholamban (p-PLB, Ser16) und p-Troponin I (Herzisoform, Ser23/24). RALA diente der Überprüfung der geladenen Proteinmenge. Quantifizierung der p-Phospholamban (p-PLB, Ser16) Bandenintensität in Bezug zu RALA (n=3). ***P<0.001, ns: nicht signifikant.

Obwohl aus den *in vitro* Daten hervorgeht, dass die Aktivierung der PKA nach akuter Myostatin Deletion ein Sekundäreffekt ist, ist aus der Literatur bekannt, dass es sich hierbei sowie bei der Aktivierung des PKA-Zielmoleküls CAMKII um Ursachen von Herzinsuffizienz handelt³⁵³. Um zu überprüfen, ob die Inhibierung des β 1-adrenergen Rezeptors die Entstehung einer Herzinsuffizienz nach akuter Myostatin Deletion verhindert, wurde aMyHC-MCM und aMyHC-MCM/*Mstn*^{fl/fl} Mäusen parallel zur Tamoxifengabe der β -Blocker Atenolol oral über einen Zeitraum von 10 Tagen verabreicht (s. 3.2.1.3). Die Herzfunktion wurde vor der Gabe von Tamoxifen und Atenolol und 10

Tage nach der ersten Tamoxifenadministration mit Hilfe des MRTs überprüft. Dabei zeigte sich anhand der Ejektionsfraktion (s. Abb. 41A) und des endsystolischen Volumens (s. Abb. 41B), dass die Gabe von Atenolol die Hypokontraktilität nach akuter Myostatin Deletion nicht verbessert. Desweiteren verhindert die Inhibierung des β -adrenergen Rezeptors auch nicht die Entstehung einer Hypertrophie, wie anhand der linksventrikulären Masse in der Enddiastole (s. Abb. 41C) und der linksventrikulären Wanddicke in der Enddiastole (s. Abb. 41D) sichtbar wird. Somit scheint die Aktivierung des β -adrenergen Signalwegs nach akuter Myostatin Deletion nicht für die Entstehung der Herzinsuffizienz verantwortlich zu sein.

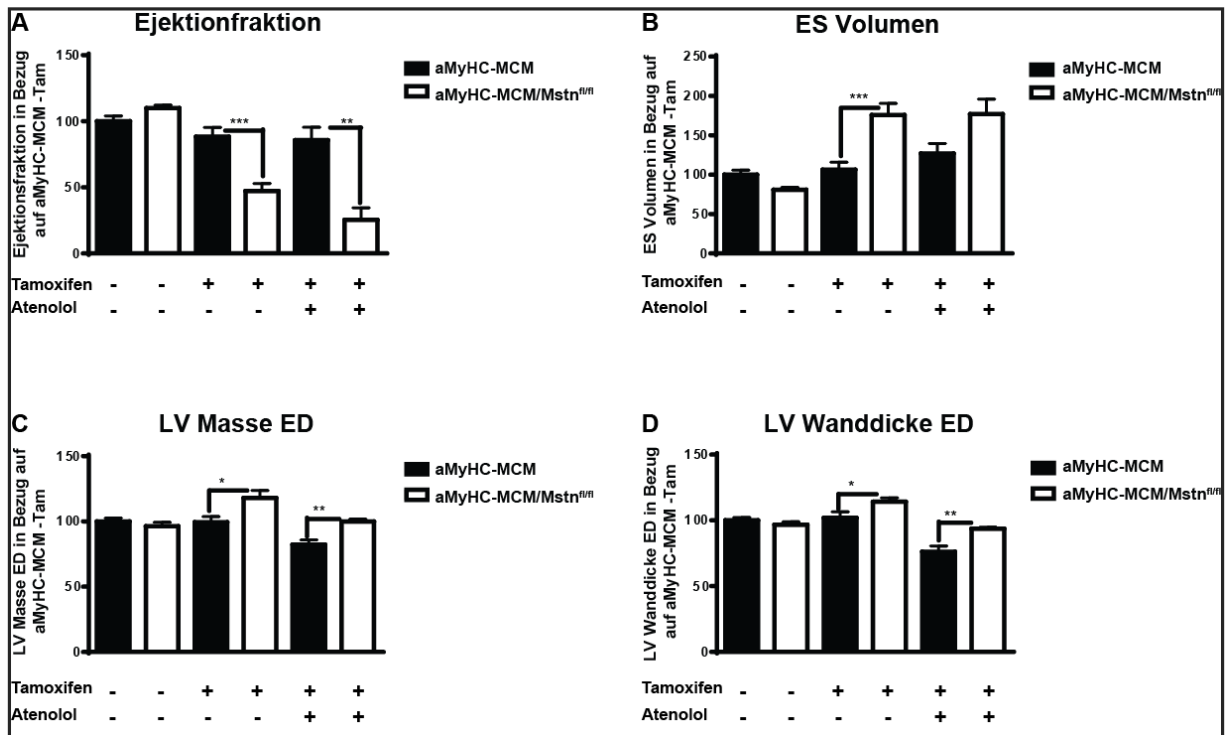


Abbildung 41: Der β -blocker Atenolol verbessert die Herzinsuffizienz nach akuter Deletion von Myostatin nicht

aMyHC-MCM und aMyHC-MCM/Mstn^{fl/fl} Mäuse wurden mit Tamoxifen und mit oder ohne den β 1-Adrenorezeptorblocker Atenolol (0,1g/l oral im Trinkwasser der Mäuse über einen Zeitraum von 10 Tagen) behandelt. (A-D) MRT-Auswertung von aMyHC-MCM und aMyHC-MCM/Mstn^{fl/fl} Herzen vor Tamoxifengabe sowie 10 Tage nach der ersten Tamoxifengabe mit und ohne Atenolol (n_{ohne} ≥ 7 ohne Atenolol, n_{mit} ≥ 3 mit Atenolol). (A) MRT-Auswertung der Ejektionsfraktion. (B) MRT-Analyse des endsystolischen Volumens. (C) MRT-Auswertung der linksventrikulären Masse in der Enddiastole (LV Masse ED). (D) MRT-Analyse der linksventrikulären Wanddicke in der Enddiastole (LV Wanddicke ED). Dargestellt sind Mittelwert \pm SEM. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001.

4.1.7.3 Akute Deletion von Myostatin führt zu einer Herabregulierung des *Regulator of G protein signaling 2 (Rgs2)*

Wie im Vorfeld diskutiert scheint die Wirkung von Myostatin - zumindest auf den β -adrenergen Rezeptor - ein Sekundäreffekt zu sein. Dies legt nahe, dass Myostatin zuerst auf die Transkription eines Zielmoleküls wirkt, welches im Anschluss für die beobachtete Wirkung auf die G_{aq} und β -

adrenerge Signalkaskade verantwortlich ist. Zur Identifizierung von potentiellen transkriptionellen Zielmolekülen wurde ein DNA MicroArray (s. 3.2.2.4) durchgeführt. Dabei detektierten wir eine Herabregulierung vom *Regulator of G protein signaling 2* (*Rgs2*, s. Abb. 42) 10 Tage nach akuter Myostatin Deletion in Herzventrikeln. Wir konnten dieses Ergebniss mit Hilfe einer quantitativen *Rgs2* RT-PCR bestätigen (s. Abb. 42A). *Rgs2* ist ein bekannter Inhibitor der $G_{\alpha q}$ -Signaltransduktionskaskade³⁵⁹, hemmt aber auch den β -adrenergen Rezeptor³⁶⁰. Interessanterweise wurde gezeigt, dass *Rgs2* eine essentielle Funktion in der Verhinderung von Herzinsuffizienz besitzt³⁶¹. Die Herunterregulation von *Rgs2* nach akuter Myostatin Deletion wäre demzufolge eine Erklärung für die beobachtete Herzinsuffizienz. Um Signalwege über die Myostatin die *Rgs2* Expression aktiviert zu identifizieren, verwendeten wir wiederum isolierte adulte murine Kardiomyozyten (s. 3.2.1.7). Wir konnten zeigen, dass eine 30-minütige Stimulierung mit Myostatin (30ng/ml) zu einem Anstieg der RGS2 Proteinexpression führt (s. Abb. 42B). Diese Wirkung ist auch nach einer 30-minütigen Vorbehandlung mit dem TAK1-Inhibitor (5Z)-7-Oxozeanol und nachfolgender Stimulierung mit Myostatin vorhanden (s. Abb. 42B). Dies beweist, dass die Wirkung von Myostatin auf RGS2 unabhängig von TAK1 ist. Neben TAK1 wird die Myostatin Signaltransduktion hauptsächlich über SMAD Proteine vermittelt. Deshalb haben wir den murinen *Rgs2* Promoter auf das Vorhandensein von SMAD-bindenden Elementen untersucht. Wir identifizierten eine Bindestelle für FAST1, einem SMAD-interagierenden Protein. Dies erhöht die Wahrscheinlichkeit, dass Myostatin die *Rgs2* Transkription über den SMAD2, SMAD3 Signalweg aktiviert.

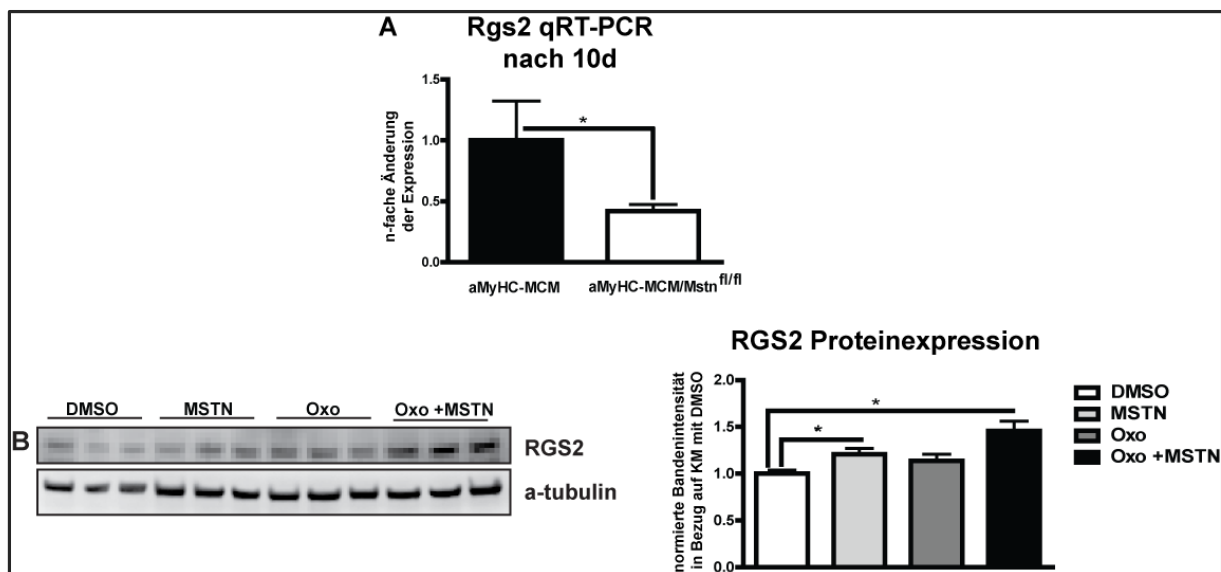


Abbildung 42: Deletion von Myostatin in adulten Kardiomyozyten inhibiert die *Rgs2* Expression

(A) Quantitative RT-PCR zur Analyse der *Rgs2* Expression in aMyHC-MCM und aMyHC-MCM/*Mstn*^{fl/fl} Herzventrikeln (3 unabhängige Experimente, n≥3). (B) Isolierte murine ventrikuläre Kardiomyozyten wurden mit DMSO (1h), 30ng/ml Myostatin (MSTN, 30min) und dem TAK1-Inhibitor (5Z)-7-Oxozeanol (5μM, 1h) stimuliert. Desweiteren wurden Kardiomyozyten mit 5μM (5Z)-7-Oxozeanol 30min vorinkubiert und dann über einen Zeitraum von weiteren 30min mit 30ng/ml Myostatin stimuliert. Western Blot und Quantifizierung der RGS2 Proteinexpression dieser Stimulierungsbedingungen. A-Tubulin wurde zur Normierung verwendet (3 unabhängige Experimente, n=3). Dargestellt sind Mittelwert ±SEM. *P<0.05.

Wir stellen folgenden hypothetischen Mechanismus zur Entstehung der Herzinsuffizienz auf (s. Abb. 43): die akute Deletion von Myostatin führt - vermutlich über den Smad2, Smad 3 Signalweg - zu einer Hemmung der *Rgs2* Transkription. Dadurch wird der inhibitorische Effekt von Rgs2 auf die β -adrenerge und G_{aq} Signaltransduktionskaskade vermindert. Dies führt zu einer Aktivierung der Proteinkinase A und ihrem Zielmolekül CAMKII. Da eine Hemmung des β -adrenergen Signalwegs nicht zu einer Verbesserung der Herzinsuffizienz führte, wird diese vermutlich hauptsächlich über die G_{aq} Signalkaskade vermittelt. Dieser Signalweg aktiviert dann die Proteinkinase C und steigert die Calcineurin Expression. Eine Aktivierung von CAMKII, Calcineurin und dem PKC Zielmolekül PKD stimuliert MEF2A und führt dadurch zur Hypokontraktilität.

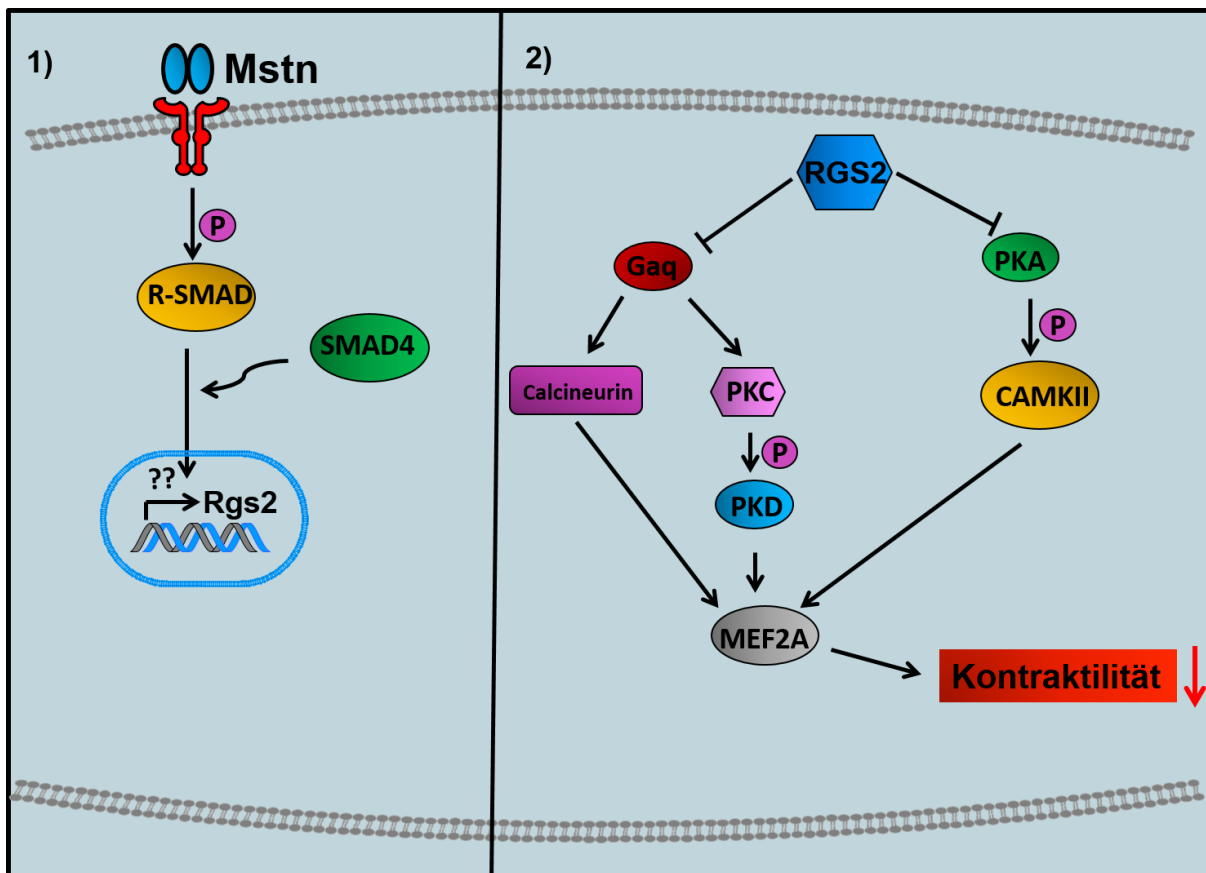


Abbildung 43: Hypothese zur Herzinsuffizienz nach akuter Myostatin Deletion

(1) Myostatin stimuliert, vermutlich über Smads, die *Rgs2* Expression. Die Deletion von Myostatin führt dadurch zur transkriptionellen Inhibition der *Rgs2* Expression (1) und verringert die hemmende Wirkung von RGS2 auf die G_{aq} und β -adrenerge Signalkaskade (2). Dadurch kommt es zu einem Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration und zur Aktivierung von PKC, Calcineurin und CAMKII. PKD, Calcineurin und CAMKII aktivieren MEF2A, wodurch die Stressantwort des Herzens induziert wird (2).

4.1.8 Myostatin Überexpression verursacht interstitielle Fibrose

4.1.8.1 Myostatin Überkompensation führt zu interstitieller Fibrose

Der Myostatin Promotor enthält eine MEF2 Bindestelle ³⁶². Dies warf die Frage auf, ob die starke Hochregulation von MEF2A nach akuter Myostatin Deletion (s. Abb. 37B) die Expression von Myostatin in Nicht-Kardiomyozyten beeinflusst. Um dies zu überprüfen haben wir die Myostatin Expression in Herzventrikeln zu verschiedenen Zeitpunkten nach Tamoxifenadministration mit einer quantitativen RT-PCR (s. 3.2.2.3.2) untersucht. Überraschenderweise wird Myostatin in Herzventrikeln beginnend von Tag 21 nach Tamoxifengabe stark hochreguliert (s. Abb. 44A). Diese Hochregulation ist auch noch nach 120 Tagen vorhanden (s. Abb. 44A). Um die Zellpopulation, die für die Hochregulation von Myostatin verantwortlich ist näher einzugrenzen, isolierten wir Kardiomyozyten und Nicht-Kardiomyozyten von aMyHC-MCM und aMyHC-MCM/*Mstn*^{fl/fl} Mäusen 6 Wochen nach Tamoxifengabe (s. 3.2.1.7). Die nachfolgende qRT-PCR ergab, dass die in Herzventrikeln beobachtete Überkompensation von Nicht-Kardiomyozyten stammte (s. Abb. 44B) und die Myostatin Expression in Kardiomyozyten auch nach 6 Wochen noch stark reduziert ist (s. Abb. 23A). Die Überkompensation der Myostatin Expression durch Nicht-Kardiomyozyten verläuft parallel zur Wiederherstellung der Herzfunktion (s. 4.1.2) und ist vermutlich auch deren Ursache. Deshalb schließen wir, dass das Vorhandensein von lokalem Myostatin so wichtig ist, dass eine induzierbare Kardiomyozyten-spezifische Deletion durch Nicht-Kardiomyozyten kompensiert werden muss.

Es ist bekannt, dass Myostatin in der Skelettmuskulatur eine profibrotische Wirkung besitzt ^{123,134,340-343}. Desweiteren zeigten Morrissette et al. ³²¹, dass alternde konstitutive Myostatin *knockout* Mäuse weniger Fibrose im Herzen entwickeln. Deshalb wollten wir untersuchen, ob die starke Überkompensation der Myostatin Expression von Nicht-Kardiomyozyten positiv für das Herz ist (wie anhand des Rückgangs der Herzinsuffizienz zu beobachten) oder zu einer Fibrose führt. Dazu analysierten wir midventrikuläre Herzschnitte von aMyHC-MCM und aMyHC-MCM/*Mstn*^{fl/fl} Mäusen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Tamoxifengabe, die einer Kollagen-I Immunfluoreszenzfärbung unterzogen wurden (s. 3.2.4.6). Die quantitative Auswertung ergab, dass der Kollagen-I Gehalt in aMyHC-MCM/*Mstn*^{fl/fl} Herzen 6 Wochen nach Tamoxifengabe stark anstieg (s. Abb. 44C, D-G). Dies verläuft parallel zum Anstieg der Myostatin Expression durch Nicht-Kardiomyozyten (s. Abb. 44A, C). Wir haben keinen Einfluss von Tamoxifen selbst auf aMyHC-MCM Kontrollen 84 Tage nach Tamoxifengabe festgestellt (s. Abb. 44C, D).

Um zu validieren, dass wirklich die Überexpression von Myostatin für die Entstehung der interstitiellen Fibrose (s. Abb. 44C, D-G) verantwortlich ist, unterzogen wir unsere konditionellen Überexpressionsmäuse (aMyHC-Cre/CAGG-*Mstn*) einer Kollagen-I Immunfluoreszenzfärbung. Damit konnten wir bestätigen (s. Abb. 45), dass eine Überexpression von Myostatin in Kardiomyozyten interstitielle Fibrose verursacht, während eine Deletion von Myostatin in Kardiomyozyten von der Entwicklung an (aMyHC-Cre/*Mstn*^{fl/fl}) keinen Einfluss besitzt (s. Abb. 45).

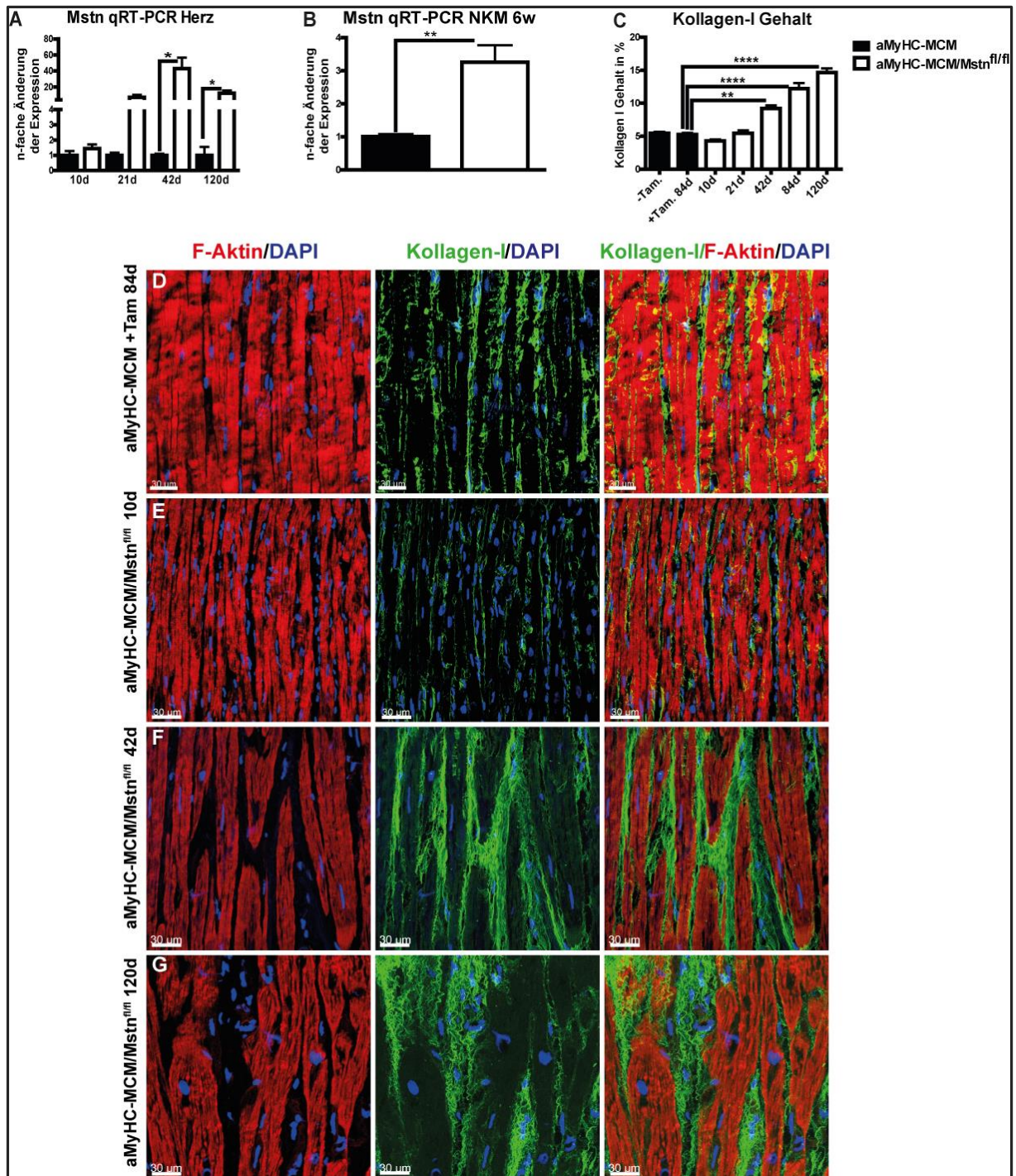


Abbildung 44: Überkompensation von Nicht-Kardiomyozyten verursacht interstitielle Fibrose

(A) Quantitative RT-PCR zur Analyse der Myostatin Expression in Herzventrikeln von aMyHC-MCM und aMyHC-MCM/*Mstn*^{fl/fl} Mäusen 10, 21, 42 und 120 Tage nach Tamoxifenadministration (3 unabhängige Experimente, n=3). (B) Quantitative Myostatin RT-PCR von isolierten Nicht-Kardiomyozyten von aMyHC-MCM und aMyHC-MCM/*Mstn*^{fl/fl} Mäusen 6 Wochen nach Tamoxifengabe (3 unabhängige Experimente, n≥3). (C) Auswertung des Kollagen-I Gehalts im midventrikulären Bereich von aMyHC-MCM und aMyHC-MCM/*Mstn*^{fl/fl} Mäusen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Tamoxifengabe. Der Kollagen-I Gehalt wurde in 5 verschiedenen Bereichen pro Herz ausgewertet (n=3). Dargestellt sind Mittelwert ±SEM. *P<0.05, **P<0.01, ****P<0.0001. (D-G) Immunfluoreszenzfärbung von Kollagen-I in aMyHC-MCM Herzventrikeln 84 Tage (D) und in aMyHC-MCM/*Mstn*^{fl/fl} Herzen 10 (E), 42 (F) und 120 (G) Tage nach Tamoxifenadministration. Maßstab: 30 μm.

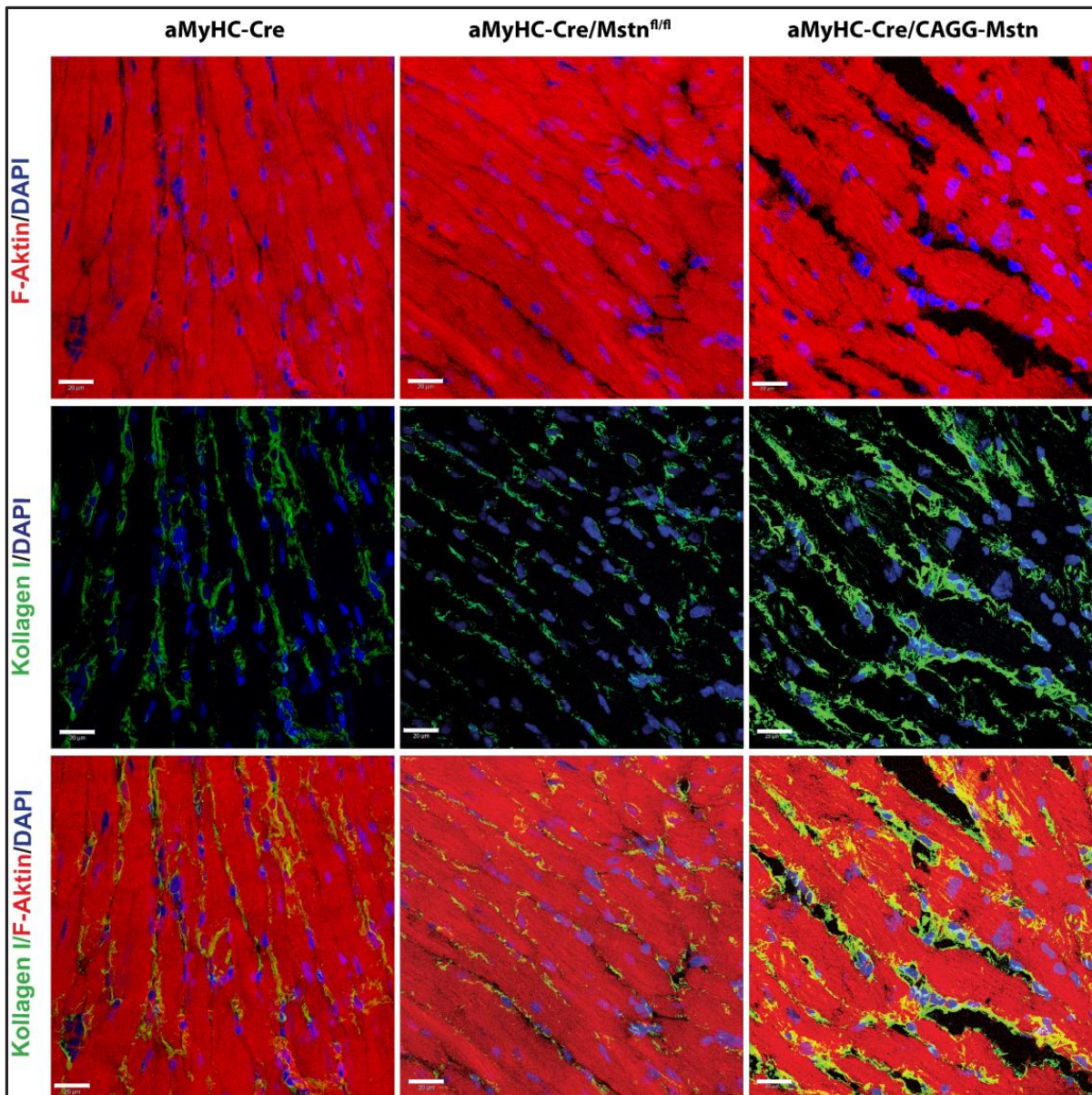


Abbildung 45: Konstitutive Überexpression von Myostatin in Kardiomyozyten induziert interstitielle Fibrose

Immunfluoreszenzfärbung für F-Aktin/DAPI, Kollagen-I/DAPI und F-Aktin/Kollagen-I/DAPI (63x) im midventrikulären Bereich von aMyHC-Cre, aMyHC-Cre/*Mstn*^{fl/fl} und aMyHC-Cre/CAGG-*Mstn* Herzen. Maßstab: 20µm

4.1.8.2 Langzeit-Überexpression von Myostatin induziert interstitielle Fibrose und verschlechtert dadurch die Kontraktilität des Herzens

Da Fibrose zu einer „Versteifung“ des Herzens, genauer einer restriktiven Kardiomyopathie führt, untersuchten wir, ob eine Überexpression von Myostatin über einen längeren Zeitraum die Herzfunktion verschlechtert. Hierfür analysierten wir aMyHC-Cre/CAGG-*Mstn* und CAGG-*Mstn* Mäuse im Alter von 9 Monaten mit Hilfe des MRTs. Die Überexpression von Myostatin über einen längeren Zeitraum führt zu einer starken interstitiellen und perivaskulären Fibrose (s. Abb. 46C). Desweiteren wird aus den MRT-Daten die Tendenz zu einer verschlechterten Kontraktilität des linken Ventrikels

anhand der Ejektionsfraktion, des Schlagvolumens und des endsystolischen Volumens deutlich (s. Tab. 19).

Tabelle 19: Überexpression von Myostatin über einen längeren Zeitraum verschlechtert die Kontraktilität leicht

Mauslinie	linker Ventrikel						rechter Ventrikel				Gewicht in g	
	EF in %	SV in μ l	LV Masse ES in mg	LV Masse ED in mg	EDV in μ l	ESV in μ l	LV Wand- dicke in μ m	EF in %	SV in μ l	EDV in μ l		ESV in μ l
CAGG- Mstn 9 m	45.9 ± 3.4	40.4 ± 1.7	94.6 ± 3	88.2 ± 2.8	89.9 ± 5	49.5 ± 5.7	784.5 ± 21.1	42.2 ± 2.3	27.2 ± 1.1	65.6 ± 4.2	38.4 ± 3.8	32.2 ± 3.1
aMyHC- Cre/CAGG -Mstn 9m	24.1 ± 6.5	31.6 ± 6.2	107.5 ± 5.3	105.7 ± 7.4	138 ± 14	106.4 ± 19.1	701 ± 18.1	34.1 ± 2.1	27.3 ± 0.4	80.3 ± 3.8	53.1 ± 4.1	30.8 ± 0.9

MRT-Auswertung von CAGG-Mstn und aMyHC-Cre/CAGG-Mstn Mäusen. Es wurden Männchen im Alter von 9 Monaten verwendet (n=3). EF: Ejektionsfraktion; SV: Schlagvolumen; LV Masse ES: linksventrikuläre Masse in der Endsystole; LV Masse ED: linksventrikuläre Masse in der Enddiastole; EDV: enddiastolisches Volumen; ES: endsystolisches Volumen; LV Wanddicke: linksventrikuläre Wanddicke. Dargestellt sind Mittelwert \pm SEM. Signifikante Veränderungen wurden rot markiert. *P<0.05

Analog zu den Ergebnissen der jüngeren Mäuse (s. 3.1.3), konnten wir auch nach 9 Monaten keinen Einfluss der Myostatin Überexpression auf die Kardiomyozyten-Fläche beobachten (s. Abb. 46A, B). Jedoch kam es zu einer Reduktion der linksventrikulären Wanddicke (s. Tab. 19).

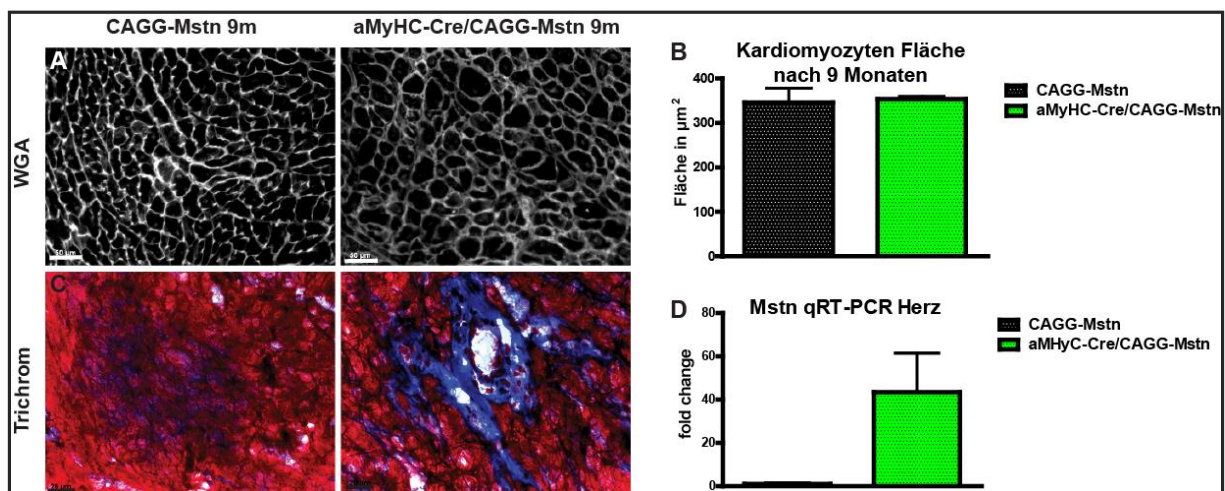


Abbildung 46: Langzeit-Überexpression von Myostatin führt zu einer starken interstitiellen Fibrose

(A) Repräsentative WGA Färbung von midventrikulären Herzquerschnitten von 9 Monate alten CAGG-Mstn und aMyHC-Cre/CAGG-Mstn Mäusen. Maßstab: 50 μ m. (B) Auswertung der Kardiomyozyten Fläche. Dafür wurden vier verschiedene Bereiche pro Herz (n=3) ausgewertet. (C) Repräsentative Trichromfärbung von midventrikulären Herzquerschnitten von CAGG-Mstn und aMyHC-Cre/CAGG-Mstn Mäusen im Alter von 9 Monaten. Maßstab: 20 μ m. (D) Quantitative Myostatin RT-PCR von Herzventrikeln von 9 Monate alten CAGG-Mstn und aMyHC-Cre/CAGG-Mstn Mäusen. *Arp* wurde zur Normierung verwendet.

Somit scheint eine kurzfristige Überexpression von Myostatin, wie unter pathologischen Bedingungen beobachtet, zu einer verbesserten Kontraktilität (s. 4.1.2) zu führen. Die langfristige Überexpression verursacht jedoch eine interstitielle und perivaskuläre Fibrose, die letztendlich zur „Versteifung des Herzens“ und damit einhergehendem Funktionsverlust führt.

4.1.9 Die profibrotische Wirkung von Myostatin wird über p38 vermittelt

Um den molekularen Mechanismus, der die interstitielle Fibrose nach Überexpression von Myostatin (s. 4.1.8) verursacht zu identifizieren, überprüften wir verschiedene profibrotische Signalwege, unter anderem auch p38. Bei p38 handelt es sich um einen bekannten Aktivator von Fibrose im Herzen. Dies wurde durch verschiedene transgene Mausmodelle bestätigt³⁶³⁻³⁶⁵. Philip et al. haben in verschiedenen Zelltypen, unter anderem in C2C12 Zellen (Myoblasten) gezeigt, dass Myostatin p38 aktivieren kann¹¹³. Morissette et al.¹⁶⁵ behauptete das Gegenteil in Adenovirus-infizierten neonatalen Ratten-Kardiomyozyten. Dies legte zumindest eine Verbindung zwischen Myostatin und p38 nahe. Unsere *in vivo* Daten zeigen, dass eine Kardiomyozyten-spezifische Überexpression eines Myostatin Transgens (aMyHC-Cre/CAGG-Mstn) p38 über seine vorgeschalteten Kinasen TAK1 und MKK3/6 aktiviert (s. Abb. 47).

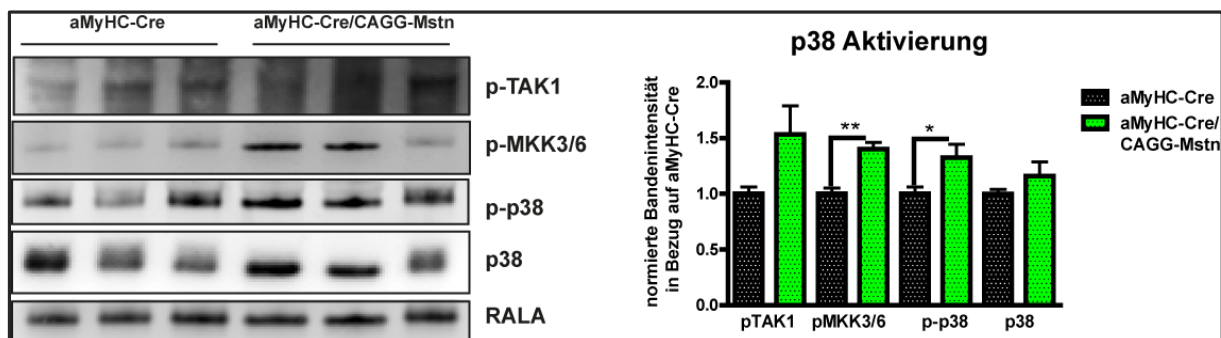


Abbildung 47: Die profibrotische Wirkung von Myostatin wird über p38 vermittelt

Western Blot und Quantifizierung der Expression von p-TAK1 (Thr187), p-MKK3/6 (Ser189/297), p-p38 (Thr180/Tyr182) und p38 in aMyHC-Cre und aMyHC-Cre/CAGG-Mstn Herzlysaten (3 unabhängige Experimente, $n \geq 3$). RALA diente als Ladekontrolle. Dargestellt sind Mittelwert \pm SEM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Um den Myostatin-p38 Signalweg weiter zu validieren, untersuchten wir, ob die überkompensierte Expression von Myostatin in Nicht-Kardiomyozyten 6 Wochen nach Tamoxifengabe auch zur Aktivierung der p38 Signaltransduktion führt. Dabei konnten wir anhand einer gesteigerten Phosphorylierung von TAK1, MKK3/6 und p38 bestätigen, dass der p38 Signalweg auch in aMyHC-MCM/Mstn^{fl/fl} Herzlysaten 6 Wochen nach Tamoxifengabe aktiviert ist (s. Abb. 48). Dies legt nahe, dass die profibrotische Wirkung von Myostatin im Herzen über p38 vermittelt wird.

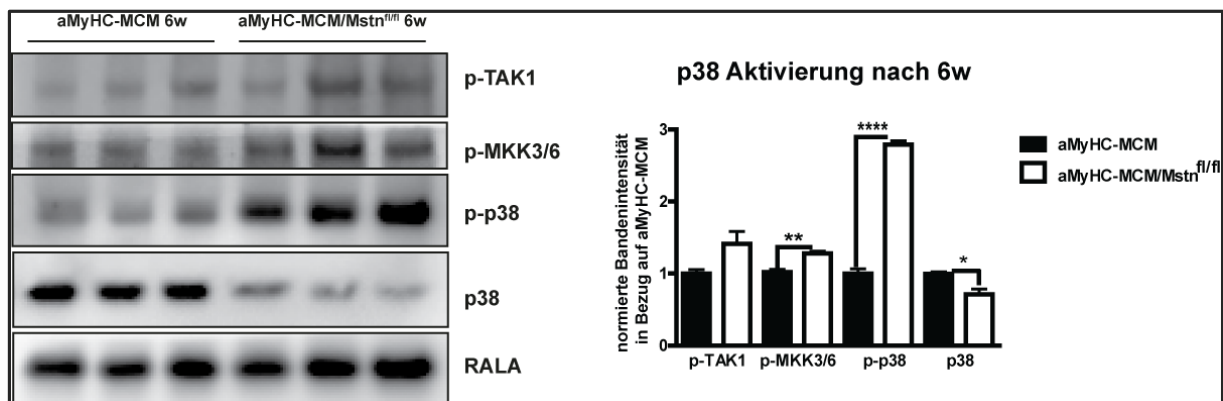


Abbildung 48: Überkompensation von Myostatin durch Nicht-Kardiomyozyten aktiviert auch p38

Western Blot und Quantifizierung der Expression von p-TAK1 (Thr187), p-MKK3/6 (Ser189/297), p-p38 (Thr180/Tyr182) und p38 in aMyHC-MCM und aMyHC-MCM/Mstn^{fl/fl} Herzlysaten 6 Wochen nach Tamoxifengabe. RALA diente als Ladekontrolle. Dargestellt sind Mittelwert \pm SEM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$.

Um zu beweisen, dass die Aktivierung von p38 durch Myostatin für die Entwicklung der interstitiellen Fibrose verantwortlich ist, stimulierten wir isolierte murine adulte Kardiomyozyten mit Myostatin und dem p38 Inhibitor SB203580. Die 30-minütige Stimulation mit Myostatin (30ng/ml) führte zu einem starken Anstieg der p38 Phosphorylierung im Vergleich zu den DMSO-behandelten Kardiomyozyten (s. Abb. 49A). Die Effizienz des p38 Inhibitors SB203580 wurde anhand der Phosphorylierung des p38 Zielmoleküls Hsp27 deutlich (s. Abb. 49A). Nachdem aus diesen stimulierten Kardiomyozyten RNA isoliert wurde, wurde die Kollagen-I Expression mit Hilfe einer quantitativen RT-PCR überprüft. Dabei beobachteten wir, dass Myostatin eine starke Hochregulation der Kollagen-I Expression verursacht (s. Abb. 49B). Dieser Effekt wurde komplett geblockt, wenn die Kardiomyozyten vorher 30min mit dem p38 Inhibitor SB203580 inkubiert wurden (s. Abb. 49B).

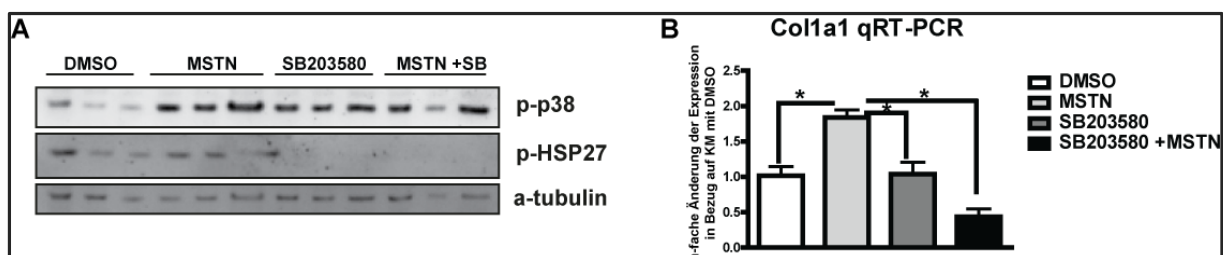


Abbildung 49: Die profibrotische Wirkung von Myostatin wird über p38 vermittelt

Murine adulte ventrikuläre Wildtyp Kardiomyozyten (1 Tag in Kultur) wurden mit DMSO (1h), 30ng/ml Myostatin (MSTN, 30min) und dem p38 Inhibitor SB203580 (10 μ M, 1h) stimuliert. Desweiteren wurden sie 30min mit 10 μ M SB203580 vorinkubiert und anschließend mit 30ng/ml Myostatin (MSTN) für weitere 30min stimuliert. (A) Western Blot von p-p38 (Thr180/Tyr182) und p-HSP27 (Ser82) in behandelten Kardiomyozyten. A-Tubulin diente als Ladekontrolle (3 unabhängige Experimente, n=3). (B) Quantitative RT-PCR zur Überprüfung der Kollagen-I (*Col1a1*) Expression in den behandelten Kardiomyozyten (3 unabhängige Experimente, n=3). *Arp* wurde zur Normierung verwendet. Dargestellt sind Mittelwert \pm SEM. * $P < 0.05$.

Diese Ergebnisse führten zu der Hypothese, dass Myostatin p38 über die Kinasen TAK1 und MKK3/6 aktiviert. Die Aktivierung von p38 führt zur Induktion der Kollagen-I Expression, der Ursache der interstitiellen Fibrose. Somit wird die profibrotische Wirkung von Myostatin über eine Myostatin-TAK1-MKK3/6-p38 Signalkaskade vermittelt.

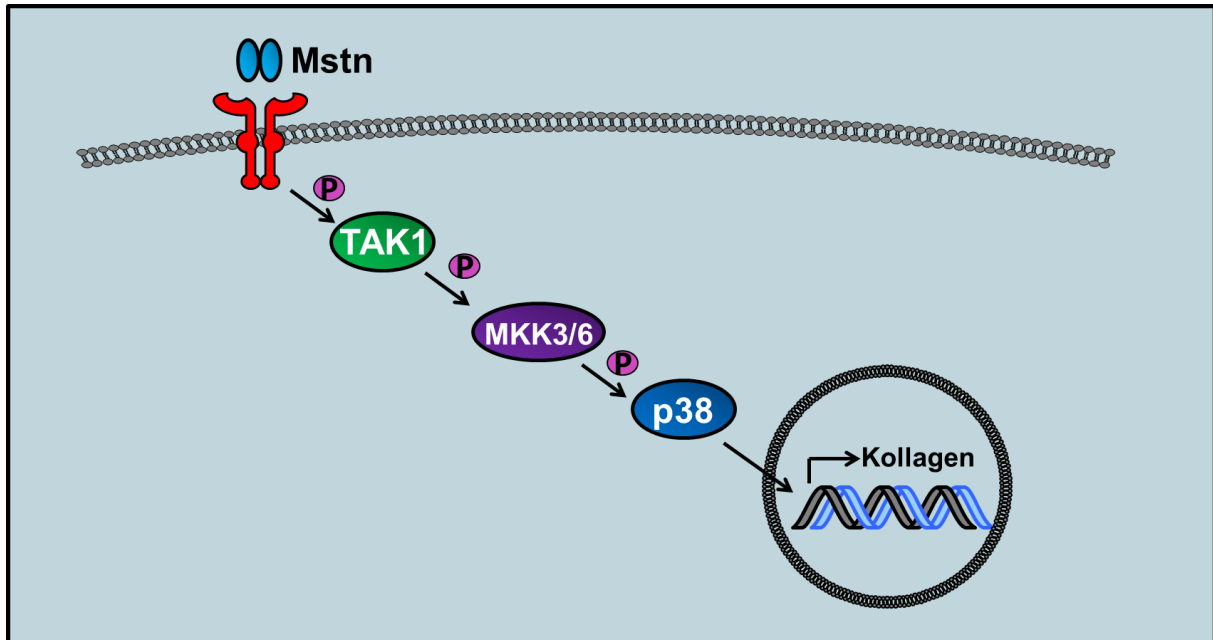


Abbildung 50: Schematische Darstellung des Signalmechanismus

Myostatin stimuliert p38 über Aktivierung von TAK1, einer Serin/Threonin-Kinase, die die Signaltransduktion von Myostatin vermittelt und MKK3/6. Die Aktivierung von p38 führt zur Induktion der Kollagen-I Expression.

4.2 Wirkung und Interaktion der Wachstumsfaktoren Myostatin und IGF-1 in murinen Kardiomyozyten

Die Auswertung der MicroArray Daten (s. 3.2.2.4) zeigte nach akuter Myostatin Deletion eine Hochregulation von Genen, die in die IGF-1 Signaltransduktion involviert sind (s. Abb. 51). Dabei sind sowohl der IGF-1 Rezeptor (*Igf1r*), als auch verschiedene Isoformen der Phosphatidylinositol-3-phosphat Kinase (PI3K), einem wichtigen Signalvermittler der IGF-1 Signaltransduktion hochreguliert.

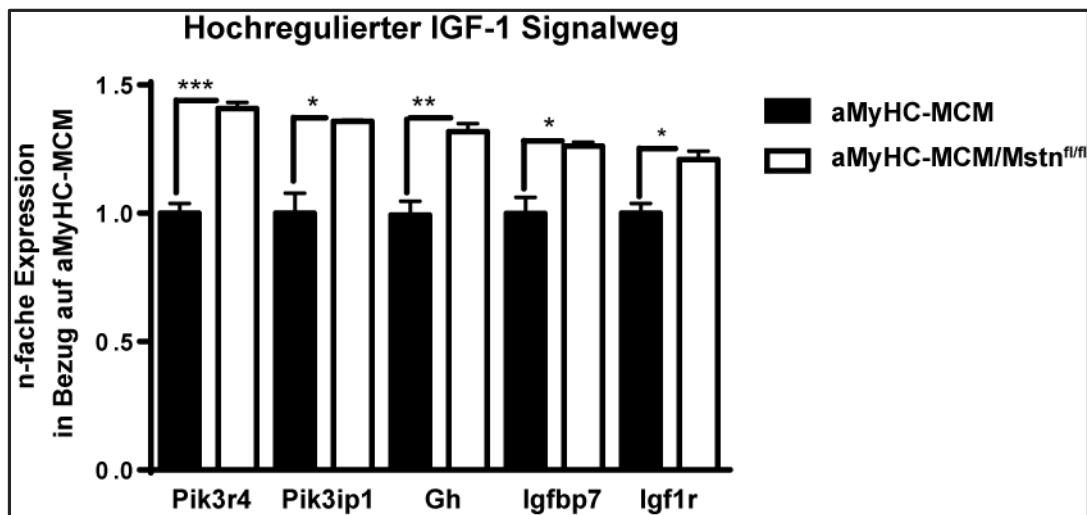


Abbildung 51: Akute Myostatin Deletion aktiviert den IGF-1 Signalweg

MicroArray-Analyse von aMyHC-MCM und aMyHC-MCM/*Mstn*^{fl/fl} ventrikulären Proben (n=3) in Bezug auf die Expression von Genen, die mit dem IGF-1 Signalweg in Zusammenhang stehen. Dargestellt sind Mittelwert \pm SEM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Bei dem *Insulin-like Growth Factor 1* (IGF-1) handelt es sich um ein kleines Polypeptid, das, wie am Namen schon erkennbar, Homologie mit Proinsulin aufweist. Es ist einer der wichtigsten Regulatoren von Muskelwachstum und nimmt diesbezüglich eine gegensätzliche Funktion zu Myostatin ein. So führt die Überexpression einer muskelspezifischen Isoform von *Igf-1* zur ausgeprägten Hypertrophie der Skelettmuskulatur¹⁸⁹, während der konstitutive knockout von IGF-1 perinatal lethal ist und ein deutliches verringertes Skelettmuskelwachstum zeigt¹⁷⁸. Myostatin und *Igf-1* sind somit zwei der wichtigsten Gegenspieler in der Regulation des Skelettmuskelwachstums. Um zu untersuchen, ob diese Funktion auch in Herzmuskelzellen konserviert ist, und ob eine Deletion von *Igf-1* die Hypertrophie und Herzinsuffizienz nach akuter Myostatin Deletion verhindern kann, generierten wir Mausmodelle zur Kardiomyozyten-spezifischen Ausschaltung von Myostatin und *Igf-1* (s. 3.1.10.5). Mit Hilfe dieser Mausmodelle sollte auch die Identifikation von neuen Signalwegen, die die Myostatin mit der IGF-1 Signaltransduktion verbinden, ermöglicht werden.

4.2.1 Evaluierung der Mausmodelle

4.2.1.1 Effiziente Deletion von *Igf-1* in Kardiomyozyten

Wie oben (s. 4.2) schon beschrieben, handelt es sich bei IGF-1 um einen wichtigen Regulator des Skelettmuskelwachstums. Erstaunlicherweise existiert bis heute keine Studie über die Deletion von *Igf-1* in Kardiomyozyten. Jedoch wurde gezeigt, dass die Überexpression eines *Igf-1* Transgens zu einer Hypertrophie des Herzens führt²⁸³. Um die Funktion von IGF-1 im adulten Herzen – besonders im Hinblick auf Interaktionen mit Myostatin – zu untersuchen, etablierten wir zwei Mausmodelle.

Durch eine Verpaarung der *Igf-1^{fl/fl}* (s. 3.1.10.5) mit einer aMyHC-MCM Mauslinie (s. 3.1.10.2), wurde eine Tamoxifen-induzierbare Deletion von *Igf-1* im adulten murinen Herzen ermöglicht (*aMyHC-MCM/Igf-1^{fl/fl}*). Dadurch können akute Effekte einer *Igf-1* Deletion untersucht und neue Signalwege identifiziert werden. Um dieses Mausmodell evaluieren zu können, wurden quantitative RT-PCRs (s. 3.2.2.3.2) mit verschiedenen *Igf-1* Oligonukleotiden (s. Tab. 9) durchgeführt. Dies beruht darauf, dass *Igf-1* alternativ gespleißt werden kann. In Nagern existieren zwei Isoformen, hier systemisches *Igf-1* (auch *Igf-1Ea*) und eine muskelspezifische Isoform, hier *Mgf* (*mechano growth factor* oder *Igf-1Eb*) genannt (s. Abb. 12). Beide Spleißvarianten enthalten Exon 3 und 4, die für das reife IGF-1 Peptid kodieren. Bei systemischem *Igf-1* wird Exon 4 direkt zu Exon 6 gespleißt, während das Spleißen von Exon 4 zu Exon 5 und Exon 6 zu *Mgf* führt^{366,367}. Für die Pan-*Igf-1* bezeichnete qRT-PCR wurden Oligonukleotide, die an Exon 3 und Exon 4 binden, verwendet. Wir konnten zeigen, dass die Induktion der Deletion von *Igf-1* in Kardiomyozyten zu einer signifikanten Reduktion sowohl der Pan-*Igf-1*, wie auch der *Mgf* Expression führt (s. Abb. 52B, E, F). Desweiteren wird deutlich, dass die Reduktion im Falle der muskelspezifischen *Mgf* Isoform im Vergleich zu systemischem *Igf-1* deutlich stärker ausfällt (s. Abb. 52C-F). Dabei kommt es zu einer 95,6%igen Reduktion der *Mgf* Expression in *aMyHC-MCM/Igf-1^{fl/fl}* Kardiomyozyten 10 Tage nach Tamoxifengabe (s. Abb. 52F). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass es sich bei *Mgf* um die vorwiegende Isoform in Kardiomyozyten handelt. Als Kontrolltiere wurden wiederum ebenfalls mit Tamoxifen behandelte *aMyHC-MCM* Mäuse verwendet, um unspezifische Effekte von Tamoxifen auszuschließen.

Um die Langzeitfolgen einer Deletion von *Igf-1* in Kardiomyozyten zu untersuchen, wurden *Igf-1^{fl/fl}* (s. 3.1.10.5) Mäuse mit *aMyHC-Cre* (s. 3.1.10.1) Mäusen verpaart (*aMyHC-Cre/Igf-1^{fl/fl}*). Dadurch wird *Igf-1* in Kardiomyozyten zwischen E7.5 und E8^{338,339} deletiert. Analog zu *aMyHC-Cre/Mstn^{fl/fl}* Mäusen wurden auch hier Männchen im Alter von 4,5 Monaten verwendet. Um die Effizienz der *Igf-1* Deletion zu evaluieren, wurde wiederum eine qRT-PCR mit cDNA von Kardiomyozyten (s. 2.2.1.7) durchgeführt. Als Kontrolltiere wurden *aMyHC-Cre* Mäuse verwendet. Ähnlich zu dem induzierbaren Modell ist die *Mgf* Expression im Vergleich zur Expression von systemischem *Igf-1* deutlich stärker reduziert (s. Abb. 53). Dabei führt die Deletion von *Igf-1* in Kardiomyozyten von der Entwicklung an, zu einer 93% Reduktion der *Mgf* Expression in adulten Kardiomyozyten (s. Abb. 53B).

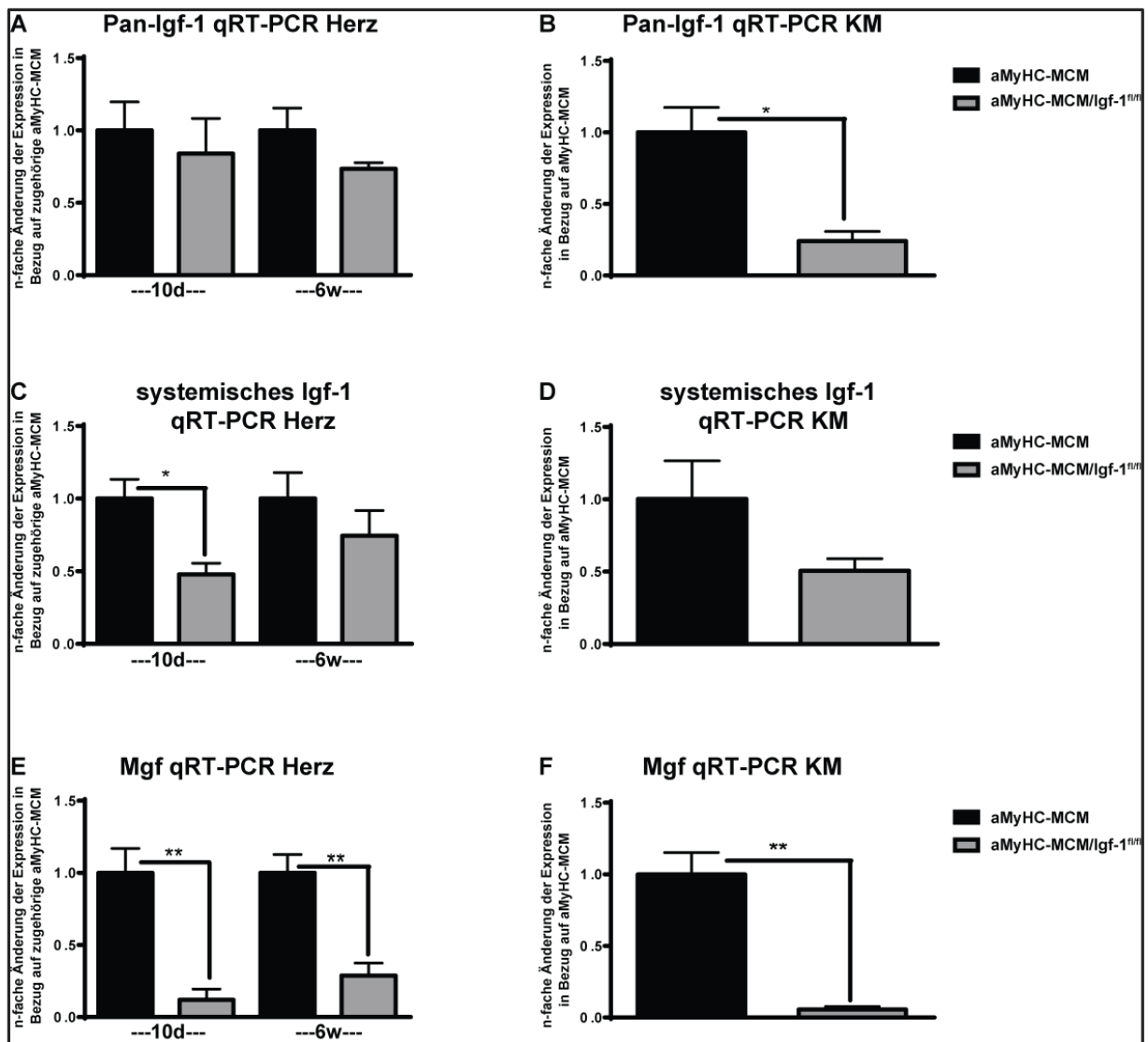


Abbildung 52: Das aMyHC-MCM/Igf-1^{fl/fl} Mausmodell ermöglicht eine effiziente Ausschaltung von Igf-1 in Kardiomyozyten

(A) Quantitative Pan-Igf-1 RT-PCR von aMyHC-MCM und aMyHC-MCM/Igf-1^{fl/fl} Herzventrikeln 10 Tage und 6 Wochen nach Tamoxifenadministration (3 unabhängige Experimente, n=3). (B) Quantitative RT-PCR zur Analyse der Pan-Igf-1 Expression in aMyHC-MCM und aMyHC-MCM/Igf-1^{fl/fl} Kardiomyozyten (KM) 10 Tage nach der ersten Tamoxifengabe (3 unabhängige Experimente, n=3). (C) Quantitative RT-PCR zur Auswertung der Expression von systemischem Igf-1 in aMyHC-MCM und aMyHC-MCM/Igf-1^{fl/fl} Herzventrikeln 10 Tage und 6 Wochen nach Tamoxifenadministration (3 unabhängige Experimente, n=3). (D) Quantitative RT-PCR zur Analyse der Expression von systemischem Igf-1 in aMyHC-MCM und aMyHC-MCM/Igf-1^{fl/fl} Kardiomyozyten (KM) 10 Tage nach der ersten Tamoxifengabe (3 unabhängige Experimente, n=3). (E) Quantitative Mgf RT-PCR von aMyHC-MCM und aMyHC-MCM/Igf-1^{fl/fl} Herzventrikeln 10 Tage und 6 Wochen nach Tamoxifenadministration (3 unabhängige Experimente, n=3). (F) Quantitative RT-PCR zur Auswertung der Mgf Expression in aMyHC-MCM und aMyHC-MCM/Igf-1^{fl/fl} Kardiomyozyten (KM) 10 Tage nach der ersten Tamoxifengabe (3 unabhängige Experimente, n=3). Dargestellt sind Mittelwert \pm SEM. *P<0.05, **P<0.01

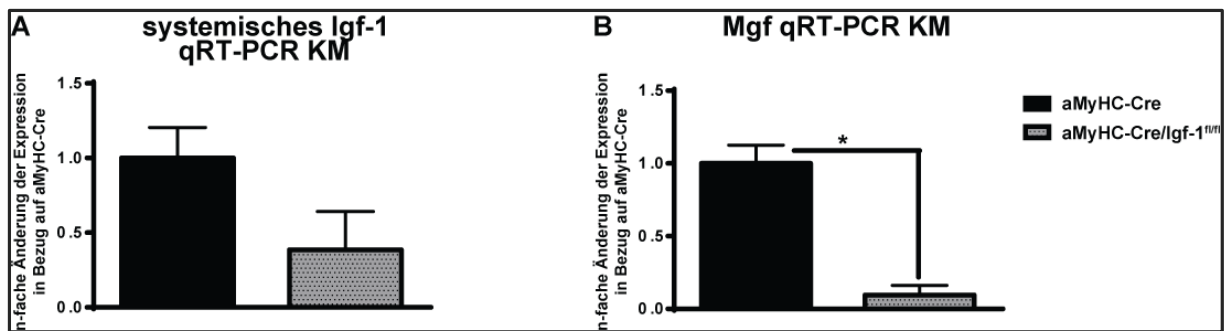


Abbildung 53: Starke Runterregulation der *Mgf* Expression im aMyHC-Cre/*Igf-1*^{fl/fl} Mausmodell

(A) Quantitative RT-PCR zur Analyse der Expression von systemischem *Igf-1* in aMyHC-Cre und aMyHC-Cre/*Igf-1*^{fl/fl} Kardiomyozyten (KM, 3 unabhängige Experimente, n=2). (B) Quantitative *Mgf* RT-PCR in aMyHC-Cre und aMyHC-Cre/*Igf-1*^{fl/fl} Kardiomyozyten (KM, 3 unabhängige Experimente, n=2). Dargestellt sind Mittelwert \pm SEM. *P<0.05.

4.2.1.2 Erfolgreiche Deletion von Myostatin und *Igf-1* in Kardiomyozyten

Um zu überprüfen, ob eine Deletion von *Igf-1* die Hypertrophie und Herzinsuffizienz nach akuter Myostatin Deletion verhindern kann, wurde ein Kardiomyozyten-spezifischer Doppel-*knockout* generiert. Dieser sollte auch der Identifikation neuer Signalwege, durch die Myostatin und IGF-1 interagieren, dienen. Es wurde wiederum die Wirkung der akuten Deletion im adulten Herzen sowie der Deletion von der Entwicklung an, untersucht.

Um eine induzierbare, Kardiomyozyten-spezifische Deletion von Myostatin und *Igf-1* im adulten murinen Herzen zu erreichen, wurden *Igf-1*^{fl/fl} (s. 3.1.10.5), *Mstn*^{fl/fl} (s. 3.1.10.3) und aMyHC-MCM (s. 3.1.10.2) Mäuse miteinander verpaart (aMyHC-MCM/*Mstn*^{fl/fl}/*Igf-1*^{fl/fl}). Mit Hilfe einer β -Galaktosidase-Färbung (s. 3.2.4.4) wurde die Rekombination 6 Wochen nach Induktion der Deletion in midventrikulären Herz-Gefrierschnitten untersucht (s. Abb. 54A, B). Die starke und homogene Blaufärbung spricht für eine erfolgreiche Rekombination in Kardiomyozyten. Zur weiteren Evaluierung dieses Mausmodells wurde wiederum die Expression der verschiedenen *Igf-1* Isoformen und die Expression Myostatin's mit Hilfe einer quantitativen RT-PCR (s. 3.2.2.3.2) überprüft. Dabei konnten wir zeigen, dass die Deletion von Myostatin und *Igf-1* zu einer signifikanten Reduktion, sowohl von Pan-*Igf-1*, als auch von systemischem *Igf-1* und *Mgf* führten (s. Abb. 54C-H). Analog zur akuten Deletion von *Igf-1* wird auch hier deutlich, dass die Reduktion im Falle der muskelspezifischen *Mgf* Isoform im Vergleich zu systemischem *Igf-1* deutlich stärker ausfällt (s. Abb. 54E-G). Dabei wird die *Mgf* Expression in aMyHC-MCM/*Mstn*^{fl/fl}/*Igf-1*^{fl/fl} Kardiomyozyten 10 Tage nach Tamoxifengabe um 97,4% erniedrigt (s. Abb. 54G), während die Expression von systemischem *Igf-1* nur um 55,1% zurückgeht (s. Abb. 54E). Überraschenderweise geht selbst in Kardiomyozyten die Expression von Myostatin nur um ca. 50% zurück (s. Abb. 54J). Dies könnte darauf hindeuten, dass Mäuse, in denen Myostatin stärker deletiert wurde, zu den 60% die vor Tag 10 starben gehörten und wir nur die schwächsten Phänotypen selektionieren. Analog zur akuten Deletion von Myostatin alleine kommt es auch nach Deletion von Myostatin und *Igf-1* zu einer starken Überkompensation durch Nicht-Kardiomyozyten nach 6 Wochen (s. Abb. 54I). Als Kontrolltiere wurden wieder Tamoxifen behandelte aMyHC-MCM Mäuse verwendet.

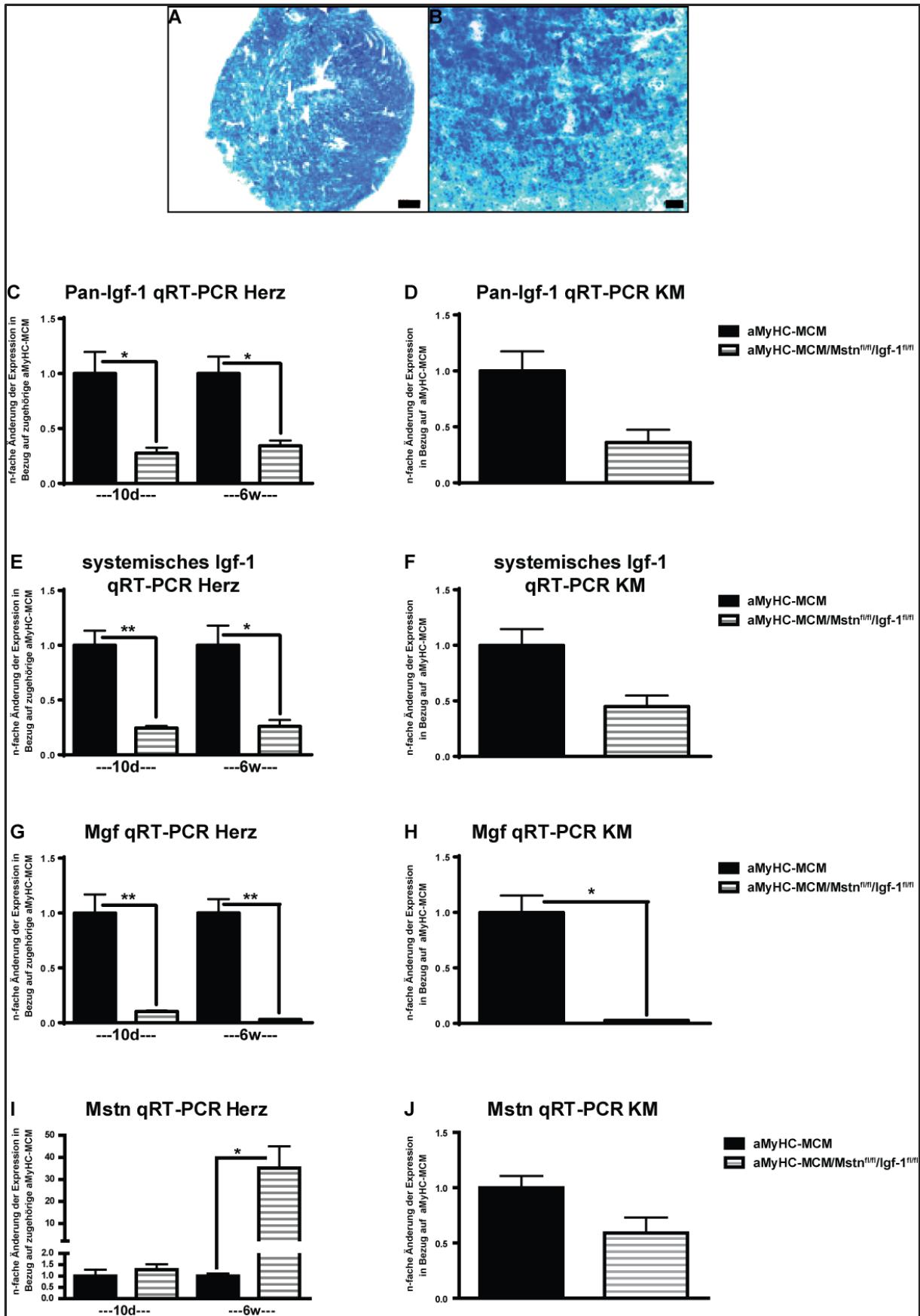
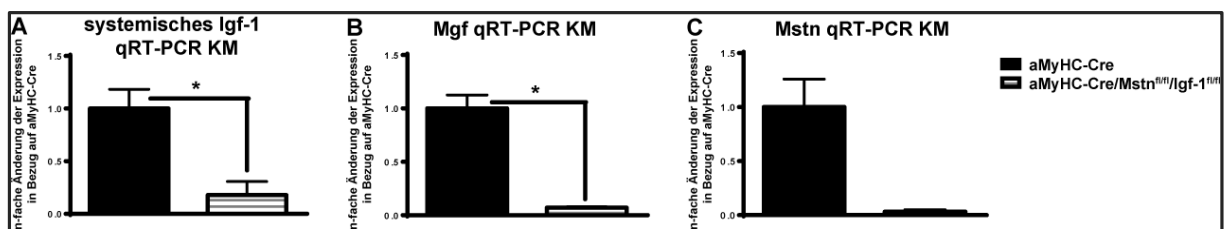


Abbildung 54: Erfolgreiche Rekombination nach Tamoxifengabe im aMyHC-MCM/*Mstn*^{fl/fl}/*Igf-1*^{fl/fl} Mausmodell

(A-B) Repräsentative β -Galaktosidase-Färbung von midventrikulär geschnittenen aMyHC-MCM/*Mstn*^{fl/fl}/*Igf-1*^{fl/fl} Herzen 6 Wochen nach Tamoxifengabe. (A) Maßstab: 200 μ m. (B) Maßstab: 20 μ m. (C, E, G, I) Quantitative Pan-*Igf-1* (C), systemische *Igf-1* (G), *Mgf* (E) und Myostatin (I) RT-PCR von aMyHC-MCM und aMyHC-MCM/*Mstn*^{fl/fl}/*Igf-1*^{fl/fl} Herzventrikeln 10 Tage und 6 Wochen nach Tamoxifenadministration (3 unabhängige Experimente, n=3). (D, F, H, J) Quantitative RT-PCR zur Analyse der Pan-*Igf-1* (D), systemischen *Igf-1* (F), *Mgf* (H) und Myostatin (J) Expression in aMyHC-MCM und aMyHC-MCM/*Mstn*^{fl/fl}/*Igf-1*^{fl/fl} Kardiomyozyten (KM) 10 Tage nach der ersten Tamoxifengabe (3 unabhängige Experimente, n \geq 2). Dargestellt sind Mittelwert \pm SEM. *P<0.05, **P<0.01.

Um die Langzeit-Auswirkungen einer Deletion sowohl von *Igf-1*, als auch von Myostatin in Kardiomyozyten zu untersuchen, wurden *Mstn*^{fl/fl} (s. 3.1.10.3), *Igf-1*^{fl/fl} (s. 3.1.10.5) und aMyHC-Cre (s. 3.1.10.1) Mäuse zur Generierung von aMyHC-Cre/*Mstn*^{fl/fl}/*Igf-1*^{fl/fl} Mäusen verpaart. Zur Analyse wurden grundsätzlich Männchen im Alter von 4,5 Monaten verwendet. Die Effizienz der Deletion von Myostatin und *Igf-1* wurde durch eine quantitative RT-PCR mit cDNA von frisch isolierten Kardiomyozyten (s. 3.2.1.7) durchgeführt. aMyHC-Cre Mäuse dienten als Kontrolltiere. Wir fanden eine stark reduzierte Expression von systemischem *Igf-1*, *Mgf* und Myostatin (s. Abb. 55).

Abbildung 55: Effiziente Ausschaltung von Myostatin und *Igf-1*

(A) Quantitative RT-PCR zur Analyse der Expression von systemischem *Igf-1* in aMyHC-Cre und aMyHC-Cre/*Mstn*^{fl/fl}/*Igf-1*^{fl/fl} Kardiomyozyten (KM, 3 unabhängige Experimente, n=2). (B) Quantitative *Mgf* RT-PCR in aMyHC-Cre und aMyHC-Cre/*Mstn*^{fl/fl}/*Igf-1*^{fl/fl} Kardiomyozyten (KM, 3 unabhängige Experimente, n=2). (C) Quantitative RT-PCR zur Analyse der Expression von Myostatin (*Mstn*) in aMyHC-Cre und aMyHC-Cre/*Mstn*^{fl/fl}/*Igf-1*^{fl/fl} Kardiomyozyten (KM, 3 unabhängige Experimente, n=2). Dargestellt sind Mittelwert \pm SEM. *P<0.05.

4.2.2 Hohe Lethalität nach Deletion von Myostatin und *Igf-1* in adulten Kardiomyozyten

Wie schon gezeigt (s. Abb. 51), sind mehrere Gene, die in die IGF-1 Signaltransduktion involviert sind, nach akuter Myostatin Deletion hochreguliert. Um zu überprüfen ob eine Deletion von *Igf-1* die Hypertrophie und Herzinsuffizienz nach akuter Myostatin Deletion verhindern kann, etablierten wir Kardiomyozyten-spezifische Doppel-*knockouts* von Myostatin und *Igf-1* (s. 3.1.10.5). Deren Herzparameter wurden, ebenso wie die der Mäuse, in denen nur *Igf-1* in adulten Kardiomyozyten deletiert wurde (aMyHC-MCM/*Igf-1*^{fl/fl}) mit Hilfe des MRT analysiert.

Dabei wurde anhand einer 10 Tage nach Tamoxifengabe leicht reduzierten Ejektionsfraktion, einem reduzierten Schlagvolumen und einem etwas größeren endsystolischen Volumen (s. Tab. 20) deutlich, dass die akute Deletion von *Igf-1* in adulten Kardiomyozyten zu einer leichten systolischen Dysfunktion führt. Eine positive inotrope Wirkung von exogenem IGF-1 auf Rattenherzen wurde

bereits nachgewiesen³⁰⁵, und kann durch unsere Ergebnisse bestätigt werden. Desweiteren beobachteten wir ein verringertes enddiastolisches Volumen (s. Tab. 20, Abb. 56C), ein Indikator für die Entstehung einer Hypotrophie 10 Tage nach akuter Deletion von *Igf-1*.

Die Deletion von Myostatin und *Igf-1* führt überraschenderweise zu einer 59,5% reduzierten Überlebensrate 10 Tage nach der ersten Tamoxifengabe (s. Abb. 56E). Diese ist – im Vergleich zur akuten Deletion von Myostatin alleine – deutlich höher (s. Abb. 56E). Bei der nachfolgenden Diskussion des Phänotyps sollte beachtet werden, dass nur diejenigen Mäuse, die überlebt haben, und somit einen schwächeren Phänotyp zeigen, ausgewertet werden konnten. Anhand des Vierkammerblicks wird ein – der akuten Deletion von Myostatin – ähnlicher Phänotyp offensichtlich (s. Abb. 56B, D). Dabei sind die beiden Atrien stark dilatiert und im Pleurabereich befinden sich Ödeme (s. Abb. 56D). Dies ist ein Indikator für eine schwere Linksherzinsuffizienz.

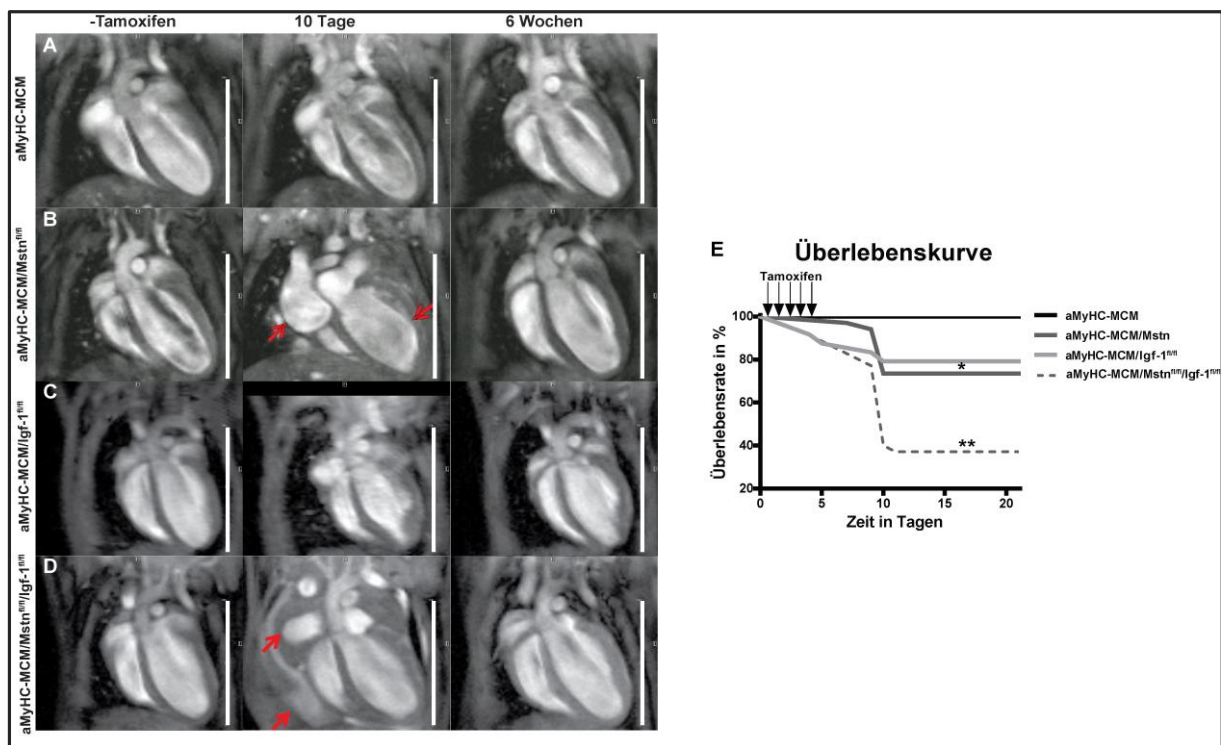


Abbildung 56: Hohe Lethalität nach Deletion von Myostatin und *Igf-1* in adulten Kardiomyozyten

(A-D) Repräsentative MRT Vierkammerblicke von aMyHC-MCM (A), aMyHC-MCM/*Mstn*^{fl/fl} (B), aMyHC-MCM/*Igf-1*^{fl/fl} (C) und aMyHC-MCM/*Mstn*^{fl/fl}/*Igf-1*^{fl/fl} (D) Mäusen vor, 10 Tage und 6 Wochen nach Tamoxifengabe. Die roten Pfeile zeigen ein dilatiertes rechtes Atrium (B, D), einen dilatierten linken Ventrikel (B) und ein Lungenödem (D). Maßstab: 10mm. (E) Überlebenskurve von aMyHC-MCM (n=15), aMyHC-MCM/*Mstn*^{fl/fl} (n=34), aMyHC-MCM/*Igf-1*^{fl/fl} (n=24) und aMyHC-MCM/*Mstn*^{fl/fl}/*Igf-1*^{fl/fl} (n=35) Mäusen nach Tamoxifenadministration. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Mantel-Cox-Test. *P<0.05, **P<0.01.

Die Herzinsuffizienz nach akuter Deletion von Myostatin und *Igf-1* wird anhand der erniedrigten Ejektionsfraktion, des verringerten Schlagvolumens und der Vergrößerung des endsystolischen Volumens deutlich (s. Tab. 20). Dass sich die Ejektionsfraktion im Vergleich zur Deletion von

Myostatin alleine, nach Deletion von Myostatin und *Igf-1* weniger verschlechtert, könnte an der Selektionierung der schwächsten, überlebenden Phänotypen liegen. Ähnlich zur akuten Deletion von Myostatin verbessert sich die Kontraktilität nach 6 Wochen wieder (s. Tab. 20), wobei der Ausgangswert vor Tamoxifengabe jedoch nicht wieder erreicht wird.

Zusammenfassend ist die Deletion von *Igf-1* nicht in der Lage, die Herzinsuffizienz nach akuter Myostatin Deletion in Kardiomyozyten zu verhindern. Stattdessen führt die Deletion beider Wachstumsfaktoren zu einer Verstärkung des Phänotyps, wodurch fast 60% der Mäuse innerhalb der ersten 10 Tage nach Tamoxifengabe sterben.

Tabelle 20: Schwere Herzinsuffizienz nach Deletion von Myostatin und *Igf-1* in adulten Kardiomyozyten

Mauslinie und Tage nach Tamoxifengabe	EF in %	SV in μ l	LV Masse ES in mg	LV Masse ED in mg	EDV in μ l	ESV in μ l	LV Wanddicke ED in μ m	Gewicht in g
aMyHC-MCM								
-Tam	52 \pm 2.6	37.7 \pm 2.1	74.2 \pm 3.7	64.5 \pm 2.2	72.4 \pm 1.7	34.7 \pm 1.9	714.7 \pm 45.2	26 \pm 0.8
10d	47 \pm 3.4	34.7 \pm 2.8	74.9 \pm 4.2	63.1 \pm 2.8	74.4 \pm 2.9	39.3 \pm 3.1	697.3 \pm 23.1	26.2 \pm 0.5
6w	54 \pm 1.8	39.1 \pm 1.5	79.1 \pm 3.9	66.6 \pm 3.3	72.3 \pm 1.2	33.2 \pm 1.3	715.4 \pm 26.7	27.3 \pm 0.6
aMyHC-MCM/Mstn^{fl/fl}								
-Tam	61 \pm 1.4	40.3 \pm 1.6	74.3 \pm 3.1	62.9 \pm 2.4	66.5 \pm 2.3	26.2 \pm 1.3	701 \pm 20.2	27.5 \pm 1.1
10d	23 \pm 2.9 $\Delta\Delta\Delta\Delta$ (0d), ****	18.6 \pm 2.2 $\Delta\Delta\Delta\Delta$ (0d), ***	75 \pm 4.4	72.8 \pm 3.9 Δ (0d), *	74.2 \pm 3.5	59.6 \pm 3.8 $\Delta\Delta\Delta\Delta$ (0d), ***	782.6 \pm 23.6 Δ (0d), *	26.9 \pm 0.9
6w	60 \pm 3.5 $\Delta\Delta\Delta\Delta$ (10d)	41.8 \pm 2 $\Delta\Delta\Delta\Delta$ (10d)	82.8 \pm 5.5	69.6 \pm 4.4	69.7 \pm 1.9	27.8 \pm 2.9 $\Delta\Delta\Delta\Delta$ (10d)	779.5 \pm 32	29.8 \pm 1.0
aMyHC-MCM/Igf-1^{fl/fl}								
-Tam	57 \pm 4.1	36.2 \pm 2.8	61.6 \pm 5.1	53.4 \pm 5.9	63.6 \pm 6.7	27.4 \pm 5.1	659 \pm 21.3	24 \pm 1.9
10d	42 \pm 1.7 $\Delta\Delta$ (0d)	25.4 \pm 8.9 $\Delta\Delta$ (0d), *	69.1 \pm 7.7	62.5 \pm 6.1	62.4 \pm 9.9 *	37 \pm 12.8 Δ (0d)	750.8 \pm 11.8	23.7 \pm 1.9
6w	56 \pm 5	36 \pm 2 Δ (10d)	69.9 \pm 6.8	59.6 \pm 6.3	64.8 \pm 6.6	28.8 \pm 5.9	696.2 \pm 30.9	26 \pm 1.1
aMyHC-MCM/Mstn^{fl/fl}/Igf-1^{fl/fl}								
-Tam	57 \pm 6.8	35.5 \pm 5.5	63.2 \pm 3.8	55.1 \pm 4.7	62.5 \pm 5.7	27 \pm 5.3	639 \pm 7.5	23.6 \pm 1.1
10d	36 \pm 11 $\Delta\Delta\Delta$ (0d)	24.3 \pm 4.1 $\Delta\Delta$ (0d), *	71 \pm 10.6	67 \pm 12.7	72 \pm 13.1	48 \pm 14 $\Delta\Delta\Delta$ (0d)	737 \pm 28.3	22.7 \pm 1.7 ***
6w	51 \pm 4.4	32.4 \pm 3.1	65 \pm 10.9	59 \pm 18.1	64.3 \pm 3.9	31.7 \pm 4.3	710 \pm 79.1	25.7 \pm 1.6

MRT-Auswertung von aMyHC-MCM (n \geq 7), aMyHC-MCM/Mstn^{fl/fl} (n \geq 7), aMyHC-MCM/Igf-1^{fl/fl} (n \geq 5) und aMyHC-MCM/Mstn^{fl/fl}/Igf-1^{fl/fl} (n \geq 4) Mäusen vor, 10 Tage und 6 Wochen nach Tamoxifengabe. Es wurden Männchen im Alter von 3 Monaten verwendet. Dargestellt sind Mittelwert \pm SEM. EF: Ejektionsfraktion; SV: Schlagvolumen; LV Masse ES: linksventrikuläre Masse in der Endsystole; LV Masse ED: linksventrikuläre Masse in der Enddiastole; EDV: enddiastolisches Volumen; ESV: endsystolisches Volumen; LV Wanddicke ED: linksventrikuläre Wanddicke in der Enddiastole. Signifikante Werte wurden rot markiert. *P<0.05, ***P<0.001, ****P<0.0001 in Bezug auf die zugehörige aMyHC-MCM Kontrolle. Δ P<0.05, $\Delta\Delta$ P<0.01, $\Delta\Delta\Delta$ P<0.001, $\Delta\Delta\Delta\Delta$ P<0.0001 in Bezug auf dieselbe Mauslinie zum angegebenen Zeitpunkt.

4.2.3 Deletion von *Igf-1* verhindert die Entstehung einer Hypertrophie nach akuter Deletion von Myostatin

IGF-1 und Myostatin sind gegensätzliche Regulatoren des Skelettmuskelwachstums. Dies warf die Frage auf, ob die Hypertrophie des Herzens nach akuter Deletion von Myostatin in Kardiomyozyten durch *Igf-1* vermittelt wird. Es wurde bereits gezeigt, dass es nach akuter Deletion von Myostatin zu einer Hochregulation verschiedener, in die IGF-1 Signaltransduktion involvierter, Gene kommt (s. Abb. 51). Die MRT-Analyse der aMyHC-MCM/*Mstn*^{fl/fl}/*Igf-1*^{fl/fl} Mäuse ergab, dass diese im Gegensatz zur akuten Deletion von Myostatin alleine, keine Hypertrophie entwickeln (s. Abb. 57J, K). Um dies näher zu untersuchen, wurden midventrikuläre Gefrierschnitte der verschiedenen Mausmodelle einer Lektin-Färbung (s. 3.2.4.5) unterzogen (s. Abb. 57A-H). Daraus wird ersichtlich, dass die akute Deletion von *Igf-1* zu einer Hypotrophie der einzelnen Kardiomyozyten führt (s. Abb. 57B, F, I). Desweiteren stellten wir fest, dass die Deletion von Myostatin und *Igf-1* keinen Einfluss auf die Größe der einzelnen Kardiomyozyten ausübt (s. Abb. 57D, H, I). Somit verhindert die Deletion von *Igf-1* die Entstehung einer Hypertrophie des Herzens nach akuter Myostatin Deletion. Dies spricht für eine gegenseitige Regulation der beiden Signaltransduktionswege.

Um die Wirkung von IGF-1 auf die Hypertrophie nach akuter Myostatin Deletion noch weiter zu validieren, untersuchten wir die Expression des hypertrophen Genprogramms. Dabei kommt es nach akuter Myostatin Deletion zu einer Hochregulation der *Anp* und *Bnp* Expression (s. Abb. 57L, M), während die akute Deletion von *Igf-1* zu einer Reduktion der *Anp* Expression führt (s. Abb. 57L). In Übereinstimmung mit den Ergebnissen des MRTs und der Lektinfärbung, verhindert die akute Deletion von *Igf-1* auch im induzierbaren Doppel-*knockout* (aMyHC-MCM/*Mstn*^{fl/fl}/*Igf-1*^{fl/fl}) die Reaktivierung des fetalen Genprogramms, die nach akuter Deletion von Myostatin alleine stattfindet (s. Abb. 57L-N).

4.2.4 Die Deletion von Myostatin und *Igf-1* von der Entwicklung an verursacht eine Herzinsuffizienz

Um die Langzeitwirkung einer Deletion von *Igf-1* alleine, sowie von Myostatin und *Igf-1* zu untersuchen, wurde die Herzfunktion von aMyHC-Cre, aMyHC-Cre/*Mstn*^{fl/fl}, aMyHC-Cre/*Igf-1*^{fl/fl} und aMyHC-Cre/*Mstn*^{fl/fl}/*Igf-1*^{fl/fl} im MRT analysiert. Es wurden wiederum Männchen im Alter von 4,5 Monaten verwendet. Die Deletion von Myostatin alleine führt, wie schon in 4.1.3 beschrieben, zu einer ventrikulären systolischen Dysfunktion. Dabei entwickeln aMyHC-Cre/*Mstn*^{fl/fl} Mäuse jedoch keine Hypertrophie des Herzens (s. 4.1.3, Abb. 41, Tab. 21).

Im Gegensatz dazu führt die Deletion von *Igf-1* von der Entwicklung an zu einer Hypotrophie des Herzens. Dies wird bereits am Vierkammerblick deutlich (s. Abb. 58). Die Hypotrophie wird desweiteren durch die verringerte linksventrikuläre Masse und das verringerte endsystolische und enddiastolische Volumen validiert (s. Tab. 21). Desweiteren bezieht sich die Hypotrophie auf den linken, wie auch auf den rechten Ventrikel (s. Tab. 21). Das verringerte Schlagvolumen ist ein weiterer Indikator für eine Hypotrophie. Da die Ejektionsfraktion nicht verändert und das

endsystolische Volumen sogar geringer ist, beeinflusst die Deletion von *Igf-1* in Kardiomyozyten von der Entwicklung an die Kontraktilität des Herzens nicht.

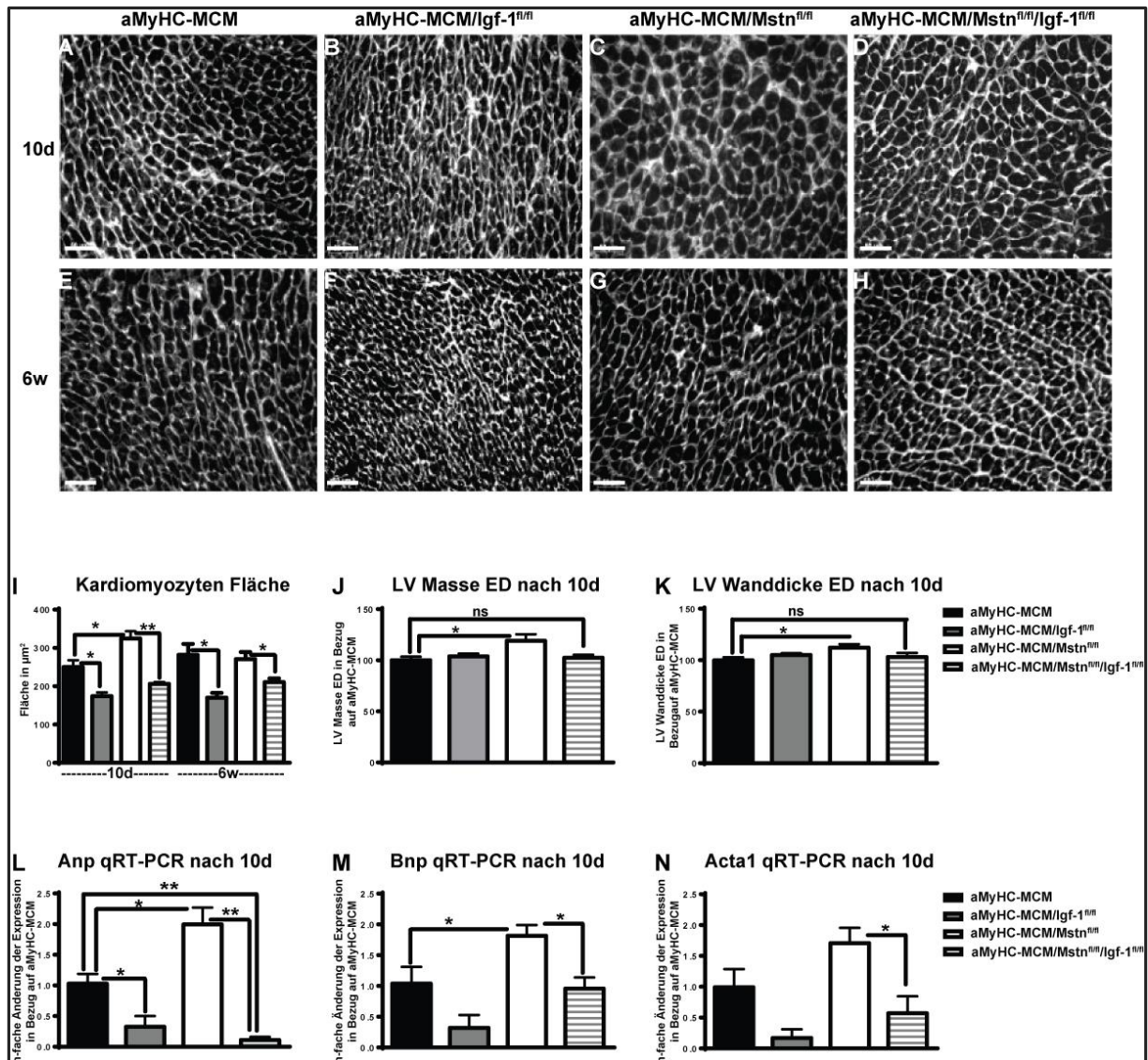


Abbildung 57: Deletion von *Igf-1* verhindert die Entwicklung einer Hypertrophie nach akuter Myostatin Deletion in Kardiomyozyten

(A-H) Repräsentative WGA-Färbung von aMyHC-MCM (A, E), aMyHC-MCM/*Igf-1*^{fl/fl} (B, F), aMyHC-MCM/*Mstn*^{fl/fl} (C, G) und aMyHC-MCM/*Mstn*^{fl/fl}/*Igf-1*^{fl/fl} (D, H) Herzventrikeln 10 Tage und 6 Wochen nach Tamoxifen-Gabe. Maßstab: 50µm. (I) Auswertung der Kardiomyozyten Fläche. Es wurden 4 verschiedene Bereiche des Herzens ausgewertet und der Mittelwert gebildet (n=3). (J-K) MRT-Auswertung der linksventrikulären Masse in der Enddiastole (LV Masse ED, J) und der linksventrikulären Wanddicke in der Enddiastole (LV Wanddicke ED, K) 10 Tage nach Tamoxifenadministration in aMyHC-MCM (n≥7), aMyHC-MCM/*Mstn*^{fl/fl} (n≥7), aMyHC-MCM/*Igf-1*^{fl/fl} (n≥5) und aMyHC-MCM/*Mstn*^{fl/fl}/*Igf-1*^{fl/fl} (n≥4) Mäusen. (L-N) quantitative RT-PCR zur Analyse der Expression von *Anp* (L), *Bnp* (M) und *Acta1* (N) in Herzventrikeln von aMyHC-MCM, aMyHC-MCM/*Mstn*^{fl/fl}, aMyHC-MCM/*Igf-1*^{fl/fl} und aMyHC-MCM/*Mstn*^{fl/fl}/*Igf-1*^{fl/fl} Mäusen (n≥3). *Arp* wurde zur Normierung verwendet. Dargestellt sind Mittelwert ±SEM. *P<0.05, **P<0.01, ns: nicht signifikant.

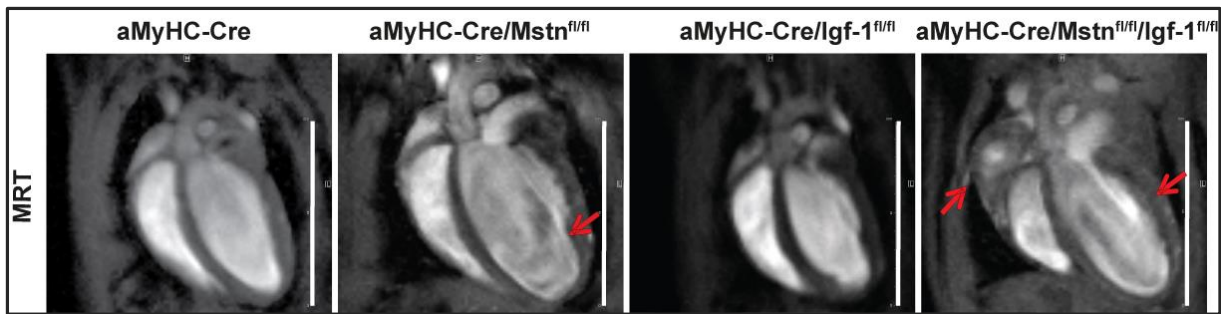


Abbildung 58: Deletion von Myostatin und *Igf-1* von der Entwicklung an verursacht Herzinsuffizienz

Repräsentative MRT Vierkammerblicke von aMyHC-Cre, aMyHC-Cre/*Mstn*^{fl/fl}, aMyHC-Cre/*Igf-1*^{fl/fl} und aMyHC-Cre/*Mstn*^{fl/fl}/*Igf-1*^{fl/fl} Mäusen. Es wurden Männchen im Alter von 4,5 Monaten verwendet. Maßstab: 10mm.

Ähnlich wie nach akuter Deletion von Myostatin und *Igf-1* führt auch die Deletion der beiden Wachstumsfaktoren von der Entwicklung an zu einer Herzinsuffizienz (s. Abb. 58, Tab. 21). Anhand des Vierkammerblicks wird deutlich, dass sowohl der linke Ventrikel, als auch das rechte Atrium stark dilatiert sind (s. Abb. 58). Die Herzinsuffizienz wird durch eine verringerte Ejektionsfraktion und ein reduziertes Schlagvolumen bestätigt (s. Tab. 21). Interessanterweise scheint *Igf-1*, sowohl nach akuter (s. 4.2.3), wie auch nach langfristiger Deletion in Kardiomyozyten, einen größeren Einfluss auf das Kardiomyozytenwachstum im Vergleich zu Myostatin zu besitzen. So verringert das Ausschalten von *Igf-1* auch im Doppelknockout (aMyHC-Cre/*Mstn*^{fl/fl}/*Igf-1*^{fl/fl}) die linksventrikuläre Masse (s. Tab. 21).

4.2.5 Die kanonische IGF-1 Signaltransduktion ist nicht für die Inhibierung der Hypertrophie im induzierbaren Doppelknockout verantwortlich

Wir konnten zeigen (s. 4.2.3), dass die Deletion von *Igf-1* die Entwicklung einer Hypertrophie nach akuter Deletion von Myostatin verhindert. Um den Signaltransduktionsmechanismus, der für diese antihypertrophe Wirkung verantwortlich ist, zu identifizieren wurde die Aktivierung von kanonischen *Igf-1* Zielmolekülen untersucht (s. Abb. 59). Dabei stellten wir fest, dass die akute Deletion von *Igf-1* in Kardiomyozyten zu einer Hemmung der IGF-1 Signaltransduktion führt, wie anhand der Phosphorylierung der Zielmoleküle IRS-1 (Insulinrezeptor-Substrat-1), AKT, mTOR und dem ribosomalen Protein S6 deutlich wird (s. Abb. 59).

Bei AKT handelt es sich um einen der Hauptvermittler von physiologischer Hypertrophie^{314,368-371}, die zumindest teilweise durch mTOR vermittelt wird³⁷². Darauf beruhte unsere Annahme, dass durch Inhibition des IGF-1-AKT-mTOR Signalweges die Entwicklung einer Hypertrophie nach akuter Myostatin Deletion verhindert wird. Überraschenderweise ist dieser kanonische IGF-1 Signaltransduktionsweg in aMyHC-MCM/*Mstn*^{fl/fl}/*Igf-1*^{fl/fl} Mäusen 10 Tage nach Tamoxifenadministration jedoch nicht verändert (s. Abb. 59A, C, D). Desweiteren wird die Hemmung von AKT nach akuter *Igf-1* Deletion im Doppel-*knockout* sogar leicht überkompensiert (s. Abb. 59B). Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass die Wirkung von IGF-1 auf die Hypertrophie nach akuter Myostatin Deletion nicht über AKT und mTOR vermittelt wird. Desweiteren legen sie nahe, dass ein

Crosstalk zwischen diesen beiden Hauptregulatoren des Muskelwachstums besteht. Ob dieser auf gemeinsamen, noch zu identifizierenden, Zielmolekülen, oder auf transkriptioneller Ebene stattfindet, muss noch untersucht werden. Dabei deutet die erhöhte Expression des IGF-1 Rezeptors sowie der *Pi3k* (s. Abb. 51) zusammen mit den obigen Ergebnissen eher auf einen transkriptionellen Effekt hin.

Tabelle 21: Herzinsuffizienz nach Deletion von Myostatin und *Igf-1* von der Entwicklung an

	aMyHC-Cre	aMyHC-Cre/ Mstn ^{fl/fl}	aMyHC-Cre/ IGF-1 ^{fl/fl}	aMyHC-Cre/ Mstn ^{fl/fl} /IGF-1 ^{fl/fl}	
linker Ventrikel	EF in %	49.4±1.5	33.5±6.8 *	50.9±2.5	33.2±8.2 *
	SV in µl	41.9±2.2	26.9±4.9 **	31.2±3.2 *	25.4±5.7 **
	LV Masse ES in mg	86.2±2.1	82.9±6.5	59.5±4.7 **	63.9±6.5 *
	LV Masse ED in mg	76.8±2.6	82.5±6.7	62.8±5.3 ***	66.8±7.1 **
	EDV in µl	84.7±3.4	95±12.6	61±4.1 **	75.2±9.5
	ESV in µl	42.8±2	72.8±16.8 *	29.8±2.1 **	49.8±12.9
	LV Wanddicke ED in µm	705.7±20	691.3±31.8	657.4±20.1	632±32.9
rechter Ventrikel	EF in %	43.3±2.3	32.1±4.7 *	38.7±4	29.3±7.9
	SV in µl	31.3±1.7	23.1±3.4 *	23±2.8 *	17.4±5.2 **
	EDV in µl	72.9±3.4	75.5±6	59.4±3.5 *	58.4±3 *
	ESV in µl	41.6±2.9	52.4±7.1	36.4±3	41±4.6

MRT-Auswertung von aMyHC-Cre (n=10), aMyHC-Cre/Mstn^{fl/fl} (n=9), aMyHC-Cre/Igf-1^{fl/fl} (n=5) und aMyHC-Cre/Mstn^{fl/fl}/Igf-1^{fl/fl} (n=6) Mäusen. Es wurden Männchen im Alter von 4,5 Monaten verwendet. Dargestellt sind Mittelwert ±SEM. EF: Ejektionsfraktion; SV: Schlagvolumen; LV Masse ES: linksventrikuläre Masse in der Endsystole; LV Masse ED: linksventrikuläre Masse in der Enddiastole; EDV: enddiastolisches Volumen; ESV: endsystolisches Volumen; LV Wanddicke ED: linksventrikuläre Wanddicke in der Enddiastole. Signifikante Werte wurden rot markiert. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 in Bezug auf die aMyHC-Cre Kontrolle.

4.2.6 AMPK Aktivierung als potentielle Ursache der Akt Phosphorylierung in aMyHC-MCM/Mstn^{fl/fl}/Igf-1^{fl/fl} Herzen

In der Literatur wurde beschrieben, dass AMPK AKT an Position 473 phosphorylieren und damit aktivieren kann³⁷³. Da eine akute Deletion von Myostatin zur Aktivierung der AMPK führt (s. 4.1.5), wäre dies eine mögliche Erklärung für die höhere Akt Aktivität in aMyHC-MCM/Mstn^{fl/fl}/Igf-1^{fl/fl} Mäusen (s. Abb. 59B). Deshalb untersuchten wir die Aktivität des AMPK-Signalweges nach akuter

Deletion von Myostatin, *Igf-1* und beiden Wachstumsfaktoren. Dabei stellten wir – anhand einer gesteigerten Phosphorylierung von AMPK und ihren direkten Zielmolekülen Acetyl-CoA-Carboxylase (ACC) und Glykogen Synthase (GS) - fest, dass der AMPK Signaltransduktionsweg auch nach akuter Deletion beider Wachstumsfaktoren aktiviert ist (s. Abb. 60). Hierbei könnte es sich um die Ursache der Aktivierung von Akt in aMyHC-MCM/*Mstn^{fl/fl}/Igf-1^{fl/fl}* Herzen handeln. Desweiteren ist die, wenn auch nicht signifikante, Tendenz einer Aktivierung des AMPK Signalweges auch nach akuter Deletion von *Igf-1* in Kardiomyozyten zu erkennen (s. Abb. 60). Dies würde die, im Vergleich zur akuten Deletion von Myostatin alleine, noch weiter gesteigerte Phosphorylierung der Acetyl-CoA-Carboxylase in aMyHC-MCM/*Mstn^{fl/fl}/Igf-1^{fl/fl}* Herzen erklären (s. Abb. 60C). Hieraus wird auch deutlich, dass IGF-1 unabhängig von AMPK die Entwicklung einer Hypertrophie nach akuter Deletion von Myostatin verhindert.

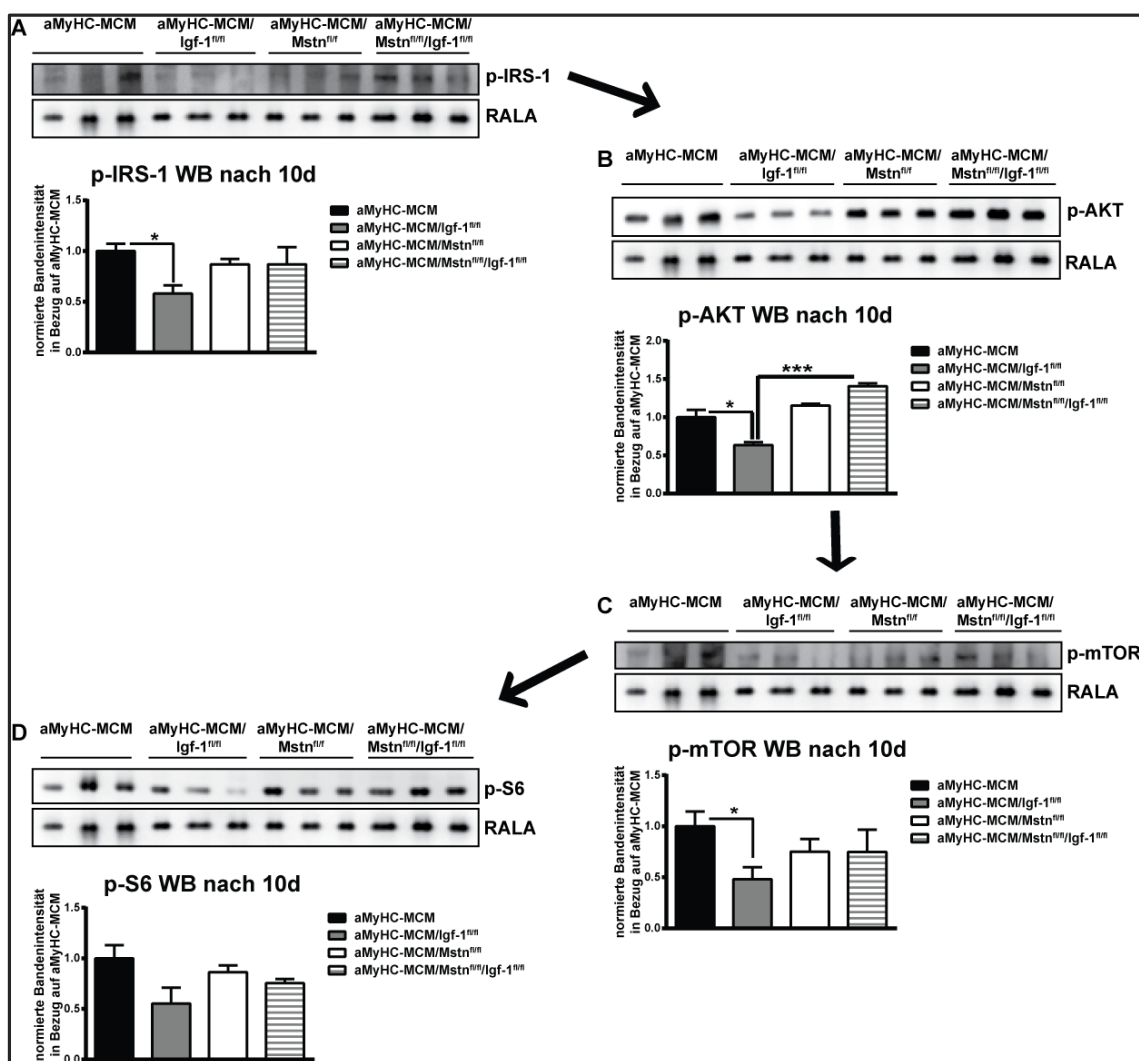


Abbildung 59: Die kanonische IGF-1 Signaltransduktion ist nicht für die Hemmung der Hypertrophie nach akuter Myostatin Deletion verantwortlich

Western Blot und Quantifizierung der Expression von p-IRS-1 (Ser302, A), p-AKT (Ser473, B), p-mTOR (Ser2448, C) und p-S6 (Ser235/236, D) in aMyHC-MCM, aMyHC-MCM/*Igf-1^{fl/fl}*, aMyHC-MCM/*Mstn^{fl/fl}* und aMyHC-MCM/*Mstn^{fl/fl}/Igf-1^{fl/fl}* Herzlysaten (n=3) 10 Tage nach Tamoxifengabe. RALA wurde zur Normierung verwendet. Dargestellt sind Mittelwert \pm SEM. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

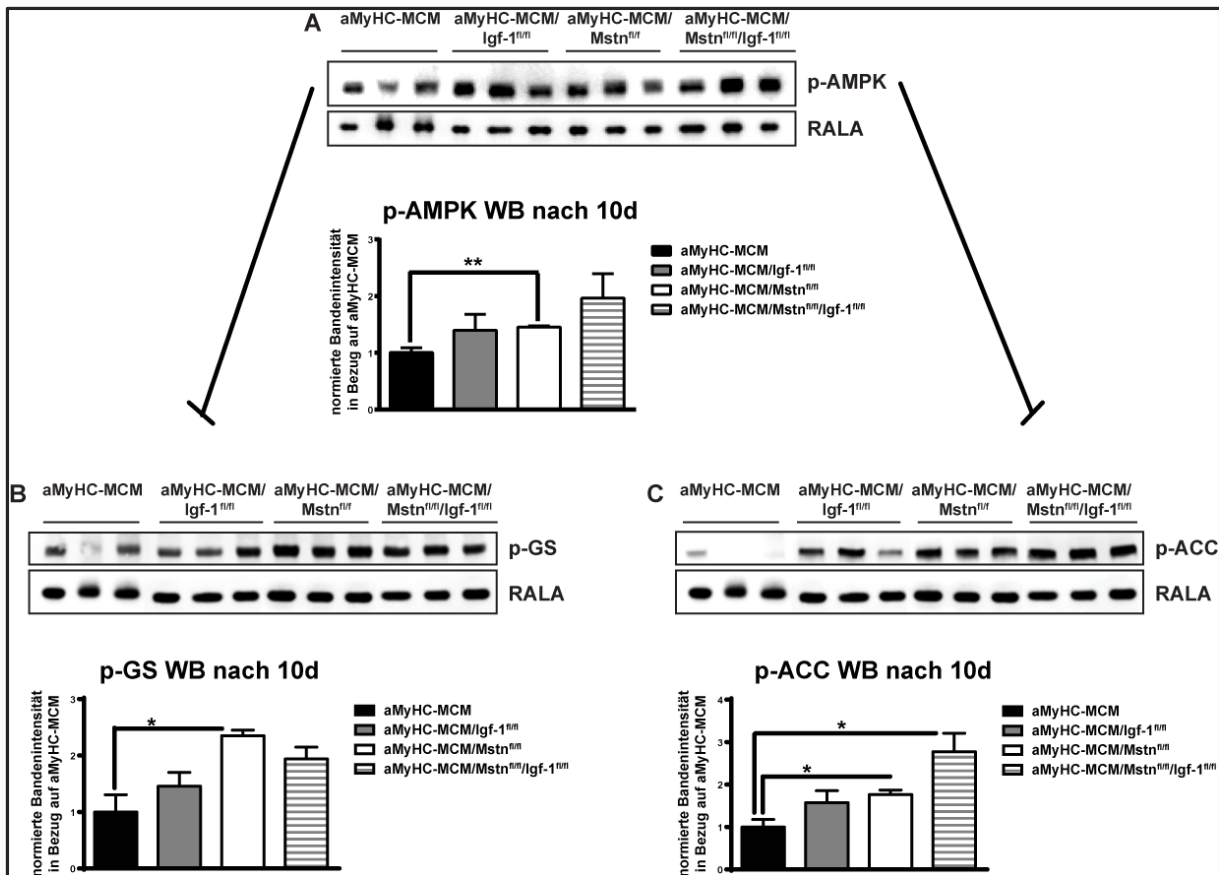


Abbildung 60: AMPK Signaltransduktionskaskade ist auch nach akuter Deletion von Myostatin und *Igf-1* aktiviert

Western Blot und Quantifizierung der Expression von p-AMPK- α (Thr172, A), p-Glykogen Synthase (p-GS, Ser641, B) und p-Acetyl-CoA-Carboxylase (p-ACC, Ser79, C) in aMyHC-MCM, aMyHC-MCM/*Igf-1*^{fl/fl}, aMyHC-MCM/*Mstn*^{fl/fl} und aMyHC-MCM/*Mstn*^{fl/fl}/*Igf-1*^{fl/fl} Herzlysaten (n=3) 10 Tage nach Tamoxifengabe. RALA wurde zur Normierung verwendet. Dargestellt sind Mittelwert \pm SEM. *P<0.05.

4.2.7 Induzierbare Doppel-knockouts entwickeln eine schwere Ersatzfibrose

Es wurde bereits gezeigt, dass die Überkompensation von Myostatin durch Nicht-Kardiomyozyten zur Entstehung einer interstitiellen Fibrose führt (s. 4.1.8.1). Im Gegensatz zu Myostatin wurde *Mgf* eine antifibrotische Wirkung nach Induktion eines Infarkts zugewiesen³⁷⁴. Dies warf die Frage auf, ob sich die interstitielle Fibrose, die durch die Überkompensation von Myostatin zustande kam (s. 4.1.8.1) durch Deletion von *Igf-1* verschlimmern würde.

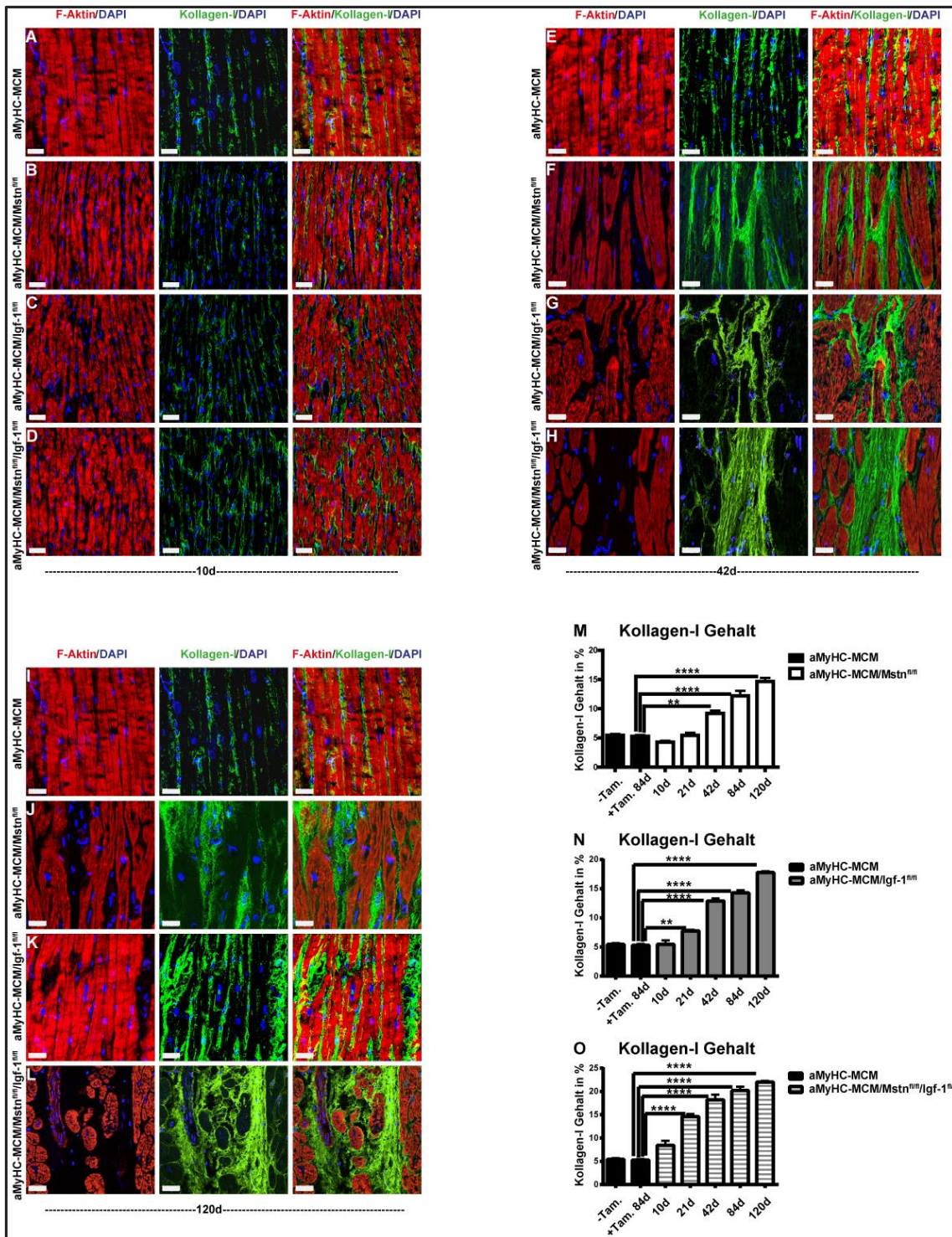


Abbildung 61: Entstehung einer Ersatzfibrose in aMyHC-MCM/Mstn^{fl/fl}/Igf-1^{fl/fl} Herzen

(A-L) Repräsentative Immunfluoreszenzfärbung von Kollagen-I in aMyHC-MCM (84 Tage nach Tamoxifengabe), aMyHC-MCM/Mstn^{fl/fl}, aMyHC-MCM/Igf-1^{fl/fl} und aMyHC-MCM/Mstn^{fl/fl}/Igf-1^{fl/fl} Herzentrikeln 10 (B-D), 42 (F-H) und 120 (J-L) Tage nach Tamoxifengabe. Maßstab: 30µm. (M-O) Auswertung des Kollagen-I Gehalts im midventrikulären Bereich von aMyHC-MCM, aMyHC-MCM/Mstn^{fl/fl} (M), aMyHC-MCM/Igf-1^{fl/fl} (N) und aMyHC-MCM/Mstn^{fl/fl}/Igf-1^{fl/fl} (O) Mäusen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Tamoxifengabe. Der Kollagen-I Gehalt wurde in 5 verschiedenen Bereichen pro Herz ausgewertet (n=3). Dargestellt sind Mittelwert ±SEM. **P<0.01, ****P<0.0001.

Dazu analysierten wir midventrikuläre Herzschnitte von aMyHC-MCM, aMyHC-MCM/*Mstn*^{fl/fl}, aMyHC-MCM/*Igf-1*^{fl/fl} und aMyHC-MCM/*Mstn*^{fl/fl}/*Igf-1*^{fl/fl} Mäusen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Tamoxifengabe mit Hilfe einer Kollagen-I Immunfärbung (s. 3.2.4.6). Dabei war in keinem Mausmodell ein Einfluss auf die Entstehung einer Fibrose des Herzens 10 Tage nach Tamoxifenadministration zu erkennen (s. Abb. 61A-D, M-O). 6 Wochen nach Tamoxifengabe entwickelten aMyHC-MCM/*Igf-1*^{fl/fl} Mäuse jedoch eine – im Vergleich zu aMyHC-MCM/*Mstn*^{fl/fl} Mäusen – schwerere interstitielle Fibrose (s. Abb. 61F, G, J, K, M, N). Dieser Effekt wird in aMyHC-MCM/*Mstn*^{fl/fl}/*Igf-1*^{fl/fl} Mäusen noch verschlimmert (s. Abb. 61H, O) und führt nach 120 Tagen zu einer Ersatzfibrose (s. Abb. 61L). Tamoxifen selbst beeinflusst die Entstehung einer Fibrose nicht (s. Abb. 61A, E, I, M-O).

5. Diskussion

5.1 Die gewebesautonome Funktion von Myostatin im adulten Herzen

Ich konnte im Rahmen dieser Dissertation zeigen, dass Myostatin eine wichtige Funktion in der Erhaltung der Morphologie und Funktion des adulten Herzens besitzt und in die Entwicklung einer Herzinsuffizienz involviert ist. Desweiteren konnte ich neue biologische Funktionen von Myostatin in der Regulierung des Herzwachstums und der Kontrolle des Kardiomyozyten-Metabolismus aufzeigen. Dabei wurden mehrere intrazelluläre Signalwege, die für Teile des Herzphänotyps verantwortlich sind, identifiziert.

5.1.1 AMPK als Vermittler der Hypertrophie nach Myostatin Deletion

Im Rahmen dieser Dissertation sollte unter anderem die Frage beantwortet werden, ob Myostatin im Herzen eine analoge Funktion als negativer Regulator des Muskelwachstums zur Skelettmuskulatur besitzt⁵⁴. Eine der Ursachen, die zu den unterschiedlichen publizierten Ergebnissen in Bezug auf eine Hypertrophie des Herzens führte, ist, dass die Mehrzahl der Studien an konstitutiven Myostatin *knockouts* durchgeführt wurde. Dies erschwert die genaue Bestimmung der normierten Herzmasse, da sie durch die Hypermuskularität ein stark erhöhtes Körpergewicht besitzen. Dieses Problem konnten wir durch die Verwendung Kardiomyozyten-spezifischer Mausmodelle umgehen. Dabei beobachteten wir keine Auswirkungen auf das Körpergewicht nach Überexpression oder Deletion von Myostatin (s. 4.1.2 und 4.1.3). Dies ermöglicht uns die direkte Vergleichbarkeit der transgenen Mäuse und ihrer zugehörigen Kontrollen. Ich konnte zeigen, dass die akute Deletion von Myostatin eine Hypertrophie des Herzens induziert, während sowohl die Deletion als auch die Überexpression von der Entwicklung an keine Auswirkung auf die ventrikuläre Masse haben (s. 4.1.2 und 4.1.3). Diese Daten stimmen mit denen von Heineke et al.¹⁷⁰ überein, der keine Veränderung der Herzmasse nach herzspezifischer Deletion mit Hilfe einer Nkx2.5-Cre beobachtete. Somit scheint nur die akute Deletion von Myostatin eine Hypertrophie des Herzens zu induzieren. Da Myostatin eine hohe Homologie zu anderen Familienmitgliedern, insbesondere GDF-11^{54,375}, aufweist, könnte eine Kompensation der Deletion von Myostatin während der Entwicklung durch Familienmitglieder die Entstehung einer Hypertrophie verhindern. Eine ähnliche Kompensation kann vermutlich in der Skelettmuskulatur aufgrund der deutlich höheren Myostatin Expression nicht stattfinden.

Eine der stärksten molekularen Veränderungen in Herzen von aMyHC-MCM/*Mstn*^{fl/fl} Mäusen war die Aktivierung der AMP-aktivierten Kinase (AMPK). AMPK ist ein Schlüsselenzym im Metabolismus des Herzens und die Aktivierung nach akuter Deletion von Myostatin könnte die Ursache der Veränderung des metabolischen Programms sein. Eine Aktivierung der AMPK sowie eine gesteigerte Glykolyse tritt nach verschiedenen pathologischen Zuständen im Herzen, wie Ischämie, Hypertrophie oder linksventrikulärer druckinduzierter Hypertrophy, auf^{36,37,345,376}. Meine Ergebnisse zeigten, dass sowohl die Überexpression von Myostatin *in vivo* als auch die Stimulierung von Kardiomyozyten mit rekombinantem Myostatin *in vitro* innerhalb kürzester Zeit die AMPK Aktivität hemmten (*in vitro*

innerhalb von 10 Minuten, s. 4.1.5). Dies legt nahe, dass AMPK ein direktes Zielmolekül von Myostatin und die Aktivierung nach akuter Deletion von Myostatin kein Sekundäreffekt aufgrund der Herzinsuffizienz ist. Interessanterweise konnte ich beweisen, dass die AMPK Aktivierung über TAK1 vermittelt wurde und nicht über den bekannten SMAD Signalweg, der laut Literatur für die Mehrzahl der intrazellulären Effekte von Myostatin verantwortlich ist ^{100,377}. Dass dies über TAK1 vermittelt wird, überraschte uns jedoch, da TAK1 als AMPK Kinase beschrieben wurde ³⁷⁸. Die einzige Studie, die dies im Herzen zeigte, hemmte die TAK1 Aktivität durch Überexpression einer dominant negativen Form und verhinderte dadurch die AMPK Phosphorylierung in neonatalen Kardiomyozyten ³⁷⁹. Eine Überexpression der aktiven Form von TAK1 war in dieser Studie jedoch nicht in der Lage, AMPK zu aktivieren. Deshalb vermuten wir, dass TAK1 eine unterschiedliche Wirkung in neonatalen und adulten Kardiomyozyten besitzt.

Leider existieren keine Mausmodelle mit einer erhöhten AMPK Aktivität im Herzen und die Frage, ob AMPK zur Entwicklung oder Inhibierung des hypertrophen Wachstums beiträgt, wird kontrovers diskutiert. Transgene Mäuse mit einer reduzierten AMPK Aktivität im Herzen zeigen jedenfalls keinen Herzphänotyp und zumindest in einem Mausmodell ein kleineres Herz ^{348,380,381}. Dies stimmt mit meinen Ergebnissen überein, da die Inhibierung von AMPK *in vivo* mit Hilfe von Compound C die Entstehung der Hypertrophy und Aktivierung des hypertrophen Genprogramms nach akuter Deletion von Myostatin verhinderte (s. 4.1.6). Daraus schlossen wir, dass Myostatin seine antihypertrophe Wirkung über TAK1 und AMPK vermittelt. Die inhibitorische Wirkung von Myostatin auf die AMPK scheint nicht nur auf Kardiomyozyten begrenzt zu sein. Vor kurzem wurde publiziert, dass die konstitutive Deletion von Myostatin AMPK in der Skelettmuskulatur und in weißem Fettgewebe stimuliert und dadurch die Insulinsensitivität verbessert ³⁵². Da die Gabe des AMPK-Inhibitors Compound C selbst in den Kontrolltieren zu einer verschlechterten Herzkontraktilität führte, schließen wir die Aktivierung der AMPK als Ursache der Herzinsuffizienz aus. Dies entspricht auch der allgemeinen Ansicht, dass AMPK einen positiven Einfluss auf die Herzfunktion besitzt.

5.1.2 Herabregulation von *Rgs2* als Ursache der Herzinsuffizienz

Adulte Herzen, in denen Myostatin akut deletiert wurde, zeigten eine Aktivierung der G_q und β -adrenergen Signaltransduktion (s. 4.1.7.1), während die Überexpression von Myostatin diese Signalwege inhibierte. Dies konnte jedoch *in vitro* nach Stimulierung mit rekombinantem Myostatin nicht beobachtet werden (s. 4.1.7.2). Daraus schließen wir, dass Myostatin die Phosphorylierung der β -adrenergen Zielmoleküle nicht direkt beeinflusst. Da die Gabe von Atenolol, einem β 1-Adrenorezeptorblocker, die Entwicklung der Herzinsuffizienz nach akuter Deletion von Myostatin *in vivo* nicht verhinderte (s. 4.1.7.2), schließen wir die Aktivierung der β -adrenerge Signaltransduktion als Ursache der Herzinsuffizienz aus. Dies legt nahe, dass die Entstehung der Herzinsuffizienz zumindest teilweise über den G_q Signalweg vermittelt wird. Die Auswertung der MicroArray Daten ergaben eine Herunterregulation des *Regulator of G protein signaling 2 (Rgs2)*, eines bekannten Inhibitors des G_q Signalweges ³⁵⁹, der auch die β -adrenerge Signaltransduktion inhibieren kann ³⁶⁰. Dies legt nahe, dass Myostatin die Expression von *Rgs2* aktiviert und dadurch die G_q und β -adrenerge Signaltransduktion hemmt. Das Vorhandensein einer FAST1 (ein SMAD interagierendes Protein) Bindestelle im *Rgs2* Promoter untermauert unsere Hypothese, dass Myostatin über SMADs die *Rgs2* Expression stimuliert. Dies könnte mit Hilfe einer Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) validiert

werden. Desweiteren könnte man *in vivo* durch Inhibierung der G_q Signaltransduktion versuchen, die Entstehung der Herzinsuffizienz zu verhindern und dadurch unsere Hypothese bestätigen. Diese beinhaltet, dass die akute Deletion von Myostatin zur Herunterregulation von *Rgs2* und demzufolge zur Aktivierung der G_q und β -adrenergen Signaltransduktion führt. Dadurch werden PKC und CAMKII verstärkt phosphoryliert und die MEF2A Expression steigt an. Sämtliche dieser Signalmoleküle spielen eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie der Herzinsuffizienz und Hypertrophie^{353-356,382}. So sind transgene Mäuse, die PKC- α überexprimieren, hypokontraktile³⁵⁵, und eine Überexpression der CAMKII δ_c führt zu vorzeitigem Tod, Kardiomyopathie und ebenfalls einer deutlich reduzierten Kontraktilität³⁵⁴. All diese Signalmoleküle führen zu einer Aktivierung von MEF2A, einem hypertrophen Transkriptionsfaktor, dessen Überexpression zu dilativer Kardiomyopathie und mechanischer Dysfunktion führt³⁵⁸. Dies und die Tatsache, dass *Rgs2 knockout* Mäuse auch Hypertrophie und Herzinsuffizienz nach induzierter Druckbelastung des Herzens entwickeln,³⁸³ stützt unsere Hypothese, dass Myostatin über *Rgs2* und die G_q Signaltransduktion die Entwicklung der Herzinsuffizienz blockiert. Ein letzter Beweis hierfür steht jedoch noch aus.

5.1.3 Einordnung des Herzinsuffizienz-Phänotyps in die Literatur

Zu Beginn der Analyse der aMyHC-MCM/*Mstn*^{fl/fl} Mäuse waren wir überrascht, dass die akute Deletion von Myostatin in adulten Kardiomyozyten zu einem so starken Herzphänotyp führte. Diese Mäuse zeigten eine um mehr als 50% reduzierte Ejektionsfraktion, Hypertrophie und eine gesteigerte Lethalität (s. 4.1.2), während die Deletion von Myostatin in Kardiomyozyten von der Entwicklung einen leichteren Herzphänotyp verursachte (s. 4.1.3). Erstaunlicherweise führt die konstitutive Deletion von Myostatin in der Literatur zu unterschiedlichen Ergebnissen und zeigt nur leichte Auswirkungen auf die Herzfunktion¹⁶⁵⁻¹⁶⁸. So zeigte die Gruppe um Rodgers, dass 7 und 13 Monate alte konstitutive Myostatin *knockouts* eine verringerte Ejektionsfraktion, Hypertrophie und dilatative Kardiomyopathie zeigen^{167,168}. Im Gegensatz dazu haben weder Morissette et al.¹⁶⁵ noch Cohn et al.¹⁶⁶ eine Auswirkung auf die Herzfunktion oder Hypertrophie in 7 Wochen und 2 Jahre alten konstitutiven Myostatin *knockouts* beobachtet. Artaza et al.¹⁶⁹ beobachtete zwar in 7 Wochen alten konstitutiven *knockouts* eine Hypertrophie des Herzens, jedoch ohne Verschlechterung der Herzfunktion. Diese Daten zeigen, dass die Auswirkungen der konstitutiven Myostatin Deletion altersabhängig sind und der Phänotyp im Vergleich zu unseren konditionalen und induzierbar konditionalen Modellen schwächer ausgeprägt ist. Vermutlich entstehen die unterschiedlichen Phänotypen nach konstitutiver, konditionaler und adulter konditionaler Myostatin Mutationen durch unterschiedliche Kompensationsmechanismen. Ich konnte zeigen, dass die akute Deletion von Myostatin in Kardiomyozyten durch eine starke Expression von Nicht-Kardiomyozyten kompensiert wurde, wodurch sich – in den Mäusen, die nicht aufgrund der schweren Herzinsuffizienz starben – wahrscheinlich der Herzinsuffizienz-Phänotyp zurückbildete (s. 4.1.2 und 4.1.8). Im Gegensatz dazu führte die Deletion von Myostatin in Kardiomyozyten von der Entwicklung an zu keiner Hochregulation in Nicht-Kardiomyozyten und verhinderte deshalb eine vollständige Kompensation (s. 4.1.3). Konstitutive *knockouts*, die Myostatin nicht in anderen Zelltypen aktivieren können, müssen andere Anpassungsmechanismen entwickeln um die schwerwiegenden Effekte eines Verlusts von Myostatin auszugleichen. Vermutlich wird der Verlust von Myostatin in konstitutiven *knockouts* durch andere, zu Myostatin hoch homologe Mitglieder der GDF Familie (insbesondere GDF-11),

kompensiert^{54,375}. Die stärkere Hypermuskularität von Mäusen, die mit einem ActRIIB (einem Typ 1 Rezeptor, an den unter anderem Myostatin bindet) Inhibitor behandelt werden, spricht im Vergleich zu konstitutiven Myostatin *knockouts* zumindest für eine limitierte kompensatorische Funktion anderer ActRIIB Liganden³⁸⁴.

Frühere Versuche die Funktion von Myostatin im Herzen durch genetische Deletion zu untersuchen, wurden durch folgende Punkte limitiert: (1) Konstitutive Myostatin *knockouts* entwickeln eine starke Hypermuskularität, die sich auf das kardiovaskuläre System auswirkt, (2) kompensatorische Mechanismen, die nach dem direkten Verlust von Myostatin ablaufen, werden von langsameren adaptiven und sekundären Mechanismen überlagert, wenn Myostatin während der Entwicklung ausgeschaltet wird. Dabei scheinen die negativen Auswirkungen einer Myostatin Deletion invers mit dem Zeitpunkt der Deletion zusammenzuhängen. Dies wird beispielsweise durch einen fehlenden Herzphänotyp in konditionalen *Nkx2.5-Cre/Mstn^{fl/fl}* Mäusen deutlich¹⁷⁰. Außerdem ist die Myostatin Expression negativ mit den Kardiomyozyten Proliferationsindex korreliert¹⁵⁴. Da *Nkx2.5* der früheste Marker in der Herzentwicklung ist und vor der Entwicklung reifer Kardiomyozyten exprimiert wird, könnte dies die Ursache des nicht beobachteten Phänotyps sein. Die von uns verwendete *aMyHC-Cre* wird zwischen E7.5 und E8, also später als *Nkx2.5*, exprimiert^{338,339}. Ein weiteres Argument ist, dass Heineke et al. herzspezifische Myostatin *knockouts* im Alter von 8-10 Wochen untersuchten. In diesem Alter beobachteten wir ebenfalls keine Veränderung in der Überlebenskurve. (3) Die starken Kompensationsmechanismen, die nach einem Verlust von Myostatin auftreten, zeigen die Notwendigkeit der kontinuierlichen Analyse der Mausmodelle vor und nach Myostatin Deletion, die nur durch ein induzierbares Modell möglich ist.

Obwohl in der Mehrzahl der Fälle kein oder nur ein leichter Herzphänotyp in konstitutiven Myostatin *knockouts* beobachtet wurde, führte die Verpaarung eines konstitutiven Myostatin *knockouts* mit dem *dyw/dyw* Mausmodell einer Laminin-defizienten kongenitalen Muskeldystrophie zu einer erhöhten postnatalen Lethalität¹⁴⁷. Desweiteren wurde eine erhöhte Mortalität in Kälbern mit zwei Kopien des inaktiven Myostatin Allels beschrieben³⁸⁵. Dies untermauert unsere Daten und zeigt, dass die Inhibierung von Myostatin schwerwiegende Auswirkungen auf die Herzfunktion hat. Dies sollte bei den klinischen Studien zur Inhibierung von Myostatin zur Behandlung von Muskeldystrophien sorgfältig überprüft werden, insbesondere da Patienten, die unter Muskeldystrophie leiden, häufiger an Herzinsuffizienz erkranken.

5.1.4 Ist Myostatin ein Überlebensfaktor des Herzens?

Ich konnte zeigen, dass die Myostatin Konzentration in adulten Kardiomyozyten so bedeutend ist, dass eine akute Deletion zu einer erhöhten Lethalität führt (s. 4.1.2). Die Notwendigkeit einer regulierten Myostatin Konzentration im Herzen wird auch durch die starke Hochregulation durch Nicht-Kardiomyozyten nach akuter Deletion in Kardiomyozyten untermauert (s. 4.1.8). Wir vermuten, dass diese Überkompensation die Ursache der Umkehr des Herzinsuffizienz-Phänotyps ist. Dabei legt die Tatsache, dass der Myostatin Promoter eine MEF2 Bindestelle besitzt⁹³ und MEF2A nach akuter Deletion von Myostatin hochreguliert ist, nahe, dass die Myostatin Expression durch einen negativen Feedback-Mechanismus reguliert wird. Die Überkompensation wird auch durch einen der konditionalen Überexpression analogen Signaltransduktionsmechanismus verifiziert, der sich vollständig von den Ergebnissen nach akuter Deletion von Myostatin unterscheidet. Falls diese

Überkompensation nicht möglich ist oder nicht früh genug passiert, überleben die Mäuse die akute Deletion von Myostatin nicht. Dabei könnte die Identifikation der Zielmoleküle von Myostatin, die für die Umkehr des Herzinsuffizienz-Phänotyps verantwortlich sind, auch für therapeutische Zwecke interessant sein.

Das Fehlen eines funktionierenden Antikörpers erschwert die Identifikation des genauen Zelltyps, der für die Hochregulation verantwortlich ist. Aufgrund der Zugehörigkeit zur TGF- β Familie wären Fibroblasten oder Makrophagen naheliegende Quellen ³⁹. Die Expression von Myostatin wurde zumindest in frisch isolierten Herzfibroblasten nachgewiesen (unpublizierte Ergebnisse von Dr. Milena Furtado). Weitere Versuche sind notwendig, um zu beweisen, dass die Überkompensation durch Fibroblasten verursacht wird.

Desweiteren konnten ich zeigen, dass die akute Überexpression von Myostatin in adulten Kardiomyozyten zu einer leicht verbesserten Kontraktilität führte (s. 4.1.2). Somit scheint die Hochregulation von Myostatin, wie sie unter pathologischen Zuständen im Herzen ^{70,156-159,163,164} beobachtet wurde, positive Auswirkungen auf die Herzfunktion und das *Remodeling* zu besitzen. Um dies weiter zu validieren, könnte untersucht werden, ob die akute Überexpression von Myostatin die Kontraktilität und Morphologie nach einem induzierten Herzinfarktes verbessert. Interessanterweise wäre Myostatin nicht das einzige Mitglied der GDF Familie, dem eine schützende Funktion im Herzen zugewiesen wird. So wurde gezeigt, dass GDF15 eine protektive und antihypertrophe Funktion im Herzen nach pathologischen Zuständen einnimmt ³⁸⁶.

Jedoch zeigten wir auch, dass eine längere Überexpression von Myostatin zu interstitieller Fibrose führt. Dies würde erklären, wieso Myostatin unter pathologischen Bedingungen nur für einen Zeitraum von 30 Tagen hochreguliert wird. Wir vermuten, dass diese Hochregulation zu einer verbesserten Kontraktilität des Herzens führt, aber aufgrund der Verhinderung einer unerwünschten Fibrose limitiert werden muss.

Somit zeigen unsere Daten, dass die Regulation der Myostatin Expression im adulten Herzen für die Erhaltung der Herzfunktion notwendig ist und deuten auf eine interessante neue Rolle als protektiver antihypertropher Faktor hin.

5.1.5 Myostatin verursacht interstitielle Fibrose

Die starke Überkompensation der Myostatin Expression im Herzen durch Nicht-Kardiomyozyten verursachte eine interstitielle Fibrose (s. 4.1.8). Dies verdeutlicht die Notwendigkeit einer ausbalancierten Kontrolle der Myostatin Expression. Die profibrotische Wirkung von Myostatin auf das Herz wurde auch durch unsere Myostatin überexprimierenden Mausmodelle bestätigt (s. 4.1.8). Diese zeigten, dass eine Fibrose nur nach einer längerfristigen Hochregulation der Myostatin Expression induziert wird, während eine kurzfristige Überexpression von Myostatin keine Fibrose verursacht und zu einer leicht verbesserten Kontraktilität führt. Eine langfristige (9 Monate in Mäusen) Überexpression von Myostatin verschlechtert jedoch die Kontraktilität des Herzens. Dies ist nicht überraschend, da durch eine interstitielle Fibrose das Myokard „steifer“ wird, wodurch eine

verschlechterte Kontraktilität verursacht wird. Eine profibrotische Wirkung von Myostatin wurde auch in der Skelettmuskulatur beschrieben¹³⁴, bis zu unserer Studie aber nicht im Herzen überprüft.

Unsere Daten zeigen, dass sowohl die langfristige Überexpression als auch die Überkompensation durch Nicht-Kardiomyozyten die Kollagen-I Expression über den TAK1-MKK3/6-p38 Signalweg induziert (s. 4.1.9). Mehrere genetische Mausmodelle bewiesen die profibrotischen Eigenschaften von p38³⁶³⁻³⁶⁵. Interessanterweise besitzt p38 auch antihypertrophe Eigenschaften und transgene Mäuse mit einer herzspezifischen Inhibierung von p38 entwickeln hypertrophe Kardiomyopathie durch Hochregulation des Calcineurin Signalweges. Da p38 in in aMyHC-MCM/*Mstn*^{fl/fl} Mäusen nach 6 Wochen stark aktiviert ist, könnte dies die Ursache für den Rückgang der Hypertrophie sein. Desweiteren war die Hochregulation von Calcineurin 10 Tage nach akuter Deletion von Myostatin nach 6 Wochen auf ein basales Level zurückgegangen. Dies untermauert, dass Myostatin auch im Herzen eine antihypertrophe Eigenschaft besitzt.

5.1.6 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Dissertation wurden mehrere neue Funktionen und Signalwege von Myostatin im adulten Herzen entdeckt. Die Hauptpunkte dabei sind (s. Abb. 62):

- Die akute Deletion von Myostatin verursacht eine Hypertrophie des Herzens, die über TAK1 und AMPK vermittelt wird und eine Reaktivierung des fetalen metabolischen Programms einschließt
- Die akute Deletion von Myostatin führt zu einer schweren Herzinsuffizienz, die mit einer Herunterregulation von *Rgs2* und Aktivierung des G_q Signalweges assoziiert ist
- Die akute Deletion von Myostatin in Kardiomyozyten wird nach 6 Wochen durch Nicht-Kardiomyozyten überkompensiert und führt dadurch zu einer interstitiellen Fibrose
- Die kurzfristige Überexpression von Myostatin verbessert die Kontraktilität des Herzens, während eine langfristige Überexpression durch Aktivierung von p38 über TAK1 zu interstitieller Fibrose führt

Unsere Ergebnisse sind auch im Hinblick auf die pharmakologische Hemmung der Myostatin Signaltransduktion zur Behandlung von Muskeldystrophien von Bedeutung. Dabei sollte versucht werden, die Inhibierung auf die Skelettmuskulatur zu begrenzen. Desweiteren zeigen sie eine völlig neue positive Rolle von Myostatin als möglichem protektiven und antihypertrophen Wachstumsfaktor auf.

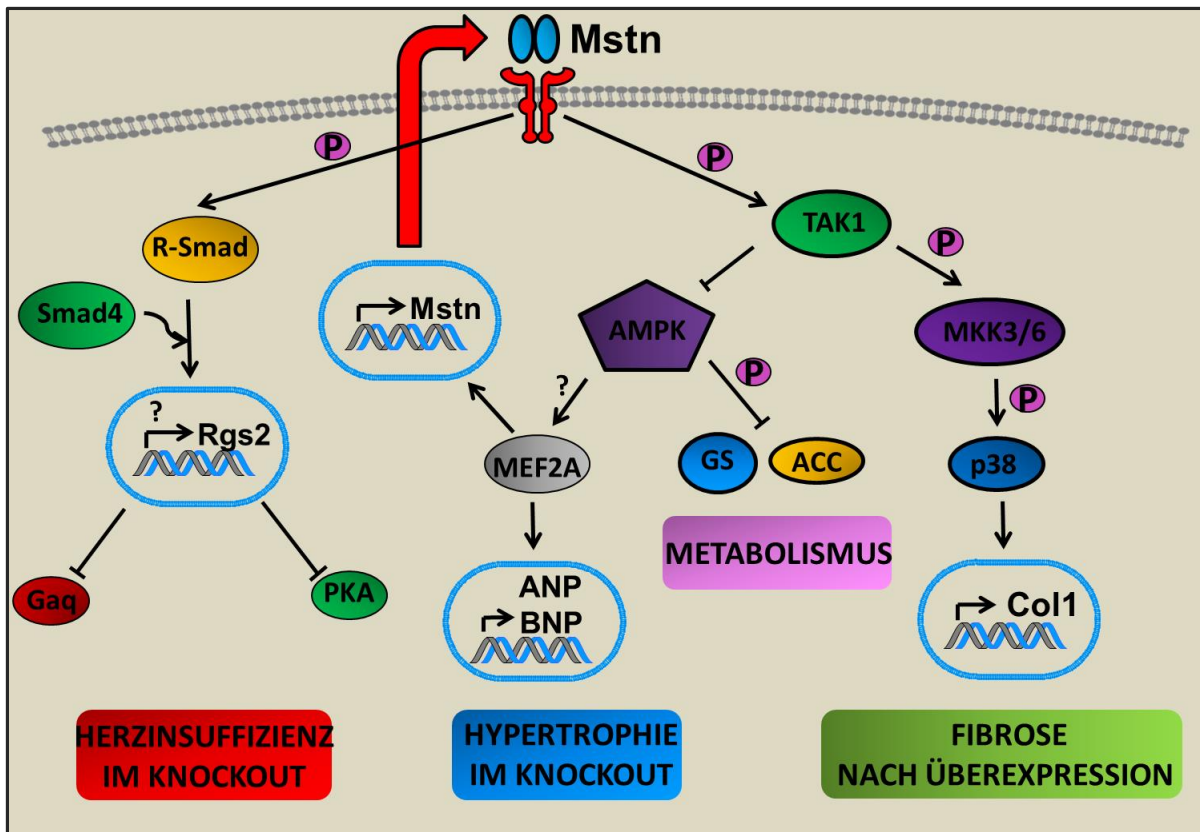


Abbildung 62: Schematische Darstellung der Funktion von Myostatin im adulten Herzen

Myostatin (*Mstn*) stimuliert, vermutlich über Smads, die *Rgs2* Expression. Die Deletion von Myostatin führt dadurch zur transkriptionellen Inhibition der *Rgs2* Expression und verringert die hemmende Wirkung von RGS2 auf die G_q und β -adrenerge Signalkaskade. Dies ist vermutlich die Ursache der Herzinsuffizienz nach akuter Deletion von Myostatin. Desweiteren hemmt Myostatin die AMPK Aktivität über seinen Rezeptor und TAK1. AMPK inhibiert daraufhin ihre Zielmoleküle Glykogen Synthase (GS) und Acetyl-CoA Carboxylase (ACC). Dadurch führt die akute Deletion von Myostatin in Kardiomyozyten zu einer Reaktivierung des fetalen metabolischen Programms. Wir konnten zeigen, dass die antihypertrophe Wirkung von Myostatin über AMPK *in vivo* vermittelt wird. Eine Überexpression von Myostatin führt hingegen zu einer interstitiellen Fibrose durch Aktivierung von TAK1, MKK3/6 und p38. Dies stimuliert die Kollagen-I (*Col1*) Expression. Und schließlich führt die akute Deletion von Myostatin in Kardiomyozyten zu einer Überkompensation von Nicht-Kardiomyozyten die über MEF2A vermittelt sein könnte.

5.1.7 Ausblick

Wir konnten zeigen, dass die akute Deletion von Myostatin zu einer Herzinsuffizienz führt und vermuten die transkriptionelle Inhibition von *Rgs2* und daraus resultierende Aktivierung der G_q Signaltransduktion als Ursache. Um zu beweisen, dass Myostatin über den SMAD Signalweg die *Rgs2* Transkription hemmt, könnte eine Chromatin Immunopräzipitation mit SMAD4 und der FAST1-Bindestelle am *Rgs2* Promoter durchgeführt werden. Dies würde jedoch nur den Signalweg identifizieren, aber nicht bestätigen, ob er die zugrundeliegende Ursache ist. Um diese definitiv zu identifizieren, könnten $aMyHC-MCM/Mstn^{fl/fl}$ Mäuse entweder mit RGS2 selbst oder mit einem G_q Inhibitor behandelt und parallel die Deletion induziert werden. Dies würde unsere Hypothese, dass die Herzinsuffizienz nach akuter Deletion von Myostatin über *Rgs2* vermittelt wird, endgültig

bestätigen. Um zu überprüfen, ob der kontraktile Apparat selbst von der akuten Deletion von Myostatin beeinträchtigt wird, könnten Kardiomyozyten isoliert und deren Kontraktilität und Calciumströme analysiert werden. Dies wäre zumindest aufgrund dessen naheliegend, dass T-Cap, ein sarkomeres Protein, welches an der Z-Scheibe lokalisiert ist, mit Myostatin assoziiert und dessen Sekretion inhibiert⁸⁹.

Unsere Ergebnisse sind besonders auch in Bezug auf die Inhibierung von Myostatin zur Behandlung von Muskeldystrophien von Bedeutung. Sie könnten beispielsweise mit Hilfe einer ubiquitär exprimierten induzierbaren Cre-Linie, mit der Myostatin akut in allen Geweben ausgeschaltet wird, bestätigt werden. Dies wäre auch im Hinblick auf die Überkompensation von Myostatin durch Nicht-Kardiomyozyten interessant, da diese nicht mehr möglich und die Herzinsuffizienz vermutlich nicht reversibel wäre. Desweiteren könnten Wildtypen zum Beispiel mit dem momentan getesteten löslichen ActRIIB Rezeptor behandelt und ihre Herzfunktion überprüft werden. Dies würde dann auch auf pharmakologischer Ebene unsere genetischen Daten bestätigen.

Um die Quelle der Überkompensation zu identifizieren, evaluieren wir momentan eine *Knockin*-Maus (generiert von). Anhand dieses Mausmodells könnten neue Zelltypen, die Myostatin exprimieren, identifiziert werden. Desweiteren könnte überprüft werden, in welchen Zelltypen Myostatin nach pathologischen Bedingungen im Herzen überexprimiert wird. Würde sich dadurch unsere Vermutung, dass die Überkompensation von Fibroblasten stammt, bewahrheiten, könnten wir Myostatin in Fibroblasten deletieren bzw. überexprimieren und mögliche Auswirkungen auf die Herzfunktion und die Entwicklung einer Fibrose untersuchen.

Ein neuer interessanter Aspekt ist die Frage, ob die kurzfristige Überexpression von Myostatin die Herzfunktion verbessern und die Entwicklung einer pathologischen Hypertrophie verbessern kann. Dabei könnte man unseren induzierbaren Kardiomyozyten-spezifischen Überexpressionsmäusen einen Herzinfarkt oder eine linksventrikuläre Hypertrophie induzieren. Würde unsere Hypothese stimmen, müsste die Überexpression die Kontraktilität und das *Remodelling* nach diesen pathologischen Zuständen verbessern.

5.2 Wirkung und Interaktion der Wachstumsfaktoren Myostatin und IGF-1 im Herzen

Im zweiten Teil dieser Dissertation sollte die Frage beantwortet werden, ob eine Deletion von *Igf-1* die Hypertrophie nach akuter Deletion von Myostatin in Kardiomyozyten verhindern kann und wie diese beiden gegensätzlichen Wachstumsfaktoren sich regulieren und interagieren. Dazu wurden induzierbare konditionale (aMyHC-MCM/*Mstn*^{fl/fl}/*Igf-1*^{fl/fl}) und konditionale (aMyHC-Cre/*Mstn*^{fl/fl}/*Igf-1*^{fl/fl}) Mausmodelle untersucht.

5.2.1 Die Regulation der Hypertrophie des Herzens durch Myostatin und IGF-1

Ich konnte zeigen, dass die akute Deletion von Myostatin zu einer Hypertrophie des Herzens führt (s. 4.1.2), während die Deletion von *Igf-1* Hypotrophie verursacht (s. 4.2.3). Interessanterweise scheint IGF-1 eine stärkere Funktion in der Regulation der Hypertrophie im Herzen zu besitzen, da die Deletion beider Faktoren die Entstehung einer Hypertrophie verhinderte (s. 4.2.3).

IGF-1 reguliert die Muskelmasse hauptsächlich über die Proteinkinase AKT. Diese stimuliert die Proteinsynthese über mTOR und hemmt die Degradation über FOXOs und GSK3 β ³⁸⁷. Myostatin besitzt – zumindest in der Skelettmuskulatur – eine inhibitorische Wirkung auf AKT^{108,110,124,316-318} und AKT stellt den bisher einzigen identifizierten Knotenpunkt der Myostatin und IGF-1 Signaltransduktion dar. Erstaunlicherweise fanden wir zwar nach akuter Deletion von *Igf-1* eine Inhibierung von AKT und mTOR, jedoch nicht nach Deletion beider Wachstumsfaktoren (s. 4.2.5). Somit verhindert die Deletion von *Igf-1* die Hypertrophie nach akuter Deletion von Myostatin nicht über AKT und mTOR. Interessanterweise wurde in Kardiomyozyten-spezifischen *Igf1r knockouts* eine Hemmung der Hypertrophie nach sportlicher Betätigung beobachtet, die ebenfalls nicht über AKT vermittelt wurde³⁸⁸. Außerdem konnten wir durch diese Ergebnisse bestätigen, dass die Deletion von Myostatin die AKT Phosphorylierung im Herzen von aMyHC-MCM/*Mstn*^{fl/fl}/*Igf-1*^{fl/fl} Mäusen aktiviert.

Da auch IRS-1 nach Deletion beider Wachstumsfaktoren –im Vergleich zur akuten Deletion von *Igf-1* alleine– nicht mehr inhibiert wird, legt dies nahe, dass die Signaltransduktion nicht über IRS-1 und PI3K vermittelt wird. Eine Möglichkeit wäre deshalb, dass die Hemmung der Hypertrophie im Herzen von aMyHC-MCM/*Mstn*^{fl/fl}/*Igf-1*^{fl/fl} Mäusen über den RAS-RAF-MAPK Weg vermittelt wird. Dieser ist neben PI3K-AKT ein weiterer wichtiger Signalweg von IGF-1 und die Überexpression von *Ras in vivo* führt auch zu ventrikulärer Hypertrophie³⁸⁹⁻³⁹¹. Analoge Ergebnisse wurden mit einer Überexpression von MEK1 erreicht³⁹². Passend dazu verhinderte dominant negatives *Raf1* die Entstehung einer Hypertrophie nach einer induzierten Druckbelastung des Herzens³⁹³. Dies verdeutlicht, dass der RAS-RAF-MAPK Weg prohypertroph wirkt und eine Hemmung dieses Weges durch Deletion von *Igf-1* Ursache der Verhinderung der Hypertrophie in aMyHC-MCM/*Mstn*^{fl/fl}/*Igf-1*^{fl/fl} Mäusen sein könnte.

Desweiteren ist die Hauptisoform von *Igf-1*, die in aMyHC-MCM/*Mstn*^{fl/fl}/*Igf-1*^{fl/fl} Mäusen deletiert wurde *Mgf* (s. 4.2.1.2). Santini et al.³¹² fanden in der Skelettmuskulatur sowie im Herzen von gewebsspezifischen *Mgf* überexprimierenden Mäusen keine veränderte Phosphorylierung von PI3K, AKT und GSK3 β , und folgerten, dass AKT nicht in die, durch *Mgf* verursachte Hypertrophie involviert ist. Stattdessen führte die Überexpression von *Mgf* zur Aktivierung des PDK1/SGK1 Komplexes und verursacht dadurch AKT unabhängig Hypertrophie. Somit könnte die starke Deletion von *Mgf* die Entwicklung der Hypertrophie in aMyHC-MCM/*Mstn*^{fl/fl}/*Igf-1*^{fl/fl} Mäusen durch Inhibierung des PDK1/SGK1 Komplexes hemmen.

Die letzten beiden Möglichkeiten bezogen sich darauf, dass *Igf-1* die Hypertrophie nach akuter Deletion von Myostatin über einen eigenen, Myostatin unabhängigen, Signalweg verhindert. Man könnte jedoch auch spekulieren, dass gemeinsame Zielmoleküle existieren, die in diesem Falle von *Igf-1* stärker reguliert wären. Eine Identifikation neuer Zielmoleküle, die posttranslational oder transkriptionell von beiden Wachstumsfaktoren reguliert wären, wäre mit Hilfe einer MicroArray Analyse oder Phospho *in vivo* SILAC (*stable isotope labeling of amino acids in cell culture*) möglich.

Im ersten Teil der Dissertation zeigte ich, dass eine Inhibierung der AMPK die Entwicklung der Hypertrophie nach akuter Deletion von Myostatin verhinderte. Dies legte die Vermutung nahe, dass die Deletion von *Igf-1* über AMPK auch in aMyHC-MCM/*Mstn^{fl/fl}/Igf-1^{fl/fl}* Mäusen die Ursache der Inhibierung der Hypertrophie ist. Jedoch stellten wir sowohl nach akuter Deletion von *Igf-1* alleine, als auch in aMyHC-MCM/*Mstn^{fl/fl}/Igf-1^{fl/fl}* Mäusen eine leichte Aktivierung der AMPK fest. Die Fähigkeit von IGF-1, AMPK zu inhibieren wurde bereits in der Literatur beschrieben³⁹⁴. Dies schließt aus, dass IGF-1 die Entwicklung einer Hypertrophie nach akuter Deletion von Myostatin über AMPK verhindert. Jedoch scheint AMPK ein neues gemeinsames Zielmolekül von Myostatin und IGF-1 darzustellen.

Außerdem fanden wir nach akuter Deletion von Myostatin eine Hochregulierung des IGF-1 Rezeptors sowie verschiedener Untereinheiten der *Pi3k*. Dies würde vermutlich sekundär zu einer verstärkten IGF-1 Signaltransduktion führen. Dabei könnte die Deletion von *Igf-1* zumindest partiell von IGF-2, welches mit sechsfach niedrigerer Affinität an den IGF-1R bindet, kompensiert werden. Da nicht bekannt ist, wie Myostatin AKT inhibiert, würde dies die nicht veränderte Phosphorylierung von AKT nach Deletion beider Wachstumsfaktoren erklären.

5.2.2 Deletion von Myostatin und IGF-1 verursacht schwere Herzinsuffizienz

Obwohl IGF-1 kardioprotektiv und positiv inotrop wirkt, verursacht die Deletion des IGF-1 Rezeptors im Herzen bzw. im Herzen und in der Skelettmuskulatur keinen Herzphänotyp^{388,395} und keinerlei Verschlechterung der Herzfunktion. Analoge Ergebnisse wurden in konditionalen dominant negativen *Pi3k* Mausmodellen erhalten^{287,288,396,397}. Somit scheint die Inhibierung des IGF-1 Signalweges keine schwerwiegenden Auswirkungen auf die Herzfunktion zu haben. Dies könnte darauf beruhen, dass der Insulin Rezeptor eine Deletion des IGF-1 Rezeptors partiell kompensieren kann³⁹⁵. Auch in meinen Mausmodellen wurde nach akuter Deletion von *Igf-1* in adulten Herzen nur eine milde ventrikuläre Dysfunktion festgestellt, während die Deletion von der Entwicklung an die Herzfunktion nicht beeinträchtigte (s. 4.2.2 und 4.2.4). Das verringerte Schlagvolumen beruhte dabei auf der verkleinerten Masse, während die Ejektionsfraktion unverändert blieb.

Die akute Deletion von Myostatin verursachte eine Aktivierung der Phosphatase Calcineurin und der Proteinkinase C (PKC, s. 4.1.7). Calcineurin gilt als einer der Hauptvermittler der Hypertrophie des Herzens und eine Überexpression von Calcineurin führt zu Herzinsuffizienz, Dilatation des Herzens, pulmonalen Ödemen und vorzeitigem Tod³⁵⁶, während eine gesteigerte Aktivität von PKC- α Hypokontraktilität verursacht³⁵⁵. IGF-1 ist zumindest in der Skelettmuskulatur sowie in kultivierten Kardiomyozyten in der Lage Calcineurin und PKC zu aktivieren³⁹⁸⁻⁴⁰⁰. Dies führte zu der Hypothese, dass die Deletion von *Igf-1* durch Inhibierung von Calcineurin und PKC die Herzinsuffizienz nach akuter Deletion von Myostatin verbessern kann. Die Analyse der aMyHC-MCM/*Mstn^{fl/fl}/Igf-1^{fl/fl}* Mäuse ergab jedoch eine – im Vergleich zur akuten Deletion von Myostatin alleine - schwerere Herzinsuffizienz. Dabei starben fast 60% der Mäuse innerhalb der ersten 10 Tage nach Induktion der Deletion, wobei die überlebenden Mäuse einen der akuten Deletion von Myostatin ähnlichen Phänotyp zeigten. Dies beinhaltete eine starke Dilatation des rechten Atriums und beider Ventrikel, Ödeme im Pleurabereich und eine eingeschränkte Herzfunktion (s. 4.2.2). Interessanterweise war jedoch in denjenigen Mäusen, die überlebten, Myostatin nur zu ungefähr 50% in Kardiomyozyten reduziert (s. 4.2.1.2). Daraus schließen wir, dass eine lineare Korrelation zwischen der prozentualen

Rekombination und der Überlebensrate existiert. Somit selektionieren wir in unseren Analysen die Mäuse mit den schwächeren Phänotypen. Dieser Phänotyp war jedoch, im Gegensatz zur akuten Deletion von Myostatin alleine, nicht komplett reversibel nach 6 Wochen. Da auch in aMyHC-MCM/*Mstn*^{fl/fl}/*Igf-1*^{fl/fl} Mäusen eine Hochregulation der Myostatin Expression nach 6 Wochen stattfand, ist dies vermutlich ebenfalls die Ursache der Verbesserung der Herzfunktion (s. 5.1.4).

Die Schwere des Phänotyps wirft die Frage auf, ob dieser aufgrund additiver Auswirkungen der Deletion beider Wachstumsfaktoren verursacht wird oder durch einen synergistischen Signalweg. Dass Synergien zwischen der Myostatin und IGF-1 Signaltransduktion bestehen, wurde bereits am Beispiel der AMPK deutlich.

Zu Beginn der Analyse dieses Mausmodells wurde die Vermutung aufgestellt, dass die Schwere der Herzinsuffizienz über eine verstärkte Apoptose durch Inhibierung der Proteinkinase AKT verursacht sein könnte. Jedoch wurde keine Hemmung von AKT in aMyHC-MCM/*Mstn*^{fl/fl}/*Igf-1*^{fl/fl} Herzen beobachtet (s. 4.2.5).

Ein möglicher synergistischer Effekt, der die hohe Lethalität erklären könnte, wäre eine Inhibierung von NFκB durch Myostatin und IGF-1. Es wurde beschrieben, dass TAK1, ein nach unseren Ergebnissen neuer Vermittler der Myostatin Signaltransduktion im Herzen, direkt mit IKK interagiert und dadurch zur nukleären Translokation von NFκB führt⁴⁰¹. Daneben ist auch IGF-1 in der Lage, NFκB zu aktivieren⁴⁰²⁻⁴⁰⁶. Obwohl die Funktion von NFκB im Herzen noch nicht eindeutig entschlüsselt wurde, deuten neuere Studien darauf hin, dass NFκB eine schützende Funktion einnimmt. So verhindert NFκB oxidativen Stress und wirkt anti-inflammatorisch, wodurch der Verlauf einer Herzinsuffizienz abgemildert wird⁴⁰⁷⁻⁴⁰⁹. Somit könnte die Deletion von Myostatin und *Igf-1* durch Inhibierung von NFκB zu erhöhtem oxidativen Stress führen und dadurch den Phänotyp der akuten Deletion von Myostatin alleine noch verschlimmern. Interessanterweise ist auch AMPK in der Lage, NFκB zu inhibieren⁴¹⁰. Die Aktivierung des AMPK Signalweges nach akuter Deletion von Myostatin, *Igf-1* und beiden Wachstumsfaktoren unterstützt diese Hypothese (s. 4.2.6). Das Vorliegen von oxidativem Stress wird durch eine, durch unsere MicroArray Daten identifizierte, Hochregulation der NADPH Oxidase NOX4 sowie des zugehörigen Urotensin-II Rezeptors nach akuter Deletion von Myostatin unterstützt. NADPH Oxidasen sind die Hauptquelle von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS)⁴¹¹. Interessanterweise ist NOX4 mit der Insulin Signaltransduktion verknüpft⁴¹² und kann über ROS AKT aktivieren⁴¹³⁻⁴¹⁵. Dies könnte die fehlende Hemmung der kanonischen IGF-1 Signaltransduktion über AKT nach akuter Deletion von Myostatin und *Igf-1* erklären (s. 4.2.5). Eine andere Begründung wäre, dass die akute Deletion von Myostatin zur Aktivierung von PKA und CAMKII führt, die beide ebenfalls AKT aktivieren können⁴¹⁶. Da Myostatin zumindest in der Literatur jedoch eine direkte inhibitorische Wirkung auf AKT zugeschrieben wird^{110,124}, erscheint diese Möglichkeit eher unwahrscheinlich.

Ein möglicher additiver Effekt von IGF-1, der auch zu erhöhtem oxidativen Stress führt, ist die Aktivierung von Sirt1 durch MGF^{417,418}. Sirt1 ist eine NAD-abhängige Histon-Deacetylase, die ähnlich wie IGF-1 im Herzen eine kardioprotektive Funktion durch Inhibierung von oxidativem Stress ausübt. So sterben konstitutive Sirt1 *knockouts* unter anderem pre- oder postnatal durch Fehlbildungen des Herzens⁴¹⁹. Desweiteren schützt eine moderate herzspezifische Überexpression von Sirt1 vor Apoptose und verlangsamt die Entwicklung altersbedingter kontraktile Dysfunktion⁴²⁰ und die herzspezifische Deletion verschlimmert die oxidative Verletzung des Myokards nach

Ischämie/Reperfusion⁴²¹. Somit könnte die Inhibierung von *Mgf* zu erhöhtem oxidativen Stress führen und dadurch die Lethalität in *aMyHC-MCM/Mstn^{fl/fl}/Igf-1^{fl/fl}* noch erhöhen.

5.2.3 Schwere interstitielle und Ersatzfibrose in *aMyHC-MCM/Mstn^{n/n}/Igf-1^{n/n}* Mäusen

Im ersten Teil dieser Dissertation wurde bereits gezeigt, dass die Überkompensation der Myostatin Expression nach akuter Deletion in Kardiomyozyten eine interstitielle Fibrose verursacht (4.1.8). Dies bestätigte eine profibrotische Wirkung von Myostatin im murinen Herzen. Im Gegensatz zu Myostatin besitzt IGF-1 eine antifibrotische Wirkung und die Überexpression von *Igf-1* oder *Igf1r* verhindert die Entwicklung einer Fibrose nach verschiedenen pathologischen Bedingungen im Herzen^{291,422}. Dabei induziert IGF-1 die Proliferation von Fibroblasten in Kultur und steigert die Kollagen Produktion^{423,424}. Ich konnte zeigen, dass die akute Deletion von *Igf-1* in Kardiomyozyten eine – im Vergleich zur Überkompensation von Myostatin – schwerere interstitielle Fibrose verursacht (s. 4.2.7). Die Kombination einer Überexpression von Myostatin und einer Deletion von *Igf-1*, wie sie in *aMyHC-MCM/Mstn^{fl/fl}/Igf-1^{fl/fl}* vorkommt, verursacht nicht nur eine interstitielle, sondern auch eine Ersatzfibrose (s. 4.2.7). Eine Ersatzfibrose entsteht, wenn nekrotische Kardiomyozyten durch Fibroblasten ersetzt werden⁴²⁵.

Dies wirft wiederum die Frage auf, ob Myostatin und IGF-1 ihre pro- bzw. antifibrotische Wirkung über gemeinsame Signalwege ausüben. Wir zeigten, dass Myostatin im Herzen eine Fibrose durch Aktivierung des TAK1-p38 Signalweges induzierte (s. 4.1.9). Da IGF-1 auch in der Lage ist, p38 zu aktivieren^{160,399}, würde eine Deletion von *Igf-1* p38 inhibieren und könnte dadurch nicht zur Verstärkung des Phänotyps in *aMyHC-MCM/Mstn^{fl/fl}/Igf-1^{fl/fl}* Mäusen beitragen. TAK1 ist jedoch auch in der Lage, JNK zu aktivieren⁴²⁶, während IGF-1 JNK inhibiert⁴²⁷⁻⁴²⁹. Die MAP-Kinase JNK wirkt profibrotisch und stimuliert die Bildung von Myofibroblasten sowie die Kollagen Produktion⁴³⁰⁻⁴³². Somit würde JNK durch Überexpression von Myostatin und Deletion von *Igf-1* stark aktiviert werden und dadurch Fibrose induzieren.

IGF-1 ist jedoch auch in der Lage, STAT3 in Kardiomyozyten zu aktivieren⁴³³. Die Deletion von STAT3 verursacht interstitielle Fibrose^{434,435}, unter anderem durch Aktivierung von CTGF⁴³⁴, einem profibrotischen sekretierten Matrix-assoziierten Protein. Dabei wirkt CTGF durch Aktivierung der Fibroblasten Proliferation und der Differenzierung zu Myofibroblasten und steigert die Produktion der extrazellulären Matrix Proteine⁴³⁶⁻⁴³⁸. Die akute Deletion von *Igf-1* würde dieser Hypothese nach STAT3 inhibieren und dadurch CTGF aktivieren. Interessanterweise ist TGF- β einer der Hauptfaktoren, die CTGF aktivieren^{439,440}. Obwohl dies für Myostatin nicht bekannt ist, legt die Zugehörigkeit zur TGF- β Familie nahe, dass Myostatin ebenfalls CTGF aktivieren kann. Somit würde dann die akute Deletion von *Igf-1* synergistisch mit der Überkompensation von Myostatin zu einer schweren Fibrose durch Aktivierung von CTGF führen.

5.2.4 Zusammenfassung

Im Rahmen der Analyse der Wirkung und Interaktion von Myostatin und IGF-1 im murinen Herzen wurden folgende Ergebnisse erzielt:

- Deletion von *Igf-1* führt zu Hypotrophie, einer leichten ventrikulären Dysfunktion und interstitieller Fibrose
- alternative Spleißvariante *Mgf* scheint die Hauptform in Kardiomyozyten darzustellen
- akute Deletion von Myostatin und *Igf-1* in adulten Herzen verursacht eine 60%ige Lethalität, schwere Herzinsuffizienz und Ödeme im Pleurabereich
- Deletion von *Igf-1* verhindert die Entstehung einer Hypertrophie nach akuter Myostatin Deletion unabhängig von der Proteinkinase AKT
- Überkompensation von Myostatin und Deletion von *Igf-1* verursacht eine schwere Ersatzfibrose

Um die zugrundeliegenden Mechanismen sowie mögliche neue Interaktionen zwischen Myostatin und IGF-1 zu identifizieren, sind noch weitere Versuche notwendig. Die möglichen Ansatzpunkte wurden bereits diskutiert (s. 5.2.1-5.2.3).

6. Anhang

6.1 Literaturverzeichnis

1. Hill, J.A. & Olson, E.N. Cardiac plasticity. *The New England journal of medicine* **358**, 1370-1380 (2008).
2. Tortora, G.J. & Derrickson, B. *Principles of anatomy & physiology*, (Wiley, Hoboken, NJ, 2012).
3. Banerjee, I., Fuseler, J.W., Price, R.L., Borg, T.K. & Baudino, T.A. Determination of cell types and numbers during cardiac development in the neonatal and adult rat and mouse. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* **293**, H1883-1891 (2007).
4. Tirziu, D., Giordano, F.J. & Simons, M. Cell communications in the heart. *Circulation* **122**, 928-937 (2010).
5. Baudino, T.A., Carver, W., Giles, W. & Borg, T.K. Cardiac fibroblasts: friend or foe? *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* **291**, H1015-1026 (2006).
6. Sussman, M.A., McCulloch, A. & Borg, T.K. Dance band on the Titanic: biomechanical signaling in cardiac hypertrophy. *Circulation research* **91**, 888-898 (2002).
7. Young, A.A., Legrice, I.J., Young, M.A. & Smaill, B.H. Extended confocal microscopy of myocardial laminae and collagen network. *Journal of microscopy* **192**, 139-150 (1998).
8. Caulfield, J.B. & Borg, T.K. The collagen network of the heart. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* **40**, 364-372 (1979).
9. Souders, C.A., Bowers, S.L. & Baudino, T.A. Cardiac fibroblast: the renaissance cell. *Circulation research* **105**, 1164-1176 (2009).
10. Corda, S., Samuel, J.L. & Rappaport, L. Extracellular matrix and growth factors during heart growth. *Heart failure reviews* **5**, 119-130 (2000).
11. Kang, P.M., Haunstetter, A., Aoki, H., Usheva, A. & Izumo, S. Morphological and molecular characterization of adult cardiomyocyte apoptosis during hypoxia and reoxygenation. *Circulation research* **87**, 118-125 (2000).
12. Heineke, J. & Molkentin, J.D. Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways. *Nature reviews. Molecular cell biology* **7**, 589-600 (2006).
13. Ganau, A., *et al.* Patterns of left ventricular hypertrophy and geometric remodeling in essential hypertension. *Journal of the American College of Cardiology* **19**, 1550-1558 (1992).
14. Barry, S.P. & Townsend, P.A. What causes a broken heart--molecular insights into heart failure. *International review of cell and molecular biology* **284**, 113-179 (2010).
15. Dorn, G.W., 2nd, Robbins, J. & Sugden, P.H. Phenotyping hypertrophy: eschew obfuscation. *Circulation research* **92**, 1171-1175 (2003).
16. Lorell, B.H. & Carabello, B.A. Left ventricular hypertrophy: pathogenesis, detection, and prognosis. *Circulation* **102**, 470-479 (2000).
17. Dorn, G.W., 2nd. The fuzzy logic of physiological cardiac hypertrophy. *Hypertension* **49**, 962-970 (2007).
18. Shiojima, I. & Walsh, K. Regulation of cardiac growth and coronary angiogenesis by the Akt/PKB signaling pathway. *Genes & development* **20**, 3347-3365 (2006).
19. Kang, P.M. & Izumo, S. Apoptosis in heart: basic mechanisms and implications in cardiovascular diseases. *Trends in molecular medicine* **9**, 177-182 (2003).
20. Chien, K.R. Meeting Koch's postulates for calcium signaling in cardiac hypertrophy. *The Journal of clinical investigation* **105**, 1339-1342 (2000).
21. Lecker, S.H., Goldberg, A.L. & Mitch, W.E. Protein degradation by the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* **17**, 1807-1819 (2006).
22. Ni, Y.G., *et al.* Foxo transcription factors blunt cardiac hypertrophy by inhibiting calcineurin signaling. *Circulation* **114**, 1159-1168 (2006).

23. Kerkela, R., Woulfe, K. & Force, T. Glycogen synthase kinase-3beta -- actively inhibiting hypertrophy. *Trends in cardiovascular medicine* **17**, 91-96 (2007).
24. Li, H.H., *et al.* Atrogin-1/muscle atrophy F-box inhibits calcineurin-dependent cardiac hypertrophy by participating in an SCF ubiquitin ligase complex. *The Journal of clinical investigation* **114**, 1058-1071 (2004).
25. Hobbs, R.E. Guidelines for the diagnosis and management of heart failure. *American journal of therapeutics* **11**, 467-472 (2004).
26. Kannel, W.B. Vital epidemiologic clues in heart failure. *Journal of clinical epidemiology* **53**, 229-235 (2000).
27. Levy, D., *et al.* Long-term trends in the incidence of and survival with heart failure. *The New England journal of medicine* **347**, 1397-1402 (2002).
28. Zannad, F., *et al.* Incidence, clinical and etiologic features, and outcomes of advanced chronic heart failure: the EPICAL Study. *Epidemiologie de l'Insuffisance Cardiaque Avancee en Lorraine. Journal of the American College of Cardiology* **33**, 734-742 (1999).
29. Ellery, S., Pakrashi, T., Paul, V. & Sack, S. Predicting mortality and rehospitalization in heart failure patients with home monitoring--the Home CARE pilot study. *Clinical research in cardiology : official journal of the German Cardiac Society* **95 Suppl 3**, III29-35 (2006).
30. Lloyd-Jones, D.M., *et al.* Lifetime risk for developing congestive heart failure: the Framingham Heart Study. *Circulation* **106**, 3068-3072 (2002).
31. Mudd, J.O. & Kass, D.A. Tackling heart failure in the twenty-first century. *Nature* **451**, 919-928 (2008).
32. Taegtmeyer, H., Sen, S. & Vela, D. Return to the fetal gene program: a suggested metabolic link to gene expression in the heart. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1188**, 191-198 (2010).
33. Fisher, D.J. Oxygenation and metabolism in the developing heart. *Seminars in perinatology* **8**, 217-225 (1984).
34. Lopaschuk, G.D., Spafford, M.A. & Marsh, D.R. Glycolysis is predominant source of myocardial ATP production immediately after birth. *The American journal of physiology* **261**, H1698-1705 (1991).
35. Barger, P.M. & Kelly, D.P. Fatty acid utilization in the hypertrophied and failing heart: molecular regulatory mechanisms. *The American journal of the medical sciences* **318**, 36-42 (1999).
36. Doenst, T., *et al.* Decreased rates of substrate oxidation ex vivo predict the onset of heart failure and contractile dysfunction in rats with pressure overload. *Cardiovascular research* **86**, 461-470 (2010).
37. Razeghi, P., *et al.* Metabolic gene expression in fetal and failing human heart. *Circulation* **104**, 2923-2931 (2001).
38. Hausenloy, D.J. & Yellon, D.M. Cardioprotective growth factors. *Cardiovascular research* **83**, 179-194 (2009).
39. Xiao, H. & Zhang, Y.Y. Understanding the role of transforming growth factor-beta signalling in the heart: overview of studies using genetic mouse models. *Clinical and experimental pharmacology & physiology* **35**, 335-341 (2008).
40. Javelaud, D. & Mauviel, A. Mammalian transforming growth factor-betas: Smad signaling and physio-pathological roles. *The international journal of biochemistry & cell biology* **36**, 1161-1165 (2004).
41. Massague, J., Seoane, J. & Wotton, D. Smad transcription factors. *Genes & development* **19**, 2783-2810 (2005).
42. Vitt, U.A., Hsu, S.Y. & Hsueh, A.J. Evolution and classification of cystine knot-containing hormones and related extracellular signaling molecules. *Molecular endocrinology* **15**, 681-694 (2001).

43. Derynck, R. & Zhang, Y.E. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature* **425**, 577-584 (2003).
44. Parker, T.G., Packer, S.E. & Schneider, M.D. Peptide growth factors can provoke "fetal" contractile protein gene expression in rat cardiac myocytes. *The Journal of clinical investigation* **85**, 507-514 (1990).
45. Cummins, P. Fibroblast and transforming growth factor expression in the cardiac myocyte. *Cardiovascular research* **27**, 1150-1154 (1993).
46. Gneccchi, M., Zhang, Z., Ni, A. & Dzau, V.J. Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy. *Circulation research* **103**, 1204-1219 (2008).
47. Kakkar, R. & Lee, R.T. Intramyocardial fibroblast myocyte communication. *Circulation research* **106**, 47-57 (2010).
48. Rohr, S. Arrhythmogenic implications of fibroblast-myocyte interactions. *Circulation. Arrhythmia and electrophysiology* **5**, 442-452 (2012).
49. Tian, Y. & Morrisey, E.E. Importance of myocyte-nonmyocyte interactions in cardiac development and disease. *Circulation research* **110**, 1023-1034 (2012).
50. Shimano, M., Ouchi, N. & Walsh, K. Cardiokines: recent progress in elucidating the cardiac secretome. *Circulation* **126**, e327-332 (2012).
51. Markkanen, J.E., Rissanen, T.T., Kivela, A. & Yla-Herttuala, S. Growth factor-induced therapeutic angiogenesis and arteriogenesis in the heart--gene therapy. *Cardiovascular research* **65**, 656-664 (2005).
52. Schultz Jel, J., *et al.* TGF-beta1 mediates the hypertrophic cardiomyocyte growth induced by angiotensin II. *The Journal of clinical investigation* **109**, 787-796 (2002).
53. Suzuki, Y.J. Growth factor signaling for cardioprotection against oxidative stress-induced apoptosis. *Antioxidants & redox signaling* **5**, 741-749 (2003).
54. McPherron, A.C., Lawler, A.M. & Lee, S.J. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. *Nature* **387**, 83-90 (1997).
55. McPherron, A.C. & Lee, S.J. Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 12457-12461 (1997).
56. Kambadur, R., Sharma, M., Smith, T.P. & Bass, J.J. Mutations in myostatin (GDF8) in double-muscled Belgian Blue and Piedmontese cattle. *Genome research* **7**, 910-916 (1997).
57. Grobet, L., *et al.* A deletion in the bovine myostatin gene causes the double-muscled phenotype in cattle. *Nature genetics* **17**, 71-74 (1997).
58. Mosher, D.S., *et al.* A mutation in the myostatin gene increases muscle mass and enhances racing performance in heterozygote dogs. *PLoS genetics* **3**, e79 (2007).
59. Hadjipavlou, G., Matika, O., Clop, A. & Bishop, S.C. Two single nucleotide polymorphisms in the myostatin (GDF8) gene have significant association with muscle depth of commercial Charollais sheep. *Animal genetics* **39**, 346-353 (2008).
60. Acosta, J., Carpio, Y., Borroto, I., Gonzalez, O. & Estrada, M.P. Myostatin gene silenced by RNAi show a zebrafish giant phenotype. *Journal of biotechnology* **119**, 324-331 (2005).
61. Hill, E.W., McGivney, B.A., Gu, J., Whiston, R. & Machugh, D.E. A genome-wide SNP-association study confirms a sequence variant (g.66493737C>T) in the equine myostatin (MSTN) gene as the most powerful predictor of optimum racing distance for Thoroughbred racehorses. *BMC genomics* **11**, 552 (2010).
62. Schuelke, M., *et al.* Myostatin mutation associated with gross muscle hypertrophy in a child. *The New England journal of medicine* **350**, 2682-2688 (2004).
63. Matsakas, A., *et al.* Molecular, cellular and physiological investigation of myostatin propeptide-mediated muscle growth in adult mice. *Neuromuscular disorders : NMD* **19**, 489-499 (2009).
64. Yang, J., *et al.* Expression of myostatin pro domain results in muscular transgenic mice. *Molecular reproduction and development* **60**, 351-361 (2001).
65. Zhu, X., Hadhazy, M., Wehling, M., Tidball, J.G. & McNally, E.M. Dominant negative myostatin produces hypertrophy without hyperplasia in muscle. *FEBS letters* **474**, 71-75 (2000).

66. Reisz-Porszasz, S., *et al.* Lower skeletal muscle mass in male transgenic mice with muscle-specific overexpression of myostatin. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* **285**, E876-888 (2003).
67. Zimmers, T.A., *et al.* Induction of cachexia in mice by systemically administered myostatin. *Science* **296**, 1486-1488 (2002).
68. Rodgers, B.D. & Garikipati, D.K. Clinical, agricultural, and evolutionary biology of myostatin: a comparative review. *Endocrine reviews* **29**, 513-534 (2008).
69. Lee, S.J. & McPherron, A.C. Regulation of myostatin activity and muscle growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 9306-9311 (2001).
70. Sharma, M., *et al.* Myostatin, a transforming growth factor-beta superfamily member, is expressed in heart muscle and is upregulated in cardiomyocytes after infarct. *Journal of cellular physiology* **180**, 1-9 (1999).
71. Ji, S., *et al.* Myostatin expression in porcine tissues: tissue specificity and developmental and postnatal regulation. *The American journal of physiology* **275**, R1265-1273 (1998).
72. Ng, L., *et al.* Neuroinformatics for genome-wide 3D gene expression mapping in the mouse brain. *IEEE/ACM transactions on computational biology and bioinformatics / IEEE, ACM* **4**, 382-393 (2007).
73. Lein, E.S., *et al.* Genome-wide atlas of gene expression in the adult mouse brain. *Nature* **445**, 168-176 (2007).
74. McPherron, A.C. & Lee, S.J. Suppression of body fat accumulation in myostatin-deficient mice. *The Journal of clinical investigation* **109**, 595-601 (2002).
75. Allen, D.L., Hittel, D.S. & McPherron, A.C. Expression and function of myostatin in obesity, diabetes, and exercise adaptation. *Medicine and science in sports and exercise* **43**, 1828-1835 (2011).
76. Wilkes, J.J., Lloyd, D.J. & Gekakis, N. Loss-of-function mutation in myostatin reduces tumor necrosis factor alpha production and protects liver against obesity-induced insulin resistance. *Diabetes* **58**, 1133-1143 (2009).
77. Lee, S.J. Regulation of muscle mass by myostatin. *Annual review of cell and developmental biology* **20**, 61-86 (2004).
78. Gonzalez-Cadavid, N.F., *et al.* Organization of the human myostatin gene and expression in healthy men and HIV-infected men with muscle wasting. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 14938-14943 (1998).
79. Smith, T.P., Lopez-Corrales, N.L., Kappes, S.M. & Sonstegard, T.S. Myostatin maps to the interval containing the bovine mh locus. *Mammalian genome : official journal of the International Mammalian Genome Society* **8**, 742-744 (1997).
80. Walling, G.A., *et al.* Mapping of quantitative trait loci for growth and carcass traits in commercial sheep populations. *Journal of animal science* **82**, 2234-2245 (2004).
81. Szabo, G., *et al.* A deletion in the myostatin gene causes the compact (Cmpt) hypermuscular mutation in mice. *Mammalian genome : official journal of the International Mammalian Genome Society* **9**, 671-672 (1998).
82. Wolfman, N.M., *et al.* Activation of latent myostatin by the BMP-1/tolloid family of metalloproteinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 15842-15846 (2003).
83. Thies, R.S., *et al.* GDF-8 propeptide binds to GDF-8 and antagonizes biological activity by inhibiting GDF-8 receptor binding. *Growth factors* **18**, 251-259 (2001).
84. Breitbart, A., Auger-Messier, M., Molkenstin, J.D. & Heineke, J. Myostatin from the heart: local and systemic actions in cardiac failure and muscle wasting. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* **300**, H1973-1982 (2011).
85. Anderson, S.B., Goldberg, A.L. & Whitman, M. Identification of a novel pool of extracellular pro-myostatin in skeletal muscle. *The Journal of biological chemistry* **283**, 7027-7035 (2008).

86. Hill, J.J., *et al.* The myostatin propeptide and the follistatin-related gene are inhibitory binding proteins of myostatin in normal serum. *The Journal of biological chemistry* **277**, 40735-40741 (2002).
87. Joulia-Ekaza, D. & Cabello, G. The myostatin gene: physiology and pharmacological relevance. *Current opinion in pharmacology* **7**, 310-315 (2007).
88. Hill, J.J., Qiu, Y., Hewick, R.M. & Wolfman, N.M. Regulation of myostatin in vivo by growth and differentiation factor-associated serum protein-1: a novel protein with protease inhibitor and follistatin domains. *Molecular endocrinology* **17**, 1144-1154 (2003).
89. Nicholas, G., *et al.* Titin-cap associates with, and regulates secretion of, Myostatin. *Journal of cellular physiology* **193**, 120-131 (2002).
90. Wang, H., Zhang, Q. & Zhu, D. hSGT interacts with the N-terminal region of myostatin. *Biochemical and biophysical research communications* **311**, 877-883 (2003).
91. Matzuk, M.M., *et al.* Multiple defects and perinatal death in mice deficient in follistatin. *Nature* **374**, 360-363 (1995).
92. Ma, K., *et al.* Characterization of 5'-regulatory region of human myostatin gene: regulation by dexamethasone in vitro. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* **281**, E1128-1136 (2001).
93. Spiller, M.P., *et al.* The myostatin gene is a downstream target gene of basic helix-loop-helix transcription factor MyoD. *Molecular and cellular biology* **22**, 7066-7082 (2002).
94. Salerno, M.S., *et al.* Molecular analysis of fiber type-specific expression of murine myostatin promoter. *American journal of physiology. Cell physiology* **287**, C1031-1040 (2004).
95. Allen, D.L. & Unterman, T.G. Regulation of myostatin expression and myoblast differentiation by FoxO and SMAD transcription factors. *American journal of physiology. Cell physiology* **292**, C188-199 (2007).
96. Callis, T.E., *et al.* MicroRNA-208a is a regulator of cardiac hypertrophy and conduction in mice. *The Journal of clinical investigation* **119**, 2772-2786 (2009).
97. Allen, D.L. & Loh, A.S. Posttranscriptional mechanisms involving microRNA-27a and b contribute to fast-specific and glucocorticoid-mediated myostatin expression in skeletal muscle. *American journal of physiology. Cell physiology* **300**, C124-137 (2011).
98. Bell, M.L., Buvoli, M. & Leinwand, L.A. Uncoupling of expression of an intronic microRNA and its myosin host gene by exon skipping. *Molecular and cellular biology* **30**, 1937-1945 (2010).
99. Attisano, L. & Wrana, J.L. Signal transduction by the TGF-beta superfamily. *Science* **296**, 1646-1647 (2002).
100. Rebbapragada, A., Benchabane, H., Wrana, J.L., Celeste, A.J. & Attisano, L. Myostatin signals through a transforming growth factor beta-like signaling pathway to block adipogenesis. *Molecular and cellular biology* **23**, 7230-7242 (2003).
101. Joulia-Ekaza, D. & Cabello, G. Myostatin regulation of muscle development: molecular basis, natural mutations, physiopathological aspects. *Experimental cell research* **312**, 2401-2414 (2006).
102. Tsuchida, K., *et al.* Activin signaling as an emerging target for therapeutic interventions. *Cell communication and signaling : CCS* **7**, 15 (2009).
103. Heldin, C.H., Miyazono, K. & ten Dijke, P. TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* **390**, 465-471 (1997).
104. Massague, J. TGF-beta signal transduction. *Annual review of biochemistry* **67**, 753-791 (1998).
105. Zhu, X., Topouzis, S., Liang, L.F. & Stotish, R.L. Myostatin signaling through Smad2, Smad3 and Smad4 is regulated by the inhibitory Smad7 by a negative feedback mechanism. *Cytokine* **26**, 262-272 (2004).
106. Ishisaki, A., *et al.* Differential inhibition of Smad6 and Smad7 on bone morphogenetic protein- and activin-mediated growth arrest and apoptosis in B cells. *The Journal of biological chemistry* **274**, 13637-13642 (1999).
107. Ebisawa, T., *et al.* Smurf1 interacts with transforming growth factor-beta type I receptor through Smad7 and induces receptor degradation. *The Journal of biological chemistry* **276**, 12477-12480 (2001).

108. Morissette, M.R., Cook, S.A., Buranasombati, C., Rosenberg, M.A. & Rosenzweig, A. Myostatin inhibits IGF-I-induced myotube hypertrophy through Akt. *American journal of physiology. Cell physiology* **297**, C1124-1132 (2009).
109. Sartori, R., *et al.* Smad2 and 3 transcription factors control muscle mass in adulthood. *American journal of physiology. Cell physiology* **296**, C1248-1257 (2009).
110. Trendelenburg, A.U., *et al.* Myostatin reduces Akt/TORC1/p70S6K signaling, inhibiting myoblast differentiation and myotube size. *American journal of physiology. Cell physiology* **296**, C1258-1270 (2009).
111. Welle, S.L. Myostatin and muscle fiber size. Focus on "Smad2 and 3 transcription factors control muscle mass in adulthood" and "Myostatin reduces Akt/TORC1/p70S6K signaling, inhibiting myoblast differentiation and myotube size". *American journal of physiology. Cell physiology* **296**, C1245-1247 (2009).
112. Huang, Z., *et al.* Regulation of myostatin signaling by c-Jun N-terminal kinase in C2C12 cells. *Cellular signalling* **19**, 2286-2295 (2007).
113. Philip, B., Lu, Z. & Gao, Y. Regulation of GDF-8 signaling by the p38 MAPK. *Cellular signalling* **17**, 365-375 (2005).
114. Yang, W., *et al.* Extracellular signal-regulated kinase 1/2 mitogen-activated protein kinase pathway is involved in myostatin-regulated differentiation repression. *Cancer research* **66**, 1320-1326 (2006).
115. Rios, R., Carneiro, I., Arce, V.M. & Devesa, J. Myostatin regulates cell survival during C2C12 myogenesis. *Biochemical and biophysical research communications* **280**, 561-566 (2001).
116. McCroskery, S., Thomas, M., Maxwell, L., Sharma, M. & Kambadur, R. Myostatin negatively regulates satellite cell activation and self-renewal. *The Journal of cell biology* **162**, 1135-1147 (2003).
117. Steelman, C.A., Recknor, J.C., Nettleton, D. & Reecy, J.M. Transcriptional profiling of myostatin-knockout mice implicates Wnt signaling in postnatal skeletal muscle growth and hypertrophy. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **20**, 580-582 (2006).
118. Thomas, M., *et al.* Myostatin, a negative regulator of muscle growth, functions by inhibiting myoblast proliferation. *The Journal of biological chemistry* **275**, 40235-40243 (2000).
119. Joulia, D., *et al.* Mechanisms involved in the inhibition of myoblast proliferation and differentiation by myostatin. *Experimental cell research* **286**, 263-275 (2003).
120. Langley, B., *et al.* Myostatin inhibits myoblast differentiation by down-regulating MyoD expression. *The Journal of biological chemistry* **277**, 49831-49840 (2002).
121. Rios, R., Carneiro, I., Arce, V.M. & Devesa, J. Myostatin is an inhibitor of myogenic differentiation. *American journal of physiology. Cell physiology* **282**, C993-999 (2002).
122. Wagner, K.R., Liu, X., Chang, X. & Allen, R.E. Muscle regeneration in the prolonged absence of myostatin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 2519-2524 (2005).
123. McCroskery, S., *et al.* Improved muscle healing through enhanced regeneration and reduced fibrosis in myostatin-null mice. *J Cell Sci* **118**, 3531-3541 (2005).
124. McFarlane, C., *et al.* Myostatin induces cachexia by activating the ubiquitin proteolytic system through an NF-kappaB-independent, FoxO1-dependent mechanism. *Journal of cellular physiology* **209**, 501-514 (2006).
125. Bogdanovich, S., *et al.* Functional improvement of dystrophic muscle by myostatin blockade. *Nature* **420**, 418-421 (2002).
126. Patel, K. & Amthor, H. The function of Myostatin and strategies of Myostatin blockade-new hope for therapies aimed at promoting growth of skeletal muscle. *Neuromuscular disorders : NMD* **15**, 117-126 (2005).

127. Reardon, K.A., Davis, J., Kapsa, R.M., Choong, P. & Byrne, E. Myostatin, insulin-like growth factor-1, and leukemia inhibitory factor mRNAs are upregulated in chronic human disuse muscle atrophy. *Muscle & nerve* **24**, 893-899 (2001).
128. Dasarathy, S., Dodig, M., Muc, S.M., Kalhan, S.C. & McCullough, A.J. Skeletal muscle atrophy is associated with an increased expression of myostatin and impaired satellite cell function in the portacaval anastomosis rat. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* **287**, G1124-1130 (2004).
129. Sun, D.F., Chen, Y. & Rabkin, R. Work-induced changes in skeletal muscle IGF-1 and myostatin gene expression in uremia. *Kidney international* **70**, 453-459 (2006).
130. Liu, C.M., *et al.* Myostatin antisense RNA-mediated muscle growth in normal and cancer cachexia mice. *Gene therapy* **15**, 155-160 (2008).
131. Siriatt, V., *et al.* Antagonism of myostatin enhances muscle regeneration during sarcopenia. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* **15**, 1463-1470 (2007).
132. Bogdanovich, S., Perkins, K.J., Krag, T.O., Whittemore, L.A. & Khurana, T.S. Myostatin propeptide-mediated amelioration of dystrophic pathophysiology. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **19**, 543-549 (2005).
133. Murphy, K.T., *et al.* Antibody-directed myostatin inhibition improves diaphragm pathology in young but not adult dystrophic mdx mice. *The American journal of pathology* **176**, 2425-2434 (2010).
134. Wagner, K.R., McPherron, A.C., Winik, N. & Lee, S.J. Loss of myostatin attenuates severity of muscular dystrophy in mdx mice. *Annals of neurology* **52**, 832-836 (2002).
135. Benabdallah, B.F., Bouchentouf, M. & Tremblay, J.P. Improved success of myoblast transplantation in mdx mice by blocking the myostatin signal. *Transplantation* **79**, 1696-1702 (2005).
136. Minetti, G.C., *et al.* Functional and morphological recovery of dystrophic muscles in mice treated with deacetylase inhibitors. *Nature medicine* **12**, 1147-1150 (2006).
137. Parsons, S.A., Millay, D.P., Sargent, M.A., McNally, E.M. & Molkenkin, J.D. Age-dependent effect of myostatin blockade on disease severity in a murine model of limb-girdle muscular dystrophy. *The American journal of pathology* **168**, 1975-1985 (2006).
138. Ohsawa, Y., *et al.* Muscular atrophy of caveolin-3-deficient mice is rescued by myostatin inhibition. *The Journal of clinical investigation* **116**, 2924-2934 (2006).
139. Zhou, X., *et al.* Reversal of cancer cachexia and muscle wasting by ActRIIB antagonism leads to prolonged survival. *Cell* **142**, 531-543 (2010).
140. Benny Klimek, M.E., *et al.* Acute inhibition of myostatin-family proteins preserves skeletal muscle in mouse models of cancer cachexia. *Biochemical and biophysical research communications* **391**, 1548-1554 (2010).
141. Murphy, K.T., *et al.* Antibody-directed myostatin inhibition enhances muscle mass and function in tumor-bearing mice. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* **301**, R716-726 (2011).
142. Qiao, C., *et al.* Hydrodynamic limb vein injection of adeno-associated virus serotype 8 vector carrying canine myostatin propeptide gene into normal dogs enhances muscle growth. *Human gene therapy* **20**, 1-10 (2009).
143. Bartoli, M., *et al.* AAV-mediated delivery of a mutated myostatin propeptide ameliorates calpain 3 but not alpha-sarcoglycan deficiency. *Gene therapy* **14**, 733-740 (2007).
144. Qiao, C., *et al.* Myostatin propeptide gene delivery by adeno-associated virus serotype 8 vectors enhances muscle growth and ameliorates dystrophic phenotypes in mdx mice. *Human gene therapy* **19**, 241-254 (2008).
145. Magee, T.R., *et al.* Myostatin short interfering hairpin RNA gene transfer increases skeletal muscle mass. *The journal of gene medicine* **8**, 1171-1181 (2006).
146. Kinouchi, N., *et al.* Atelocollagen-mediated local and systemic applications of myostatin-targeting siRNA increase skeletal muscle mass. *Gene therapy* **15**, 1126-1130 (2008).

147. Li, Z.F., Shelton, G.D. & Engvall, E. Elimination of myostatin does not combat muscular dystrophy in dy mice but increases postnatal lethality. *The American journal of pathology* **166**, 491-497 (2005).
148. Amthor, H., *et al.* Lack of myostatin results in excessive muscle growth but impaired force generation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 1835-1840 (2007).
149. Lin, J., *et al.* Myostatin knockout in mice increases myogenesis and decreases adipogenesis. *Biochemical and biophysical research communications* **291**, 701-706 (2002).
150. Bernardo, B.L., *et al.* Postnatal PPARdelta activation and myostatin inhibition exert distinct yet complimentary effects on the metabolic profile of obese insulin-resistant mice. *PLoS one* **5**, e11307 (2010).
151. Yang, J. & Zhao, B. Postnatal expression of myostatin propeptide cDNA maintained high muscle growth and normal adipose tissue mass in transgenic mice fed a high-fat diet. *Molecular reproduction and development* **73**, 462-469 (2006).
152. Zhao, B., Wall, R.J. & Yang, J. Transgenic expression of myostatin propeptide prevents diet-induced obesity and insulin resistance. *Biochemical and biophysical research communications* **337**, 248-255 (2005).
153. Akpan, I., *et al.* The effects of a soluble activin type IIB receptor on obesity and insulin sensitivity. *International journal of obesity* **33**, 1265-1273 (2009).
154. McKoy, G., Bicknell, K.A., Patel, K. & Brooks, G. Developmental expression of myostatin in cardiomyocytes and its effect on foetal and neonatal rat cardiomyocyte proliferation. *Cardiovascular research* **74**, 304-312 (2007).
155. Torrado, M., Iglesias, R., Nespereira, B. & Mikhailov, A.T. Identification of candidate genes potentially relevant to chamber-specific remodeling in postnatal ventricular myocardium. *Journal of biomedicine & biotechnology* **2010**, 603159 (2010).
156. Shyu, K.G., Lu, M.J., Wang, B.W., Sun, H.Y. & Chang, H. Myostatin expression in ventricular myocardium in a rat model of volume-overload heart failure. *European journal of clinical investigation* **36**, 713-719 (2006).
157. George, I., *et al.* Myostatin activation in patients with advanced heart failure and after mechanical unloading. *European journal of heart failure* **12**, 444-453 (2010).
158. Gruson, D., Ahn, S.A., Ketelslegers, J.M. & Rousseau, M.F. Increased plasma myostatin in heart failure. *Eur J Heart Fail* **13**, 734-736 (2011).
159. Lenk, K., *et al.* Impact of exercise training on myostatin expression in the myocardium and skeletal muscle in a chronic heart failure model. *European journal of heart failure* **11**, 342-348 (2009).
160. Shyu, K.G., Ko, W.H., Yang, W.S., Wang, B.W. & Kuan, P. Insulin-like growth factor-1 mediates stretch-induced upregulation of myostatin expression in neonatal rat cardiomyocytes. *Cardiovasc Res* **68**, 405-414 (2005).
161. Cook, S.A., Matsui, T., Li, L. & Rosenzweig, A. Transcriptional effects of chronic Akt activation in the heart. *The Journal of biological chemistry* **277**, 22528-22533 (2002).
162. Bish, L.T., Morine, K.J., Sleeper, M.M. & Sweeney, H.L. Myostatin is upregulated following stress in an Erk-dependent manner and negatively regulates cardiomyocyte growth in culture and in a mouse model. *PLoS One* **5**, e10230 (2010).
163. Bish, L.T., *et al.* Myostatin is elevated in congenital heart disease and after mechanical unloading. *PLoS one* **6**, e23818 (2011).
164. Fernandez-Sola, J., *et al.* Increased myostatin activity and decreased myocyte proliferation in chronic alcoholic cardiomyopathy. *Alcoholism, clinical and experimental research* **35**, 1220-1229 (2011).
165. Morissette, M.R., *et al.* Myostatin regulates cardiomyocyte growth through modulation of Akt signaling. *Circulation research* **99**, 15-24 (2006).

166. Cohn, R.D., Liang, H.Y., Shetty, R., Abraham, T. & Wagner, K.R. Myostatin does not regulate cardiac hypertrophy or fibrosis. *Neuromuscular disorders : NMD* **17**, 290-296 (2007).
167. Rodgers, B.D., *et al.* Myostatin represses physiological hypertrophy of the heart and excitation-contraction coupling. *The Journal of physiology* **587**, 4873-4886 (2009).
168. Jackson, M.F., *et al.* The aging myostatin null phenotype: reduced adiposity, cardiac hypertrophy, enhanced cardiac stress response, and sexual dimorphism. *The Journal of endocrinology* **213**, 263-275 (2012).
169. Artaza, J.N., *et al.* Alterations in myostatin expression are associated with changes in cardiac left ventricular mass but not ejection fraction in the mouse. *The Journal of endocrinology* **194**, 63-76 (2007).
170. Heineke, J., *et al.* Genetic deletion of myostatin from the heart prevents skeletal muscle atrophy in heart failure. *Circulation* **121**, 419-425 (2010).
171. Goldspink, G. Loss of muscle strength during aging studied at the gene level. *Rejuvenation research* **10**, 397-405 (2007).
172. Salmon, W.D., Jr. & Daughaday, W.H. A hormonally controlled serum factor which stimulates sulfate incorporation by cartilage in vitro. *The Journal of laboratory and clinical medicine* **49**, 825-836 (1957).
173. Froesch, E.R., Buergi, H., Ramseier, E.B., Bally, P. & Labhart, A. Antibody-Suppressible and Nonsuppressible Insulin-Like Activities in Human Serum and Their Physiologic Significance. An Insulin Assay with Adipose Tissue of Increased Precision and Specificity. *The Journal of clinical investigation* **42**, 1816-1834 (1963).
174. Megyesi, K., *et al.* Insulin and non-suppressible insulin-like activity (NSILA-s): evidence for separate plasma membrane receptor sites. *Biochemical and biophysical research communications* **57**, 307-315 (1974).
175. Rinderknecht, E. & Humbel, R.E. Amino-terminal sequences of two polypeptides from human serum with nonsuppressible insulin-like and cell-growth-promoting activities: evidence for structural homology with insulin B chain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **73**, 4379-4381 (1976).
176. Rinderknecht, E. & Humbel, R.E. The amino acid sequence of human insulin-like growth factor I and its structural homology with proinsulin. *The Journal of biological chemistry* **253**, 2769-2776 (1978).
177. LeRoith, D. & Roberts, C.T., Jr. Insulin-like growth factors. *Annals of the New York Academy of Sciences* **692**, 1-9 (1993).
178. Liu, J.P., Baker, J., Perkins, A.S., Robertson, E.J. & Efstratiadis, A. Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (Igf-1) and type 1 IGF receptor (Igf1r). *Cell* **75**, 59-72 (1993).
179. Baker, J., Liu, J.P., Robertson, E.J. & Efstratiadis, A. Role of insulin-like growth factors in embryonic and postnatal growth. *Cell* **75**, 73-82 (1993).
180. Powell-Braxton, L., *et al.* IGF-I is required for normal embryonic growth in mice. *Genes & development* **7**, 2609-2617 (1993).
181. Baker, J., *et al.* Effects of an Igf1 gene null mutation on mouse reproduction. *Molecular endocrinology* **10**, 903-918 (1996).
182. Woods, K.A., Camacho-Hubner, C., Savage, M.O. & Clark, A.J. Intrauterine growth retardation and postnatal growth failure associated with deletion of the insulin-like growth factor I gene. *The New England journal of medicine* **335**, 1363-1367 (1996).
183. Yakar, S., *et al.* Normal growth and development in the absence of hepatic insulin-like growth factor I. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 7324-7329 (1999).
184. Mathews, L.S., *et al.* Growth enhancement of transgenic mice expressing human insulin-like growth factor I. *Endocrinology* **123**, 2827-2833 (1988).
185. Barton-Davis, E.R., Shoturma, D.I., Musaro, A., Rosenthal, N. & Sweeney, H.L. Viral mediated expression of insulin-like growth factor I blocks the aging-related loss of skeletal muscle

- function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 15603-15607 (1998).
186. Barton, E.R., Morris, L., Musaro, A., Rosenthal, N. & Sweeney, H.L. Muscle-specific expression of insulin-like growth factor I counters muscle decline in mdx mice. *The Journal of cell biology* **157**, 137-148 (2002).
 187. Coleman, M.E., *et al.* Myogenic vector expression of insulin-like growth factor I stimulates muscle cell differentiation and myofiber hypertrophy in transgenic mice. *The Journal of biological chemistry* **270**, 12109-12116 (1995).
 188. Kaspar, B.K., Llado, J., Sherkat, N., Rothstein, J.D. & Gage, F.H. Retrograde viral delivery of IGF-1 prolongs survival in a mouse ALS model. *Science* **301**, 839-842 (2003).
 189. Musaro, A., *et al.* Localized Igf-1 transgene expression sustains hypertrophy and regeneration in senescent skeletal muscle. *Nature genetics* **27**, 195-200 (2001).
 190. Shavlakadze, T., Winn, N., Rosenthal, N. & Grounds, M.D. Reconciling data from transgenic mice that overexpress IGF-I specifically in skeletal muscle. *Growth hormone & IGF research : official journal of the Growth Hormone Research Society and the International IGF Research Society* **15**, 4-18 (2005).
 191. LeRoith, D. & Roberts, C.T., Jr. Insulin-like growth factor I (IGF-I): a molecular basis for endocrine versus local action? *Molecular and cellular endocrinology* **77**, C57-61 (1991).
 192. Yang, S., Alnaqeeb, M., Simpson, H. & Goldspink, G. Cloning and characterization of an IGF-1 isoform expressed in skeletal muscle subjected to stretch. *Journal of muscle research and cell motility* **17**, 487-495 (1996).
 193. McKoy, G., *et al.* Expression of insulin growth factor-1 splice variants and structural genes in rabbit skeletal muscle induced by stretch and stimulation. *The Journal of physiology* **516 (Pt 2)**, 583-592 (1999).
 194. Goldspink, G. Age-related loss of skeletal muscle function; impairment of gene expression. *Journal of musculoskeletal & neuronal interactions* **4**, 143-147 (2004).
 195. Hameed, M., Orrell, R.W., Cobbold, M., Goldspink, G. & Harridge, S.D. Expression of IGF-I splice variants in young and old human skeletal muscle after high resistance exercise. *The Journal of physiology* **547**, 247-254 (2003).
 196. Bach, M.A., Roberts, C.T., Jr., Smith, E.P. & LeRoith, D. Alternative splicing produces messenger RNAs encoding insulin-like growth factor-I prohormones that are differentially glycosylated in vitro. *Molecular endocrinology* **4**, 899-904 (1990).
 197. Goldspink, G. Cloning of local growth factors involved in the determination of muscle mass. *British journal of sports medicine* **34**, 159-160 (2000).
 198. Musaro, A., *et al.* Stem cell-mediated muscle regeneration is enhanced by local isoform of insulin-like growth factor 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 1206-1210 (2004).
 199. Goldspink, G. Mechanical signals, IGF-I gene splicing, and muscle adaptation. *Physiology (Bethesda)* **20**, 232-238 (2005).
 200. Le Roith, D. Seminars in medicine of the Beth Israel Deaconess Medical Center. Insulin-like growth factors. *The New England journal of medicine* **336**, 633-640 (1997).
 201. Mathews, L.S., Norstedt, G. & Palmiter, R.D. Regulation of insulin-like growth factor I gene expression by growth hormone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **83**, 9343-9347 (1986).
 202. Le Roith, D., Bondy, C., Yakar, S., Liu, J.L. & Butler, A. The somatomedin hypothesis: 2001. *Endocrine reviews* **22**, 53-74 (2001).
 203. Isgaard, J., *et al.* Regulation of insulin-like growth factor messenger ribonucleic acid in rat growth plate by growth hormone. *Endocrinology* **122**, 1515-1520 (1988).
 204. Clemmons, D.R. & Van Wyk, J.J. Factors controlling blood concentration of somatomedin C. *Clinics in endocrinology and metabolism* **13**, 113-143 (1984).

205. De Meyts, P. & Whittaker, J. Structural biology of insulin and IGF1 receptors: implications for drug design. *Nature reviews. Drug discovery* **1**, 769-783 (2002).
206. Daughaday, W.H. & Rotwein, P. Insulin-like growth factors I and II. Peptide, messenger ribonucleic acid and gene structures, serum, and tissue concentrations. *Endocrine reviews* **10**, 68-91 (1989).
207. Jones, J.I. & Clemmons, D.R. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocrine reviews* **16**, 3-34 (1995).
208. Barton-Davis, E.R., Shoturma, D.I. & Sweeney, H.L. Contribution of satellite cells to IGF-I induced hypertrophy of skeletal muscle. *Acta physiologica Scandinavica* **167**, 301-305 (1999).
209. Edwall, D., Schalling, M., Jennische, E. & Norstedt, G. Induction of insulin-like growth factor I messenger ribonucleic acid during regeneration of rat skeletal muscle. *Endocrinology* **124**, 820-825 (1989).
210. DeVol, D.L., Rotwein, P., Sadow, J.L., Novakofski, J. & Bechtel, P.J. Activation of insulin-like growth factor gene expression during work-induced skeletal muscle growth. *The American journal of physiology* **259**, E89-95 (1990).
211. Bamman, M.M., Petrella, J.K., Kim, J.S., Mayhew, D.L. & Cross, J.M. Cluster analysis tests the importance of myogenic gene expression during myofiber hypertrophy in humans. *Journal of applied physiology* **102**, 2232-2239 (2007).
212. Engert, J.C., Berglund, E.B. & Rosenthal, N. Proliferation precedes differentiation in IGF-I-stimulated myogenesis. *The Journal of cell biology* **135**, 431-440 (1996).
213. Adi, S., Bin-Abbas, B., Wu, N.Y. & Rosenthal, S.M. Early stimulation and late inhibition of extracellular signal-regulated kinase 1/2 phosphorylation by IGF-I: a potential mechanism mediating the switch in IGF-I action on skeletal muscle cell differentiation. *Endocrinology* **143**, 511-516 (2002).
214. Mukherjee, A., Wilson, E.M. & Rotwein, P. Insulin-like growth factor (IGF) binding protein-5 blocks skeletal muscle differentiation by inhibiting IGF actions. *Molecular endocrinology* **22**, 206-215 (2008).
215. Jacquemin, V., Butler-Browne, G.S., Furling, D. & Mouly, V. IL-13 mediates the recruitment of reserve cells for fusion during IGF-1-induced hypertrophy of human myotubes. *Journal of cell science* **120**, 670-681 (2007).
216. James, P.L., Stewart, C.E. & Rotwein, P. Insulin-like growth factor binding protein-5 modulates muscle differentiation through an insulin-like growth factor-dependent mechanism. *The Journal of cell biology* **133**, 683-693 (1996).
217. Florini, J.R. & Ewton, D.Z. Highly specific inhibition of IGF-I-stimulated differentiation by an antisense oligodeoxyribonucleotide to myogenin mRNA. No effects on other actions of IGF-T. *The Journal of biological chemistry* **265**, 13435-13437 (1990).
218. Tureckova, J., Wilson, E.M., Cappalonga, J.L. & Rotwein, P. Insulin-like growth factor-mediated muscle differentiation: collaboration between phosphatidylinositol 3-kinase-Akt-signaling pathways and myogenin. *The Journal of biological chemistry* **276**, 39264-39270 (2001).
219. Satchek, J.M., Ohtsuka, A., McLary, S.C. & Goldberg, A.L. IGF-I stimulates muscle growth by suppressing protein breakdown and expression of atrophy-related ubiquitin ligases, atrogin-1 and MuRF1. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* **287**, E591-601 (2004).
220. Laviola, L., Natalicchio, A. & Giorgino, F. The IGF-I signaling pathway. *Current pharmaceutical design* **13**, 663-669 (2007).
221. Rosenfeld, R.G. & Hwa, V. The growth hormone cascade and its role in mammalian growth. *Hormone research* **71 Suppl 2**, 36-40 (2009).
222. Kelley, K.M., et al. Insulin-like growth factor-binding proteins (IGFBPs) and their regulatory dynamics. *The international journal of biochemistry & cell biology* **28**, 619-637 (1996).
223. Laron, Z. Insulin-like growth factor 1 (IGF-1): a growth hormone. *Molecular pathology : MP* **54**, 311-316 (2001).

224. Baxter, R.C. Insulin-like growth factor (IGF)-binding proteins: interactions with IGFs and intrinsic bioactivities. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* **278**, E967-976 (2000).
225. Guler, H.P., Zapf, J., Schmid, C. & Froesch, E.R. Insulin-like growth factors I and II in healthy man. Estimations of half-lives and production rates. *Acta endocrinologica* **121**, 753-758 (1989).
226. Kim, J.J. & Accili, D. Signalling through IGF-I and insulin receptors: where is the specificity? *Growth hormone & IGF research : official journal of the Growth Hormone Research Society and the International IGF Research Society* **12**, 84-90 (2002).
227. De Meyts, P., *et al.* Role of the time factor in signaling specificity: application to mitogenic and metabolic signaling by the insulin and insulin-like growth factor-I receptor tyrosine kinases. *Metabolism: clinical and experimental* **44**, 2-11 (1995).
228. Riedemann, J. & Macaulay, V.M. IGF1R signalling and its inhibition. *Endocrine-related cancer* **13 Suppl 1**, S33-43 (2006).
229. Soos, M.A. & Siddle, K. Immunological relationships between receptors for insulin and insulin-like growth factor I. Evidence for structural heterogeneity of insulin-like growth factor I receptors involving hybrids with insulin receptors. *The Biochemical journal* **263**, 553-563 (1989).
230. Moxham, C.P., Duronio, V. & Jacobs, S. Insulin-like growth factor I receptor beta-subunit heterogeneity. Evidence for hybrid tetramers composed of insulin-like growth factor I and insulin receptor heterodimers. *The Journal of biological chemistry* **264**, 13238-13244 (1989).
231. Treadway, J.L., Morrison, B.D., Goldfine, I.D. & Pessin, J.E. Assembly of insulin/insulin-like growth factor-1 hybrid receptors in vitro. *The Journal of biological chemistry* **264**, 21450-21453 (1989).
232. Soos, M.A., Field, C.E. & Siddle, K. Purified hybrid insulin/insulin-like growth factor-I receptors bind insulin-like growth factor-I, but not insulin, with high affinity. *The Biochemical journal* **290 (Pt 2)**, 419-426 (1993).
233. Ullrich, A., *et al.* Insulin-like growth factor I receptor primary structure: comparison with insulin receptor suggests structural determinants that define functional specificity. *The EMBO journal* **5**, 2503-2512 (1986).
234. Araki, E., *et al.* Alternative pathway of insulin signalling in mice with targeted disruption of the IRS-1 gene. *Nature* **372**, 186-190 (1994).
235. Tamemoto, H., *et al.* Insulin resistance and growth retardation in mice lacking insulin receptor substrate-1. *Nature* **372**, 182-186 (1994).
236. Rother, K.I., *et al.* Evidence that IRS-2 phosphorylation is required for insulin action in hepatocytes. *The Journal of biological chemistry* **273**, 17491-17497 (1998).
237. Blakesley, V.A., Scrimgeour, A., Esposito, D. & Le Roith, D. Signaling via the insulin-like growth factor-I receptor: does it differ from insulin receptor signaling? *Cytokine & growth factor reviews* **7**, 153-159 (1996).
238. Dupont, J. & LeRoith, D. Insulin and insulin-like growth factor I receptors: similarities and differences in signal transduction. *Hormone research* **55 Suppl 2**, 22-26 (2001).
239. Giorgetti, S., Ballotti, R., Kowalski-Chauvel, A., Tartare, S. & Van Obberghen, E. The insulin and insulin-like growth factor-I receptor substrate IRS-1 associates with and activates phosphatidylinositol 3-kinase in vitro. *The Journal of biological chemistry* **268**, 7358-7364 (1993).
240. Vanhaesebroeck, B. & Alessi, D.R. The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB. *The Biochemical journal* **346 Pt 3**, 561-576 (2000).
241. Cianfarani, S., Geremia, C., Puglianiello, A., Maiorana, A. & Germani, D. Late effects of disturbed IGF signaling in congenital diseases. *Endocrine development* **11**, 16-27 (2007).
242. Petley, T., Graff, K., Jiang, W., Yang, H. & Florini, J. Variation among cell types in the signaling pathways by which IGF-I stimulates specific cellular responses. *Hormone and metabolic*

- research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et metabolisme* **31**, 70-76 (1999).
243. Shepherd, P.R., Withers, D.J. & Siddle, K. Phosphoinositide 3-kinase: the key switch mechanism in insulin signalling. *The Biochemical journal* **333 (Pt 3)**, 471-490 (1998).
 244. Stitt, T.N., *et al.* The IGF-1/PI3K/Akt pathway prevents expression of muscle atrophy-induced ubiquitin ligases by inhibiting FOXO transcription factors. *Molecular cell* **14**, 395-403 (2004).
 245. Sandri, M., *et al.* Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. *Cell* **117**, 399-412 (2004).
 246. Li, B.G., Hasselgren, P.O., Fang, C.H. & Warden, G.D. Insulin-like growth factor-I blocks dexamethasone-induced protein degradation in cultured myotubes by inhibiting multiple proteolytic pathways: 2002 ABA paper. *The Journal of burn care & rehabilitation* **25**, 112-118 (2004).
 247. Hanaoka, B.Y., Peterson, C.A. & Crofford, L.J. Glucocorticoid effects on skeletal muscle: benefit and risk in patients with autoimmune inflammatory rheumatoid diseases. *Expert review of clinical immunology* **8**, 695-697 (2012).
 248. Grey, A., Chen, Q., Xu, X., Callon, K. & Cornish, J. Parallel phosphatidylinositol-3 kinase and p42/44 mitogen-activated protein kinase signaling pathways subserve the mitogenic and antiapoptotic actions of insulin-like growth factor I in osteoblastic cells. *Endocrinology* **144**, 4886-4893 (2003).
 249. Derijard, B., *et al.* JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain. *Cell* **76**, 1025-1037 (1994).
 250. Han, J., Lee, J.D., Bibbs, L. & Ulevitch, R.J. A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science* **265**, 808-811 (1994).
 251. Rouse, J., *et al.* A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins. *Cell* **78**, 1027-1037 (1994).
 252. Davis, R.J. The mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *The Journal of biological chemistry* **268**, 14553-14556 (1993).
 253. Bok, R.A. & Small, E.J. Bloodborne biomolecular markers in prostate cancer development and progression. *Nature reviews. Cancer* **2**, 918-926 (2002).
 254. Ullrich, A. & Schlessinger, J. Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* **61**, 203-212 (1990).
 255. Haruta, T., *et al.* A rapamycin-sensitive pathway down-regulates insulin signaling via phosphorylation and proteasomal degradation of insulin receptor substrate-1. *Molecular endocrinology* **14**, 783-794 (2000).
 256. Nagoshi, T., *et al.* PI3K rescues the detrimental effects of chronic Akt activation in the heart during ischemia/reperfusion injury. *The Journal of clinical investigation* **115**, 2128-2138 (2005).
 257. Neri Serneri, G.G., *et al.* Increased cardiac sympathetic activity and insulin-like growth factor-I formation are associated with physiological hypertrophy in athletes. *Circulation research* **89**, 977-982 (2001).
 258. Koziris, L.P., *et al.* Serum levels of total and free IGF-I and IGFBP-3 are increased and maintained in long-term training. *Journal of applied physiology* **86**, 1436-1442 (1999).
 259. Yeh, J.K., *et al.* Effect of growth hormone administration and treadmill exercise on serum and skeletal IGF-I in rats. *The American journal of physiology* **266**, E129-135 (1994).
 260. Donohue, T.J., *et al.* Induction of myocardial insulin-like growth factor-I gene expression in left ventricular hypertrophy. *Circulation* **89**, 799-809 (1994).
 261. Ren, J., Jefferson, L., Sowers, J.R. & Brown, R.A. Influence of age on contractile response to insulin-like growth factor 1 in ventricular myocytes from spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* **34**, 1215-1222 (1999).
 262. Ren, J., Samson, W.K. & Sowers, J.R. Insulin-like growth factor I as a cardiac hormone: physiological and pathophysiological implications in heart disease. *Journal of molecular and cellular cardiology* **31**, 2049-2061 (1999).

263. Reiss, K., *et al.* Upregulation of IGF1, IGF1-receptor, and late growth related genes in ventricular myocytes acutely after infarction in rats. *Journal of cellular physiology* **158**, 160-168 (1994).
264. Kontoleon, P.E., *et al.* Hormonal profile in patients with congestive heart failure. *International journal of cardiology* **87**, 179-183 (2003).
265. Roubenoff, R., *et al.* Cytokines, insulin-like growth factor 1, sarcopenia, and mortality in very old community-dwelling men and women: the Framingham Heart Study. *The American journal of medicine* **115**, 429-435 (2003).
266. Watanabe, S., *et al.* Insulin-like growth factor axis (insulin-like growth factor-I/insulin-like growth factor-binding protein-3) as a prognostic predictor of heart failure: association with adiponectin. *European journal of heart failure* **12**, 1214-1222 (2010).
267. Juul, A., Scheike, T., Davidsen, M., Gyllenborg, J. & Jorgensen, T. Low serum insulin-like growth factor I is associated with increased risk of ischemic heart disease: a population-based case-control study. *Circulation* **106**, 939-944 (2002).
268. Vasan, R.S., *et al.* Serum insulin-like growth factor I and risk for heart failure in elderly individuals without a previous myocardial infarction: the Framingham Heart Study. *Annals of internal medicine* **139**, 642-648 (2003).
269. Laughlin, G.A., Barrett-Connor, E., Criqui, M.H. & Kritiz-Silverstein, D. The prospective association of serum insulin-like growth factor I (IGF-I) and IGF-binding protein-1 levels with all cause and cardiovascular disease mortality in older adults: the Rancho Bernardo Study. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **89**, 114-120 (2004).
270. Conti, E., *et al.* Markedly reduced insulin-like growth factor-1 in the acute phase of myocardial infarction. *Journal of the American College of Cardiology* **38**, 26-32 (2001).
271. Laron, Z., Klinger, B. & Silbergeld, A. Patients with Laron syndrome have Osteopenia/Osteoporosis. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* **14**, 156-157 (1999).
272. Feinberg, M.S., Scheinowitz, M. & Laron, Z. Echocardiographic dimensions and function in adults with primary growth hormone resistance (Laron syndrome). *The American journal of cardiology* **85**, 209-213 (2000).
273. Ito, H., *et al.* Insulin-like growth factor-I induces hypertrophy with enhanced expression of muscle specific genes in cultured rat cardiomyocytes. *Circulation* **87**, 1715-1721 (1993).
274. Foncea, R., *et al.* Insulin-like growth factor-I rapidly activates multiple signal transduction pathways in cultured rat cardiac myocytes. *The Journal of biological chemistry* **272**, 19115-19124 (1997).
275. Bark, T.H., McNurlan, M.A., Lang, C.H. & Garlick, P.J. Increased protein synthesis after acute IGF-I or insulin infusion is localized to muscle in mice. *The American journal of physiology* **275**, E118-123 (1998).
276. Duerr, R.L., *et al.* Insulin-like growth factor-1 enhances ventricular hypertrophy and function during the onset of experimental cardiac failure. *The Journal of clinical investigation* **95**, 619-627 (1995).
277. Buerke, M., *et al.* Cardioprotective effect of insulin-like growth factor I in myocardial ischemia followed by reperfusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**, 8031-8035 (1995).
278. Friehs, I., Stamm, C., Cao-Danh, H., McGowan, F.X. & del Nido, P.J. Insulin-like growth factor-1 improves postischemic recovery in hypertrophied hearts. *The Annals of thoracic surgery* **72**, 1650-1656 (2001).
279. Otani, H., *et al.* Insulin-like growth factor-I improves recovery of cardiac performance during reperfusion in isolated rat heart by a wortmannin-sensitive mechanism. *Journal of cardiovascular pharmacology* **35**, 275-281 (2000).

280. Carroll, P.V., *et al.* IGF-I treatment in adults with type 1 diabetes: effects on glucose and protein metabolism in the fasting state and during a hyperinsulinemic-euglycemic amino acid clamp. *Diabetes* **49**, 789-796 (2000).
281. Norby, F.L., Wold, L.E., Duan, J., Hintz, K.K. & Ren, J. IGF-I attenuates diabetes-induced cardiac contractile dysfunction in ventricular myocytes. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* **283**, E658-666 (2002).
282. McMullen, J.R., *et al.* The insulin-like growth factor 1 receptor induces physiological heart growth via the phosphoinositide 3-kinase(p110alpha) pathway. *The Journal of biological chemistry* **279**, 4782-4793 (2004).
283. Reiss, K., *et al.* Overexpression of insulin-like growth factor-1 in the heart is coupled with myocyte proliferation in transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 8630-8635 (1996).
284. Delaughter, M.C., Taffet, G.E., Fiorotto, M.L., Entman, M.L. & Schwartz, R.J. Local insulin-like growth factor I expression induces physiologic, then pathologic, cardiac hypertrophy in transgenic mice. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **13**, 1923-1929 (1999).
285. Torella, D., *et al.* Cardiac stem cell and myocyte aging, heart failure, and insulin-like growth factor-1 overexpression. *Circulation research* **94**, 514-524 (2004).
286. Palmén, M., *et al.* Cardiac remodeling after myocardial infarction is impaired in IGF-1 deficient mice. *Cardiovascular research* **50**, 516-524 (2001).
287. Shioi, T., *et al.* The conserved phosphoinositide 3-kinase pathway determines heart size in mice. *The EMBO journal* **19**, 2537-2548 (2000).
288. Luo, J., *et al.* Class IA phosphoinositide 3-kinase regulates heart size and physiological cardiac hypertrophy. *Molecular and cellular biology* **25**, 9491-9502 (2005).
289. Welch, S., *et al.* Cardiac-specific IGF-1 expression attenuates dilated cardiomyopathy in tropomodulin-overexpressing transgenic mice. *Circulation research* **90**, 641-648 (2002).
290. McMullen, J.R., *et al.* Protective effects of exercise and phosphoinositide 3-kinase(p110alpha) signaling in dilated and hypertrophic cardiomyopathy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 612-617 (2007).
291. Li, B., *et al.* Insulin-like growth factor-1 attenuates the detrimental impact of nonocclusive coronary artery constriction on the heart. *Circulation research* **84**, 1007-1019 (1999).
292. Kajstura, J., *et al.* IGF-1 overexpression inhibits the development of diabetic cardiomyopathy and angiotensin II-mediated oxidative stress. *Diabetes* **50**, 1414-1424 (2001).
293. Li, Q., *et al.* Overexpression of insulin-like growth factor-1 in mice protects from myocyte death after infarction, attenuating ventricular dilation, wall stress, and cardiac hypertrophy. *The Journal of clinical investigation* **100**, 1991-1999 (1997).
294. Ren, J., *et al.* IGF-I alleviates diabetes-induced RhoA activation, eNOS uncoupling, and myocardial dysfunction. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* **294**, R793-802 (2008).
295. Li, Q., *et al.* Cardiac-specific overexpression of insulin-like growth factor 1 attenuates aging-associated cardiac diastolic contractile dysfunction and protein damage. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* **292**, H1398-1403 (2007).
296. Wang, L., Ma, W., Markovich, R., Chen, J.W. & Wang, P.H. Regulation of cardiomyocyte apoptotic signaling by insulin-like growth factor I. *Circulation research* **83**, 516-522 (1998).
297. Shiraishi, I., *et al.* Nuclear targeting of Akt enhances kinase activity and survival of cardiomyocytes. *Circulation research* **94**, 884-891 (2004).
298. Yamashita, K., *et al.* Reperfusion-activated Akt kinase prevents apoptosis in transgenic mouse hearts overexpressing insulin-like growth factor-1. *Circulation research* **88**, 609-614 (2001).
299. Vetter, U., Kupferschmid, C., Lang, D. & Pentz, S. Insulin-like growth factors and insulin increase the contractility of neonatal rat cardiocytes in vitro. *Basic research in cardiology* **83**, 647-654 (1988).
300. Anversa, P. Aging and longevity: the IGF-1 enigma. *Circulation research* **97**, 411-414 (2005).

301. Kinugawa, S., *et al.* Positive inotropic effect of insulin-like growth factor-1 on normal and failing cardiac myocytes. *Cardiovascular research* **43**, 157-164 (1999).
302. von Lewinski, D., Voss, K., Hulsmann, S., Kogler, H. & Pieske, B. Insulin-like growth factor-1 exerts Ca²⁺-dependent positive inotropic effects in failing human myocardium. *Circulation research* **92**, 169-176 (2003).
303. Munaron, L. & Fiorio Pla, A. Calcium influx induced by activation of tyrosine kinase receptors in cultured bovine aortic endothelial cells. *Journal of cellular physiology* **185**, 454-463 (2000).
304. Miyamoto, S., Howes, A.L., Adams, J.W., Dorn, G.W., 2nd & Brown, J.H. Ca²⁺ dysregulation induces mitochondrial depolarization and apoptosis: role of Na⁺/Ca²⁺ exchanger and AKT. *The Journal of biological chemistry* **280**, 38505-38512 (2005).
305. Cittadini, A., *et al.* Insulin-like growth factor-1 but not growth hormone augments mammalian myocardial contractility by sensitizing the myofilament to Ca²⁺ through a wortmannin-sensitive pathway: studies in rat and ferret isolated muscles. *Circ Res* **83**, 50-59 (1998).
306. Cittadini, A., *et al.* Adenoviral gene transfer of Akt enhances myocardial contractility and intracellular calcium handling. *Gene therapy* **13**, 8-19 (2006).
307. Li, Q., Ceylan-Isik, A.F., Li, J. & Ren, J. Deficiency of insulin-like growth factor 1 reduces sensitivity to aging-associated cardiomyocyte dysfunction. *Rejuvenation research* **11**, 725-733 (2008).
308. Stavropoulou, A., *et al.* IGF-1 expression in infarcted myocardium and MGF E peptide actions in rat cardiomyocytes in vitro. *Molecular medicine* **15**, 127-135 (2009).
309. Carpenter, V., *et al.* Mechano-growth factor reduces loss of cardiac function in acute myocardial infarction. *Heart, lung & circulation* **17**, 33-39 (2008).
310. Dai, Z., Wu, F., Yeung, E.W. & Li, Y. IGF-IEc expression, regulation and biological function in different tissues. *Growth hormone & IGF research : official journal of the Growth Hormone Research Society and the International IGF Research Society* **20**, 275-281 (2010).
311. Rosenthal, N. & Musaro, A. Gene therapy for cardiac cachexia? *International journal of cardiology* **85**, 185-191 (2002).
312. Santini, M.P., Winn, N. & Rosenthal, N. Signalling pathways in cardiac regeneration. *Novartis Foundation symposium* **274**, 228-238; discussion 239-243, 272-226 (2006).
313. Shiojima, I., *et al.* Disruption of coordinated cardiac hypertrophy and angiogenesis contributes to the transition to heart failure. *The Journal of clinical investigation* **115**, 2108-2118 (2005).
314. Taniyama, Y., *et al.* Akt3 overexpression in the heart results in progression from adaptive to maladaptive hypertrophy. *Journal of molecular and cellular cardiology* **38**, 375-385 (2005).
315. Tsukahara, H., Gordienko, D.V., Tonshoff, B., Gelato, M.C. & Goligorsky, M.S. Direct demonstration of insulin-like growth factor-I-induced nitric oxide production by endothelial cells. *Kidney international* **45**, 598-604 (1994).
316. Amirouche, A., *et al.* Down-regulation of Akt/mammalian target of rapamycin signaling pathway in response to myostatin overexpression in skeletal muscle. *Endocrinology* **150**, 286-294 (2009).
317. Lipina, C., Kendall, H., McPherron, A.C., Taylor, P.M. & Hundal, H.S. Mechanisms involved in the enhancement of mammalian target of rapamycin signalling and hypertrophy in skeletal muscle of myostatin-deficient mice. *FEBS letters* **584**, 2403-2408 (2010).
318. Yang, W., Zhang, Y., Li, Y., Wu, Z. & Zhu, D. Myostatin induces cyclin D1 degradation to cause cell cycle arrest through a phosphatidylinositol 3-kinase/AKT/GSK-3 beta pathway and is antagonized by insulin-like growth factor 1. *The Journal of biological chemistry* **282**, 3799-3808 (2007).
319. Kurokawa, M., *et al.* Monitor of the myostatin autocrine action during differentiation of embryonic chicken myoblasts into myotubes: effect of IGF-I. *Molecular and cellular biochemistry* **331**, 193-199 (2009).

320. Valdes, J.A., *et al.* IGF-1 induces IP(3) dependent calcium signal involved in the regulation of myostatin gene expression mediated by NFAT during myoblast differentiation. *Journal of cellular physiology* (2012).
321. Morissette, M.R., *et al.* Effects of myostatin deletion in aging mice. *Aging cell* **8**, 573-583 (2009).
322. Kocamis, H., Gahr, S.A., Batelli, L., Hubbs, A.F. & Killefer, J. IGF-I, IGF-II, and IGF-receptor-1 transcript and IGF-II protein expression in myostatin knockout mice tissues. *Muscle & nerve* **26**, 55-63 (2002).
323. Williams, N.G., *et al.* Endocrine actions of myostatin: systemic regulation of the IGF and IGF binding protein axis. *Endocrinology* **152**, 172-180 (2011).
324. Braun, T. & Gautel, M. Transcriptional mechanisms regulating skeletal muscle differentiation, growth and homeostasis. *Nature reviews. Molecular cell biology* **12**, 349-361 (2011).
325. Agah, R., *et al.* Gene recombination in postmitotic cells. Targeted expression of Cre recombinase provokes cardiac-restricted, site-specific rearrangement in adult ventricular muscle in vivo. *J Clin Invest* **100**, 169-179 (1997).
326. Sohal, D.S., *et al.* Temporally regulated and tissue-specific gene manipulations in the adult and embryonic heart using a tamoxifen-inducible Cre protein. *Circ Res* **89**, 20-25 (2001).
327. Rodriguez, C.I., *et al.* High-efficiency deleter mice show that FLPe is an alternative to Cre-loxP. *Nat Genet* **25**, 139-140 (2000).
328. Lobe, C.G., *et al.* Z/AP, a double reporter for cre-mediated recombination. *Dev Biol* **208**, 281-292 (1999).
329. Liu, J.L., *et al.* Insulin-like growth factor-I affects perinatal lethality and postnatal development in a gene dosage-dependent manner: manipulation using the Cre/loxP system in transgenic mice. *Mol Endocrinol* **12**, 1452-1462 (1998).
330. Sanchez-Roman, I., *et al.* The beta-blocker atenolol lowers the longevity-related degree of fatty acid unsaturation, decreases protein oxidative damage, and increases extracellular signal-regulated kinase signaling in the heart of C57BL/6 mice. *Rejuvenation Res* **13**, 683-693.
331. Kondo, M., *et al.* Caloric restriction stimulates revascularization in response to ischemia via adiponectin-mediated activation of endothelial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem* **284**, 1718-1724 (2009).
332. Larson, A.C., *et al.* Self-gated cardiac cine MRI. *Magn Reson Med* **51**, 93-102 (2004).
333. O'Connell, T.D., Rodrigo, M.C. & Simpson, P.C. Isolation and culture of adult mouse cardiac myocytes. *Methods Mol Biol* **357**, 271-296 (2007).
334. Chomczynski, P. & Sacchi, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162**, 156-159 (1987).
335. Saiki, R.K., *et al.* Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-491 (1988).
336. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. & Randall, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**, 265-275 (1951).
337. Shyu, K.G., Lu, M.J., Wang, B.W., Sun, H.Y. & Chang, H. Myostatin expression in ventricular myocardium in a rat model of volume-overload heart failure. *Eur J Clin Invest* **36**, 713-719 (2006).
338. Lompre, A.M., Nadal-Ginard, B. & Mahdavi, V. Expression of the cardiac ventricular alpha- and beta-myosin heavy chain genes is developmentally and hormonally regulated. *J Biol Chem* **259**, 6437-6446 (1984).
339. Lyons, G.E., Schiaffino, S., Sassoon, D., Barton, P. & Buckingham, M. Developmental regulation of myosin gene expression in mouse cardiac muscle. *J Cell Biol* **111**, 2427-2436 (1990).
340. Zhu, J., *et al.* Relationships between transforming growth factor-beta1, myostatin, and decorin: implications for skeletal muscle fibrosis. *J Biol Chem* **282**, 25852-25863 (2007).
341. Li, Z.B., Kollias, H.D. & Wagner, K.R. Myostatin directly regulates skeletal muscle fibrosis. *J Biol Chem* **283**, 19371-19378 (2008).

342. Welle, S., Cardillo, A., Zanche, M. & Tawil, R. Skeletal muscle gene expression after myostatin knockout in mature mice. *Physiological genomics* **38**, 342-350 (2009).
343. Li, Z.B., Zhang, J. & Wagner, K.R. Inhibiting myostatin reverses muscle fibrosis through apoptosis. *Journal of cell science* (2012).
344. Doenst, T., *et al.* Decreased rates of substrate oxidation ex vivo predict the onset of heart failure and contractile dysfunction in rats with pressure overload. *Cardiovasc Res* **86**, 461-470.
345. Kolwicz, S.C., Jr. & Tian, R. Glucose metabolism and cardiac hypertrophy. *Cardiovasc Res* **90**, 194-201.
346. Sorokina, N., *et al.* Recruitment of compensatory pathways to sustain oxidative flux with reduced carnitine palmitoyltransferase I activity characterizes inefficiency in energy metabolism in hypertrophied hearts. *Circulation* **115**, 2033-2041 (2007).
347. Kudo, N., Barr, A.J., Barr, R.L., Desai, S. & Lopaschuk, G.D. High rates of fatty acid oxidation during reperfusion of ischemic hearts are associated with a decrease in malonyl-CoA levels due to an increase in 5'-AMP-activated protein kinase inhibition of acetyl-CoA carboxylase. *J Biol Chem* **270**, 17513-17520 (1995).
348. Xing, Y., *et al.* Glucose metabolism and energy homeostasis in mouse hearts overexpressing dominant negative alpha2 subunit of AMP-activated protein kinase. *The Journal of biological chemistry* **278**, 28372-28377 (2003).
349. Nascimben, L., *et al.* Mechanisms for increased glycolysis in the hypertrophied rat heart. *Hypertension* **44**, 662-667 (2004).
350. Tian, R., Musi, N., D'Agostino, J., Hirshman, M.F. & Goodyear, L.J. Increased adenosine monophosphate-activated protein kinase activity in rat hearts with pressure-overload hypertrophy. *Circulation* **104**, 1664-1669 (2001).
351. Allard, M.F., Parsons, H.L., Saeedi, R., Wambolt, R.B. & Brownsey, R. AMPK and metabolic adaptation by the heart to pressure overload. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **292**, H140-148 (2007).
352. Zhang, C., *et al.* Myostatin-deficient mice exhibit reduced insulin resistance through activating the AMP-activated protein kinase signalling pathway. *Diabetologia* **54**, 1491-1501 (2011).
353. Antos, C.L., *et al.* Dilated cardiomyopathy and sudden death resulting from constitutive activation of protein kinase a. *Circulation research* **89**, 997-1004 (2001).
354. Zhang, T., *et al.* The deltaC isoform of CaMKII is activated in cardiac hypertrophy and induces dilated cardiomyopathy and heart failure. *Circ Res* **92**, 912-919 (2003).
355. Braz, J.C., *et al.* PKC-alpha regulates cardiac contractility and propensity toward heart failure. *Nature medicine* **10**, 248-254 (2004).
356. Molkentin, J.D., *et al.* A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell* **93**, 215-228 (1998).
357. Lim, H.W. & Molkentin, J.D. Calcineurin and human heart failure. *Nat Med* **5**, 246-247 (1999).
358. van Oort, R.J., *et al.* MEF2 activates a genetic program promoting chamber dilation and contractile dysfunction in calcineurin-induced heart failure. *Circulation* **114**, 298-308 (2006).
359. Heximer, S.P., Watson, N., Linder, M.E., Blumer, K.J. & Hepler, J.R. RGS2/GOS8 is a selective inhibitor of Gqalpha function. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 14389-14393 (1997).
360. Nunn, C., *et al.* RGS2 inhibits beta-adrenergic receptor-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Cell Signal* **22**, 1231-1239.
361. Takimoto, E., *et al.* Regulator of G protein signaling 2 mediates cardiac compensation to pressure overload and antihypertrophic effects of PDE5 inhibition in mice. *J Clin Invest* **119**, 408-420 (2009).
362. Spiller, M.P., *et al.* The myostatin gene is a downstream target gene of basic helix-loop-helix transcription factor MyoD. *Mol Cell Biol* **22**, 7066-7082 (2002).

363. Liao, P., *et al.* The in vivo role of p38 MAP kinases in cardiac remodeling and restrictive cardiomyopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 12283-12288 (2001).
364. Zhang, S., *et al.* The role of the Grb2-p38 MAPK signaling pathway in cardiac hypertrophy and fibrosis. *J Clin Invest* **111**, 833-841 (2003).
365. Nishida, K., *et al.* p38alpha mitogen-activated protein kinase plays a critical role in cardiomyocyte survival but not in cardiac hypertrophic growth in response to pressure overload. *Molecular and cellular biology* **24**, 10611-10620 (2004).
366. Bell, G.I., Stempien, M.M., Fong, N.M. & Rall, L.B. Sequences of liver cDNAs encoding two different mouse insulin-like growth factor I precursors. *Nucleic Acids Res* **14**, 7873-7882 (1986).
367. Matheny, R.W., Jr., Nindl, B.C. & Adamo, M.L. Minireview: Mechano-growth factor: a putative product of IGF-I gene expression involved in tissue repair and regeneration. *Endocrinology* **151**, 865-875.
368. Condorelli, G., *et al.* Akt induces enhanced myocardial contractility and cell size in vivo in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 12333-12338 (2002).
369. Matsui, T., *et al.* Phenotypic spectrum caused by transgenic overexpression of activated Akt in the heart. *The Journal of biological chemistry* **277**, 22896-22901 (2002).
370. Chen, W.S., *et al.* Growth retardation and increased apoptosis in mice with homozygous disruption of the Akt1 gene. *Genes Dev* **15**, 2203-2208 (2001).
371. DeBosch, B., *et al.* Akt1 is required for physiological cardiac growth. *Circulation* **113**, 2097-2104 (2006).
372. Shioi, T., *et al.* Akt/protein kinase B promotes organ growth in transgenic mice. *Mol Cell Biol* **22**, 2799-2809 (2002).
373. Leclerc, G.M., Leclerc, G.J., Fu, G. & Barredo, J.C. AMPK-induced activation of Akt by AICAR is mediated by IGF-1R dependent and independent mechanisms in acute lymphoblastic leukemia. *J Mol Signal* **5**, 15.
374. Santini, M.P., *et al.* Enhancing repair of the mammalian heart. *Circulation research* **100**, 1732-1740 (2007).
375. Nakashima, M., Toyono, T., Akamine, A. & Joyner, A. Expression of growth/differentiation factor 11, a new member of the BMP/TGFbeta superfamily during mouse embryogenesis. *Mechanisms of development* **80**, 185-189 (1999).
376. Dolinsky, V.W. & Dyck, J.R. Role of AMP-activated protein kinase in healthy and diseased hearts. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* **291**, H2557-2569 (2006).
377. Kemaladewi, D.U., *et al.* Cell-type specific regulation of myostatin signaling. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **26**, 1462-1472 (2012).
378. Momcilovic, M., Hong, S.P. & Carlson, M. Mammalian TAK1 activates Snf1 protein kinase in yeast and phosphorylates AMP-activated protein kinase in vitro. *The Journal of biological chemistry* **281**, 25336-25343 (2006).
379. Xie, M., *et al.* A pivotal role for endogenous TGF-beta-activated kinase-1 in the LKB1/AMP-activated protein kinase energy-sensor pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 17378-17383 (2006).
380. Musi, N., *et al.* Functional role of AMP-activated protein kinase in the heart during exercise. *FEBS letters* **579**, 2045-2050 (2005).
381. Russell, R.R., 3rd, *et al.* AMP-activated protein kinase mediates ischemic glucose uptake and prevents postischemic cardiac dysfunction, apoptosis, and injury. *The Journal of clinical investigation* **114**, 495-503 (2004).
382. Fielitz, J., *et al.* Requirement of protein kinase D1 for pathological cardiac remodeling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 3059-3063 (2008).

383. Takimoto, E., *et al.* Regulator of G protein signaling 2 mediates cardiac compensation to pressure overload and antihypertrophic effects of PDE5 inhibition in mice. *J Clin Invest* **119**, 408-420 (2009).
384. Lee, S.J., *et al.* Regulation of muscle growth by multiple ligands signaling through activin type II receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 18117-18122 (2005).
385. Casas, E., Bennett, G.L., Smith, T.P. & Cundiff, L.V. Association of myostatin on early calf mortality, growth, and carcass composition traits in crossbred cattle. *Journal of animal science* **82**, 2913-2918 (2004).
386. Xu, J., *et al.* GDF15/MIC-1 functions as a protective and antihypertrophic factor released from the myocardium in association with SMAD protein activation. *Circulation research* **98**, 342-350 (2006).
387. Clemmons, D.R. Role of IGF-I in skeletal muscle mass maintenance. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* **20**, 349-356 (2009).
388. Kim, J., *et al.* Insulin-like growth factor I receptor signaling is required for exercise-induced cardiac hypertrophy. *Molecular endocrinology* **22**, 2531-2543 (2008).
389. Hunter, J.J., Tanaka, N., Rockman, H.A., Ross, J., Jr. & Chien, K.R. Ventricular expression of a MLC-2v-ras fusion gene induces cardiac hypertrophy and selective diastolic dysfunction in transgenic mice. *The Journal of biological chemistry* **270**, 23173-23178 (1995).
390. Zheng, M., *et al.* Sarcoplasmic reticulum calcium defect in Ras-induced hypertrophic cardiomyopathy heart. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* **286**, H424-433 (2004).
391. Ruan, H., *et al.* Gi alpha 1-mediated cardiac electrophysiological remodeling and arrhythmia in hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation* **116**, 596-605 (2007).
392. Bueno, O.F., *et al.* The MEK1-ERK1/2 signaling pathway promotes compensated cardiac hypertrophy in transgenic mice. *The EMBO journal* **19**, 6341-6350 (2000).
393. Harris, I.S., *et al.* Raf-1 kinase is required for cardiac hypertrophy and cardiomyocyte survival in response to pressure overload. *Circulation* **110**, 718-723 (2004).
394. Suzuki, A., *et al.* IGF-1 phosphorylates AMPK-alpha subunit in ATM-dependent and LKB1-independent manner. *Biochemical and biophysical research communications* **324**, 986-992 (2004).
395. Laustsen, P.G., *et al.* Essential role of insulin and insulin-like growth factor 1 receptor signaling in cardiac development and function. *Molecular and cellular biology* **27**, 1649-1664 (2007).
396. Crackower, M.A., *et al.* Regulation of myocardial contractility and cell size by distinct PI3K-PTEN signaling pathways. *Cell* **110**, 737-749 (2002).
397. Patrucco, E., *et al.* PI3Kgamma modulates the cardiac response to chronic pressure overload by distinct kinase-dependent and -independent effects. *Cell* **118**, 375-387 (2004).
398. Musaro, A., McCullagh, K.J., Naya, F.J., Olson, E.N. & Rosenthal, N. IGF-1 induces skeletal myocyte hypertrophy through calcineurin in association with GATA-2 and NF-ATc1. *Nature* **400**, 581-585 (1999).
399. Munoz, J.P., *et al.* The transcription factor MEF2C mediates cardiomyocyte hypertrophy induced by IGF-1 signaling. *Biochemical and biophysical research communications* **388**, 155-160 (2009).
400. Pecherskaya, A. & Solem, M. IGF1 activates PKC alpha-dependent protein synthesis in adult rat cardiomyocytes. *Molecular cell biology research communications : MCBRC* **4**, 166-171 (2000).
401. Wang, C., *et al.* TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. *Nature* **412**, 346-351 (2001).

402. Balaram, S.K., Agrawal, D.K. & Edwards, J.D. Insulin like growth factor-1 activates nuclear factor-kappaB and increases transcription of the intercellular adhesion molecule-1 gene in endothelial cells. *Cardiovascular surgery* **7**, 91-97 (1999).
403. Heck, S., Lezoualc'h, F., Engert, S. & Behl, C. Insulin-like growth factor-1-mediated neuroprotection against oxidative stress is associated with activation of nuclear factor kappaB. *The Journal of biological chemistry* **274**, 9828-9835 (1999).
404. Liu, W., Liu, Y. & Lowe Jr, W.L., Jr. The role of phosphatidylinositol 3-kinase and the mitogen-activated protein kinases in insulin-like growth factor-I-mediated effects in vascular endothelial cells. *Endocrinology* **142**, 1710-1719 (2001).
405. Chetty, A., Cao, G.J. & Nielsen, H.C. Insulin-like Growth Factor-I signaling mechanisms, type I collagen and alpha smooth muscle actin in human fetal lung fibroblasts. *Pediatric research* **60**, 389-394 (2006).
406. Eisner, V., *et al.* Hyperosmotic stress-dependent NFkappaB activation is regulated by reactive oxygen species and IGF-1 in cultured cardiomyocytes. *FEBS letters* **580**, 4495-4500 (2006).
407. Hikoso, S., *et al.* The I{kappa}B kinase {beta}/nuclear factor {kappa}B signaling pathway protects the heart from hemodynamic stress mediated by the regulation of manganese superoxide dismutase expression. *Circulation research* **105**, 70-79 (2009).
408. Timmers, L., *et al.* Targeted deletion of nuclear factor kappaB p50 enhances cardiac remodeling and dysfunction following myocardial infarction. *Circulation research* **104**, 699-706 (2009).
409. Misra, A., *et al.* Nuclear factor-kappaB protects the adult cardiac myocyte against ischemia-induced apoptosis in a murine model of acute myocardial infarction. *Circulation* **108**, 3075-3078 (2003).
410. Salminen, A., Hyttinen, J.M. & Kaarniranta, K. AMP-activated protein kinase inhibits NF-kappaB signaling and inflammation: impact on healthspan and lifespan. *Journal of molecular medicine* **89**, 667-676 (2011).
411. Bedard, K. & Krause, K.H. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiological reviews* **87**, 245-313 (2007).
412. Mahadev, K., *et al.* The NAD(P)H oxidase homolog Nox4 modulates insulin-stimulated generation of H₂O₂ and plays an integral role in insulin signal transduction. *Molecular and cellular biology* **24**, 1844-1854 (2004).
413. Gorin, Y., *et al.* Angiotensin II-induced ERK1/ERK2 activation and protein synthesis are redox-dependent in glomerular mesangial cells. *The Biochemical journal* **381**, 231-239 (2004).
414. Djordjevic, T., *et al.* Human urotensin II is a novel activator of NADPH oxidase in human pulmonary artery smooth muscle cells. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **25**, 519-525 (2005).
415. Mochizuki, T., *et al.* Inhibition of NADPH oxidase 4 activates apoptosis via the AKT/apoptosis signal-regulating kinase 1 pathway in pancreatic cancer PANC-1 cells. *Oncogene* **25**, 3699-3707 (2006).
416. Latronico, M.V., Costinean, S., Lavitrano, M.L., Peschle, C. & Condorelli, G. Regulation of cell size and contractile function by AKT in cardiomyocytes. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1015**, 250-260 (2004).
417. Vinciguerra, M., Santini, M.P., Claycomb, W.C., Ladurner, A.G. & Rosenthal, N. Local IGF-1 isoform protects cardiomyocytes from hypertrophic and oxidative stresses via SirT1 activity. *Aging* **2**, 43-62 (2010).
418. Vinciguerra, M., *et al.* mIGF-1/JNK1/SirT1 signaling confers protection against oxidative stress in the heart. *Aging cell* **11**, 139-149 (2012).
419. Cheng, H.L., *et al.* Developmental defects and p53 hyperacetylation in Sir2 homolog (SIRT1)-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 10794-10799 (2003).
420. Alcendor, R.R., *et al.* Sirt1 regulates aging and resistance to oxidative stress in the heart. *Circulation research* **100**, 1512-1521 (2007).

421. Hsu, C.P., *et al.* Silent information regulator 1 protects the heart from ischemia/reperfusion. *Circulation* **122**, 2170-2182 (2010).
422. Huynh, K., *et al.* Cardiac-specific IGF-1 receptor transgenic expression protects against cardiac fibrosis and diastolic dysfunction in a mouse model of diabetic cardiomyopathy. *Diabetes* **59**, 1512-1520 (2010).
423. Butt, R.P., Laurent, G.J. & Bishop, J.E. Collagen production and replication by cardiac fibroblasts is enhanced in response to diverse classes of growth factors. *European journal of cell biology* **68**, 330-335 (1995).
424. van Eickels, M., Vetter, H. & Grohe, C. Angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibition attenuates insulin-like growth factor-I (IGF-I) induced cardiac fibroblast proliferation. *British journal of pharmacology* **131**, 1592-1596 (2000).
425. Krenning, G., Zeisberg, E.M. & Kalluri, R. The origin of fibroblasts and mechanism of cardiac fibrosis. *Journal of cellular physiology* **225**, 631-637 (2010).
426. Shirakabe, K., *et al.* TAK1 mediates the ceramide signaling to stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase. *The Journal of biological chemistry* **272**, 8141-8144 (1997).
427. Honsho, S., *et al.* Pressure-mediated hypertrophy and mechanical stretch induces IL-1 release and subsequent IGF-1 generation to maintain compensative hypertrophy by affecting Akt and JNK pathways. *Circulation research* **105**, 1149-1158 (2009).
428. Galvan, V., Logvinova, A., Sperandio, S., Ichijo, H. & Bredesen, D.E. Type 1 insulin-like growth factor receptor (IGF-IR) signaling inhibits apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1). *The Journal of biological chemistry* **278**, 13325-13332 (2003).
429. Zhao, P., *et al.* Cardiac-specific overexpression of insulin-like growth factor I (IGF-1) rescues lipopolysaccharide-induced cardiac dysfunction and activation of stress signaling in murine cardiomyocytes. *Shock* **32**, 100-107 (2009).
430. Hocevar, B.A., Brown, T.L. & Howe, P.H. TGF-beta induces fibronectin synthesis through a c-Jun N-terminal kinase-dependent, Smad4-independent pathway. *The EMBO journal* **18**, 1345-1356 (1999).
431. Jablonska, E., Markart, P., Zakrzewicz, D., Preissner, K.T. & Wygrecka, M. Transforming growth factor-beta1 induces expression of human coagulation factor XII via Smad3 and JNK signaling pathways in human lung fibroblasts. *The Journal of biological chemistry* **285**, 11638-11651 (2010).
432. Pedram, A., Razandi, M., O'Mahony, F., Lubahn, D. & Levin, E.R. Estrogen receptor-beta prevents cardiac fibrosis. *Molecular endocrinology* **24**, 2152-2165 (2010).
433. Takahashi, T., *et al.* Characterization of insulin-like growth factor-1-induced activation of the JAK/STAT pathway in rat cardiomyocytes. *Circulation research* **85**, 884-891 (1999).
434. Hilfiker-Kleiner, D., *et al.* Signal transducer and activator of transcription 3 is required for myocardial capillary growth, control of interstitial matrix deposition, and heart protection from ischemic injury. *Circulation research* **95**, 187-195 (2004).
435. Jacoby, J.J., *et al.* Cardiomyocyte-restricted knockout of STAT3 results in higher sensitivity to inflammation, cardiac fibrosis, and heart failure with advanced age. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 12929-12934 (2003).
436. Ahmed, M.S., *et al.* Connective tissue growth factor--a novel mediator of angiotensin II-stimulated cardiac fibroblast activation in heart failure in rats. *Journal of molecular and cellular cardiology* **36**, 393-404 (2004).
437. Daniels, A., van Bilsen, M., Goldschmeding, R., van der Vusse, G.J. & van Nieuwenhoven, F.A. Connective tissue growth factor and cardiac fibrosis. *Acta physiologica* **195**, 321-338 (2009).
438. Frazier, K., Williams, S., Kothapalli, D., Klapper, H. & Grotendorst, G.R. Stimulation of fibroblast cell growth, matrix production, and granulation tissue formation by connective tissue growth factor. *The Journal of investigative dermatology* **107**, 404-411 (1996).

439. Igarashi, A., Okochi, H., Bradham, D.M. & Grotendorst, G.R. Regulation of connective tissue growth factor gene expression in human skin fibroblasts and during wound repair. *Molecular biology of the cell* **4**, 637-645 (1993).
440. Chen, M.M., Lam, A., Abraham, J.A., Schreiner, G.F. & Joly, A.H. CTGF expression is induced by TGF- beta in cardiac fibroblasts and cardiac myocytes: a potential role in heart fibrosis. *Journal of molecular and cellular cardiology* **32**, 1805-1819 (2000).

6.2 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
%	Prozent
AAV	Adeno-assoziierte Viren
ACC	Acetyl-CoA Carboxylase
ACE	<i>Angiotensin converting enzyme</i>
Acta1	Actin, α 1
ActRIIB	<i>activin A receptor type II B</i>
Acvr	<i>activin A receptor type II</i>
Acvr11	<i>activin A receptor type II-like 1</i>
AIDS	<i>acquired immunodeficiency syndrome</i>
ALK	<i>Activin receptor-like kinase</i>
ALS	<i>acid labile subunit</i>
aMyHC	<i>α-Myosin heavy chain</i>
AMPK	<i>AMP-activated Kinase</i>
ANP	<i>Atrial natriuretic peptide</i>
ARP	<i>Acidic ribosomal protein</i>
ATP	Adenosintriphosphat
AV-Knoten	Atrioventrikularknoten
Bad	<i>Bcl2-associated agonist of cell death</i>
Bcl	<i>B-cell CLL/lymphoma</i>
Bicin	N-Bis(2-hydroxyethyl)glycin
Bis-Tris	Bis(2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxymethyl)methan
BMP-1	<i>bone morphogenetic protein 1</i>
bMyHC	<i>β-myosin heavy chain</i>
BNP	<i>Brain type natriuretic peptide</i>
bpm	<i>beats per minute</i>
BSA	Bovines Serum-Albumin
CAGG	<i>chicken beta actin promoter/enhancer coupled with the cytomegalovirus (CMV) immediate-early enhancer</i>
CamkII	<i>Calcium/Calmodulin-dependent protein kinase II</i>
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CCD	<i>charged coupled device</i>
CDK2	<i>cyclin dependent kinase 2</i>
cDNA	Komplementäre DNA
ChIP	Chromatin Immunopräzipitation
cm	Zentimeter
Col1a1	Collagen-Typ I α -1
Co-Smad	<i>common mediator Smad</i>
Cre	<i>Causes recombination</i>
C-terminal	carboxyterminal
CTGF	<i>connective tissue growth factor</i>
Cy2	Carbocyanin
d	Tag
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindol

dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	1,4-Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
ED	Enddiastole
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EDV	enddiastolisches Volumen
EF	Ejektionsfraktion
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
EGFP	<i>Enhanced green fluorescent protein</i>
EGTA	Ethylenglykoltetraessigsäure
EKG	Elektrokardiogramm
ERK	extrazellulär signalregulierte Kinase
ES	Endsystole
ESV	endsystolisches Volumen
ES-Zellen	Embryonale Stammzellen
Fast1	<i>forkhead activin signal transducer 1</i>
FCS	fötales Kälberserum
FGF	<i>Fibroblast growth factor</i>
Fhl1	<i>four and a half LIM domain 1</i>
FLASH	<i>fast low angle shot sequence (MRT)</i>
fl/fl	<i>flox/flox</i>
FoxO1/3	<i>Forkhead box O1/3</i>
FRT	<i>Flippase recognition target</i>
FSTL-3	<i>follistatin-like 3</i>
g	Gramm
GASP-1	<i>growth and differentiation factor-associated protein 1</i>
GC-Gehalt	Gehalt an Guanin und Cytosin
GDF-8	<i>growth and differentiation factor 8 = Myostatin (Mstn)</i>
GDF-11	<i>growth and differentiation factor 11</i>
GDF-15	<i>growth and differentiation factor 15</i>
GH	<i>growth hormone</i>
Grb2	<i>growth factor receptor-bound protein 2</i>
GS	Glykogensynthese
GSK-3 β	Glykogensynthese Kinase 3 β
h	Stunde
HE-Färbung	Hämatoxylin und Eosin Färbung
HGF	<i>Hepatocyte growth factor</i>
Hopx	<i>HOP homeobox</i>
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
hSGT	<i>human small glutamine-rich tetratricopeptide repeat-containing protein</i>
Hsp27	<i>Heat shock protein 27kDa</i>

I-Bande	isotrope Bande
IF	Immunfluoreszenz
IGF-1	<i>Insulin-like growth factor 1</i>
IGF-1R	<i>Insulin-like growth factor 1 receptor</i>
IGFBP	IGF bindende Proteine
IKK	I κ B α Kinase Komplex
<i>in vitro</i>	außerhalb des lebenden Organismus (lat.)
<i>in vivo</i>	im Lebendigen (lat.)
IP3	Inositoltrisphosphat
IR	Insulinrezeptor
IRES	Interne ribosomale Eintrittsstelle
IRS-1	Insulinrezeptor Substrat 1
I-Smad	inhibitorisches Smad
Iso	Isoprenalin
JNK	c-Jun N-terminale Kinasen
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KM	Kardiomyozyten
l	Liter
loxP	<i>locus of cross-over (x)</i> des Bakteriophagen P1
LTBP-3	<i>latent transforming growth factor β binding protein 3</i>
LTCC	<i>L type calcium channel</i>
LV	linksventrikulär
MAPK	Mitogen aktivierte Proteinkinase
MAPKAP	MAPK assoziiertes Protein
MCM	MerCreMer
mdx	<i>x chromosome-linked muscular dystrophy</i>
MEF2A	Myocyte enhancer factor 2A
MEK1	Mitogen aktivierte Proteinkinase Kinase 1
Mer	<i>Mutated estrogen receptor binding domain</i>
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
μ g	Mikrogramm
mg	Milligramm
MGF	<i>Mechano growth factor</i>
MHz	Megahertz
min	Minute
μ l	Mikroliter
μ m	Mikrometer
μ M	Mikromolar
miR	microRNA
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MKK3/6	<i>Mitogen activated protein kinase kinase 3/6</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MRT	Magnetresonanztomographie
ms	Millisekunde
Mstn	Myostatin
mTOR	<i>Mechanistic target of rapamycin</i>

MuRF-1	<i>muscle RING-finger protein-1</i>
Myf5	<i>myogenic factor 5</i>
Myh7	<i>myosin heavy chain 7= bMyHC</i>
MyoD	<i>myogenic determination factor</i>
NCX	Na ⁺ /Ca ²⁺ exchanger
NFAT	<i>nuclear factor of activated T-cells</i>
NFκB	nuclear factor κ light polypeptide gene enhancer in B cells
ng	Nanogramm
NKM	Nicht-Kardiomyozyten
Nkx2.5	Nk2 Homöobox 5
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
NOX4	NADPH Oxidase 4
ns	nicht signifikant
N-terminal	aminoterminal
Oxo	(5Z)-7-Oxozeanol
p70RSK	p70 ribosomale S6 Kinase
PACE	<i>paired dibasic amino acid-cleaving enzyme</i>
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PDK	<i>3-phosphoinositide dependent protein kinase-1</i>
PECAM	<i>platelet/endothelial cell adhesion protein</i>
PFA	Paraformaldehyd
PGK-Neo	Phosphoglyceratkinase Promoter inkl. Neomycin Resistenz
Pi16	<i>peptidase inhibitor 16</i>
PI3K	Phosphatidylinositol-3-kinase
Pik3ip1	Phosphatidylinositol-3-kinase interagierendes Protein 1
Pik3r4	Phosphatidylinositol-3-kinase, regulatorische Untereinheit 4
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PKD	Proteinkinase D
PLB	Phospholamban
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PPARγ	<i>peroxisome proliferator-activated receptor γ</i>
Prkcq	<i>Proteinkinase C ∅</i>
qRT-PCR	<i>quantitative Real-time PCR</i>
Raf	<i>rapidly accelerated fibrosarcoma</i>
RalA	<i>Ras-like protein A</i>
Ras	<i>rat sarcoma</i>
Rb	<i>retinoblastoma associated protein</i>
Rgs2	<i>Regulator of G-protein signaling 2</i>
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
Rosa	<i>reverse orientation splice acceptor β-gal</i>

rpm	<i>rounds per minute</i>
R-Smad	<i>receptor-regulating Smad</i>
RSRR	Aminosäure-Einbuchstabencode für Arginin (R) und Serin (S)
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
RyR2	Ryanodin Rezeptor 2
S6	Ribosomales protein S6
S6K	ribosomale S6 Kinase
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	<i>standard error of the mean</i>
Ser	Aminosäuren-Dreibuchstabencode für Serin
SERCA	<i>sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase</i>
SGK1	Serum/Glukokortikoid regulierte Kinase 1
SH2	<i>Src homology 2</i>
shc	<i>Src homology 2 domain-containing protein</i>
shRNA	<i>short hairpin RNA</i>
SILAC	<i>stable isotope labeling of amino acids in cell culture</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
Sirt1	Sirtuin 1
Smurf1	Smad Ubiquitinierungs-Regulationsfaktor 1
sos	<i>son of sevenless</i>
STAT3	<i>signal transducer and activator of transcription 3</i>
SV	Schlagvolumen
SV40	<i>Simian vacuolating virus 40</i>
T	Tesla
T1	longitudinale Relaxationszeit im MRT
T2	transversale Relaxationszeit im MRT
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TAK1	TGF- β aktivierte Kinase 1
Tam	Tamoxifen
Taq	<i>thermus aquaticus</i> (lat.)
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung (<i>tris buffered saline</i>)
TBS/T	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween-20
T-cap	<i>Titin-cap</i> (Telethonin)
TE	Echozeit im MRT
TGF- β	<i>transforming growth factor β</i>
TGF β R	<i>transforming growth factor β receptor</i>
TGIF	<i>TGF-β induced factor homeobox</i>
Thr	Aminosäure-Dreibuchstabencode für Threonin
TR	Repetitionszeit im MRT
TRITC	Tetramethylrhodamin-isothiocyanat
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TTCC	<i>T type calcium channel</i>
T-Tubuli	transversale Tubuli
Tyr	Aminosäure-Dreibuchstabencode für Tyrosin
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
w	Woche

WB	Western Blot
WGA	<i>Wheat germ agglutinin</i>
Wnt4	<i>wingless-type MMTV integration site family, member 4</i>
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indoxyl- β -D-galactosid

6.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Innere Anatomie des Herzens (nach Tortora und Derrickson ²)	2
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Funktionsphasen des Herzens (nach Tortora und Derrickson ²)	3
Abbildung 3: Zelltypen des Herzens	4
Abbildung 4: Physiologische und pathophysiologische Bedingungen im Herzen (nach Hill et al. ¹).....	6
Abbildung 5: Signalwege, die physiologische und pathologische Veränderungen des Herzens verursachen (nach Hill et al. ¹).....	7
Abbildung 6: Kardioprotektive Wachstumsfaktoren und ihre Signalwege (nach Hausenloy und Yellon ³⁸)	9
Abbildung 7: Phänotypen nach Myostatin Mutationen oder knockout (nach Rodgers et al. ⁶⁸).....	10
Abbildung 8: Sequenzvergleich von Mitgliedern der TGF- β Familie (nach Lee ⁷⁷)	11
Abbildung 9: Proteolytische Prozessierung von Myostatin (nach Lee ⁷⁷)	12
Abbildung 10: Signaltransduktion von Myostatin (nach Joulia-Ekaza et al. ⁸⁷)	14
Abbildung 11: IGF-1 ein Hauptregulator des Muskel- und Knochenwachstums	17
Abbildung 12: Alternatives Spleißen des <i>Igf-1</i> Gens (nach Goldspink ¹⁹⁹)	18
Abbildung 13: Strukturvergleich von IGF-1 und Insulin	19
Abbildung 14: Regulierung der Muskelmasse durch den IGF-1 Signalweg (nach Hanaoka et al. ²⁴⁷) ...	21
Abbildung 15: Schematische Darstellung des IGF-1 Signalweges (nach Bok und Small ²⁵³)	22
Abbildung 16: morphologische Analyse von transgenen <i>Igf-1r</i> überexprimierenden Mäusen (nach McMullen et al. ²⁸²)	23
Abbildung 17: Interaktionen von Myostatin und IGF-1 in der Skelettmuskulatur (nach Braun und Gautel ³²⁴)	26
Abbildung 18: Schematische Darstellung des <i>Mstn</i> ^{fl/fl} Konstrukts	37
Abbildung 19: Schematische Darstellung des CAGG- <i>Mstn</i> Konstrukts	38
Abbildung 20: Repräsentatives Programm einer Genotypisierungs-PCR	44
Abbildung 21: Repräsentatives Programm für eine qRT-PCR	45
Abbildung 22: Mechanismus der β -Galaktosidase-Färbung	49
Abbildung 23: Effiziente Ausschaltung der Myostatin Expression in Kardiomyozyten.....	53
Abbildung 24: Hoher Reinheitsgrad der Kardiomyozytenfraktion.....	54
Abbildung 25: Effiziente Überexpression von Myostatin im adulten Herzen.....	55
Abbildung 26: Akute Deletion von Myostatin in adulten Kardiomyozyten führt zu einer gesteigerten Lethalität	55
Abbildung 27: Akute Deletion von Myostatin in adulten Kardiomyozyten führt zu Herzinsuffizienz und ventrikulärer Hypertrophy	57

Abbildung 28: Akute Deletion von Myostatin führt zu einer verschlechterten atrioventrikulären Erregungsleitung und atrialer Fibrose	58
Abbildung 29: Kardiomyozyten-spezifische Deletion von Myostatin verringert die Überlebensrate ..	59
Abbildung 30: Deletion von Myostatin in Kardiomyozyten führt zu linksventrikulärer Dysfunktion ...	61
Abbildung 31: Deletion von Myostatin aktiviert das hypertrophe Genprogramm	62
Abbildung 32: Akute Deletion von Myostatin aktiviert Gene, die mit Herzinsuffizienz und Hypertrophie korreliert sind.....	63
Abbildung 33: Myostatin inhibiert den AMPK Signalweg	65
Abbildung 34: Myostatin hemmt AMPK über ALK4/5 und TAK1	66
Abbildung 35: AMPK-Inhibitor Compound C verhindert Hypertrophie nach akuter Myostatin Deletion <i>in vivo</i>	68
Abbildung 36: Modell des Signalmechanismus.....	69
Abbildung 37: Akute Deletion von Myostatin in adulten Kardiomyozyten aktiviert den G _{αq} und β-adrenergen Signalweg.....	70
Abbildung 38: β-adrenerge und G _{αq} Signalwege sind nur 10 Tage nach akuter Myostatin Deletion aktiviert	71
Abbildung 39: Myostatin hemmt den β-adrenergen und G _{αq} Signalweg.....	71
Abbildung 40: Myostatin beeinflusst die β-adrenerge Signaltransduktion nicht direkt	72
Abbildung 41: Der β-blocker Atenolol verbessert die Herzinsuffizienz nach akuter Deletion von Myostatin nicht	73
Abbildung 42: Deletion von Myostatin in adulten Kardiomyozyten inhibiert die Rgs2 Expression.....	74
Abbildung 43: Hypothese zur Herzinsuffizienz nach akuter Myostatin Deletion	75
Abbildung 44: Überkompensation von Nicht-Kardiomyozyten verursacht interstitielle Fibrose	77
Abbildung 45: Konstitutive Überexpression von Myostatin in Kardiomyozyten induziert interstitielle Fibrose	78
Abbildung 46: Langzeit-Überexpression von Myostatin führt zu einer starken interstitiellen Fibrose	79
Abbildung 47: Die profibrotische Wirkung von Myostatin wird über p38 vermittelt.....	80
Abbildung 48: Überkompensation von Myostatin durch Nicht-Kardiomyozyten aktiviert auch p38...	81
Abbildung 49: Die profibrotische Wirkung von Myostatin wird über p38 vermittelt.....	81
Abbildung 50: Schematische Darstellung des Signalmechanismus.....	82
Abbildung 51: Akute Myostatin Deletion aktiviert den IGF-1 Signalweg.....	83
Abbildung 52: Das aMyHC-MCM/ <i>Igf-1^{fl/fl}</i> Mausmodell ermöglicht eine effiziente Ausschaltung von <i>Igf-1</i> in Kardiomyozyten	85
Abbildung 53: Starke Runterregulation der <i>Mgf</i> Expression im aMyHC-Cre/ <i>Igf-1^{fl/fl}</i> Mausmodell.....	86
Abbildung 54: Erfolgreiche Rekombination nach Tamoxifengabe im aMyHC-MCM/ <i>Mstn^{fl/fl}/Igf-1^{fl/fl}</i> Mausmodell.....	88
Abbildung 55: Effiziente Ausschaltung von Myostatin und <i>Igf-1</i>	88
Abbildung 56: Hohe Lethalität nach Deletion von Myostatin und <i>Igf-1</i> in adulten Kardiomyozyten...	89
Abbildung 57: Deletion von <i>Igf-1</i> verhindert die Entwicklung einer Hypertrophie nach akuter Myostatin Deletion in Kardiomyozyten.....	92
Abbildung 58: Deletion von Myostatin und <i>Igf-1</i> von der Entwicklung an verursacht Herzinsuffizienz	93
Abbildung 59: Die kanonische IGF-1 Signaltransduktion ist nicht für die Hemmung der Hypertrophie nach akuter Myostatin Deletion verantwortlich	95
Abbildung 60: AMPK Signaltransduktionskaskade ist auch nach akuter Deletion von Myostatin und <i>Igf-1</i> aktiviert	96

Abbildung 61: Entstehung einer Ersatzfibrose in α MyHC-MCM/ <i>Mstn</i> ^{fl/fl} / <i>Igf-1</i> ^{fl/fl} Herzen	97
Abbildung 62: Schematische Darstellung der Funktion von Myostatin im adulten Herzen	105

6.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien	27
Tabelle 2: Verwendete Gebrauchsmaterialien.....	28
Tabelle 3: Verwendete Laborgeräte.....	29
Tabelle 4: Verwendete Kit-Systeme	30
Tabelle 5: Verwendete Zellkulturmedien und Zusätze	30
Tabelle 6: Verwendete Puffer, Medien und Lösungen	31
Tabelle 7: Verwendete Inhibitoren, Aktivatoren und rekombinante Proteine.....	33
Tabelle 8: Verwendete Oligonukleotide für Genotypisierungen	33
Tabelle 9: Verwendete Oligonukleotide für quantitative Real-time PCR.....	34
Tabelle 10: Verwendete Erstantikörper	34
Tabelle 11: Verwendete Sekundäntikörper	36
Tabelle 12: Verwendete Software.....	38
Tabelle 13: Reaktionsansatz für eine Genotypisierungs-PCR.....	43
Tabelle 14: Reaktionsansatz für eine qRT-PCR.....	45
Tabelle 15: Standardreihe zur Proteinbestimmung nach Lowry.....	47
Tabelle 16: Akute Deletion von Myostatin verursacht Herzinsuffizienz	56
Tabelle 17: Deletion von Myostatin in Kardiomyozyten führt zu linksventrikulärer Dysfunktion.....	60
Tabelle 18: Akute Deletion von Myostatin reaktiviert das fetale metabolische Programm.....	64
Tabelle 19: Überexpression von Myostatin über einen längeren Zeitraum verschlechtert die Kontraktilität leicht.....	79
Tabelle 20: Schwere Herzinsuffizienz nach Deletion von Myostatin und <i>Igf-1</i> in adulten Kardiomyozyten.....	90
Tabelle 21: Herzinsuffizienz nach Deletion von Myostatin und <i>Igf-1</i> von der Entwicklung an.....	94

6.4 Lebenslauf

6.5 Danksagung