

Aus der Medizinischen Klinik m. S.
Kardiologie und Angiologie
der Medizinischen Fakultät Charité –
Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Die Koronarbilanz von Myostatin am menschlichen Herzen:

myokardiale Freisetzung oder Extraktion bei Patienten mit Herzinsuffizienz und erhaltener Ejektionsfraktion

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von
Christian Georg Manfred Georgi
aus Berlin

Datum der Promotion: 08. Dezember 2017

Inhaltsverzeichnis

1. Abstract	5
1.1 Abstract (deutsch).....	5
1.2 Abstract (english).....	7
2. Einleitung.....	8
2.1 Myostatin.....	8
2.1.1 Geschichte des Myostatins	8
2.1.2 Synthese und Struktur.....	9
2.1.3 Extrazelluläre Regulation	11
2.1.4 Rezeptoren und Signaltransduktion	12
2.1.4.1 Der Smad-Signalweg	13
2.1.4.2 Der Mitogenaktivierte Proteinkinasen (MAPK)-Weg	14
2.1.4.3 Blockade des Insulin-like Growth Factor 1 (IGF-1) vermittelten Muskelwachstums	14
2.1.5 Wirkungen	15
2.1.5.1 Skelettmuskulatur.....	15
2.1.5.2 Wirkungen auf das Fettgewebe.....	17
2.1.5.3 Wirkungen auf die Herzmuskulatur	18
2.1.5.4 Lokal vs. systemisch	20
2.2 Herzinsuffizienz	21
2.2.1 Diastolische Herzinsuffizienz.....	21
2.2.1.1 Diastolische Dysfunktion	23
2.2.1.2 Linksventrikuläre Hypertrophie (LVH)	26
2.2.2 Herzinsuffizienz mit reduzierter Ejektionsfraktion.....	27
2.2.2.1 Kardiale Kachexie	28
2.3. Myostatin am pathologischen Herzen.....	29
3. Material und Methoden.....	35
3.1 Patienten	35

3.1.1 Ein- und Ausschlusskriterien	35
3.1.2 Einteilung in Studienkohorten.....	36
3.2 Präinterventionelle Untersuchungen	37
3.2.1 Anamnese	37
3.2.2 Transthorakale Echokardiographie	37
3.2.3 Kardio-CT und Bestimmung der linksventrikulären Herzmasse	38
3.3 Pulmonalvenenisolation und Blutentnahme	38
3.4 Labortechnische Auswertung der Proben	40
3.4.1 ELISA zur Myostatin-Konzentrationsbestimmung	40
3.4.1.1 Prinzip des kompetitiven ELISA	41
3.4.1.2 Geräte und Materialien.....	42
3.4.1.3 Durchführung.....	42
3.5 NT-ProBNP-Bestimmungen.....	43
3.6 Koronargradient und arterio-venöser Gradient.....	43
3.7 Statistik	44
4. Ergebnisse.....	46
4.1 Klinische und demografische Daten	46
4.2 Plasma-Myostatin-Konzentration, Koronargradient und arterio-venöser Gradient.	47
4.3 Zusammenhang zwischen Myostatin, LV-Masse und diastolischer Dysfunktion....	49
5. Diskussion.....	53
6. Literatur	62
7. Anhang.....	76
7.1 Abkürzungsverzeichnis	76
7.2 Abbildungsverzeichnis	78
7.3 Tabellenverzeichnis	79
7.4 Eidesstattliche Versicherung	80
7.5 Lebenslauf	81

7.6 Publikationsverzeichnis	83
7.7 Danksagung.....	84

1. Abstract

1.1 Abstract (deutsch)

Einleitung: Myostatin ist ein 1997 erstmals beschriebenes Regulator-Protein in der Homöostase von Muskelgewebe. An genetisch veränderten Mäusen konnten ein hemmender Einfluss von Myostatin während der fetalen Skelettmuskelentwicklung sowie eine antihypertrophe Wirkung im adulten Organismus nachgewiesen werden. Neben den Effekten auf die Skelettmuskulatur ließ sich eine relevante Bedeutung von Myostatin auf Fettgewebe, Insulinstoffwechsel, Brustdrüsen- und Herzmuskelgewebe erkennen. Bisheriger Hauptgegenstand der kardialen Myostatin-Forschung war die Herzinsuffizienz mit reduzierter Ejektionsfraktion (HFrEF); hier konnte eine Erhöhung sowohl der myokardialen Myostatin-Expression als auch der venösen Plasma-Konzentration bei akuter und chronischer Herzinsuffizienz demonstriert werden. Ebenso zeigten sich Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen Myostatin-Konzentration und kardialer Kachexie.

Material und Methoden: Wir untersuchten in unserer Arbeit erstmals die Regulation von kardialem Myostatin bei Herzinsuffizienz mit erhaltener Ejektionsfraktion (HFpEF). Hierfür entnahmen wir bei insgesamt 43 Vorhofflimmer-Patienten (davon 24 Patienten mit HFpEF, 7 mit HFrEF und 12 Kontrollen) während Pulmonalvenenisolation Proben aus Femoralarterie, -vene und Sinus coronarius und bestimmten mittels ELISA die Myostatin-Konzentration. Anhand des Koronargradienten, der die Differenz aus zeitgleich gemessener arterieller und koronarvenöser Myostatin-Konzentration im Plasma beschreibt, sind Rückschlüsse auf eine kardiale Myostatinsekretion bzw. –absorption möglich. Weiterhin untersuchten wir einen möglichen Zusammenhang zwischen der Plasma-Myostatin-Konzentration und der präinterventionell im Cardiac-CT-ermittelten linksventrikulären Masse sowie der echokardiographisch bestimmten diastolischen Funktion.

Ergebnisse: Es zeigte sich eine signifikante Korrelation zwischen dem Grad der diastolischen Funktionsstörung (objektivierbar durch den echokardiographischen Funktionsparameter E/E') und der Myostatin-Konzentration im koronarvenösen Plasma

($p < 0.001$). Darüber hinaus fanden wir eine signifikante negative Korrelation zwischen der linksventrikulären Masse und Plasma-Myostatin-Konzentration ($p = 0.04$) in einer Subanalyse von 28 Patienten. Ein relevanter Koronargradient und damit eine myokardiale Netto-Sekretion bei HFpEF konnte nicht gezeigt werden.

Zusammenfassung: Wir liefern mit unseren Untersuchungen weitere Hinweise auf eine pro-fibrotische, anti-hypertrophe Wirkweise und damit signifikante Beteiligung von Myostatin an Remodelling-Prozessen am menschlichen Herzen.

Diese Ergebnisse sollten insbesondere in der zukünftigen Forschung an medikamentösen Therapieansätzen bezüglich Myostatin-Blockade bzw. -Induktion Beachtung finden.

1.2 Abstract (english)

Introduction: Myostatin, a negative regulator of muscle tissue, was first described in 1997. In experiments with Myostatin Knock-Out-mice, the inhibitory effects of Myostatin on fetal muscle development as well as adult muscle homeostasis were demonstrated. Besides skeletal muscle, Myostatin was found to affect fat tissue, insulin metabolism, mammary gland and also heart muscle. So far, the particular focus in cardiac Myostatin research was on Heart Failure with reduced Ejection Fraction (HFrEF). Studies showed elevated levels of circulating Myostatin and tissue expression in both acute and chronic heart failure. Furthermore, a close relation to cardiac cachexia could be detected.

Methods: This study for the first time concentrates on patients with Heart Failure with preserved Ejection Fraction (HFpEF). We took blood samples from femoral artery, femoral vein and coronary sinus in 43 patients with atrial fibrillation undergoing pulmonary vein ablation and compared circulating Myostatin levels. Of these 43 patients, 24 were diagnosed HFpEF, 7 HFrEF and 12 patients were defined as controls. By establishing a coronary gradient - the difference between arterial and coronary sinus levels determined at the same procedure - we aimed to detect a myocardial specific secretion or consumption of Myostatin. Moreover, we investigated possible relations between Myostatin plasma levels and both CT calculated LV-heart mass and diastolic dysfunction.

Results: Indeed, we found a significant direct correlation between Myostatin levels and E/E' as echocardiographic marker of diastolic dysfunction ($p < 0.001$). In a subgroup of 28 patients, Myostatin levels correlated inversely with LV mass ($p = 0.04$).

A significant coronary gradient and associated myocardial secretion or consumption of Myostatin could not be detected in HFpEF.

Conclusions: Our results show evidence for a pro-fibrotic and anti-hypertrophic effect of Myostatin in myocardium. Thus, Myostatin may represent a key player in cardiac remodelling after myocardial infarction and in heart failure.

This may be relevant in future approaches to Myostatin inhibition or induction in the drug therapy of skeletal muscle or myocardial diseases.

2. Einleitung

2.1 Myostatin

2.1.1 Geschichte des Myostatins

Der britische Zoologe und Forscher William S. Bullough entwickelte im Jahr 1962 eine neue Theorie physiologisch aktiver Substanzen. Er stellte nach einer Reihe von Experimenten an epidermalen Zellen von Schweinen die Hypothese auf, dass die Kontrolle der mitotischen Aktivität eines jeden bekannten Gewebes einem negativen Feedback-Mechanismus unterliegt (1). Die neu entdeckten körpereigenen Botenstoffe nannte er Chalone. Seiner Theorie zufolge wirken die Chalone am Ort ihrer Bildung hemmend auf die Zellteilung ein, sind nicht speziesspezifisch und von ihrer Struktur her Proteine.

An dieser Theorie hielt Bullough fest, obwohl in der Folgezeit trotz intensiver Forschung keine in das Schema passende Substanz eindeutig identifiziert werden konnte.

Erst 35 Jahre später, im Jahr 1997, gelang einer Forschergruppe um Alexandra McPherron und Si-Jin Lee an der John Hopkins Medical School an Mäusen der Nachweis eines Proteins, das als negativer Regulator der Skelettmuskelmasse die Kriterien von Bullough weitgehend erfüllt (2). Sie nannten diesen Botenstoff Myostatin.

Nachdem McPherron den Genlocus für Myostatin eindeutig zuordnen konnte, züchtete sie Mäuse, deren Erbgut sie exakt an dieser Stelle veränderte. Das Ergebnis waren Mäuse mit mehr als doppelt so stark ausgeprägter Skelettmuskulatur wie bei typischen Artgenossen und einem unterdurchschnittlichen Fettgehalt. In den folgenden Jahren wurde die Existenz von Myostatin an Hand natürlicher Mutationen des Myostatin-Gens in vielen weiteren Spezies nachgewiesen, darunter in so genannten Belgian Blue-Rindern (3),(4, 5), deren außergewöhnlich ausgeprägte Muskulatur in der Rinderzucht schon seit mehreren Jahrhunderten geschätzt wird. Darüber hinaus wurden Gendefekte auch bei Hunden (6), Schafen (7) und 2004 erstmals bei einem Menschen festgestellt (8). Schuelke et al. wiesen bei einem Neugeborenen, bei dem bereits bei der Geburt ein ungewöhnlich hoher Anteil an Skelettmuskelmasse bemerkt worden war, einen homozygoten Gendefekt am Myostatin-Genlocus (MSTN) nach und lieferten damit

einen weiteren Hinweis darauf, dass die Funktion von Myostatin speziesübergreifend in hohem Maße erhalten geblieben ist.

Konzentrierte sich die Forschung anfangs besonders auf den Einfluss von Myostatin auf die Homöostase der Skelettmuskulatur, so wurde nach und nach ein Bezug zu anderen Organsystemen und Gewebearten hergestellt. Während in der Embryogenese Myostatin ausschließlich in Skelettmuskelzellen nachgewiesen wird, wo es die Differenzierung und Proliferation des Myoblasts kontrolliert (2), ist es im adulten Organismus nicht mehr auf diese Gewebeart beschränkt. So zeigten Sharma et al. (9) bereits 1999 an Biopsien von Schaf-, Mäuse- und Rinderherzen, dass Myostatin auch in Kardiomyozyten und Purkinjefasern exprimiert wird. Auch in Fettgewebe (10) und Brustdrüse (11) konnte in der Folgezeit eine Myostatin-Expression nachgewiesen werden, auch wenn zu den Wirkungen von Myostatin auf diese Gewebearten weiterhin unterschiedliche Auffassungen bestehen (11, 12).

Nach neueren Erkenntnissen könnte Myostatin außerdem eine bedeutende Rolle im Insulinstoffwechsel spielen und dort zu einer verminderten Insulinsensitivität und niedrigeren Adiponectin-Ausschüttung im Fettgewebe beitragen (13).

Da sich die Wissenschaft erst seit vergleichsweise kurzer Zeit mit Myostatin beschäftigt, sind viele Fragen bezüglich Wirkung, Wirkmechanismus und Interaktion mit anderen Stoffen weiterhin Gebiet intensiver Forschung.

Ein Überblick über den bisherigen Wissensstand betreffend Struktur, Wirkmechanismus und Wechselwirkungen wird in den nächsten Abschnitten dargestellt.

2.1.2 Synthese und Struktur

Myostatin, auch Growth Differentiation Factor-8 (GDF-8) genannt, ist Teil der Transforming Growth Factor-beta-Superfamilie und damit strukturell mit anderen Vertretern der Gruppe, besonders GDF-11, eng verwandt (2).

Myostatin wird als Vorläufer-Protein synthetisiert und durchläuft letztlich drei proteolytische Abspaltungen (2), bis es als biologisch aktive Form an seine Rezeptoren binden kann (siehe Abbildung 1). Die erste Spaltung trennt das 24 Aminosäuren lange Signalpeptid ab, das Myostatin als sekretorisches Protein kennzeichnet. Bei der zweiten Spaltung durch Furin wird das Peptid hinter Aminosäure 76 gespalten. Das nun abgespaltene N-terminale Peptid besitzt große Bedeutung für die ordnungsgemäße

Faltung des Proteins und bleibt im Anschluss an seine Abspaltung als so genanntes Propeptid nicht-kovalent an das C-terminale Peptid gebunden (14). In dieser Form wird Myostatin aus der Zelle sezerniert und zirkuliert anschließend als latenter, biologisch inaktiver Komplex im Organismus. Andererseits kann die zweite Spaltung auch über die Bindung an Latent-TGF- β -Binding-Protein-3 (LTPB-3) verhindert werden und Myostatin verbleibt als Pro-Myostatin lokal in der Extrazellulärmatrix (15). Um seine Wirkung auf die Zielgewebe zu erreichen, muss das Propeptid aus dem latenten Komplex herausgespalten werden. Dies geschieht in vivo mit Hilfe von Bone Morphogenetic Protein (BMP)-1-Metalloproteinasen, die das nicht-kovalent gebundene Propeptid aus dem latenten Komplex lösen können und damit die aktive Form, das C-terminale Dimer, erzeugen (16). Dieser Vorgang beschreibt die dritte Spaltung.

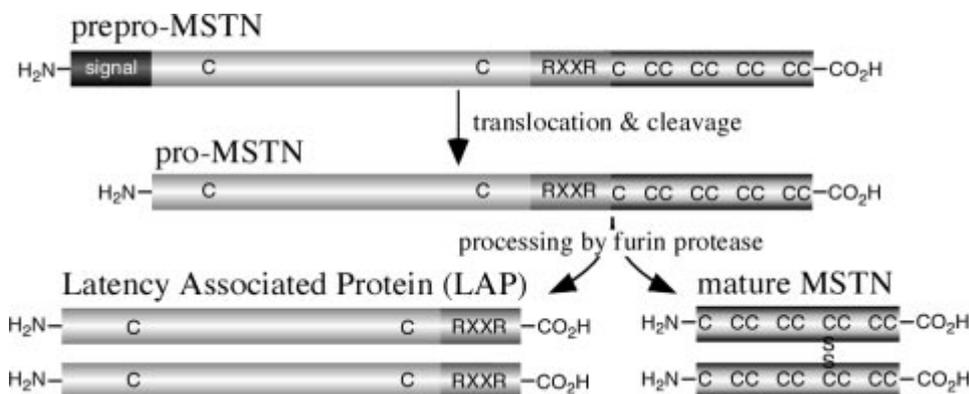


Abbildung 1 Proteolytische Spaltung des Myostatins (17)

Das C-terminale Dimer besteht aus zwei identischen Monomeren, die über Disulfidbrücken am C-terminalen Ende zu einem Homodimer verbunden sind, und hat ein Molekulargewicht von insgesamt 25 kDalton (2). In einer Studie von 2009 bestätigen Cash et al. (18), dass die beiden Monomere, die jeweils aus 109 Aminosäuren bestehen und am C-terminalen Ende durch eine für die Transformation Growth Factor (TGF)-beta-Familie charakteristische Verteilung von neun Cysteinresten gekennzeichnet sind, lediglich an einem Cysteinrest kovalent miteinander verbunden sind. Die restlichen Cysteinketten tragen, wie bereits 2004 von Lee (14) vermutet, zur typischen Cystein-Knotenstruktur bei. Da das C-terminale Peptid der biologisch aktiven Form des Myostatins entspricht, wird im Folgenden, wenn nicht explizit anders postuliert, Myostatin mit dem aktiven C-terminalen Dimer gleichgesetzt.

2.1.3 Extrazelluläre Regulation

Nach dem bisherigen Kenntnisstand zirkuliert ein Großteil des systemischen Myostatins in seiner gebundenen, inaktiven Form im Blut (19).

Neben dem bereits genannten Propeptid, das eine entscheidende Rolle bei der Inaktivierung des Myostatins spielt, existieren eine Reihe weiterer Proteine, die die aktive Form von Myostatin binden und inhibieren können.

Eines dieser Proteine ist Follistatin, ein Glykoprotein, das ursprünglich auf Grund seiner Funktion, die Ausschüttung von Follikel-stimulierendem-Hormon (FSH) in der ovariellen Follikelflüssigkeit zu blockieren, entdeckt worden war (20). Follistatin bindet an Myostatin und verhindert dadurch die Bindung von Myostatin an seinen Rezeptor. In Experimenten an Mäusen konnten Lee und Mc Pherron nachweisen, dass eine Überexpression von Follistatin eine massive Hypertrophie der Skelettmuskulatur hervorruft (21). Ging man anfangs davon aus, dass dieser Effekt ausschließlich durch die Inhibition der atrophen Wirkung von Myostatin zu Stande kam, so nimmt man mittlerweile an, dass Follistatin gleichzeitig selbst intrazelluläre Signalkaskaden beeinflusst und dadurch seine hypertrophe Wirkung entfaltet (22). Da selbst bei MSTN-/- Mäusen durch Überexpression des Follistatins noch eine weitere Muskelzunahme beobachtet wird, geht man davon aus, dass Follistatin neben Myostatin noch weitere Zielproteine zu inhibieren in der Lage ist, allen voran wohl Activin und verschiedene BMPs (19).

Ein verwandtes Protein von Follistatin, follistatin-related protein (FSTL)-3 (auch Follistatin-Like Protein-3) ist in ähnlicher Weise an Myostatin gebunden und scheint es in einer inaktiven Form zu halten. Während man die Verbindung von Myostatin und FSTL-3 in mehreren Studien sowohl in vitro als auch in vivo nachgewiesen hat (23-25), ist die tatsächliche Wirkung der Komplexbildung weiterhin nicht vollständig aufgeklärt. So zeigten Mäuse mit einer Deletion am FSTL-3-Gen keinerlei Auffälligkeiten bezüglich ihrer Muskelmasse (26).

Ein anderer extrazellulärer Inhibitor von Myostatin ist Growth and Differentiation Factor-Associated Serum Protein (GASP)-1. GASP-1 besitzt die Fähigkeit, neben dem C-terminalen Peptid mit anderen Domänen auch das Propeptid zu binden. Durch die Bindung an Myostatin verursacht GASP-1 eine deutliche Zunahme der Muskelmasse sowie der Muskelkraft (27). Es existieren weitere bekannte extrazelluläre Inhibitoren von Myostatin, darunter bereits erwähntes LTBP-3 (15), Decorin (28), die Proteine Titin-

Cap (29, 30) sowie human-Small-Glutamine-rich-Tetratricopeptide-repeat-containing protein (hSGT) (28), die die Aktivierung von Myostatin über die Bindung an das Protein beeinflussen.

Offensichtlich ist die extrazelluläre Regulation von Myostatin ein komplexer Prozess, der neben den hier genannten sicherlich noch von vielen weiteren Komponenten beeinflusst wird. Eine Reihe verschiedener Mediatoren sind in der Lage, Myostatin zu inhibieren, gleichzeitig regulieren viele von ihnen neben Myostatin noch weitere Mitglieder der TGF-beta-Familie und können somit den hypertrophen Effekt auf die Skelettmuskulatur sogar noch steigern (31). Möglicherweise spielt die gezielte Inhibierung bzw. Aktivierung auch eine Rolle bei der lokalen Wirkung von Myostatin im Gegensatz zur systemischen Wirkung oder in bestimmten pathophysiologischen Zuständen.

Festzuhalten bleibt, dass von der genetischen Manipulation über die Blockade der oben genannten natürlichen Inhibitoren bis hin zum Einbringen von anti-Myostatin-Antikörper oder löslichem Myostatin-Rezeptor, z.B. Activin-Rezeptor Typ 2B (ActRIIB) eine Vielzahl von Möglichkeiten zur gezielten Regulation der Myostatinsekretion und -aktivierung besteht. Diese Erkenntnisse sind gerade im Hinblick auf zukünftige pharmakotherapeutische Ansätze zur Blockade von Myostatin von großer Bedeutung.

2.1.4 Rezeptoren und Signaltransduktion

Das aktivierte Myostatin, von seinem Propeptid oder anderen Inhibitoren abgespalten, bindet über Activin-Rezeptoren an seine Zielzellen.

Dies löst eine intrazelluläre Signalkaskade aus, an deren Ende eine erhöhte Proteindegradation, eine verminderte Proteinsynthese, sowie ein Zellzyklus-Stop stehen.

Am Beginn der Signaltransduktion stehen zwei Rezeptoren, über die Myostatin sein Signal an die Zelle vermittelt. Diese membranständigen Rezeptoren sind strukturell Threonin-Serin-Kinasen und können mutmaßlich weitere Mitglieder der TGF-beta-Familie binden. Die direkte Bindung von Myostatin erfolgt an so genannten Activin-Rezeptor Typ II, wobei die Affinität zum ActRIIB deutlich höher ist gegenüber dem Activin-Rezeptor Typ 2A (ActRIIA) (32) und erstgenannter daher von übergeordneter Bedeutung ist.

Sobald der Rezeptor durch das freie Myostatin aktiviert wurde, lagert sich ein Activin Rezeptor Typ I (ActRI), nämlich Activin-like kinase 4 und/oder 5 (ALK4/5), an. Diese Co-Rezeptoren besitzen, im Gegensatz zu Typ II-Rezeptoren, nahe der Kinasenregion eine ihnen eigene GS-Domäne, die nach der Kopplung der beiden Rezeptoren phosphoryliert wird.

Im Endeffekt wird die Signaltransduktion also über einen heterotetrameren Rezeptorkomplex aus zwei verschiedenen homodimeren Rezeptoren eingeleitet (33).

2.1.4.1 Der Smad-Signalweg

Der aktivierte Rezeptorkomplex phosphoryliert im Folgenden seinerseits Serin-Seitenketten der intrazellulären Proteine Smad2 und Smad3. Diese lagern sich mit dem gemeinsamen Mediator Smad4 zusammen und bilden ein Heterodimer, das nun in den Zellkern wandert und dort die Transkription bestimmter Zielgene aktiviert (34).

Zu den Zielgenen der Myostatin Regulation gehört unter anderem MyoD, ein Transkriptionsfaktor, der eine entscheidende Rolle in der Differenzierung und Reparatur von Skelettmuskelfasern spielt (35). Dabei geschieht die Herunterregulierung von MyoD bei der Regulation durch Myostatin, anders als beispielsweise durch Tumor-Nekrose-Faktor (TNF) alpha vermittelt, NF-kappa-B-unabhängig, wie Mc Farlane et al. 2006 zeigten (36).

Myostatin reguliert über die Smad-Kaskade die Expression weiterer Gene wie *myf5* und *myogenin*, die für die Myogenese essentiell sind. Über die Inhibierung von MyoD und der eben genannten Gene hemmt Myostatin die Myogenese und verhindert die Differenzierung von Myoblasten zu multinukleären Muskelfasern (37).

In der Signalkette spielen weitere Smad-Proteine eine Rolle, darunter Smad6 und Smad7. Beide wirken als partielle Agonisten am ActRI und wirken dadurch kompetitiv hemmend auf die über Smad2/3 vermittelte Signaltransduktion (38). Gleichzeitig ist Smad7 in der Lage, die Anlagerung von Smad4 an Smad2/3 zu verhindern sowie die Gen-Expression von Myostatin zu inhibieren (39) und bedingt dadurch einen negativen Feedback-Mechanismus in der Smad-vermittelten Signalkaskade und außerdem in der Gen-Expression von Myostatin.

2.1.4.2 Der Mitogenaktivierte Proteinkinasen (MAPK)-Weg

Neben der Smad-Kaskade aktiviert Myostatin nach Bindung an seinen Rezeptor weitere Signalwege. Einer davon beginnt mit der Aktivierung von MAP-Kinasen und führt letztlich über zwei verschiedene Signalwege (ähnlich wie die Smad-Signalkaskade, aber von dieser unabhängig) zur Herunterregulation der Myogenese.

Daran scheint hauptsächlich die p38-MAPK beteiligt zu sein, die über eine Signalkaskade weiterer Kinasen aktiviert wird und nach der Verlagerung in den Zellkern durch Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren die Gen-Expression von Myogenese-fördernden Proteinen inhibiert (40). P38 ist ein Vertreter der MAP-Kinasen und hauptsächlich eingebunden in die Reaktion der Zelle auf externe Stimuli wie Zytokine oder Hitzeschock. Der andere Weg führt über die Ras/Raf/Mek1-Kaskade zur Aktivierung von Extracellular-signal-regulated kinases (ERK)1/2 (41).

Über die physiologische Wirkung von ERK1/2 gibt es unterschiedliche Auffassungen.

Einige Studien suggerieren eine fördernde Wirkung von ERK auf die Proteinsynthese und Zellproliferation (42, 43), andere Studien kommen zu gegenteiligen Ergebnissen (41, 44). Es scheint jedoch gesichert, dass eine vermehrte Aktivierung von ERK1/2 durch Myostatin zur verminderten Differenzierung von Myozyten führt und somit einen ähnlichen Effekt wie die Aktivierung von p38-MAPK besitzt (41).

2.1.4.3 Blockade des Insulin-like Growth Factor 1 (IGF-1) vermittelten Muskelwachstums

IGF-1 ist ein Wachstumsfaktor, der in den meisten Körperzellen eine wichtige Rolle bei Zellwachstum und -differenzierung spielt. So stellt IGF-1 auch in der Skelett- und Herzmuskulatur einen bedeutenden Mediator der Muskelhypertrophie und embryonalen Differenzierung von Myozyten dar (45, 46).

Zur Signaltransduktion von IGF-1 in der Muskelzelle bedarf es der Proteinkinase Akt, die einen wichtigen Schnittpunkt zwischen den von Myostatin und IGF-1 vermittelten Signalwegen darstellt. So wiesen Morissette et al. 2009 nach, dass eine Überexpression von Myostatin die von IGF-1 vermittelte Durchmesserzunahme von Myotuben durch inhibierte Phosphorylierung von Akt stark vermindert (47). Akt spielt in der Regulation der Skelettmuskelmasse eine entscheidende Rolle durch die Aktivierung von zwei hauptsächlich Pathways, dem Akt/Mammalian Target of Rapamycin

(mTOR)-Weg, der die Proteinsynthese reguliert, und der Akt/Forkhead Box O (FoxO)-Kaskade, die Einfluss auf die Proteindegradation besitzt (48).

mTOR ist eine durch Akt regulierte Kinase, die die Transkriptionsfaktoren 4E-BP1 und p70s6k phosphoryliert und damit die Proteinsynthese fördert (49). Der Einfluss von Myostatin führt letztlich zu einer verminderten Aktivierung von mTOR und somit einer herunterregulierten Proteinsynthese.

Über die Inhibition der Phosphorylierung von Akt nimmt Myostatin gleichzeitig Einfluss auf den durch FoxO vermittelten Proteinabbau. Myostatin erhöht die Konzentration von aktiviertem Transkriptionsfaktoren der FoxO-Gruppe im Zellkern, was zu einer vermehrten Transkription von so genannten Atrophy-related genes (Atrogenen) führt (36). Durch die Induktion von muskelspezifischen Ubiquitin-Ligasen, wie zum Beispiel Muscle Ring-Finger protein-1 (MuRF-1), wird das Ubiquitin-Proteasom-System aktiviert und die Proteindegradation gefördert (50).

Im Endeffekt lässt sich festhalten, dass die Aktivierung des Myostatin-Rezeptorkomplexes eine Reihe von unterschiedlichen Signalkaskaden auslöst oder inhibiert, deren absolute Gewichtung für die Wirkung von Myostatin auf die Zelle noch nicht abschließend geklärt ist. Die Frage, in welcher Reihenfolge die unterschiedlichen Signalwege aktiviert werden bzw. welche Wechselwirkungen untereinander bestehen, kann noch nicht hinreichend beantwortet werden.

Es lässt sich aber sagen, dass jeder der oben besprochenen Signalwege zumindest teilweise für die muskelmassenregulierende Wirkung von Myostatin verantwortlich ist.

2.1.5 Wirkungen

2.1.5.1 Skelettmuskulatur

Ein Großteil der Erkenntnisse über die Effekte von Myostatin auf die Skelettmuskulatur, aber auch auf andere Gewebe, wurde an Hand von Mäusen gewonnen, deren Myostatinproduktion entweder durch genetische Manipulation komplett unterbunden oder durch Beeinflussung der Rezeptoren oder Signaltransduktion im adulten Organismus reguliert wurde.

Wie bereits beschrieben, führt der genetische Knock-Out am MSTN-Gen bei Mäusen zu einer massiven Muskelvergrößerung auf mehr als das Doppelte (5). Die erhöhte

Muskelmasse lässt sich, wie McPherron und Lee weiter beschreiben, sowohl auf Hypertrophie als auch Hyperplasie zurückführen. Shin-Ichi Chisada et al. berichten, dass bei Myostatin-defizienten Medaka-Fischen das durch den Verlust von Myostatin gesteigerte Muskelwachstum sowohl auf Hyperplasie als auch Hypertrophie zurückzuführen ist, jedoch zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Entwicklung zuerst Hyperplasie und später Hypertrophie im Vordergrund steht (51).

Zusätzlich verändert sich unter Myostatineinfluss das Verhältnis von schnellen Muskelfasern zu langsamen Fasern hin zu den sich durch schnelle Ermüdbarkeit und hohe glykolytische Stoffwechsellage auszeichnenden schnellen Muskelfasern (52). Dies sei laut dem Autor jedoch vornehmlich während der fetalen Entwicklung der Fall, bei adulten Organismen mit experimentell veränderten Myostatinspiegeln war die Transformation nicht beobachtet worden.

Welchen Einfluss die vergrößerte Muskelmasse auf die absolute bzw. die spezifische Kraftentwicklung hat, wird in mehreren Studien unterschiedlich bewertet. So fanden Mendias et al. 2006 heraus, dass die absolute Kraft männlicher KO-Mäuse um 34% gesteigert war gegenüber Wildtyp-Mäusen (53). Zwei weitere Studien bestätigen diese These (54, 55). Auf der anderen Seite zeigen Gilson et al. 2007 in ihren Versuchen an Mäusen trotz deutlich stärker ausgeprägter Skelettmuskulatur in Myostatin-defizienten Mäusen keine Zunahme der absoluten Kraft und sogar eine Abnahme der spezifischen Kraft (Maximalkraft/Muskelgewicht) um 39% gegenüber MSTN+/+ -Mäusen (56). Matsakas et al. stellen 2012 sogar eine Verminderung der absoluten Maximalkraft um 50% fest (57). Gleichzeitig unterscheiden sich die Ergebnisse in Bezug auf Geschlecht, Alter und untersuchter Muskelgruppe der Tiere (55).

Festzuhalten bleibt, dass die absolute Maximalkraft bei MSTN-/- -Mäusen wohl gleich bleibend oder leicht erhöht ist, die spezifische Kraft jedoch gegenüber Wildtyp-Mäusen der gleichen Art signifikant vermindert ist.

Eine andere Diskussion beschäftigt sich mit der Frage, inwieweit Myostatin die Fusion von Satelliten-Zellen beeinflusst. Noch vor einigen Jahren führte man einen Großteil der Muskelhypertrophie, die sich z.B. durch Blockade des ActRIIB in adulten Organismen applizieren ließ, auf die Fusion von Muskelstammzellen, sogenannten Satellitenzellen, zurück (58). Mittlerweile sprechen jüngere Studien eher dafür, dass Myostatin direkt auf die Muskelfasern wirkt, indem es die Cytoplasma-zu-DNA-Ratio steigert und die Satellitenzell-Aktivierung maximal eine untergeordnete Rolle spielt (59, 60). Dies könnte von entscheidender Bedeutung für die pharmakologische Therapie bestimmter

Muskeldystrophien sein, bei denen bisher auf Grund des erhöhten Verbrauchs von Stammzellen unter Myostatin-Blockade mit einer Beschleunigung der Erkrankung in späteren Stadien gerechnet wurde.

In diesem Zusammenhang scheint weiterhin nennenswert, dass eine überdurchschnittlich gut ausgebildete Skelettmuskulatur auch ohne kürzlich stattgehabtes Training deutlich mehr Myostatin exprimiert als eine weniger ausgebildete Muskulatur. Dieses Phänomen beschreiben Kim et al. erstmals 2005 und sprechen im Folgenden vom „Myostatin-Paradox“ (61). Sie zeigen in ihren Versuchen weiter, dass kontinuierliches Krafttraining die Myostatin-Spiegel deutlich zu senken vermag, was u.a. Hittel et al. 2010 bestätigen (62). Dahingegen kommen Diel et al. 2010 in ihren Versuchen an Bodybuildern zu der Auffassung, dass weder Kraft- noch Ausdauertraining die Myostatin-mRNA-Konzentration im Skelettmuskel signifikant beeinflussen (63).

Wie gezeigt wurde, werden neben dem Konsens, dass Myostatin das Muskelwachstum negativ reguliert und somit dessen Blockade zu beträchtlicher Hypertrophie führt, viele Fragen bezüglich Wirkung und Beeinflussung durch äußere Stimuli weiterhin kontrovers diskutiert.

2.1.5.2 Wirkungen auf das Fettgewebe

Bereits mit der Entdeckung von Myostatin im Jahr 1997 stellten McPherron und Lee fest, dass neben der offensichtlichen Wirkung auf die Skelettmuskulatur auch ein Effekt der Myostatin-Blockade auf das Fettgewebe zu bestehen scheint (2). Gleichzeitig findet sich Expression des MSTN-Gens neben dem Skelettmuskelgewebe auch in Adipozyten, wenn auch in deutlich geringerem Ausmaß (64).

Auf das Fettgewebe hat Myostatin, im Gegensatz zum Muskel, offensichtlich einen reziproken Effekt. So beschreiben Lee und McPherron 2002 für 10 Monate alte Myostatin-KO-Mäuse bei ähnlicher Gesamtkörpermasse eine 70-prozentige Fettreduktion gegenüber Mäusen vom Wildtyp. Dies sei auf eine Verminderung der Adipozytenzahl sowie gleichzeitig Verkleinerung der Zellgröße zurückzuführen. Außerdem ließen sich für MSTN^{-/-}-Mäuse auch geringere Serum-Konzentrationen von Triglyceriden und Cholesterin feststellen (64).

Auf der anderen Seite wurde in mehreren Studien die Assoziation von Fettleibigkeit und erhöhter Myostatin-Expression in Muskel- und Fettgewebe sowie im Serum sowohl an Mäusen als auch an Menschen nachgewiesen (10, 65).

Folglich geht eine Gewichtsreduktion mit verminderten MSTN-mRNA-Werten im Skelettmuskel einher (66).

Guo et al. zeigten 2009, dass die veränderte Körperkomposition bei MSTN^{-/-}-Mäusen fast ausschließlich über das muskulär sezernierte Myostatin beeinflusst wird, wohingegen die selektive Inhibition der Signaltransduktion von Myostatin in Adipozyten keine signifikanten Auswirkungen zur Folge hatte (67). Weiterhin kann man seinen Versuchen entnehmen, dass weitere Effekte einer Myostatin-Inhibition ein verbesserter Glukose-Metabolismus und eine erhöhte Insulin-Sensitivität darstellen. In vitro vermag Myostatin die Adipogenese in Präadipozyten zu inhibieren (68), wohingegen es die Adipogenese in multipotenten mesenchymalen Stammzellen positiv beeinflusst (12), was impliziert, dass Myostatin unterschiedliche Aufgaben in Determination und Differenzierung besitzt.

Inwieweit die Wirkungen von Myostatin auf das Fettgewebe in vivo tatsächlich durch direkte Einwirkung auf die Adipozyten vermittelt werden oder doch eher ein Nebeneffekt der Skelettmuskelregulation sind, ist weiterhin umstritten. Versuche, in denen eine direkte Injektion von Myostatin vorgenommen wurde, lieferten widersprüchliche Ergebnisse in Bezug auf die Fettmassenveränderung (69, 70).

2.1.5.3 Wirkungen auf die Herzmuskulatur

Im Gegensatz zum Fettgewebe und insbesondere gegenüber der Skelettmuskulatur ist der Wissensstand über die Sekretion, Metabolisierung und Wirkung von Myostatin an der Herzmuskulatur vergleichsweise gering.

Sharma et al. wiesen 1999 erstmals Myostatin-mRNA und -Protein-Expression am Herzen nach (9). Dies gelang ihnen mittels Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) an Herzen von Schafen, sowohl an fetalen als auch an adulten Herzen, so dass sie davon ausgingen, dass kardiales Myostatin während der fetalen Entwicklung, aber auch im adulten Organismus eine Rolle spielt. Dabei zeigten sie, dass die MSTN-Expression am Herzen hauptsächlich in Kardiomyozyten und Purkinje-Fasern lokalisiert ist. Torrado et al. fügten 2010 in Studien an 20 Tage alten

Ferkeln hinzu, dass die Expression im linken Ventrikel deutlich höher ist als im rechten (71).

Artaza et al. liefern in ihrer Studie an sieben Wochen alten MSTN^{-/-}-Mäusen Hinweise darauf, dass kardial sezerniertes Myostatin in einer autokrinen bzw. parakrinen Funktion auf die Kardiomyozyten einwirkt, wohingegen das hauptsächlich vom Skelettmuskel sezernierte systemische Myostatin für die Umbauprozesse am Herzen eine untergeordnete Rolle spielt (72). Sie zeigen außerdem, dass eine Überexpression des kardialen Myostatins zu einer verminderten linksventrikulären Masse führt ohne dabei die linksventrikuläre Ejektionsfraktion zu beeinflussen. Die Reduktion der Herzmasse beruhe, laut Artaza, in Bezug auf in vitro Versuche mit Zellkulturen am ehesten auf einem Zellzyklus-Stop von sich replizierenden Kardiomyozyten, nicht auf Hypertrophie oder Apoptose. Cohn et al. finden bei 24 Monate alten MSTN^{-/-}-Mäusen keine signifikanten Unterschiede in der Herzmasse/Gesamtkörpermasse oder der Zellgröße von Kardiomyozyten sowie in der LVEF verglichen mit Wildtyp-Mäusen (73).

Offensichtlich spielt Myostatin in der fetalen Entwicklung und frühen postnatalen Phase physiologisch eine entscheidende Rolle bei der Regulation der Kardiomyozyten-Hyperplasie. Mc Koy et al. demonstrieren in ihren Versuchen an Rattenherzen, dass während der präpartalen Entwicklungsphase kardiales Myostatin stark herunterreguliert ist, am zehnten postnatalen Tag jedoch, wenn die Proliferation der Kardiomyozyten weitestgehend abgeschlossen ist und Größenzuwachs vor allem über Hypertrophie generiert wird (74), auf das sechsfache der Norm angestiegen ist (75). Im adulten Herzen falle der Myostatin Spiegel laut Mc Koy et al. wieder ab, so dass man annehmen könne, dass die Hauptaufgabe des kardialen Myostatin in der Begrenzung der frühen neonatalen Hyperplasie der Kardiomyozyten besteht.

Mit zunehmendem Alter des Organismus scheint Myostatin die Herzfunktion negativ zu beeinflussen und Fibrose am Herzen zu induzieren, da 27-30 Monate alte MSTN^{-/-}-Mäuse im Vergleich zu ihren Wildtyp-Artgenossen weniger myokardiale Fibrose, geringere LV-Dilatation und eine bessere Herzfunktion aufweisen (76). Die verbesserte Herzfunktion hängt laut Morissette et al. mit einer erhöhten Phosphorylierung des sarkoplasmatischen Proteins Phospholamban zusammen, das zu einer erhöhten Calcium-Ausschüttung ins Zytosol während der Systole führt (77).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass Myostatin (wenn auch deutlich geringer als an der Skelettmuskulatur) am Herzen exprimiert wird und in der Lage ist, in bestimmten Situationen Effekte auf die Herzmuskulatur sowie auf die Skelettmuskulatur

auszuüben. Inwieweit das kardiale Myostatin allerdings zum systemischen Myostatin-Spiegel beiträgt, ob systemisches Myostatin am Herzen metabolisiert wird und welchen Zusammenhang die Myostatin-Konzentration im Serum und die MSTN-Expression im Herzmuskel bei pathologischen Zuständen des Herzens haben, ist weiterhin ungeklärt bzw. bedarf ausführlicher weiterer Studien. Ansätze zu diesem Thema werden in Kapitel 2.3 wieder aufgegriffen.

2.1.5.4 Lokal vs. systemisch

Da in den vorhergehenden Kapiteln bereits angeklungen ist, dass Myostatin seine Wirkung im Sinne eines Hormons sowohl autokrin als auch endokrin entfalten kann, soll dieses kurze Kapitel einen Überblick über den Zusammenhang von lokaler gegenüber systemischer Wirkung geben.

Laut Breitbart et al. existieren zumindest in Säugetieren zwei verschiedene Reservoirs von Myostatin (76), die sich in der Art ihrer Aktivierung voneinander unterscheiden. Der systemische Pool speist sich zum Großteil aus Myostatin, das aus dem Skelettmuskel sezerniert wird, zu geringeren Teilen aber auch aus myokardial produziertem und sezerniertem Myostatin (78). Das kardiale Myostatin spielt im gesunden Organismus nur eine untergeordnete Rolle, gewinnt jedoch bei erhöhtem kardialen Stress an Bedeutung und beeinflusst nach Ausschüttung in die Zirkulation im pathologischen Zustand des Herzens die Regulation der Skelettmuskulatur in hohem Maße (76). Lokal wird dem myokardial gebildeten Myostatin eine antihypertrophe, profibrotische Wirkung zugeschrieben, die es jedoch nur auf spezielle Stimuli oder einen pathologischen Zustand des Herzens hin entfaltet. Dies wird in Kapitel 2.3 noch genauer erläutert und soll an dieser Stelle nur kurz Erwähnung finden.

Ob auch im Fettgewebe produziertes Myostatin zum Serum-Spiegel beiträgt, ist bislang nicht ausreichend geklärt.

Der Großteil des im Skelettmuskel hergestellten Myostatins wird nicht in den systemischen Kreislauf sezerniert, sondern wird lokal in der extrazellulären Matrix des Muskels in direkter Umgebung der Myozyten gebunden (15). Dieses lokal wirksame Myostatin trägt hauptsächlich zur Regulation der Skelettmuskulatur bei. Dass auch das systemische Myostatin trotz quantitativ geringerem Vorkommen Einfluss auf die Skelettmuskulatur haben kann, liegt an dem schnelleren Aktivierungsmechanismus

(76). Das im Serum zirkulierende Myostatin wurde am Ort seiner Bildung bereits von Furinkonvertasen gespalten und zirkuliert im Serum im latenten Komplex (25). Es benötigt zur Umwandlung in seine bioaktive Form lediglich eine weitere Spaltung durch BMP-1-Metalloproteinasen. Dahingegen liegt das lokal gebundene Myostatin im Skelettmuskel als Pro-Myostatin vor und benötigt für die Umwandlung in seine aktive Form zwei weitere Spaltungen.

Zusammenfassend wirkt Myostatin hauptsächlich am Ort seiner Bildung, nämlich am Skelettmuskel. Darüber hinaus jedoch kann es von verschiedenen Geweben auch in die Zirkulation sezerniert werden und als systemisches Myostatin den lokalen Pool im Skelettmuskel umgehen bzw. vielleicht auch an anderen Geweben, z.B. am Herzen seine Wirkung entfalten.

2.2 Herzinsuffizienz

Um die Patienten unserer Studienpopulation nach wissenschaftlichen Gesichtspunkten eindeutig in Gruppen einteilen zu können, ist eine saubere Definition der Begrifflichkeiten unerlässlich.

Dabei muss die diastolische Herzinsuffizienz inklusive einem ihrer Definitionsmerkmale - der diastolischen Dysfunktion - klar von der systolischen Herzinsuffizienz abgegrenzt werden.

Auch wenn die Konsequenzen einer Trennung beider Herzinsuffizienzformen nach heutigem Forschungsstand kontrovers diskutiert werden, unterscheiden sich Therapie und Prognose nach wie vor erheblich. Weiterhin können für unsere Betrachtungen auch die morphologischen Unterschiede und histologische Kriterien in Bezug auf die Wirkung von Myostatin am Herzen von Bedeutung sein.

2.2.1 Diastolische Herzinsuffizienz

Dougherty et al. gehörten 1984 zu den ersten, die beschrieben, dass auch Patienten mit erhaltener systolischer Pumpfunktion klinische Zeichen einer Herzinsuffizienz wie pulmonale und periphere Ödeme oder Dyspnoe aufweisen können. Man nahm damals an, dass etwa ein Drittel der herzinsuffizienten Patienten an diastolischer

Herzinsuffizienz (DHF) leidet und deren Verlauf und Prognose deutlich günstiger zu beurteilen seien (79).

Mittlerweile geht man davon aus, dass etwa bei der Hälfte aller klinisch relevanten Herzinsuffizienz-Patienten eine nur moderat oder gar nicht verminderte LVEF besteht (80) und die Prognose der Erkrankung ähnlich ungünstig ist wie bei der systolischen Herzinsuffizienz (SHF).

Der Terminus ‚diastolische Insuffizienz‘ entstand daher, dass im Gegensatz zur augenscheinlichen LVEF-Reduktion bei der systolischen Insuffizienz bei der DHF pathophysiologisch die diastolische Füllungsphase beeinträchtigt ist. So definiert sich die DHF neben dem Auftreten klinischer Herzinsuffizienz-Symptome und einer normalen LVEF über die linksventrikuläre diastolische Funktionsstörung im Sinne einer eingeschränkten LV-Relaxation und verminderten Compliance des linken Ventrikels. Diese Dysfunktionen sind jedoch kein reines Merkmal der diastolischen Herzinsuffizienz, sondern können im Gegenteil auch bei der SHF vorkommen und zu einer deutlichen Prognoseverschlechterung führen. Daher spricht man aktuell lieber von einer Herzinsuffizienz mit erhaltener Ejektionsfraktion (engl.: Heart Failure with preserved ejection fraction/HFpEF). Im Gegensatz dazu steht die Herzinsuffizienz mit reduzierter Ejektionsfraktion (HFrEF), die in der Herzinsuffizienz-Forschung mittlerweile die Ausdrucksweise ‚Systolische Herzinsuffizienz‘ ersetzt hat. In dieser Arbeit wird fortan die aktuelle Terminologie verwendet.

Offensichtlich spielen auch Patientencharakteristika wie Alter, Geschlecht und Body Mass Index eine Rolle bei der Entstehung von HFpEF im Gegensatz zu HFrEF. Patienten mit diastolischer Funktionsstörung sind tendenziell eher Frauen (81), im Schnitt etwa drei Jahre älter und signifikant öfter übergewichtig (80). So legen mit der PARAMOUNT-Studie einhergehende Daten nahe, dass Frauen unabhängig von Alter und Komorbiditäten eine signifikant schlechtere linksventrikuläre diastolische Funktion im Sinne einer erhöhten E/E'-Ratio sowie eine verminderte LV-Relaxation aufwiesen (82).

Um eine HFpEF zu diagnostizieren, müssen folgende drei Kriterien erfüllt sein:

1. Klinische Zeichen oder Symptome einer Herzinsuffizienz
2. Eine normale oder nur moderat eingeschränkte LVEF
3. Vorliegen einer diastolischen Dysfunktion

Untersuchungsbefunde bzw. Symptome der HFpEF stellen unter anderem Lungenödeme, Beinödeme, Hepatomegalie, vermehrte Müdigkeit, Leistungsminderung, Belastungsdyspnoe, gestaute Halsvenen, Veränderungen im Thorax-Röntgen dar. Die Grenze einer eingeschränkten LVEF wird von den meisten Untersuchern und Fachgremien mit <50% angegeben (83, 84).

Etwas weniger eindeutig als die beiden ersten Kriterien ist die Definition der diastolischen Dysfunktion.

Zur vereinheitlichten Diagnostik wurde hierzu 2007 von Paulus et al. ein Consensus Statement herausgegeben, das Richtlinien für die echokardiographische, klinisch-chemische Einteilung der HFpEF darstellt und auf die sich in dieser Arbeit bezogen wird.

2.2.1.1 Diastolische Dysfunktion

Wie bereits angedeutet, ist die diastolische Dysfunktion gekennzeichnet durch eine frühdiastolische Relaxations- und Füllungsstörung sowie eine verminderte Dehnbarkeit bei zunehmender Steifigkeit des linken Ventrikels. Die eingeschränkte Funktion des linken Ventrikels während der Diastole führt pathophysiologisch zu einem erhöhten linksventrikulären enddiastolischen Druck. In der Folge entwickelt sich ein zu hoher atrialer bzw. pulmonalkapillärer Druck und es resultieren die bereits oben beschriebenen klinischen Symptome der HFpEF. Die diastolische Dysfunktion korreliert in den meisten Fällen mit einer Reihe von Risikofaktoren, darunter Alter, weibliches Geschlecht, Adipositas, koronare Herzerkrankung, arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus und LV-Hypertrophie (83). In Abwesenheit genannter Faktoren ist die Entwicklung einer diastolischen Dysfunktion eher ungewöhnlich (85). Myokardiale Fibrose ist eine der Hauptdeterminanten in der Pathogenese der Diastolischen Dysfunktion. Bislang existiert keine mortalitätssenkende medikamentöse Therapie zur Behandlung der HFpEF.

Vasan et al. erkannten und benannten bereits im Jahr 2000 die Problematik im klinischen Alltag das Krankheitsbild der diastolischen Insuffizienz zu detektieren (84). Im Vergleich zur relativ einfach zu bestimmenden LVEF erwies sich die Diagnostik der diastolischen Dysfunktion als aufwendig und vielerorts uneinheitlich. Daher sprach er sich für einheitliche Standards und klare Diagnosekriterien aus. Damals erlaubte

letztlich nur der Einsatz einer Herzkatheteruntersuchung mit Druckmessungen im linken Ventrikel die endgültige Diagnose einer HFpEF. Nach wie vor liefert diese Methode endgültige Sicherheit über das Vorliegen einer linksventrikulären Füllungs- bzw. Relaxationsstörung. Darüber hinaus existieren heutzutage jedoch weitere nicht-invasive Möglichkeiten eine diastolische Dysfunktion zu diagnostizieren, die für den Patienten deutlich weniger belastend und in ihrer diagnostischen Wertigkeit kaum unterlegen sind. Allen voran ist hierbei die Echokardiographie zu nennen.

Im Einzelnen kommen folgende echokardiographische Untersuchungstechniken zum Einsatz:

Die *Mitral-Dopplerfluss-Messung* stellt vor allem das Verhältnis vom frühen, passiven Blutstrom von Atrium zu Ventrikel im Vergleich zur spätdiastolischen aktiven Füllung dar (E/A). Bei normaler diastolischer Funktion sollte der Quotient von E/A positiv sein, bei gestörter Funktion negativ, wobei zu beachten ist, dass der Gradient bei längerfristiger Funktionsstörung über eine Erhöhung des atrialen Drucks wieder pseudonormalisiert sein kann. Nachteil ist die geringe Spezifität.

Die *Fabdoppler-M-Mode-Echokardiographie* erlaubt dabei über die Messung der Einflussgeschwindigkeit in den LV eine bessere Unterscheidung zwischen normalem und pseudonormalem Quotienten. Bei erniedrigter Flussgeschwindigkeit ist von einer gestörten diastolischen Funktion auszugehen.

Mit der *Gewebedoppler-Methode* scheint die exakteste echokardiographische Bestimmung der linksventrikulären Füllungsdrücke möglich zu sein (86),(87),(88). Dabei werden über den Quotienten E/E' die frühdiastolische transmitrale Füllungsgeschwindigkeit und die frühdiastolische Mitralanulusgeschwindigkeit ins Verhältnis gesetzt.

Liegt der Gradient E/E' über 15, spricht dies mit einer hohen Spezifität für das Vorliegen eines erhöhten mittleren linksventrikulären diastolischen Füllungsdrucks (M-LVDP) und damit einer diastolischen Funktionsstörung. Ist der Gradient kleiner acht, kann eine diastolische Dysfunktion mit einem negativen prädiktiven Wert von 97% ausgeschlossen werden (86).

Einen weiteren Baustein zur Diagnostik der diastolischen Dysfunktion stellt das B-Typ natriuretische Peptid (BNP) bzw. dessen biologisch inaktives Fragment NT-ProBNP dar.

Die Ausschüttung von NT-ProBNP ist beim herzinsuffizienten Patienten eine Antwort auf erhöhte Wandspannung und wirkt über eine verstärkte Natriurese, Vasodilatation und verbesserte LV-Relaxation.

Anders als die echokardiographischen Parameter unterliegt dieser Laborwert nicht der Subjektivität des Untersuchers und verfügt gleichzeitig über einen sehr hohen negativen prädiktiven Wert (89). Damit stellt es einen hervorragenden Parameter zum Ausschluss einer HFpEF bei Patienten mit nicht kardial verursachter Dyspnoe dar und detektiert zuverlässig eine symptomatische diastolische Dysfunktion. Es eignet sich als isolierter Marker für eine diastolische Dysfunktion ohne klinische Symptomatik jedoch nur bedingt (83). Wie Dokainish et al. 2004 beschreiben, scheint die Echokardiographie mit dem Quotienten E/E' eine, wenn auch nur marginal erhöhte, Aussagekraft für die Diagnose der diastolischen Dysfunktion zu besitzen (90).

Neben der Echokardiographie und der klinischen Chemie bringt die Katheterisierung des Herzens den direktesten Beweis einer diastolischen Dysfunktion. Wie in der Publikation der European Study Group on Diastolic Heart Failure aus dem Jahr 1998 vorgeschlagen, existieren hämodynamische Kriterien, die eine diastolische Dysfunktion bestätigen (91). Überschreitet der linksventrikuläre enddiastolische Druck (LVEDP) 16 mmHg oder der mittlere pulmonalkapilläre Verschlussdruck (mPCW) 12 mmHg, gilt eine diastolische Dysfunktion bei gleichzeitig normalem linksventrikulären, enddiastolischen Volumenindex (LVEDVI) als erwiesen.

Gleichzeitig gilt auch eine verlangsamte LV-Relaxation (definiert über die diastolische Relaxationskonstante $\tau > 48\text{ms}$) bzw. eine erhöhte Steifigkeit des linken Ventrikels als wegweisend. Einen schematischen Überblick inklusive chronologischem Leitfaden über die beschriebenen Diagnosekriterien gibt Abbildung 2.

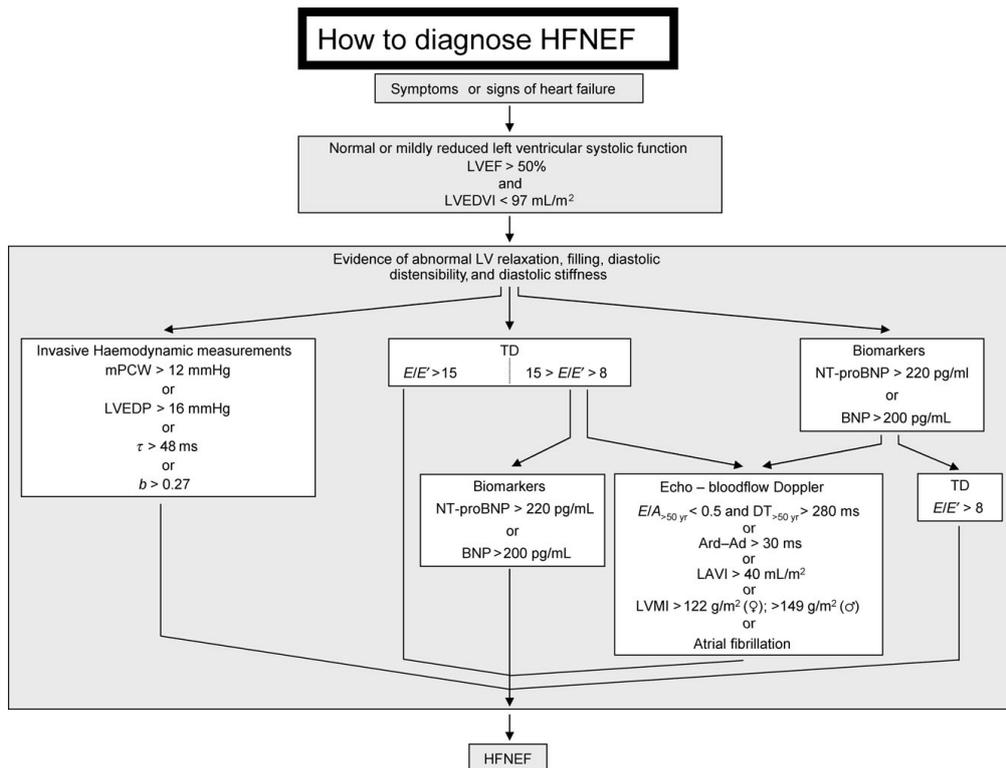


Abbildung 2 Diagnose der Herzinsuffizienz mit erhaltener Ejektionsfraktion (83)

2.2.1.2 Linksventrikuläre Hypertrophie (LVH)

Linksventrikuläre Hypertrophie beschreibt die physiologische oder pathologische Anpassung der linken Herzkammer an erhöhte Druck- und/oder Volumenverhältnisse. Dies kann extrinsisch (arterielle Hypertonie, Aortenstenose, Ischämie) oder intrinsisch (z.B. hypertrophe Kardiomyopathie) bedingt sein. Dabei zeigt sich ultrastrukturell eine Hypertrophie der einzelnen Myozyten, wohingegen eine relevante Zunahme der Zellzahl ausbleibt. Neben den Veränderungen in den Myozyten lassen sich in der Pathophysiologie der Linksherzhypertrophie auch Anpassungen in der Extrazellulärmatrix und den Koronargefäßen im Sinne einer myokardialen Fibrose bzw. vaskulären Sklerose feststellen.

Im Gegensatz dazu geht die physiologische LVH bei Sportlern mit einer prinzipiell reversiblen Hypertrophie der Myozyten einher, die Extrazellulärmatrix bleibt unverändert, myokardiale Fibrose entsteht nicht. Die Komposition des Herzmuskelgewebes bleibt größtenteils erhalten (92).

Daher ist bei Sportlern, anders als bei Hypertonikern, die kardiale Hypertrophie nicht mit einer diastolischen Dysfunktion assoziiert (93).

Gleichzeitig stellt die LVH einen wichtigen prognostischen Marker für Herzinsuffizienz und insgesamt kardiovaskulär bedingte Mortalität dar (94). Es konnte gezeigt werden, dass LVH ein unabhängiger Risikofaktor für Koronare Herzerkrankung, plötzlichen Herztod, Herzinsuffizienz und Schlaganfall ist (95-97).

Linksventrikuläre Hypertrophie ist keine obligatorische Komponente der diastolischen Dysfunktion, kann aber Teil des Pathomechanismus sein (98).

Man könnte annehmen, dass die Myostatin-Spiegel bei diesen Patienten auf Grund der antihypertrophen Wirkung von Myostatin erniedrigt seien. Entgegen der intuitiven Vermutung sind sie bei Versuchstieren mit ausgeprägter kardialer bzw. skelettmuskulärer Hypertrophie allerdings deutlich erhöht, wohingegen Sport und körperliche Betätigung die Myostatin-Ausschüttung bei chronisch herzinsuffizienten Patienten zu senken vermag (99).

2.2.2 Herzinsuffizienz mit reduzierter Ejektionsfraktion

Die WHO definiert seit 1995 Herzinsuffizienz als die Unfähigkeit des Herzens, den Organismus mit ausreichend Blut und damit mit genügend Sauerstoff zu versorgen um den Stoffwechsel unter Ruhe- wie unter Belastungsbedingungen zu gewährleisten. Klinisch liegt eine Herzinsuffizienz vor, wenn typische Symptome (Dyspnoe, Knöchelödeme, Fatigue) und Zeichen (erhöhter Jugularvenendruck, Rasselgeräusche über der Lunge, Verlagerung des Herzspitzenstoßes) auf dem Boden einer kardialen Erkrankung bestehen.

Im Gegensatz zur bereits besprochenen HFpEF besteht das Problem der HF_rEF in einer Kontraktionsschwäche des linken Ventrikels während der Systole. Dadurch ist das Schlagvolumen vermindert und die LVEF eingeschränkt.

Da auch bei der Herzinsuffizienz mit reduzierter Ejektionsfraktion eine oftmals vorausgehende diastolische Funktionsschwäche des linken Ventrikels begleitend vorliegen kann, wird dieser Terminus dem Ausdruck ‚Systolische Herzinsuffizienz‘ mittlerweile bevorzugt.

Die Prognose der chronischen Herzinsuffizienz ist weiterhin außerordentlich schlecht. So ist die mittlere Überlebensdauer von Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz

heutzutage niedriger als die der meisten Karzinome (100). Umso entscheidender ist ein besseres Verständnis der pathophysiologischen Zusammenhänge über die Entstehungsmechanismen der Herzinsuffizienz. Neben anderen neurohormonalen Faktoren scheint auch Myostatin eine Rolle bei der Entstehung der Herzinsuffizienz zu spielen. Besonders im Hinblick auf den mitunter drastischen Verlust an Skelettmuskelmasse, auch kardiale Kachexie genannt, muss das Ausmaß der Beeinflussung durch Myostatin näher untersucht werden.

2.2.2.1 Kardiale Kachexie

Kachexie bzw. der krankhafte, ungewollte Abbau von Körpermasse sind bei einer Vielzahl von chronischen Erkrankungen im Endstadium zu beobachten. Dazu zählen unter anderem tumoröse Erkrankungen, AIDS, chronische Lungenerkrankungen und die Herzinsuffizienz.

Im Zusammenhang mit letzterer spricht man auch vom Symptom der kardialen Kachexie. Eine einheitliche Definition dessen ist bis heute nicht gelungen. Anker et al. definierten kardiale Kachexie 2003 als die nicht ödematöse Abnahme des Gesamtkörpergewichts von >6% über einen Zeitraum von sechs Monaten (101). Dies ist bis heute die gängigste Methode um kardiale Kachexie zu definieren. Leicht modifiziert wurde diese Definition während der Cachexia Consensus Conference von 2006. Hier sprach man sich dafür aus, Kachexie als metabolische Dekompensation mit Gewichtsabnahme von 5% über zwölf Monate oder weniger in Patienten mit chronischer Erkrankung anzusehen und zusätzlich klinische und Laborparameter mit einzubeziehen (102).

Allgemeine Übereinstimmung gibt es darüber, kardiale Kachexie als eigenständigen Risikofaktor für Mortalität bei Patienten mit Herzinsuffizienz zu betrachten. Zu dem Zeitpunkt, an dem kardiale Kachexie bei einem herzinsuffizienten Patienten diagnostiziert wird, verringert sich die Überlebenschance drastisch. So beträgt die Mortalität über 18 Monate bei Patienten mit kardialer Kachexie 50% im Vergleich zu nichtkachektischen Herzinsuffizienz-Patienten mit 17% (103).

Neben dem drastischen Verlust an Skelettmuskelmasse sind auch das Fett- und Knochengewebe vom Abbau betroffen (104). Die Prävalenz der kardialen Kachexie beträgt circa 15 Prozent und bis zu zwei Drittel der herzinsuffizienten Patienten

entwickeln im Laufe ihrer Erkrankung ein als *Wasting* bezeichnetes Phänomen, bei dem eine Abnahme der Extremitätenmuskulatur ohne Abnahme an Gesamtkörpergewicht einhergeht, wie Mancini et al. 1992 publizierten (105).

Die pathophysiologischen Zusammenhänge der kardialen Kachexie sind bislang nicht endgültig verstanden. Eine ausführliche Besprechung dieser ist im Rahmen dieser Arbeit nicht von Bedeutung. Dennoch ist es wichtig zu erwähnen, dass nach aktuellem Forschungsstand veränderte Konzentrationen von Hormonen bzw. Zytokinen beobachtet werden, die am Entstehen der kardialen Kachexie in unterschiedlichem Maße beteiligt sind.

So werden bei chronisch herzinsuffizienten Patienten erhöhte Spiegel von Adrenalin und Noradrenalin beobachtet (106). Auch Cortisol als kataboles Hormon ist im Rahmen der kardialen Kachexie erhöht, wohingegen sein anabolischer Gegenspieler Dehydroepiandrosteron (DEAH) im Serum vermindert ist (106). Resistenzen gegenüber Wachstumshormon (107), abnormale Aldosteron-Konzentrationen (106) und erhöhte Angiotensin II-Spiegel (108) sind beschrieben in Patienten mit fortgeschrittener Herzinsuffizienz und kardialer Kachexie. Gleichzeitig scheinen die Zytokine TNF-alpha, Interleukin-1 und 6 eine Rolle in der Entstehung der kardialen Kachexie zu spielen (106). Besonders TNF-alpha werden verschiedenste Pathomechanismen wie die Apoptose-Induktion (109), die Beeinträchtigung der endothelialen Funktion (110) oder die Steigerung des Sättigungshormons Leptin (111) zugeschrieben, welches eine rasche Gewichtsabnahme fördert.

Neben den eben beschriebenen Botenstoffen gibt es Hinweise darauf, dass auch Myostatin eine bedeutende Rolle bei der Abnahme der Muskulatur im Rahmen der kardialen Kachexie spielt (78).

2.3. Myostatin am pathologischen Herzen

Unter physiologischen Bedingungen spielt Myostatin am adulten Herzen eine untergeordnete Rolle. Zwar wiesen Sharma et al. 1999 erstmals eine Myostatin-Expression an Purkinje-Fasern des Schafes nach und lieferten damit den Beweis, dass neben dem Skelettmuskel und dem Fettgewebe auch das Herz in den Myostatin-Metabolismus eingebunden ist (9). Dennoch hat das kardial produzierte Myostatin am gesunden adulten Herzen offenbar nur geringen Einfluss auf das Wachstum bzw. die

Wachstumshemmung der Skelettmuskulatur (78) und trägt nur zu einem sehr geringen Prozentsatz zu systemischen Myostatin-Spiegeln bei (76).

Neben dem adulten, gesunden Organismus ohne chronische oder akute Belastung des Herzens existieren eine Reihe von pathologischen Zuständen, bei denen das kardial produzierte Myostatin in den Mittelpunkt der Betrachtung rückt. Erst auf bestimmte Reize hin scheint sich die kardiale MSTN-Expression und -Sekretion signifikant zu verändern. Welche Reize im Einzelnen verantwortlich sind bzw. in welcher Weise die Myostatin-Produktion bzw. -Metabolisierung am Herzen beeinflusst wird, soll im Folgenden beleuchtet werden.

Wie bereits erwähnt, beschäftigten sich Sharma et al. 1999 erstmals mit der Bedeutung von Myostatin am Herzen. Sie untersuchten die MSTN-Expression an Schafsherzen und induzierten dafür ST-Hebungsinfarkte im Ventrikel-Myokard. Beobachtet werden konnte die erhöhte Expression von MSTN in den periinfarzierten Kardiomyozyten, wohingegen die Expression im gesunden Gewebe und direkt im Infarktgebiet auf Kontroll-Niveau blieb (9). Damit in Einklang steht die Studie von Lenk et al., die durch eine Ligatur des Ramus interventricularis anterior eine ischämische Kardiomyopathie an Mäusen induzierten und acht Wochen später vierfach erhöhte kardiale Protein-Expression von Myostatin registrierten (99). Im Gegensatz dazu ist in dieser Studie die mRNA-Expression weder am Herzen noch am Skelettmuskel signifikant gesteigert, was Fragen über die Herkunft des Myostatins aufwirft. Anhand dieser Ergebnisse folgerten die Arbeitsgruppen, dass Myostatin in gewisser Weise an Remodelling-Prozessen am Herzen beteiligt sein muss.

In den vergangenen Jahren intensivierte sich die Forschung zur Rolle von Myostatin bei Herzinsuffizienz bzw. chronischer Druck-/Volumenbelastung des Herzens.

In vitro-Experimente unter anderem von Shyu 2005 zeigen, dass periodische Dehnung (cyclic stretching) der Kardiomyozyten zu einer vermehrten Myostatin-Ausschüttung führt (112).

Auf diesen Beobachtungen aufbauend, entwarfen sie durch aorto-cavales Shunting bei Ratten ein Modell der erhöhten Druck-/Volumen-Belastung des Herzens und erzeugten somit eine periodische Dehnung in vivo. Vier Wochen nach Anlage des Shunts beobachteten sie eine signifikant erhöhte Myostatin-mRNA-Expression im Ventrikelmyokard (113).

Darüber hinaus kann die Myostatin-Expression in vitro auch durch humorale Stimulation beeinflusst werden. Mehrere Autoren beschreiben einen engen Zusammenhang der

Myostatin-Expression mit der Sekretion von IGF-1 im Sinne eines negativen Feedback-Mechanismus (112, 114, 115). In der Zwischenzeit konnten weitere Stimulantien ausgemacht werden, darunter Angiotensin II (116), TNF-alpha (99), Urotensin und Urocortin (117).

Auch die Stimulation von Kardiomyozyten durch eine Phenylephrin-Injektion führt zur erhöhten MSTN-Expression in vitro. Morissette et al. zeigten, dass Myostatin die Phenylephrin-vermittelte Hypertrophie in primären Kardiomyozyten über eine Hemmung von Akt inhibiert (46).

Diese in-vitro-Ergebnisse replizierten sie in der Folge auch in vivo, indem sie eine erhöhte Akt-Aktivierung und myokardiale Hypertrophie in Folge einer Phenylephrin-Injektion bei MSTN-KO-Mäusen im Vergleich zu Kontrollen demonstrierten. Diese Versuche legen zudem die Vermutung nahe, dass Myostatin nicht nur das Skelettmuskelwachstum, sondern auch das Herzmuskelwachstum reguliert. Interessanterweise war diese Beobachtung geschlechtsspezifisch. So erhöhte sich das Herzgewicht bei männlichen MSTN KO-Mäusen Stimulus-spezifisch signifikant, während das der weiblichen Mäuse unverändert blieb (46). Versuche an transgenen Mäusen zeigen, dass die Gesamtmasse des Herzens sowie die linksventrikuläre Masse bei Überexpression von kardialem Myostatin vermindert sind, ohne dass die LVEF davon beeinflusst wird (72).

Wie bereits erwähnt, zeigen auch Lenk et al. 2009 einen Anstieg der Proteinexpression im Skelettmuskel (2,4-fach) und sogar noch stärker im Herzmuskel (4-fach) auf eine induzierte kardiale Ischämie hin. Die erhöhte Expression konnte durch körperliche Betätigung innerhalb von 4 Wochen wieder auf das Ausgangsniveau gesenkt werden (99).

Mit der MSTN-Expression in Herz- und Skelettmuskel bzw. der Frage nach der Herkunft von systemischem Myostatin beschäftigen sich auch Heineke und Kollegen.

Sie zeigten an Mäusen mit herzspezifischer Deletion des MSTN-Gens, dass nach induzierter Druck-Volumen-Belastung durch TAC (Transverse Aortic Constriction) der Myostatin-Plasmaspiegel gleich bleibt, wohingegen sie bei Artgenossen vom Wildtyp ohne herzspezifische Deletion einen 3-4-fachen Anstieg der Plasmakonzentration von Myostatin feststellten (78). Der erhöhte Plasmaspiegel wiederum führt zu einer deutlichen Reduktion der Skelettmuskelmasse sowie zusätzlich zu einer geringeren, aber dennoch signifikanten Abnahme der Herzmasse. Damit messen sie dem Herzen eine bedeutende Rolle als endokrin aktives Organ in der Pathophysiologie der

Herzinsuffizienz bzw. der kardialen Kachexie bei. Sie zeigen weiterhin, dass der Verlust an Muskelmasse als Resultat der Herzinsuffizienz durch die systemische Gabe eines Myostatin inhibierenden Antikörpers (JA-16) gemindert werden kann. In Abwesenheit einer Pathologie am Herzen hat das von den Kardiomyozyten produzierte Myostatin keinen Einfluss auf den Plasmaspiegel oder das Größenwachstum der Skelettmuskulatur (78).

Um herauszufinden, ob sich dieser Sachverhalt auch auf den Menschen übertragen lässt, untersuchten George et al. 2010 Herzen von Patienten mit transplantationsbedürftiger Herzinsuffizienz während einer Left Ventricular Assist Device (LVAD)-Implantation und verglichen diese mit gesunden Herzen von Organspendern, die nicht rechtzeitig zur Transplantation zugeteilt werden konnten. Dabei zeigten sich mittels Western Blot-Analyse signifikant erhöhte Propeptid-Spiegel bei Patienten mit dilatativer und ischämischer Kardiomyopathie (DCM/ICM) vor LVAD-Implantation (115) als Zeichen erhöhter Myostatin-Aktivierung im Myokard. Außerdem wiesen sie in Serum-Proben eine um ca. 40% erhöhte Konzentration von Myostatin im latenten Komplex im Vergleich zu herzgesunden Patienten nach. Auch die Metalloproteinase BMP-1, verantwortlich für die Abspaltung des C-terminalen Peptids aus dem latenten Komplex, war bei den herzinsuffizienten Patienten signifikant erhöht, für den Rezeptor ActRIIB zeigte sich keine Signifikanz, jedoch ein Trend in Richtung Erhöhung. Zu ähnlichen Ergebnissen kommen Gruson et al. in ihrer Studie an 76 Patienten mit hauptsächlich leicht- bis mittelgradiger chronischer Herzinsuffizienz. Sie zeigen bei herzinsuffizienten Patienten einen ca. 1,5-fachen Anstieg der Serum-Myostatin-Immunreaktivität, die mit klinischen Parametern (NYHA-Klasse), nicht jedoch mit der LVEF korreliert (118).

Im Gegensatz zu diesen drei Studien stehen die Ergebnisse von Zamora und Lenk (119, 120). Beide finden in Serumproben von HFrEF-Patienten keine Erhöhung der Myostatin-Konzentration. Die Aussagekraft dieser Ergebnisse muss jedoch angesichts der niedrigen Zahl an Kontrollen (70 HFrEF vs. 11 Kontrollen) bei Zamora bzw. der insgesamt niedrigen Fallzahlen (12 HFrEF vs. 12 Kontrollen) bei Lenk angezweifelt werden. Zusammengefasst lassen sich aus den oben beschriebenen Studien folgende Kernaussagen zum aktuellen Forschungsstand zu kardialem Myostatin treffen:

- Physiologisch ist die Bedeutung von Myostatin-Expression/Sekretion am Herzen sowie die Wirkung von systemischem Myostatin auf das Herz gering.

- Myostatin ist nach Myokardinfarkt an Remodelling-Prozessen am Herzen beteiligt.
- Eine erhöhte Druck-Volumen-Belastung des linken Ventrikels führt zu einer erhöhten MSTN-Expression im Ventrikelmyokard.
- Es existiert ein enger Zusammenhang zwischen IGF-1-Ausschüttung und MSTN-Expression am Herzen.
- Myostatin vermittelt seine Wirkungen unter anderem über die Inhibierung von Akt.
- In Reaktion auf kardiale Ischämie steigt die MSTN-Expression sowohl im Skelett- als auch im Herzmuskel.
- Der systemische Plasmaspiegel von Myostatin speist sich physiologisch zu großen Teilen aus dem Skelettmuskel.
- Bei akuter Belastung des Herzens erhöht sich der Myostatin-Plasmaspiegel auf Grund von vermehrter kardialer Sekretion.
- Kardiale Überexpression und vermehrte Sekretion von Myostatin können Ursache für die pathologische Abnahme von Skelettmuskelmasse (kardiale Kachexie) sein und gleichzeitig die Herzmasse bzw. LV-Masse beeinflussen.
- Bei Patienten mit chronischer systolischer Herzinsuffizienz (HFrEF) sind die Myostatin-Plasmaspiegel ca. um den Faktor 1,5 im Vergleich zu Kontrollen erhöht.

In dieser Arbeit soll nun erstmals durch die Bestimmung des Koronargradienten, der die Differenz zwischen arterieller und koronarvenöser Konzentration darstellt, eine Einschätzung der myokardialen Myostatinfreisetzung bzw. -aufnahme am menschlichen Herzen möglich gemacht werden. Über die Entnahme von Blutproben arteriell, venös und aus dem Sinus coronarius kann der Myostatin-Gradient über dem Herzmuskel sowie dem Skelettmuskel bestimmt und zwischen den nicht herzinsuffizienten Kontrollpatienten und herzinsuffizienten Patienten verglichen werden. Dabei konzentriert sich diese Arbeit erstmals vordergründig auf Patienten mit diastolischer Herzinsuffizienz, da Myostatin in den beschriebenen Vorarbeiten als Regulator von myokardialer Hypertrophie und Fibrose charakterisiert worden ist (47, 121, 122). Außerdem gibt es bisher keine klinischen Befunde zu Myostatin-Plasmaspiegeln und

HFpEF. In diesem Zusammenhang soll auch die Beziehung zwischen Myostatin und der linksventrikulären Herzmasse untersucht werden.

3. Material und Methoden

3.1 Patienten

Für die Studie kamen Patienten in Frage, die sich auf Grund eines paroxysmalen oder persistierenden Vorhofflimmerns für eine elektive Ablation des linken Vorhofes bzw. der Pulmonalvenen in stationäre Behandlung begaben. Im Rahmen dieses Eingriffes werden routinemäßig der Sinus coronarius sondiert sowie die Arteria femoralis und die Venae femorales katheterisiert, so dass für die sequentielle Blutentnahme den Patienten keine zusätzlichen invasiven Maßnahmen zugemutet werden. Die Patienten wurden ausschließlich von den kardiologischen Stationen 132/133 aus der Klinik für Kardiologie und Angiologie am Standort Mitte der Charité Universitätsmedizin Berlin rekrutiert. Alle Patienten wurden am Vortag des Eingriffs über Nutzen, Risiken und mögliche Komplikationen des Eingriffs sowie der Blutentnahme aufgeklärt und gaben schriftlich ihr Einverständnis. Die Durchführung der Studie erfolgte gemäß den Statuten der Deklaration von Helsinki (Ethikantragsnummer 1/143/10).

3.1.1 Ein- und Ausschlusskriterien

Um in die Studie aufgenommen zu werden, mussten die Patienten alle Einschlusskriterien erfüllen und durften von keinem der Ausschlusskriterien betroffen sein (siehe Tabelle 1).

Einschlusskriterien	Ausschlusskriterien
1.) Klinische Indikation für die Durchführung einer linksatrialen Ablation/PVI	1.) Patienten unter 18 Jahre
2.) Zustimmungsfähigkeit des Patienten	2.) Schwangerschaft
3.) Unterzeichnete Einverständniserklärung	3.) Unklare Anamnese/verminderte Einsichtsfähigkeit
	4.) Bekannter arterio-venöser Shunt

Tabelle 1 Ein- und Ausschlusskriterien für Studienteilnahme

3.1.2 Einteilung in Studienkohorten

Unserem Studienprotokoll folgend wurden die Patienten an Hand von klinischen und echokardiographischen Kriterien in drei Kohorten eingeteilt (siehe Tabelle 2). Die Einteilung erfolgte absolut, kein Patient durfte in zwei Studienkohorten gleichzeitig vorkommen. Im Zweifel erfolgte eine wiederholte Einschätzung des echokardiographischen Befundes, um eine eindeutige Zuweisung der Patienten zu gewährleisten.

Aus unserer Fragestellung ergaben sich folgende drei Patientenkohorten:

Kontrollen	HFpEF	HFrEF
VHF-Patienten ohne anamnestische, klinische oder echokardiographische Anzeichen für eine Herzinsuffizienz oder diastolische Dysfunktion	VHF-Patienten mit echokardiographischem Nachweis einer diastolischen Dysfunktion oder erhöhtem NT-proBNP und Anamnese/Klinik für Herzinsuffizienz ohne eingeschränkte Ejektionsfraktion	VHF-Patienten mit Anamnese/Klinik für Herzinsuffizienz und eingeschränkter Ejektionsfraktion (LVEF <45%)

Tabelle 2 Kohorteneinteilung

Die Zuteilung zu der HFpEF-Kohorte erfolgte an Hand der oben beschriebenen Kriterien zur Diagnosestellung der diastolischen Herzinsuffizienz nach Paulus 2007. Da es sich bei unserem Patientenkollektiv ausschließlich um Patienten mit Vorhofflimmern handelt, erfordert die Zuteilung zur HFpEF-Kohorte ein echokardiographisch ermitteltes $E/E' > 8$ bzw. ein NT-ProBNP größer 220 pg/ml (Vgl. Abbildung 2 im Abschnitt *Einleitung*).

3.2 Präinterventionelle Untersuchungen

3.2.1 Anamnese

An klinischen Daten wurden folgende Parameter im Patientengespräch erfragt oder aus vorhergehenden Epikrisen ermittelt:

- Patientendaten (Alter, BMI, Geschlecht,)
- Kardiovaskuläre Vorerkrankungen (Arterielle Hypertonie, KHK,)
- Medikamente, die seit mindestens 6 Monaten eingenommen werden (ACE-Hemmer, Beta-Blocker, AT1-Blocker, Furosemid/Torasemid, HCT,)

Diese Daten wurden anonymisiert auf CRF-Bögen vermerkt und elektronisch gespeichert. Sie werden in der Auswertung mit den Konzentrationen von Myostatin in Zusammenhang gestellt.

3.2.2 Transthorakale Echokardiographie

Neben einer routinemäßigen transösophagealen Echokardiographie (TEE) zum Ausschluss intracavitärer Thromben am Vortag des Eingriffs wurde zusätzlich ein transthorakales Echokardiogramm angefertigt. Dabei sollten die globale Linksventrikuläre Ejektionsfraktion (LVEF), sowie die diastolischen Funktionsparameter, insbesondere E/E', ermittelt werden um eine vorliegende diastolische Dysfunktion zu detektieren und die Patienten anhand der oben beschriebenen Kriterien den drei Studienkohorten zuordnen zu können.

Die Einteilung der Patienten zur Kontroll- bzw. HFpEF-Gruppe nahmen wir mit Hilfe des echokardiographischen Parameters E/E' vor (siehe 3.1.2).

Zur Untersuchung wurde das Echokardiographie-Gerät Vivid 7 der Firma GE Health Care verwendet. Die benötigten Parameter wurden mittels 2D-Echokardiographie und Gewebedoppler im Zwei-, Drei-, und Vierkammerblick erhoben.

3.2.3 Kardio-CT und Bestimmung der linksventrikulären Herzmasse

Ebenfalls am Tag vor der Ablation wurde jeder Patient routinemäßig einer Computertomographie des Herzens unterzogen. Mit Hilfe des CT-Bildes und des 3D-Mapping-Programms CARTO der Firma Biosense Webster wurde ein dreidimensionales Abbild des linken Atriums inklusive der Pulmonalvenen erstellt um eine bessere Orientierung während der Ablation zu gewährleisten.

Außerdem wurde bei den meisten Patienten ein Großteil des linken Ventrikels mitabgebildet, so dass darüber die für die vorliegende Fragestellung relevante LV-Masse ermittelt werden kann. Dies erfolgt halbautomatisch mittels der Workstation Vitrea fX (Vital Images).

Da die präinterventionelle CT-Untersuchung primär eine Abbildung des linken Atriums zum Ziel hatte, variiert die Darstellung des linken Ventrikels beträchtlich zwischen den Patienten. Aus ethischen Gründen verzichteten wir auf eine studienspezifische Erweiterung des Durchleuchtungsschemas bzw. erneute Aufnahmen und beschränkten uns auf die im Rahmen der PVI-Vorbereitung erhobenen Daten.

Bei insgesamt 15 der 43 untersuchten Patienten reichte der abgebildete Anteil des LV nicht aus um daraus eine valide Masse-Berechnung durchzuführen. Daher werden in den Betrachtungen zur LV-Masse-Korrelation lediglich die 28 Patienten mit vollständig abgebildetem Ventrikel berücksichtigt.

3.3 Pulmonalvenenisolation und Blutentnahme

Am Interventionstag erfolgte nach ausführlicher Aufklärung und Vorbereitung des Patienten nach üblichem Schema die Punktion der beiden Vv. femorales sowie der A. femoralis links.

Zwecks intrakardialer Ableitung der Potentiale wurden zunächst der HIS-Katheter und der CS-Katheter über die 6 French-Schleusen eingebracht und unter Durchleuchtung im septalen Bereich des rechten Ventrikels bzw. im Koronarsinus platziert. Sobald der HIS-Katheter sowie der CS-Katheter in die gewünschte Lage vorgeschoben waren, erfolgte im Anschluss die Blutentnahme.

Dazu wurde ein AL II 6 French diagnostischer Katheter der Firma Cordis verwendet. Dieser wurde durch die 6F-Schleuse in die rechte Vena femoralis eingeführt und unter röntgenologischer Kontrolle bis in das rechte Atrium vorgeschoben. Unter stetem Wechsel der Durchleuchtungsebene zwischen der left anterior oblique (LAO)- und right anterior oblique (RAO)-Projektion erfolgte die Sondierung des CS. Der Katheter sollte optimalerweise 3-5 Zentimeter in den Sinus coronarius eingeführt sein um eine Vermischung von kardialem und corporalem venösen Blut zu verhindern (wie in Abbildung 3 dargestellt). Sobald der Katheter an der optimalen Position fixiert war, wurde mit einer üblichen 10 ml Spritze 6 ml venöses Blut aus dem Sinus coronarius abgenommen. Im weiteren Verlauf wurden aus den Zugängen an der Leiste 6 ml venöses Blut aus der Vena femoralis sowie 6 ml arterielles Blut aus der Arteria femoralis nach vorheriger Spülung mit NaCl 0,9% mit Hilfe einer handelsüblichen 10 ml Spritze entnommen.

Direkt im Anschluss an die Blutentnahmen wurden die Proben in EDTA-Röhrchen umgefüllt und schnellstmöglich bei vier Grad Celsius, 3500 Umdrehungen pro Minute, 15 Minuten lang zentrifugiert. Das überstehende Plasma wurde abpipettiert und zu jeweils 3 mal 800 µl pro Probe in kleine 2ml Probengefäße aufgeteilt. Die Proben wurden direkt danach sortiert und bei -80 Grad Celsius bis zur weiteren Verarbeitung tiefgefroren und gesammelt.

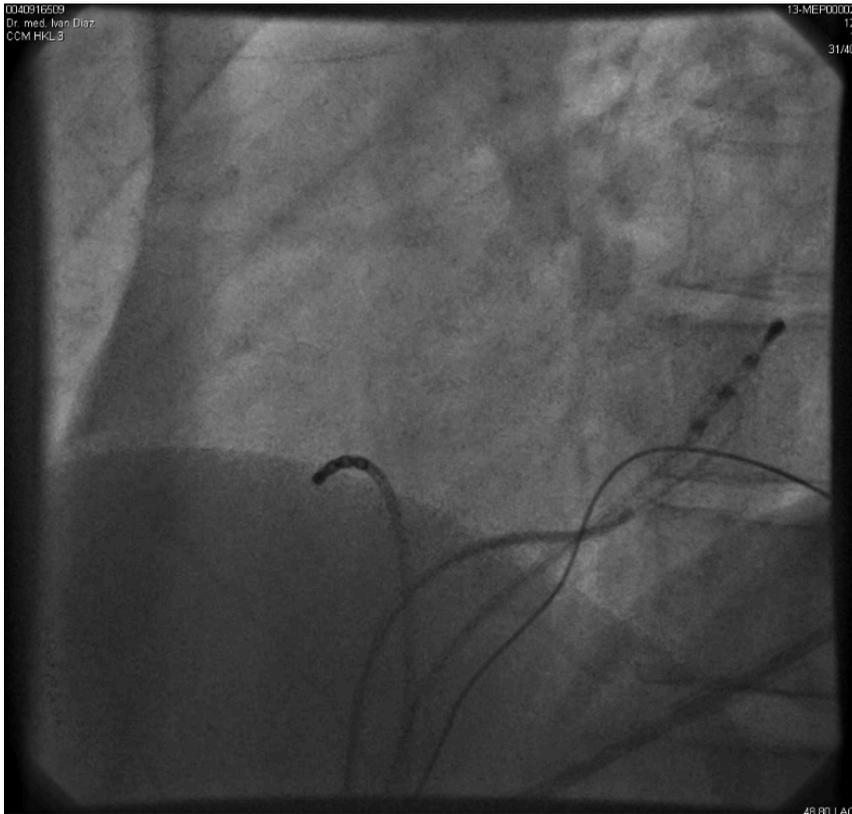


Abbildung 3 Sondierung des Sinus coronarius zur Blutentnahme im Rahmen einer Pulmonalvenenisolation

Nach der Blutentnahme wurde der eigentliche Eingriff fortgeführt. Erfolg oder Misserfolg der Ablation spielten für diese Studie keine Rolle, lediglich die erfolgreiche Blutentnahme.

3.4 Labortechnische Auswertung der Proben

3.4.1 ELISA zur Myostatin-Konzentrationsbestimmung

Die Messung der Proben erfolgte mit Hilfe des von der Immundiagnostik AG in Bensheim entwickelten Myostatin-ELISA-Kits (123). Es erfolgte die quantitative Bestimmung der Myostatin-Konzentration aus den Plasma-Proben der Patienten auf Basis eines kompetitiven ELISAs. Der Test detektiert alle Untereinheiten des humanen proMyostatins inklusive des intakten Proteins (ca. 50 kDa), des N-terminalen Propeptids (ca. 37 kDa) und des C-terminalen Peptids (ca. 15 kDa).

Es besteht keine Kreuzreaktivität mit GDF-11 oder Myoglobin. Die Interassay- und Intra-assay-Varianz in humanem Serum lag laut Herstellerangaben unter 15% bzw. 10%. Die Nachweisgrenze liegt bei 270 pg/ml.

3.4.1.1 Prinzip des kompetitiven ELISA

Die Proben (zusätzlich Standards und Kontrollen) werden mit einem biotinylierten Myostatin-Tracer versetzt und auf eine mit polyklonalem Anti-Myostatin-Antikörper beschichtete Mikrotiterplatte inkubiert. Dabei konkurriert das Myostatin-Antigen aus der Probe mit dem Tracer um die freien Bindungsstellen der Antikörper. Im zweiten Inkubationsschritt wird Streptavidin-markierte Peroxidase hinzugegeben. Diese bindet sich auf Grund der Wechselwirkung von Biotin und Streptavidin nicht-kovalent an den Myostatin-Tracer. Nach dem Auswaschen ungebundener Komponenten wird nun Tetramethylbenzidin (TMB) hinzugegeben, das ein Substrat der Peroxidase darstellt und mit dieser enzymatisch reagiert. Durch das Stoppen der Enzymreaktion mittels Säurezugabe entsteht ein Farbumschlag von blau nach gelb, der im Folgenden photometrisch bei 450 nm bestimmt werden kann.

Die Farbintensität steht dabei in umgekehrt proportionaler Beziehung zur Myostatin-Konzentration der Probe. Je mehr Myostatin in der ursprünglichen Probe vorhanden war, desto weniger biotinylierter Tracer wurde gebunden und desto geringer ist der Farbumschlag. Anhand der Standardkurve, die aus bekannten Myostatin-Konzentrationen erstellt wurde, wird die Myostatin-Konzentration der unbekanntenen Proben ermittelt.

3.4.1.2 Geräte und Materialien

Materialien	Menge	Vorbereitung
Mikrotitermodul, vorbeschichtet	12x8 Vertiefungen	
ELISA Waschpufferkonzentrat	2x100 ml	Wird vor Gebrauch 1:10 in Reinstwasser verdünnt
Probenverdünnungspuffer	1x100 ml	gebrauchsfertig
Standards (lyophilisiert)	2x6 vials	
Tracer, biotinyliertes Myostatin	1x150 µl	Wird 1:101 in Probenverdünnungspuffer verdünnt
Kontrolle (lyophilisiert)	2x1 vial	
Konjugat (Streptavidin-markierte Peroxidase)	1x200 µl	Wird 1:101 in Waschpuffer verdünnt
TMB Substrat	1x15 ml	gebrauchsfertig
ELISA Stopplösung	1x15 ml	gebrauchsfertig

Tabelle 3 Geräte und Materialien für ELISA

3.4.1.3 Durchführung

Um die Vorinkubate herzustellen, werden zu je 20 µl Plasmaprobe 180 µl Probenverdünnungspuffer in ein 1,5 ml Probengefäß hinzu pipettiert (Verdünnung 1:10). Die 200 µl verdünnten Plasmaproben werden nun, genau wie jeweils 200 µl Standards und Kontrollen mit 200 µl biotinyliertem Tracer gemischt und gut gevortext (Verhältnis 1:1). Danach schließt sich folgendes Prozedere an:

1. Die Vertiefungen der Mikrotiterstreifen werden 2-mal mit je 250 µl Waschpuffer ausgewaschen und nach dem zweiten Waschgang trocken abgetupft.

2. Jeweils 100 µl der Vorinkubate (Proben, Standards, Kontrollen) in Doppelbestimmung in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte pipettieren und 2 Stunden bei Raumtemperatur (18-26 °C) unter Schütteln inkubieren
3. Inhalt verwerfen und erneuter Waschgang (fünf mal mit 250 µl Waschpuffer) um nicht gebundene Rückstände zu entfernen
4. 100 µl des verdünnten Konjugats in jede Vertiefung pipettieren und 1 Stunde unter Schütteln inkubieren
5. Inhalt wiederum verwerfen und erneuter Waschgang (siehe 4.)
6. Pipettieren von 100 µl Substrat pro Vertiefung und 10-20 Minuten bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubieren
7. 100 µl Stopplösung pro Vertiefung dazugeben und im Mikrotiterplattenphotometer im Schüttelmodus kurz mischen
8. Sofort im Anschluss erfolgt die Messung der Extinktion mit Hilfe des Mikrotiterplattenphotometers bei einer Messwellenlänge von 450 nm.

Zur Auswertung der Ergebnisse wird das mathematische Modell der 4-Parameter-Funktion herangezogen. Dazu wird die optische Dichte auf einer linearen Ordinate, die Konzentration auf einer logarithmischen Abszisse in Bezug gestellt.

Die ermittelten Werte müssen wegen der 1:10 Probenverdünnung mit 10 multipliziert werden.

3.5 NT-ProBNP-Bestimmungen

Zur weiteren Herzinsuffizienz-Klassifizierung der Patienten wurden NT-ProBNP-Bestimmungen durchgeführt. Die Messung erfolgte mit Hilfe des automatisierten NT-ProBNP-ELISAs der Firma ROCHE (ROCHE Elecsys®).

3.6 Koronargradient und arterio-venöser Gradient

Der Koronargradient beschreibt die Differenz aus koronarvenöser und arterieller Myostatin-Konzentration eines Patienten. Er ist ein Maß für die Extraktion bzw. Sekretion des Myostatins am Herzen. Anhand der ermittelten Konzentrationen von Myostatin im arteriellen Serum sowie im CS lässt sich der Koronargradient berechnen.

In Analogie ist der arterio-venöse Gradient die Differenz aus arterieller und venöser Konzentration und stellt die Bilanz des Myostatins am Skelettmuskel dar. Durch das Aufstellen der beiden Gradienten lässt sich die myokardiale Myostatin-Veränderung einfach und übersichtlich mit derjenigen am Skelettmuskel vergleichen und in Verbindung setzen.

3.7 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mit der Software SPSS 22.0.

Alle Werte werden als Median mit zugehörigem 25. und 75. Quartil angegeben. Es wurde nicht von einer Normalverteilung der Daten ausgegangen.

Die Überprüfung eines signifikanten Unterschiedes der lokalen Myostatin-Konzentrationen (Arterie, Vene, CS) innerhalb einer Patientenkohorte erfolgte mittels nicht-parametrischer Friedman-ANOVA für verbundene Stichproben. Bei globaler Signifikanz folgte der Paarvergleich mit Hilfe des Wilcoxon-Tests mit anschließender Bonferroni-Adjustierung von P.

Zur Testung von Unterschieden zwischen den Gruppen wurde eine nicht-parametrische Kruskal-Wallis-ANOVA durchgeführt. Bei globaler Signifikanz folgte der Paarvergleich mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests mit anschließender Bonferroni-Adjustierung von P. Nicht-kontinuierliche epidemiologische Variablen (z.B. KHK: ja/nein; arterielle Hypertonie: ja/nein; Beta-Blocker-Einnahme: ja/nein) wurden mit Hilfe des Chi-Quadrat-Tests untersucht.

Zur Aufdeckung von Zusammenhängen zwischen den Myostatinwerten und der LV-Masse bzw. der diastolischen Funktion wurde eine multiple lineare Regressionsanalyse (Generalisiertes Lineares Modell) durchgeführt, deren Kandidaten-Faktoren oder -Kovariaten wie folgt ermittelt wurden: Kontinuierliche Variable (Kovariate) mussten univariat einen signifikant von Null verschiedenen Pearson-Korrelationskoeffizienten r mit dem Zielparameter aufweisen. Bei dichotomen Einflussgrößen (z. Bsp.: Betablocker ja/nein, Geschlecht) wurden zunächst die Mittelwerte der beiden Ausprägungen mittels Mann-Whitney-U-Test verglichen; nur bei Nachweis eines signifikanten Unterschieds ging diese Einflussgröße als Faktor in das Generalisierte Lineare Modell ein. Außerdem wurden die arteriellen, venösen und CS-Myostatinwerte zur Vermeidung von Multikollinearitätsproblemen immer nur einzeln in die Modelle eingeschlossen.

Schließlich sollten Koronar- und AV-Gradient nur in die Analyse einbezogen werden, wenn sie signifikant von Null verschieden waren.

Die zur Ermittlung der relativen LV-Masse benötigte Körperoberfläche wurde mit der Formel nach Dubois berechnet.

Als signifikant wurde ein α -Fehler kleiner 5% festgelegt (entsprechend einem P-Wert $<0,05$).

Bei der grafischen Darstellung in Box and Whisker-Grafiken ist folgendes zu beachten: Dargestellte Boxplots bestehen aus einer Box, deren Länge dem Interquartilbereich (IQR) entspricht, d.h. sie werden vom ersten und dritten Quartil begrenzt. Die innere Linie der Box markiert den Median. Die Whisker decken das 1,5-fache des IQR ab. Werte größer 1,5x IQR gelten als Ausreißer und werden durch einen Kreis markiert. Liegen die Werte außerhalb 3x IQR, gelten sie als Extremwerte und werden in der Grafik mit einem Stern gekennzeichnet.

4. Ergebnisse

4.1 Klinische und demografische Daten

In Tabelle 4 sind die klinischen und demografischen Daten der Patienten nach Gruppen aufgelistet.

Insgesamt wurden 43 Patienten in die Studie eingeschlossen. Davon wurden nach beschriebenen Kriterien 12 Patienten in die Kontrollgruppe, 24 Patienten in die HFpEF-Gruppe und 7 Patienten in die HFrEF-Gruppe eingeteilt. Die Einteilung in die HFpEF-Gruppe erfolgte gemäß Paulus-Kriterien bei 19 der Vorhofflimmer-Patienten primär über den Gradienten E/E' , bei fünf Patienten über ein erhöhtes NT-ProBNP bei grenzwertigem E/E' .

Die HFpEF-Gruppe unterscheidet sich per definitionem signifikant von den Kontrollen im Parameter E/E' ($P < 0,01$) sowie NT-ProBNP ($P < 0,01$). In den anderen Kategorien gab es keine signifikanten Abweichungen.

Die HFrEF-Gruppe weicht signifikant von Kontrollgruppe bzw. HFpEF-Gruppe ab in den Parametern BMI ($P = 0,036$), LVEF ($P < 0,01$), LVEDD ($P = 0,016/0,034$), E/E' ($P < 0,01$). In den Kategorien Alter, Geschlecht, Septumdurchmesser, Hinterwanddurchmesser, prozentualer Anteil von KHK-Patienten und Beta-Blocker-Einnahme sowie arterieller Hypertonie zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

Charakteristika	Kontrollen	HFpEF	HFrEF
Patienten, n	12	24	7
Alter (Jahre)	54 [53-61]	65 [55-70]	61 [48-67,5]
Geschlecht (m/w)	8/4	15/9	6/1
BMI (kg/m ²)	25,4 [24,7-26,8]	27,9 [25,8-31]	30,6 [29,4-33,1]*
Arterielle Hypertonie (% von gesamt)	50,0	70,8	85,7
LVEF (%)	60 [58,8-60,0]	60 [58,8-60]	40 [40-45]*/**
LVEDD (mm)	46 [45-47,3]	47 [43,8-52,3]	56 [53,5-57]*/**
Septum (mm)	10,5 [9,8-11,3]	12 [10,8-13]	13 [11,5-13]
Hinterwand (mm)	10 [9-12]	11 [10,8-12]	12 [11-13]
KHK (%)	16,6	16,6	14,3
Beta-Blocker (%)	91,7	87,5	100
E/E´	6,6 [6,3-7,4]	9,0 [8,1-10,4]*	8,6 [7-11,1]
NT-ProBNP (pg/ml)	51 [32,5-124]	306 [123,3-624]*	224,6*
Relative LV-Masse(g/m ²)	69 [60-94,5]	70,2 [62-78,0]	78,8 [72,1-88,4]

Tabelle 4 Baseline-Charakteristika: Die Werte sind angegeben in Medianen (25. und 75. Quartil eckig).
Abkürzungen: HFpEF, Heart Failure with Preserved Ejection Fraction; HFrEF, Heart Failure with Reduced Ejection Fraction; LVEF, Linksventrikuläre Ejektionsfraktion; LVEDD, Linksventrikulärer Enddiastolischer Durchmesser;
*p<0.05 vs. Kontrollen **p<0.05 vs. HFpEF

4.2 Plasma-Myostatin-Konzentration, Koronargradient und arterio-venöser Gradient

Die mediane arteriell gemessene Myostatin-Konzentration in der Kontrollgruppe betrug 21,3 ng/ml [17,1-26,0] im Vergleich zur HFpEF-Gruppe mit 21,4 ng/ml [19,7-23,3] und der HFrEF-Gruppe mit 19,3 ng/ml [17,1-20,2]. In gleicher Reihenfolge betrug die venös gemessenen Konzentrationen 22,2 ng/ml [17,9-26,2], 20,9 ng/ml [19,0-24,0] und 18,6 ng/ml [18,0-21,1] bzw. die Konzentrationen im Koronarsinus 22,4 ng/ml [17,1-24,2], 22,0 ng/ml [19,5-24,6] und 18,4 [17,6-20,2] (Abbildung 4).

Es ließ sich kein signifikanter Unterschied der Myostatin-Konzentrationen zwischen den verschiedenen Entnahmeorten (arteriell, venös, CS) in keiner der drei Patientengruppen feststellen (Kontrollgruppe, P =0,56; HFpEF, P =0,21, HFrEF, P =0,37). Dies bedeutet, dass in allen Gruppen sowohl der Koronar- als auch der arteriovenöse Gradient

(Abbildung 5) nicht signifikant von Null verschieden waren.

Ebenso zeigt sich kein Unterschied im Vergleich der absoluten Myostatin-Konzentrationen zwischen den Gruppen (HFpEF, HFrEF, Kontrollen).

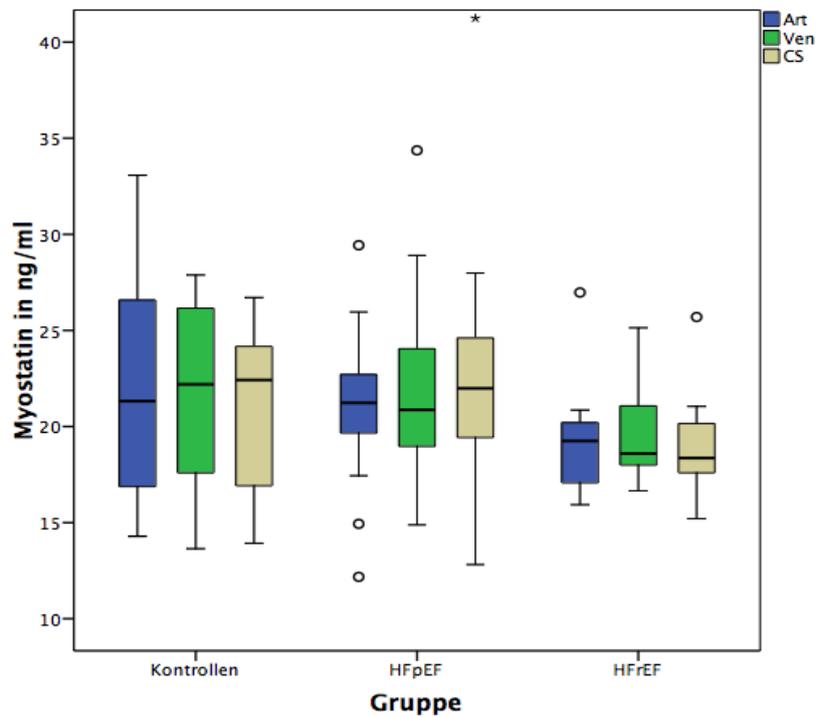


Abbildung 4 Darstellung der Myostatinkonzentrationen in Bezug auf die Patientengruppen. Die Messorte sind farblich unterlegt; blau (arteriell), grün (venös), ocker (CS)

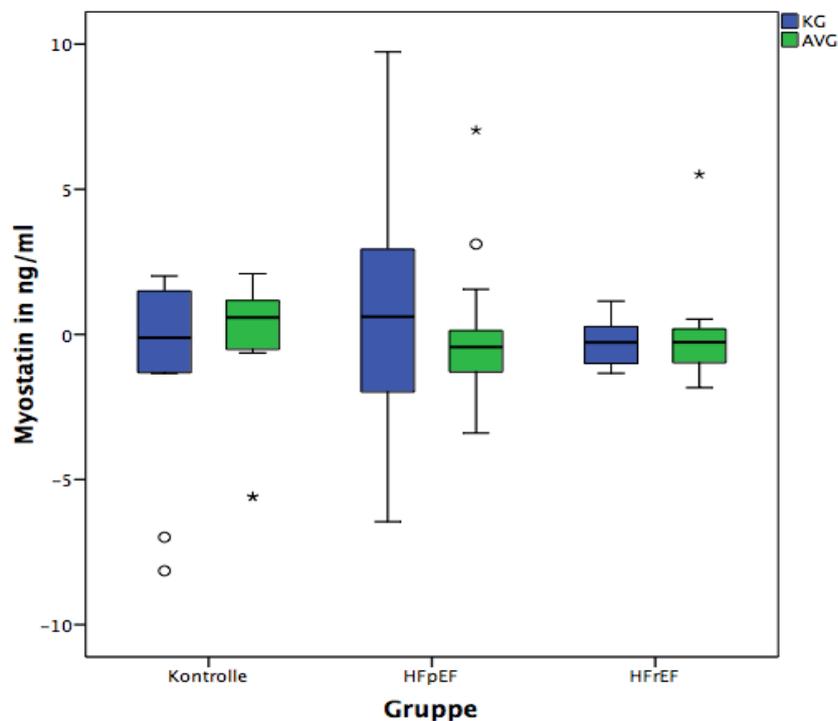


Abbildung 5 Koronargradient (blau) und AV-Gradient (grün) in Bezug auf Kohorten

4.3 Zusammenhang zwischen Myostatin, LV-Masse und diastolischer Dysfunktion

E/E' als wichtiger Parameter der diastolischen Dysfunktion wurde unabhängig von Gruppenzugehörigkeit univariat durch die in Tabelle 5 dargestellten Parameter signifikant beeinflusst. Für die restlichen Parameter aus Tabelle 4 ergab sich keine Signifikanz (eingeschlossen NT-ProBNP). Sie sind folglich nicht aufgeführt.

N= 43		Art	Ven	CS	aHTN	Alter
E/E'	Pearson Korrelation	,345	,323	,497	*	,321
	Signifikanz	,023	,035	,001	,007	,036

Tabelle 5 Signifikante Korrelation von E/E' als Marker der diastolischen Dysfunktion mit Kovariaten und Faktoren;

* bei aHTN als nominaler Variable wurde Mann-Whitney-U statt einer Pearson Korrelation verwendet

Es zeigen sich oben angegebene signifikante Korrelationen mit der arteriellen sowie venösen Myostatin-Konzentration, dem Alter und dem Vorliegen arterieller Hypertonie (n =43 Patienten, davon 14 ohne aHTN, 29 mit aHTN, Mann-Whitney-Teststatistik 306,5). Gleichzeitig besteht eine hochsignifikante Korrelation zwischen E/E' und der koronarvenösen Myostatin-Konzentration (P =0,001). Zur exakteren Detektion signifikanter Zusammenhänge erfolgte im Anschluss die multivariate Testung im Generalisierten Linearen Modell unter Einbeziehung der korrelierenden Faktoren und Kovariaten (siehe Tabelle 6-8). Hierbei bestätigte sich eine hochsignifikante Korrelation zwischen E/E' als abhängiger Variable und der koronarvenösen Myostatin-Konzentration (p =0,001). Ebenfalls zeigte sich ein, wenngleich weniger signifikanter, Zusammenhang zwischen E/E' und der venösen Myostatin-Konzentration (p =0,027) bzw. arterieller Hypertonie (p =0,026).

Parameter	B	Standardfehler	Signifikanz
Alter	0,34	0,23	0,145
Myo (CS)	0,19	0,06	0,001
aHTN	-1,28*	0,58	0,026

Tabelle 6 Generalisiertes Lineares Modell mit der Zielvariable E/E' und den signifikant korrelierenden Faktoren und Kovariaten (Zur Vermeidung von Multikollinearitätsproblemen wurden Myo Art, Myo Ven von dieser Analyse ausgeschlossen). * B bezieht sich in dieser und den folgenden Berechnungen auf die Abwesenheit arterieller Hypertonie. Es besteht somit eine signifikante negative Assoziation zwischen E/E' und Abwesenheit arterieller Hypertonie.

Parameter	B	Standardfehler	Signifikanz
Alter	0,45	0,25	0,066
Myo (Ven)	0,15	0,07	0,027
aHTN	-1,43*	0,62	0,021

Tabelle 7 Generalisiertes Lineares Modell mit der Zielvariable E/E' und den signifikant korrelierenden Faktoren und Kovariaten (exklusive Myo Art, Myo CS)

* siehe Tabelle 6

Parameter	B	Standardfehler	Signifikanz
Alter	0,04	0,03	0,11
Myo (Art)	0,12	0,06	0,063
aHTN	-1,30*	0,63	0,040

Tabelle 8 Generalisiertes Lineares Modell mit der Zielvariable E/E' und den signifikant korrelierenden Faktoren und Kovariaten (exklusive Myo Ven, Myo CS)

* siehe Tabelle 6

Eine grafische Veranschaulichung der beschriebenen Abhängigkeiten ist auf Abbildung 6 dargestellt.

Bei einer Untergruppe von 28 Patienten (aus oben erwähnten methodischen Gründen fehlen 15 Patienten bei dieser Betrachtung) wurde die linksventrikuläre Masse ermittelt und ins Verhältnis zur Körperoberfläche gesetzt. Von den 28 Patienten entstammen neun Patienten der Kontrollgruppe, 13 Patienten der HFpEF-Gruppe sowie sechs

Patienten der HFrEF-Gruppe. Die LV-Massen der untersuchten Patienten reichen von minimal 54,1 g/m² bis maximal 108,2 g/m² bei einem Median von 70,85 g/m² [61,98 – 81,58]. Damit erfüllt keiner der von uns untersuchten Patienten die Kriterien für eine linksventrikuläre Hypertrophie, die laut den Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie bei >115 g/m² bei Männern und >95 g/m²(124) liegt.

Analog zum diastolischen Funktionsparameter E/E' wurde auch die LV-Masse univariat auf potentielle Determinanten getestet. Dabei konnte lediglich die Myostatin-Konzentration im CS detektiert werden (p =0,04). Alle weiteren untersuchten Parameter zeigten keine signifikante Korrelation mit der LV-Masse, so dass in diesem Fall weitere statistische Betrachtungen im Sinne eines generalisierten linearen Modells entfallen. Der Zusammenhang zwischen der LV-Masse und E/E' wird in Abbildung 6 grafisch dargestellt.

N=28		CS
LV-Masse	Pearson Korrelation	-,390
	Signifikanz	,040

Tabelle 9 Signifikante Korrelationen von LV-Masse mit Kovariaten und Faktoren

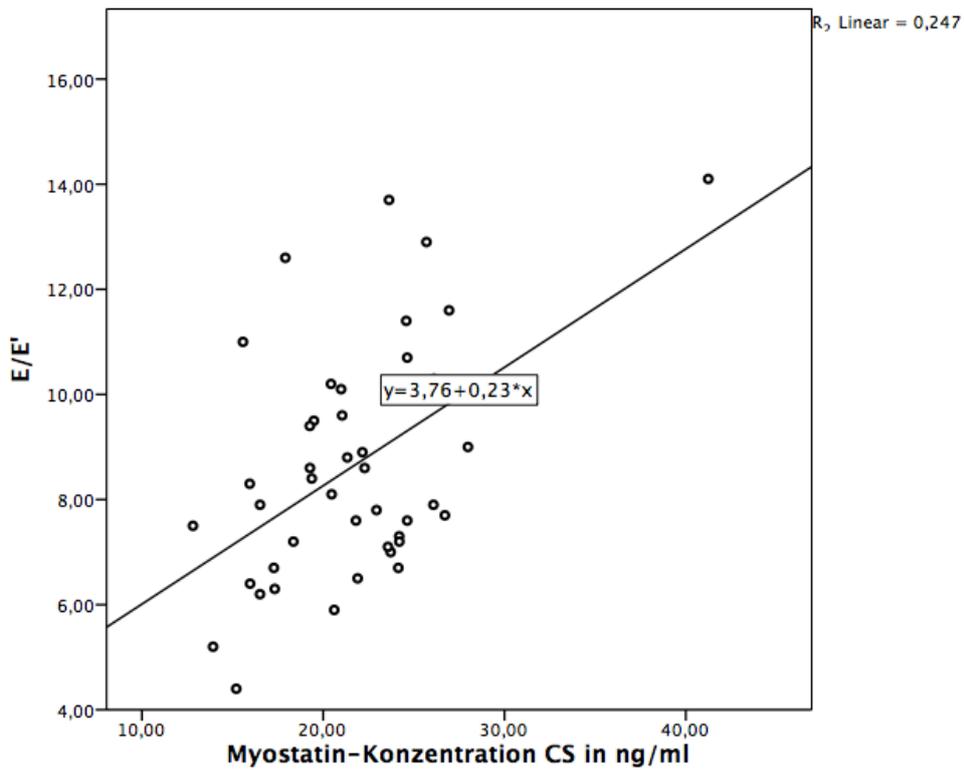


Abbildung 6 Univariate lineare Regression zwischen E/E' und der absoluten MSTN-Konzentration im CS (Koronarsinus). Das Bestimmtheitsmaß lautet $r^2 = 0,25$

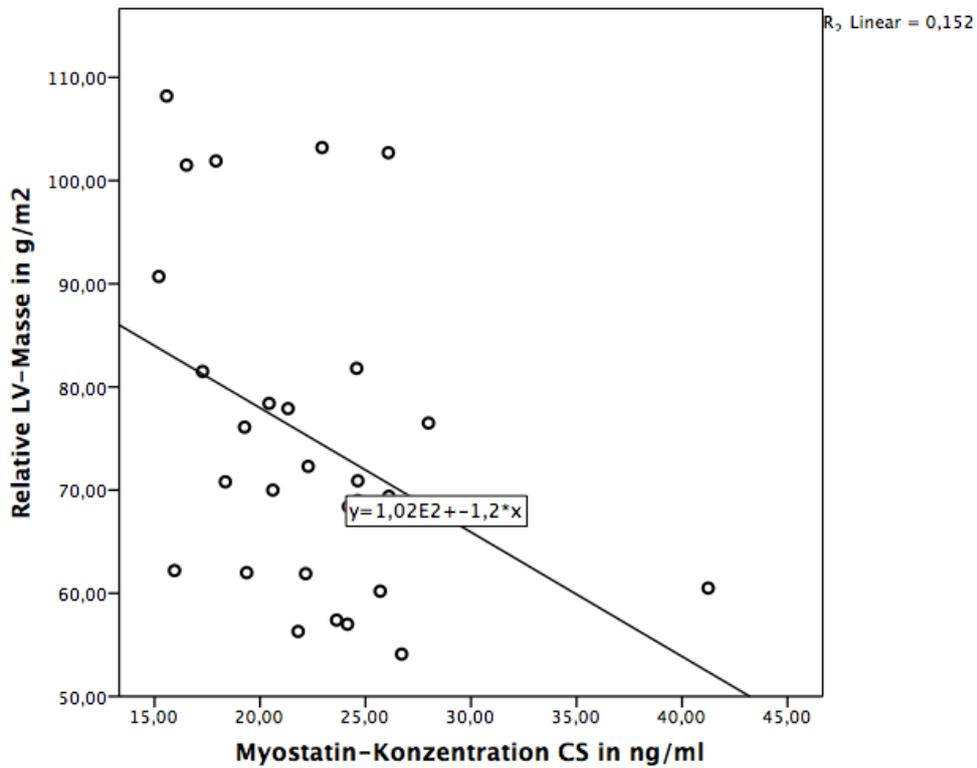


Abbildung 7 Univariate lineare Regression zwischen der relativen LV-Masse und der absoluten MSTN-Konzentration im CS. Das Bestimmtheitsmaß lautet $r^2 = 0,152$.

5. Diskussion

Diese Studie ist eine deskriptive Pilotstudie. Primäres Ziel der Studie war die Untersuchung des koronaren und arteriovenösen Gradienten von Myostatin bei HFpEF. Im Hinblick auf vorangegangene Arbeiten stellten wir die Hypothese auf, dass Myostatin am menschlichen Herzen metabolisiert wird und als Ausdruck dessen ein relevanter Koronargradient im Serum von herzinsuffizienten Patienten detektiert werden kann. Dafür wurden Plasma-Myostatin-Spiegel zwischen herzinsuffizienten Patienten mit Vorhofflimmern und Vorhofflimmer-Patienten ohne klinische Zeichen einer Herzinsuffizienz verglichen.

Außerdem sollte ein möglicher Zusammenhang zwischen den zirkulierenden Myostatin-Konzentrationen und der LV-Masse bzw. der diastolischen Funktion untersucht werden; dieses zweite Ziel der Studie basierte auf beschriebenen Effekten von Myostatin auf kardiale Fibrose und Hypertrophie (121, 122)

Erstmals wurde dabei der Fokus auf Patienten mit Herzinsuffizienz mit erhaltener Ejektionsfraktion (HFpEF) gelegt. Diese Patientengruppe wächst auf Grund zugrunde liegender Risikofaktoren (Alter, arterielle Hypertonie) stetig und stellt nicht zuletzt wegen mangelnder medikamentöser Therapieoptionen eine zunehmende Herausforderung für das Gesundheitswesen dar. Bislang ist die HFpEF in der Myostatin-Forschung jedoch stark unterrepräsentiert.

Wir fanden in unseren Untersuchungen keinen signifikanten Unterschied zwischen arteriell, venös und im Koronarsinus gemessenen Myostatin-Konzentrationen. Es ergibt sich folglich weder ein Koronargradient noch ein arterio-venöser Gradient in einer der drei Gruppen (HFpEF, HFrEF, Kontrollen). Dafür kommen unterschiedliche Erklärungen in Betracht. Einerseits wurde der kardiale Beitrag zu systemischen Myostatin-Spiegeln bislang nur an transgenen Mäusen, die einer Transverse Aortic Constriction (TAC)-Operation unterzogen wurden und damit einer akuten Verschlechterung der LVEF ausgesetzt waren, nachgewiesen. In dieser Studie von Heineke et al. konnte mit Hilfe von herz- und skelettmuskelspezifischen Promotern eine Erhöhung des zirkulierenden Myostatin-Spiegels in Folge erhöhter myokardialer MSTN-Expression gezeigt werden (78). Darüber hinaus konnte mehrfach sowohl in Mäusen als auch am Menschen eine Erhöhung der Myostatin-mRNA und -Protein-Expression am Myokard bei akuter und

chronischer HFrEF nachgewiesen werden (78, 99, 113, 115). Ob und in welchem Rahmen die gesteigerte MSTN-Expression am humanen Herzen für die erhöhten Serumspiegel verantwortlich ist, konnte bisher in klinischen Studien nicht sicher belegt werden. Anhand der von uns ermittelten Koronargradienten findet sich kein Hinweis darauf, dass eine kardiale Freisetzung von Myostatin im Rahmen der HFpEF oder HFrEF stattfindet. Ebenso finden wir, anders als beispielsweise Lenk et al. in humanen und Tierstudien (99, 120), keinen Hinweis auf eine Veränderung der Myostatin-Konzentration über die Skelettmuskulatur hinweg (kein signifikanter AV-Gradient). Zu erwähnen bleibt, dass im Gegensatz zu den oben erwähnten Studien mit vorzugsweise HFrEF-Patienten bzw. Mäusen mit kardialer Kachexie in unserer Studie prozentual größtenteils Probanden mit HFpEF bzw. Vorhofflimmerpatienten ohne Herzinsuffizienz betrachtet werden.

Es lässt sich als zweites Hauptresultat festhalten, dass sich zwischen unseren drei Studienkohorten (HFpEF, HFrEF, Kontrollen) keine signifikanten Unterschiede in der Höhe der absoluten Myostatin-Serum-Konzentrationen feststellen ließen. Was den Vergleich zwischen Patienten mit HFrEF und Kontrollen angeht, stehen unsere Ergebnisse damit im Gegensatz zur aktuellen Studienlage. Während Heineke et al. erhöhte Plasmaspiegel bei akut herzinsuffizienten Mäusen zeigen (78), stellen George et al. bei DCMP/ICMP-Patienten mit terminaler Herzinsuffizienz erhöhte systemische Myostatin-Spiegel fest (115). Gruson et al. finden ähnliche Steigerungen bei HFrEF-Patienten mit vornehmlich leichter bis mittelschwerer Herzinsuffizienz (118). Wintgens et al. bestätigen in ihrer Studie an HFrEF-Patienten nicht nur die Grundaussage, sondern beziffern auch die prozentuale Erhöhung der Myostatin-Immunreaktivität ähnlich wie ihre Kollegen auf ca. 50% im Vergleich zu Kontrollen (123). Lediglich Zamora und Lenk finden an Patienten mit ähnlichen Charakteristika keine Erhöhung der Myostatin-Konzentration im Plasma und kommen damit zu gegensätzlichen Ergebnissen (119, 120). Allerdings finden Lenk et al. trotz unveränderter Plasmaspiegel eine signifikant erhöhte Gen- und Proteinexpression von Myostatin im Skelettmuskel (134). Als Limitation dieser Studien muss jedoch die geringe Patientenzahl angesehen werden, was ebenso auf unsere Studie zutrifft. Da wir den Schwerpunkt unserer Betrachtungen auf Patienten mit HFpEF gelegt haben, sind die 7 HFrEF Patienten sicherlich nicht mehr als eine Nebenbetrachtung. Um über den Zusammenhang zwischen HFrEF und Myostatin signifikante Aussagen zu treffen, ist eine deutlich größere Fallzahl von Nöten, insbesondere da die bislang ermittelten Erhöhungen von

Myostatin mit einem Faktor von ca. 1,5 im Vergleich zu anderen Biomarkern wie NT-ProBNP (ca. Faktor 5-10) marginal sind (123). So soll hier Erwähnung finden, dass Myostatin aus diesem Grund als Biomarker für Herzinsuffizienz ungeeignet ist. In Betracht ziehen könnte man ihn allerdings als Biomarker bzw. Verlaufsparemeter bei kardialer Kachexie, wobei fraglich bleibt, ob die Änderungen der Serumkonzentration dafür ausreichen oder die Entnahme von Gewebeproben notwendig wäre, was klinisch weder verhältnismäßig noch sinnvoll wäre. Zu bedenken ist weiterhin, dass unsere Patienten mit HFrEF im Schnitt in einer klinisch wesentlich besseren Verfassung sind als beispielsweise Georges (115) Patientenkollektiv unmittelbar vor LVAD-Implantation.

Deutlich mehr unserer Patienten konnten in den Vergleich zwischen Kontrollen und HFpEF-Patienten einbezogen werden, was die statistische Aussagekraft der Ergebnisse erhöht. Doch auch hier lässt sich weder ein signifikanter Gradient über Herz- oder Skelettmuskel noch ein veränderter Spiegel im Vergleich zu Kontrollen oder HFrEF feststellen. Dies kann unterschiedliche Ursachen haben. Möglicherweise ist auch bei dieser noch geringen Fallzahl die statistische Aussagekraft zu gering um signifikante Ergebnisse zu erhalten. Ebenfalls möglich wäre, dass im Rahmen der pathophysiologischen Vorgänge bei der HFpEF die myokardiale MSTN-Expression gesteigert ist, allerdings nicht in dem Maße um ein „Überlaufen“ in den Blutkreislauf zu verursachen. Solange die Wirkungen von Myostatin am Herzen nur auto- bzw. parakrin vermittelt sind, wie beispielsweise Artaza (72) andeutet, können wir sie bei unserem Studiendesign, das heißt ohne kardiale Biopsie, nicht detektieren. Diese Theorie bleibt wegen der fehlenden histologischen Gewebeuntersuchungen lediglich Spekulation. Letztlich ist anhand unserer Ergebnisse auch nicht auszuschließen, dass Myostatin im Verlauf der HFpEF allenfalls eine untergeordnete Rolle spielt und sich Plasmakonzentrationen daher ähnlich verhalten wie bei Patienten ohne Herzinsuffizienz. Eine ethisch begründete Limitation unserer Studie ist es jedoch auch, dass die Kontrollgruppe nicht aus herzgesunden Individuen besteht, sondern vielmehr aus Patienten mit Vorhofflimmern, die allerdings nicht herzinsuffizient sind. Es wäre also auch denkbar, dass die Myostatinspiegel bereits in dieser Patientengruppe im Vergleich zu Gesunden erhöht sind. Dafür fehlen bisher klinische Untersuchungen.

Weiterhin kann argumentiert werden, dass Myostatin von mehreren Autoren eine anti-hypertrophe, aber pro-fibrotische Wirkung am Herzen zugeschrieben wird (47, 121, 122). Im Sinne der pathophysiologischen Entstehung der HFpEF könnte die häufig

einhergehende Fibrose mit einer erhöhten Myostatin-Konzentration in Einklang gebracht werden, wohingegen die antihypertrophe Wirkung von Myostatin eher im Gegensatz zur häufig bei HFpEF beobachteten LV-Hypertrophie steht. Diese beiden in Bezug auf die HFpEF gegensätzlichen Wirkungen könnten eine bedeutende pathophysiologische Rolle von Myostatin im Rahmen der HFpEF eher unwahrscheinlich erscheinen lassen. Es ist aber anzumerken, dass der pro-fibrotische Effekt bezüglich der HFpEF-Entwicklung bei weitem überwiegen sollte. Die diastolische Dysfunktion von Kardiomyozyten entwickelt sich nämlich weitgehend unabhängig von einer LV-Hypertrophie (125). So fand sich in der VALIDD-Studie, dass nur 3 % der Hypertoniker eine relevante LV-Hypertrophie hatten, alle wiesen aber eine diastolische Dysfunktion auf (126). Damit in Einklang stehen unsere Ergebnisse, die eine positive Korrelation von Plasma-Myostatin und E/E' (als Marker der diastolischen Dysfunktion) bzw. eine negative Korrelation zwischen Plasma-Myostatin und linksventrikulärer Hypertrophie zeigen und damit die profibrotischen und antihypertrophen Eigenschaften von Myostatin auf das menschliche Herz untermauern. Ebenso lässt sich festhalten, dass keiner der von uns untersuchten Patienten mit HFpEF die oben beschriebenen Kriterien einer LV-Hypertrophie erfüllt. Möglicherweise sind diese Myostatin-Effekte mit dafür verantwortlich, dass HFpEF-Patienten eher selten eine linksventrikuläre Hypertrophie, aber immer eine Fibrose des Myokards aufweisen.

Die gegenläufigen Effekte von Myostatin erschweren die Herangehensweise bei pharmakologischen Ansätzen der Myostatin-Induktion bzw. -Blockade bei verschiedenen Krankheitsbildern. So wäre beispielsweise bei hypertrophen Herzerkrankungen die Applikation von Myostatin eine verheißungsvolle Alternative zum aktuell praktizierten symptomatischen Therapiekonzept. Dagegen wäre bei muskelspezifischen Erkrankungen wie angeborenen Muskeldystrophien, aber auch im Rahmen der Kachexie bei schweren Grunderkrankungen wie AIDS, COPD oder Herzinsuffizienz der Einsatz von Myostatin-Inhibitoren durchaus erwägenswert. Tatsächlich existieren unterschiedliche Ansätze zur systemischen Myostatin-Blockade. So resultiert aus der Inhibierung von Myostatin in vivo durch Verabreichung eines inhibitorischen Antikörpers (JA-16) (127) oder der Transfektion eines dominant negativen ActRIIB-Rezeptors (128) in adulten Mäusen eine signifikant erhöhte Skelettmuskelmasse. Eindrucksvoll konnten auch Lee et al. eine Myostatin-Inhibition durch eine lösliche Form des Activin Typ IIB Rezeptors in einem in vivo Mausmodell

nachweisen, woraus sich eine bis zu 60% erhöhte Skelettmuskelmasse innerhalb von zwei Wochen ergab (129). Bei Menschen fiel die Wirkung in Phase I/II-Studien bei Patienten mit Muskeldystrophie zwar deutlich geringer aus (130, 131), dennoch wird die Entwicklung neuer Myostatin-Blocker weiterhin vielversprechend vorangetrieben. Die Induktion von linksventrikulärer Hypertrophie könnte bei Patienten mit Muskeldystrophie von Vorteil sein, dürfte im Rahmen eines potentiellen therapeutischen Einsatzes bei herzinsuffizienten Patienten eher als problematisch angesehen werden.

Bedacht werden sollte in diesem Zusammenhang außerdem, dass eine ActRIIB-Blockade nicht nur die antihypertrophen Effekte von Myostatin hemmt, sondern darüber hinaus auch weitere Liganden wie Activin-A und dessen mutmaßlich kardioprotektive Wirkung (132, 133) blockiert.

Die Ergebnisse unserer Studie stellen eine negative Korrelation zwischen Plasma-Myostatin-Konzentration im CS und LV-Masse unabhängig von der Ausprägung einer Herzinsuffizienz fest. Sollte sich dieser Zusammenhang in weiterführenden klinischen Studien bestätigen, muss bei der Suche nach weiteren Möglichkeiten der systemischen Myostatin-Blockade umso stärkeres Augenmerk auf kardiale Veränderungen im Sinne einer LV-Hypertrophie und deren Folgen gelegt werden. Damit stehen unsere Ergebnisse in Einklang mit den Untersuchungen von Morissette et al., die eine linksventrikuläre Hypertrophie in Folge herzspezifischer Blockade an Mäusen zeigten (46). Zu ähnlichen Resultaten kommt Artaza (72), der erstmals in Experimenten mit transgenen Mäusen eine MSTN-Überexpression am Herzen mit einer Reduktion der linksventrikulären Masse in Verbindung brachte. Gleichzeitig beobachtete er in MSTN ^{-/-} -Mäusen ein erhöhtes Herzgewicht ohne nennenswerte funktionelle Veränderungen.

Physiologischerweise hat in der Maus das kardial exprimierte Myostatin keinen Einfluss auf die Herzmasse oder Skelettmuskulatur (78). Bei chronischer Herzinsuffizienz jedoch scheint ihm eine Schlüsselrolle in der Entstehung kardialer Kachexie zuzukommen. So deuten Untersuchungen von Artaza und Heineke darauf hin, dass in diesem Rahmen myokardiales Myostatin sowohl autokrin reduzierend auf die Herzmasse einwirkt, als auch in endokriner Wirkweise über die Freisetzung in die Zirkulation die Skelettmuskelmasse signifikant senkt und damit kardiale Kachexie induziert (72, 78). Lenk et al. zeigten als Folge einer chronischen Herzinsuffizienz sowohl am Menschen (120) als auch tierexperimentell (99) eine Hochregulation der Protein-Expression

ebenso am Skelettmuskel, was zusätzlich zu der endokrinen Wirkung von kardial sezerniertem Myostatin eine autokrine Wirkung von am Skelettmuskel exprimiertem MSTN wahrscheinlich macht. Wie bereits erwähnt, zeigt unsere Studie einen inversen Zusammenhang zwischen koronarvenöser Myostatin-Konzentration und linksventrikulärer Herzmasse. Man kann mutmaßen, dass ein Kausalzusammenhang besteht und beide Parameter von der Regulation der myokardialen MSTN-Expression abhängen. Belegen lässt sich dieser Sachverhalt anhand unserer Daten nicht. Dennoch bekräftigen wir mit unseren Ergebnissen die These, dass kardialem Myostatin eine bedeutende Rolle in der Homöostase der Herzmuskulatur zukommt. Zu erwähnen bleibt, dass die Skelettmuskelmasse in unserer Studie nicht bestimmt wurde und daher keine Aussage über den Einfluss von Myostatin auf die Skelettmuskulatur getroffen werden kann. In unserem Patientenkollektiv mit Patienten ohne kardiale Kachexie (der BMI zeigte in allen drei Kohorten Übergewicht) ist davon allerdings auch nicht auszugehen. So ließ sich einhergehend mit dieser Annahme bei uns keine signifikante Korrelation zwischen Myostatin-Konzentration und BMI feststellen.

In mehreren der oben erwähnten Studien konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen Myostatin-Spiegeln und dem klinischen Grad der Herzinsuffizienz hergestellt werden. Hinsichtlich der linksventrikulären Funktion beziehen sich nach unserem Wissen bislang alle durchgeführten Studien auf eine Korrelation zwischen Myostatin und der LVEF als Parameter der systolischen Pumpschwäche. Diesbezüglich kommen bereits besprochene Autoren zu unterschiedlichen Ergebnissen (115, 118, 119).

In unserer Studie konzentrieren wir uns erstmals auf Patienten mit diastolischer Funktionsstörung. So konnten wir eine signifikante positive Korrelation zwischen dem diastolischen Funktionsparameter E/E' und der Myostatin-Konzentration im Koronarvenensinus aufzeigen.

Andere Autoren beschrieben in der Vergangenheit die profibrotische Wirkung von Myostatin an der Skelettmuskulatur (134-136). Ob an der Herzmuskulatur dieselben Effekte ausgelöst werden, galt bisher als umstritten. So konnten Cohn et al. 2007 an transgenen Mäusen einen Einfluss von Myostatin weder auf kardiale Hypertrophie noch auf kardiale Fibrose ausmachen (73). Morissette et al. stellten 2009 an 30 Monate alten Myostatin -/- -Mäusen hingegen verminderte kardiale Fibrose im Vergleich zu wildtyp- Artgenossen fest (77). Kürzlich zeigten auch Biesemann et al., dass eine Überexpression von kardialem Myostatin über eine p38-Aktivierung bei Mäusen zu

signifikant verstärkter kardialer Fibrose führt (122). Interessanterweise stellten sie bei 4,5 Monate alten Mäusen trotz bereits entstandener Fibrose keine Veränderungen in Bezug auf die kardiale Funktion fest, wohingegen bei gleichbleibend hohen Myostatin-Spiegeln nach neun Monaten eine signifikante Reduktion der LVEF sowie erhöhte endsystolische und diastolische Drücke festzustellen waren, die von den Autoren auf die starke Fibrose zurückgeführt wurden. Unsere Beobachtungen lassen vermuten, dass auch beim Menschen erhöhte Myostatin-Spiegel mit verstärkter kardialer Fibrose und damit über eine Versteifung des linken Ventrikels mit einer diastolischen Dysfunktion einhergehen bzw. für deren Entstehung zumindest teilweise mitverantwortlich sein könnten. Möglicherweise gibt es Subgruppen der HFPEF mit starker Fibrose, in denen erhöhte Myostatinspiegel zirkulieren, und Formen mit eher starker LV-Hypertrophie, in denen die Myostatinspiegel nicht erhöht sind. Da wir in unserer Studie keine Myokardhistologie durchgeführt haben, bleibt dies jedoch spekulativ.

Bei aller Diskussion über die mögliche Funktion von Myostatin am menschlichen Herzen und die Interpretation von unterschiedlichen Myostatin-Konzentrationen, darf eine entscheidende Frage nicht vernachlässigt werden: Was weisen wir mit unseren ELISAs und Antikörpern eigentlich genau nach?

Bislang konnte nicht eindeutig definiert werden, wie sich die Immunreaktivität für zirkulierendes Myostatin zusammensetzt. Im Plasma von adulten Mäusen liegt Myostatin zum Großteil in Form des latenten Komplexes vor (25, 69). Damit ist es an seinen Rezeptor-Bindungsstellen durch nicht-kovalente Bindung an das N-terminale Propeptid und unterschiedliche bereits erwähnte Inhibitoren (FLGR, GASP-1/2) blockiert. In den aktuell vorliegenden Studien zur Serum-Konzentration von Myostatin kamen unterschiedliche Nachweisverfahren zum Einsatz, die mitunter verschiedene Untereinheiten von Myostatin erkennen. Der hier verwendete Assay der Immundiagnostik AG detektiert sowohl proMyo als auch dessen gespaltene Untereinheiten, das N-terminale Propeptid und das C-terminale aktive Peptid, anhand von sechs verschiedenen Epitopen (123). Der Assay von BioVendor ist gegen ein Epitop aus dem N-terminalen Propeptid gerichtet (123) und erkennt daher das vollständige prePro Myostatin, das N-terminale Propeptid und den latenten Komplex, allerdings nicht den C-terminalen Liganden. In einer anderen Studie wird ein Western Blot zum Nachweis des N-terminalen Pro-Peptids angewandt (115). Außerdem

existieren seit kurzer Zeit Assays, die ausschließlich das Propeptid bzw. den C-terminalen Liganden erkennen (137, 138). Problematisch ist, dass die große Anzahl an verwendeten Nachweisverfahren einen Vergleich der Myo-Konzentrationen untereinander auf Grund unterschiedlicher Spezifitäten schwierig macht. Das Ziel aller Tests sollte die Detektion von bioaktivem C-terminalem reifem Myostatin sein, das heißt, dass die Balance zwischen Rezeptoraffinität und den verschiedenen Inhibitoren bzw. inhibitorischen Bindungsproteinen widergespiegelt wird. Dies ist mit den derzeitigen Testverfahren allerdings nicht möglich. Selbst der direkte und ausschließliche Nachweis des reifen C-terminalen Myostatins löst dieses Problem nicht, da er nicht die Rezeptor-Myostatinkomplex-Wechselwirkung wiedergeben kann. Zusätzlich wird in diesem ELISA eine Vorbehandlung mit Säure durchgeführt, um das reife Myostatin komplett aus dem Inhibitor-Komplex zu lösen: Dies ergibt die Gesamtmenge an zirkulierendem reifem Myostatin, aber lässt wegen der Vielzahl der Inhibitoren keinen Schluss auf seine biologischen Effekte zu.

Auch beim Nachweis vom Propeptid allein kann auf Grund möglicher unterschiedlicher Regulation zwischen Propeptid und aktivem Liganden nicht sicher auf die Bioaktivität geschlossen werden. Ebenso ist Western Blotting keine geeignete Methode für den quantitativen Nachweis von Myostatin in großen Patientenkohorten (138). Insgesamt sind die bislang durchgeführten Studien also mit Vorsicht und dem Wissen zu betrachten, dass eine einheitliche Nachweismethode, die neben der Immunreaktivität auch sicher die Bioaktivität bestimmt, nicht existiert. So ist denkbar, dass durch einen negativen Feedback-Mechanismus die Immunreaktivität konstant gehalten wird, während durch vermehrte Abspaltung von C-terminalem Peptid die Bioaktivität signifikant ansteigt. Hinweise auf eine gesteigerte Myostatin-Aktivität können eine erhöhte Smad 2/3- oder Erk-Phosphorylierung oder die erhöhte Expression von BMP-1 sein, was zum Beispiel George et al. in ihrer schon mehrfach zitierten Studie nachwies (115). Dennoch muss konstatiert werden, dass mit den derzeit verfügbaren Immunoassays die Bioaktivität und damit der tatsächliche Wirkungsgrad von Myostatin nicht festgestellt werden kann. Um also klinisch bedeutsame Aussagen über biologisch aktives Myostatin zu erhalten und dies von der Immunreaktivität unterscheiden zu können, wird die Entwicklung neuer Testverfahren von Nöten sein.

Zusätzlich zu eben besprochener Problematik bestehen weitere Limitationen unserer Studie. Wie bereits erwähnt, war unsere Studie als Pilotstudie konzipiert. Daher untersuchen wir mit 24 HFpEF-Patienten gegen 12 Kontrollen und respektive 7 HFrEF-

Patienten gegen die gleiche Anzahl an Kontrollen eine vergleichsweise kleine Kohorte, was bei den geringen Unterschieden in Myostatin-Konzentrationen den Nachweis statistischer Signifikanz erschwert. Außerdem war Teil unserer Studie das Aufstellen eines Koronargradienten. Dafür war eine Sondierung des Sinus coronarius notwendig, die herzgesunden Patienten aus ethischen Gründen nicht zugemutet werden konnte. Unsere Kontrollgruppe besteht daher aus Patienten, die zwar keine Herzinsuffizienz, jedoch Vorhofflimmern aufwiesen und somit nur sehr eingeschränkt als herzgesund gelten können.

Letztlich kann nachgewiesenermaßen auch typische Herzinsuffizienz-Medikation die Myostatin-Spiegel beeinflussen (113, 139). So senken Beta-Blocker (Carvedilol) die myokardiale MSTN-Expression bei induzierter Volumenbelastung in Mäusen (113). In unserer Studie, wie sicherlich bei den meisten durchgeführten Studien an herzinsuffizienten Patienten, bekamen über 90% der Patienten Beta-Blocker verabreicht, was die Ergebnisse der Myostatin-Konzentrationen zusätzlich verfälschen könnte.

Zusammengefasst sehen wir in unserer Studie keine Korrelation zwischen zirkulierendem Myostatin und HFpEF bzw. HFrEF. Dennoch ergibt sich über alle Studienteilnehmer hinweg ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Myostatin-Konzentration und der diastolischen Funktion bzw. der linksventrikulären Herzmasse, was in Einklang mit anderen Studien auf eine bedeutende Rolle von Myostatin für die Homöostase des Herzmuskelgewebes bzw. die pathophysiologischen Mechanismen in der Entstehung der Herzinsuffizienz hindeutet. Wir liefern damit weitere Hinweise auf eine anti-hypertrophe und pro-fibrotische Wirkweise von Myostatin am menschlichen Herzen. Dies sollte besonders im Hinblick auf künftige pharmakologische Ansätze der systemischen Myostatin-Therapie beim Menschen Berücksichtigung finden.

6. Literatur

1. Bullough WS. The control of mitotic activity in adult mammalian tissues. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society*. 1962;37:307-42.
2. McPherron AC, Lawler AM, Lee SJ. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. *Nature*. 1997;387(6628):83-90.
3. Grobet L, Martin LJ, Poncelet D, Pirottin D, Brouwers B, Riquet J, Schoeberlein A, Dunner S, Menissier F, Massabanda J, Fries R, Hanset R, Georges M. A deletion in the bovine myostatin gene causes the double-muscled phenotype in cattle. *Nature genetics*. 1997;17(1):71-4.
4. Kambadur R, Sharma M, Smith TP, Bass JJ. Mutations in myostatin (GDF8) in double-muscled Belgian Blue and Piedmontese cattle. *Genome research*. 1997;7(9):910-6.
5. McPherron AC, Lee SJ. Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1997;94(23):12457-61.
6. Mosher DS, Quignon P, Bustamante CD, Sutter NB, Mellersh CS, Parker HG, Ostrander EA. A mutation in the myostatin gene increases muscle mass and enhances racing performance in heterozygote dogs. *PLoS genetics*. 2007;3(5):e79.
7. Clop A, Marcq F, Takeda H, Pirottin D, Tordoir X, Bibe B, Bouix J, Caiment F, Elsen JM, Eychenne F, Larzul C, Laville E, Meish F, Milenkovic D, Tobin J, Charlier C, Georges M. A mutation creating a potential illegitimate microRNA target site in the myostatin gene affects muscularity in sheep. *Nature genetics*. 2006;38(7):813-8.
8. Schuelke M, Wagner KR, Stolz LE, Hubner C, Riebel T, Komen W, Braun T, Tobin JF, Lee SJ. Myostatin mutation associated with gross muscle hypertrophy in a child. *N Engl J Med*. 2004;350(26):2682-8.
9. Sharma M, Kambadur R, Matthews KG, Somers WG, Devlin GP, Conaglen JV, Fowke PJ, Bass JJ. Myostatin, a transforming growth factor-beta superfamily member, is expressed in heart muscle and is upregulated in cardiomyocytes after infarct. *J Cell Physiol*. 1999;180(1):1-9.
10. Allen DL, Cleary AS, Speaker KJ, Lindsay SF, Uyenishi J, Reed JM, Madden MC, Mehan RS. Myostatin, activin receptor IIb, and follistatin-like-3 gene expression are

altered in adipose tissue and skeletal muscle of obese mice. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism*. 2008;294(5):E918-27.

11. Rebbapragada A, Benchabane H, Wrana JL, Celeste AJ, Attisano L. Myostatin signals through a transforming growth factor beta-like signaling pathway to block adipogenesis. *Molecular and cellular biology*. 2003;23(20):7230-42.
12. Artaza JN, Bhasin S, Magee TR, Reisz-Porszasz S, Shen R, Groome NP, Meerasahib MF, Gonzalez-Cadavid NF. Myostatin inhibits myogenesis and promotes adipogenesis in C3H 10T(1/2) mesenchymal multipotent cells. *Endocrinology*. 2005;146(8):3547-57.
13. Zhao B, Wall RJ, Yang J. Transgenic expression of myostatin propeptide prevents diet-induced obesity and insulin resistance. *Biochemical and biophysical research communications*. 2005;337(1):248-55.
14. Lee SJ. Regulation of muscle mass by myostatin. *Annual review of cell and developmental biology*. 2004;20:61-86.
15. Anderson SB, Goldberg AL, Whitman M. Identification of a novel pool of extracellular pro-myostatin in skeletal muscle. *The Journal of biological chemistry*. 2008;283(11):7027-35.
16. Wolfman NM, McPherron AC, Pappano WN, Davies MV, Song K, Tomkinson KN, Wright JF, Zhao L, Sebald SM, Greenspan DS, Lee SJ. 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*. 2003;100(26):15842-6.
17. Rodgers BD, Garikipati DK. Clinical, agricultural, and evolutionary biology of myostatin: a comparative review. *Endocrine reviews*. 2008;29(5):513-34.
18. Cash JN, Rejon CA, McPherron AC, Bernard DJ, Thompson TB. The structure of myostatin:follistatin 288: insights into receptor utilization and heparin binding. *The EMBO journal*. 2009;28(17):2662-76.
19. Lee SJ. Extracellular Regulation of Myostatin: A Molecular Rheostat for Muscle Mass. *Immunology, endocrine & metabolic agents in medicinal chemistry*. 2010;10:183-94.
20. Ueno N, Ling N, Ying SY, Esch F, Shimasaki S, Guillemin R. Isolation and partial characterization of follistatin: a single-chain Mr 35,000 monomeric protein that inhibits the release of follicle-stimulating hormone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1987;84(23):8282-6.

21. Lee SJ, McPherron AC. Regulation of myostatin activity and muscle growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001;98(16):9306-11.
22. Winbanks CE, Weeks KL, Thomson RE, Sepulveda PV, Beyer C, Qian H, Chen JL, Allen JM, Lancaster GI, Febbraio MA, Harrison CA, McMullen JR, Chamberlain JS, Gregorevic P. Follistatin-mediated skeletal muscle hypertrophy is regulated by Smad3 and mTOR independently of myostatin. *The Journal of cell biology*. 2012;197(7):997-1008.
23. Stamler R, Keutmann HT, Sidis Y, Kattamuri C, Schneyer A, Thompson TB. The structure of FSTL3-activin A complex. Differential binding of N-terminal domains influences follistatin-type antagonist specificity. *The Journal of biological chemistry*. 2008;283(47):32831-8.
24. Tsuchida K, Arai KY, Kuramoto Y, Yamakawa N, Hasegawa Y, Sugino H. Identification and characterization of a novel follistatin-like protein as a binding protein for the TGF-beta family. *The Journal of biological chemistry*. 2000;275(52):40788-96.
25. Hill JJ, Davies MV, Pearson AA, Wang JH, Hewick RM, Wolfman NM, Qiu Y. The myostatin propeptide and the follistatin-related gene are inhibitory binding proteins of myostatin in normal serum. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(43):40735-41.
26. Mukherjee A, Sidis Y, Mahan A, Raheer MJ, Xia Y, Rosen ED, Bloch KD, Thomas MK, Schneyer AL. FSTL3 deletion reveals roles for TGF-beta family ligands in glucose and fat homeostasis in adults. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007;104(4):1348-53.
27. Haidet AM, Rizo L, Handy C, Umapathi P, Eagle A, Shilling C, Boue D, Martin PT, Sahenk Z, Mendell JR, Kaspar BK. Long-term enhancement of skeletal muscle mass and strength by single gene administration of myostatin inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008;105(11):4318-22.
28. Miura T, Kishioka Y, Wakamatsu J, Hattori A, Hennebry A, Berry CJ, Sharma M, Kambadur R, Nishimura T. Decorin binds myostatin and modulates its activity to muscle cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 2006;340(2):675-80.
29. Nicholas G, Thomas M, Langley B, Somers W, Patel K, Kemp CF, Sharma M, Kambadur R. Titin-cap associates with, and regulates secretion of, Myostatin. *J Cell Physiol*. 2002;193(1):120-31.

30. Wang H, Zhang Q, Zhu D. hSGT interacts with the N-terminal region of myostatin. *Biochemical and biophysical research communications*. 2003;311(4):877-83.
31. Lee SJ. Quadrupling muscle mass in mice by targeting TGF-beta signaling pathways. *PloS one*. 2007;2(8):e789.
32. de Caestecker M. The transforming growth factor-beta superfamily of receptors. *Cytokine & growth factor reviews*. 2004;15(1):1-11.
33. Wrana JL, Attisano L, Wieser R, Ventura F, Massague J. Mechanism of activation of the TGF-beta receptor. *Nature*. 1994;370(6488):341-7.
34. Jayaraman L, Massague J. Distinct oligomeric states of SMAD proteins in the transforming growth factor-beta pathway. *The Journal of biological chemistry*. 2000;275(52):40710-7.
35. Guttridge DC, Mayo MW, Madrid LV, Wang CY, Baldwin AS, Jr. NF-kappaB-induced loss of MyoD messenger RNA: possible role in muscle decay and cachexia. *Science*. 2000;289(5488):2363-6.
36. McFarlane C, Plummer E, Thomas M, Hennebry A, Ashby M, Ling N, Smith H, Sharma M, Kambadur R. Myostatin induces cachexia by activating the ubiquitin proteolytic system through an NF-kappaB-independent, FoxO1-dependent mechanism. *J Cell Physiol*. 2006;209(2):501-14.
37. Langley B, Thomas M, Bishop A, Sharma M, Gilmour S, Kambadur R. Myostatin inhibits myoblast differentiation by down-regulating MyoD expression. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(51):49831-40.
38. Hayashi H, Abdollah S, Qiu Y, Cai J, Xu YY, Grinnell BW, Richardson MA, Topper JN, Gimbrone MA, Jr., Wrana JL, Falb D. The MAD-related protein Smad7 associates with the TGFbeta receptor and functions as an antagonist of TGFbeta signaling. *Cell*. 1997;89(7):1165-73.
39. Forbes D, Jackman M, Bishop A, Thomas M, Kambadur R, Sharma M. Myostatin auto-regulates its expression by feedback loop through Smad7 dependent mechanism. *J Cell Physiol*. 2006;206(1):264-72.
40. Philip B, Lu Z, Gao Y. Regulation of GDF-8 signaling by the p38 MAPK. *Cellular signalling*. 2005;17(3):365-75.
41. Yang W, Chen Y, Zhang Y, Wang X, Yang N, Zhu D. Extracellular signal-regulated kinase 1/2 mitogen-activated protein kinase pathway is involved in myostatin-regulated differentiation repression. *Cancer research*. 2006;66(3):1320-6.

42. Felton-Edkins ZA, Fairley JA, Graham EL, Johnston IM, White RJ, Scott PH. The mitogen-activated protein (MAP) kinase ERK induces tRNA synthesis by phosphorylating TFIIB. *The EMBO journal*. 2003;22(10):2422-32.
43. Sale EM, Atkinson PP, Arnott CH, Chad JE, Sale GJ. Role of ERK1/ERK2 and p70S6K pathway in insulin signalling of protein synthesis. *FEBS letters*. 1999;446(1):122-6.
44. Penn BH, Berkes CA, Bergstrom DA, Tapscott SJ. How to MEK muscle. *Molecular cell*. 2001;8(2):245-6.
45. Trendelenburg AU, Meyer A, Rohner D, Boyle J, Hatakeyama S, Glass DJ. Myostatin reduces Akt/TORC1/p70S6K signaling, inhibiting myoblast differentiation and myotube size. *American journal of physiology Cell physiology*. 2009;296(6):C1258-70.
46. Morissette MR, Cook SA, Foo S, McKoy G, Ashida N, Novikov M, Scherrer-Crosbie M, Li L, Matsui T, Brooks G, Rosenzweig A. Myostatin regulates cardiomyocyte growth through modulation of Akt signaling. *Circ Res*. 2006;99(1):15-24.
47. Morissette MR, Cook SA, Buranasombati C, Rosenberg MA, Rosenzweig A. Myostatin inhibits IGF-I-induced myotube hypertrophy through Akt. *American journal of physiology Cell physiology*. 2009;297(5):C1124-32.
48. Amirouche A, Durieux AC, Banzet S, Koulmann N, Bonnefoy R, Mouret C, Bigard X, Peinnequin A, Freyssenet D. Down-regulation of Akt/mammalian target of rapamycin signaling pathway in response to myostatin overexpression in skeletal muscle. *Endocrinology*. 2009;150(1):286-94.
49. Rommel C, Bodine SC, Clarke BA, Rossman R, Nunez L, Stitt TN, Yancopoulos GD, Glass DJ. Mediation of IGF-1-induced skeletal myotube hypertrophy by PI(3)K/Akt/mTOR and PI(3)K/Akt/GSK3 pathways. *Nature cell biology*. 2001;3(11):1009-13.
50. Zhao J, Brault JJ, Schild A, Cao P, Sandri M, Schiaffino S, Lecker SH, Goldberg AL. FoxO3 coordinately activates protein degradation by the autophagic/lysosomal and proteasomal pathways in atrophying muscle cells. *Cell metabolism*. 2007;6(6):472-83.
51. Chisada S, Okamoto H, Taniguchi Y, Kimori Y, Toyoda A, Sakaki Y, Takeda S, Yoshiura Y. Myostatin-deficient medaka exhibit a double-muscling phenotype with hyperplasia and hypertrophy, which occur sequentially during post-hatch development. *Developmental biology*. 2011;359(1):82-94.

52. Girgenrath S, Song K, Whittmore LA. Loss of myostatin expression alters fiber-type distribution and expression of myosin heavy chain isoforms in slow- and fast-type skeletal muscle. *Muscle & nerve*. 2005;31(1):34-40.
53. Mendias CL, Marcin JE, Calerdon DR, Faulkner JA. Contractile properties of EDL and soleus muscles of myostatin-deficient mice. *Journal of applied physiology*. 2006;101(3):898-905.
54. Baligand C, Gilson H, Menard JC, Schakman O, Wary C, Thissen JP, Carlier PG. Functional assessment of skeletal muscle in intact mice lacking myostatin by concurrent NMR imaging and spectroscopy. *Gene therapy*. 2010;17(3):328-37.
55. Schirwis E, Agbulut O, Vadrot N, Mouisel E, Hourde C, Bonnieu A, Butler-Browne G, Amthor H, Ferry A. The beneficial effect of myostatin deficiency on maximal muscle force and power is attenuated with age. *Experimental gerontology*. 2013;48(2):183-90.
56. Gilson H, Schakman O, Combaret L, Lause P, Grobet L, Attaix D, Ketelslegers JM, Thissen JP. Myostatin gene deletion prevents glucocorticoid-induced muscle atrophy. *Endocrinology*. 2007;148(1):452-60.
57. Matsakas A, Macharia R, Otto A, Elashry MI, Mouisel E, Romanello V, Sartori R, Amthor H, Sandri M, Narkar V, Patel K. Exercise training attenuates the hypermuscular phenotype and restores skeletal muscle function in the myostatin null mouse. *Experimental physiology*. 2012;97(1):125-40.
58. McCroskery S, Thomas M, Maxwell L, Sharma M, Kambadur R. Myostatin negatively regulates satellite cell activation and self-renewal. *The Journal of cell biology*. 2003;162(6):1135-47.
59. Wang Q, McPherron AC. Myostatin inhibition induces muscle fibre hypertrophy prior to satellite cell activation. *The Journal of physiology*. 2012;590(Pt 9):2151-65.
60. Lee SJ, Huynh TV, Lee YS, Sebald SM, Wilcox-Adelman SA, Iwamori N, Lepper C, Matzuk MM, Fan CM. Role of satellite cells versus myofibers in muscle hypertrophy induced by inhibition of the myostatin/activin signaling pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012;109(35):E2353-60.
61. Kim JS, Cross JM, Bamman MM. Impact of resistance loading on myostatin expression and cell cycle regulation in young and older men and women. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism*. 2005;288(6):E1110-9.

62. Hittel DS, Axelson M, Sarna N, Shearer J, Huffman KM, Kraus WE. Myostatin decreases with aerobic exercise and associates with insulin resistance. *Medicine and science in sports and exercise*. 2010;42(11):2023-9.
63. Diel P, Schiffer T, Geisler S, Hertrampf T, Mosler S, Schulz S, Wintgens KF, Adler M. Analysis of the effects of androgens and training on myostatin propeptide and follistatin concentrations in blood and skeletal muscle using highly sensitive immuno PCR. *Molecular and cellular endocrinology*. 2010;330(1-2):1-9.
64. McPherron AC, Lee SJ. Suppression of body fat accumulation in myostatin-deficient mice. *The Journal of clinical investigation*. 2002;109(5):595-601.
65. Hittel DS, Berggren JR, Shearer J, Boyle K, Houmard JA. Increased secretion and expression of myostatin in skeletal muscle from extremely obese women. *Diabetes*. 2009;58(1):30-8.
66. Milan G, Dalla Nora E, Pilon C, Pagano C, Granzotto M, Manco M, Mingrone G, Vettor R. Changes in muscle myostatin expression in obese subjects after weight loss. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89(6):2724-7.
67. Guo T, Jou W, Chanturiya T, Portas J, Gavrilova O, McPherron AC. Myostatin inhibition in muscle, but not adipose tissue, decreases fat mass and improves insulin sensitivity. *PloS one*. 2009;4(3):e4937.
68. Kim HS, Liang L, Dean RG, Hausman DB, Hartzell DL, Baile CA. Inhibition of preadipocyte differentiation by myostatin treatment in 3T3-L1 cultures. *Biochemical and biophysical research communications*. 2001;281(4):902-6.
69. Zimmers TA, Davies MV, Koniaris LG, Haynes P, Esquela AF, Tomkinson KN, McPherron AC, Wolfman NM, Lee SJ. Induction of cachexia in mice by systemically administered myostatin. *Science*. 2002;296(5572):1486-8.
70. Stolz LE, Li D, Qadri A, Jalenak M, Klamon LD, Tobin JF. Administration of myostatin does not alter fat mass in adult mice. *Diabetes, obesity & metabolism*. 2008;10(2):135-42.
71. Torrado M, Iglesias R, Nespereira B, Mikhailov AT. Identification of candidate genes potentially relevant to chamber-specific remodeling in postnatal ventricular myocardium. *Journal of biomedicine & biotechnology*. 2010;2010:603159.
72. Artaza JN, Reisz-Porszasz S, Dow JS, Kloner RA, Tsao J, Bhasin S, Gonzalez-Cadavid NF. Alterations in myostatin expression are associated with changes in cardiac left ventricular mass but not ejection fraction in the mouse. *The Journal of endocrinology*. 2007;194(1):63-76.

73. Cohn RD, Liang HY, Shetty R, Abraham T, Wagner KR. Myostatin does not regulate cardiac hypertrophy or fibrosis. *Neuromuscular disorders : NMD*. 2007;17(4):290-6.
74. Li F, Wang X, Capasso JM, Gerdes AM. Rapid transition of cardiac myocytes from hyperplasia to hypertrophy during postnatal development. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 1996;28(8):1737-46.
75. McKoy G, Bicknell KA, Patel K, Brooks G. Developmental expression of myostatin in cardiomyocytes and its effect on foetal and neonatal rat cardiomyocyte proliferation. *Cardiovasc Res*. 2007;74(2):304-12.
76. Breitbart A, Auger-Messier M, Molkentin JD, Heineke J. Myostatin from the heart: local and systemic actions in cardiac failure and muscle wasting. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2011;300(6):H1973-82.
77. Morissette MR, Stricker JC, Rosenberg MA, Buranasombati C, Levitan EB, Mittleman MA, Rosenzweig A. Effects of myostatin deletion in aging mice. *Aging cell*. 2009;8(5):573-83.
78. Heineke J, Auger-Messier M, Xu J, Sargent M, York A, Welle S, Molkentin JD. Genetic deletion of myostatin from the heart prevents skeletal muscle atrophy in heart failure. *Circulation*. 2010;121(3):419-25.
79. Dougherty AH, Naccarelli GV, Gray EL, Hicks CH, Goldstein RA. Congestive heart failure with normal systolic function. *Am J Cardiol*. 1984;54(7):778-82.
80. Owan TE, Hodge DO, Herges RM, Jacobsen SJ, Roger VL, Redfield MM. Trends in prevalence and outcome of heart failure with preserved ejection fraction. *N Engl J Med*. 2006;355(3):251-9.
81. Gori M, Lam CS, Gupta DK, Santos AB, Cheng S, Shah AM, Claggett B, Zile MR, Kraigher-Krainer E, Pieske B, Voors AA, Packer M, Bransford T, Lefkowitz M, McMurray JJ, Solomon SD. Sex-specific cardiovascular structure and function in heart failure with preserved ejection fraction. *Eur J Heart Fail*. 2014.
82. Gori M, Lam CS, Gupta DK, Santos AB, Cheng S, Shah AM, Claggett B, Zile MR, Kraigher-Krainer E, Pieske B, Voors AA, Packer M, Bransford T, Lefkowitz M, McMurray JJ, Solomon SD, Investigators P. Sex-specific cardiovascular structure and function in heart failure with preserved ejection fraction. *Eur J Heart Fail*. 2014;16(5):535-42.
83. Paulus WJ, Tschope C, Sanderson JE, Rusconi C, Flachskampf FA, Rademakers FE, Marino P, Smiseth OA, De Keulenaer G, Leite-Moreira AF, Borbely A,

- Edes I, Handoko ML, Heymans S, Pezzali N, Pieske B, Dickstein K, Fraser AG, Brutsaert DL. How to diagnose diastolic heart failure: a consensus statement on the diagnosis of heart failure with normal left ventricular ejection fraction by the Heart Failure and Echocardiography Associations of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J*. 2007;28(20):2539-50.
84. Vasan RS, Levy D. Defining diastolic heart failure: a call for standardized diagnostic criteria. *Circulation*. 2000;101(17):2118-21.
85. Fischer M, Baessler A, Hense HW, Hengstenberg C, Muscholl M, Holmer S, Doring A, Broeckel U, Riegger G, Schunkert H. Prevalence of left ventricular diastolic dysfunction in the community. Results from a Doppler echocardiographic-based survey of a population sample. *Eur Heart J*. 2003;24(4):320-8.
86. Ommen SR, Nishimura RA, Appleton CP, Miller FA, Oh JK, Redfield MM, Tajik AJ. Clinical utility of Doppler echocardiography and tissue Doppler imaging in the estimation of left ventricular filling pressures: A comparative simultaneous Doppler-catheterization study. *Circulation*. 2000;102(15):1788-94.
87. Hillis GS, Moller JE, Pellikka PA, Gersh BJ, Wright RS, Ommen SR, Reeder GS, Oh JK. Noninvasive estimation of left ventricular filling pressure by E/e' is a powerful predictor of survival after acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*. 2004;43(3):360-7.
88. Nagueh SF, Middleton KJ, Kopelen HA, Zoghbi WA, Quinones MA. Doppler tissue imaging: a noninvasive technique for evaluation of left ventricular relaxation and estimation of filling pressures. *J Am Coll Cardiol*. 1997;30(6):1527-33.
89. Tschope C, Kasner M, Westermann D, Gaub R, Poller WC, Schultheiss HP. The role of NT-proBNP in the diagnostics of isolated diastolic dysfunction: correlation with echocardiographic and invasive measurements. *Eur Heart J*. 2005;26(21):2277-84.
90. Dokainish H, Zoghbi WA, Lakkis NM, Al-Bakshy F, Dhir M, Quinones MA, Nagueh SF. Optimal noninvasive assessment of left ventricular filling pressures: a comparison of tissue Doppler echocardiography and B-type natriuretic peptide in patients with pulmonary artery catheters. *Circulation*. 2004;109(20):2432-9.
91. How to diagnose diastolic heart failure. European Study Group on Diastolic Heart Failure. *Eur Heart J*. 1998;19(7):990-1003.
92. Scheuer J, Buttrick P. The cardiac hypertrophic responses to pathologic and physiologic loads. *Circulation*. 1987;75(1 Pt 2):163-8.

93. Schannwell CM, Schneppenheim M, Plehn G, Marx R, Strauer BE. Left ventricular diastolic function in physiologic and pathologic hypertrophy. *Am J Hypertens.* 2002;15(6):513-7.
94. Bombelli M, Facchetti R, Carugo S, Madotto F, Arenare F, Quarti-Trevano F, Capra A, Giannattasio C, Dell'Oro R, Grassi G, Sega R, Mancina G. Left ventricular hypertrophy increases cardiovascular risk independently of in-office and out-of-office blood pressure values. *J Hypertens.* 2009;27(12):2458-64.
95. Levy D, Anderson KM, Savage DD, Kannel WB, Christiansen JC, Castelli WP. Echocardiographically detected left ventricular hypertrophy: prevalence and risk factors. The Framingham Heart Study. *Ann Intern Med.* 1988;108(1):7-13.
96. Verdecchia P, Carini G, Circo A, Dovellini E, Giovannini E, Lombardo M, Solinas P, Gorini M, Maggioni AP. Left ventricular mass and cardiovascular morbidity in essential hypertension: the MAVI study. *J Am Coll Cardiol.* 2001;38(7):1829-35.
97. Gardin JM, McClelland R, Kitzman D, Lima JA, Bommer W, Klopfenstein HS, Wong ND, Smith VE, Gottdiener J. M-mode echocardiographic predictors of six- to seven-year incidence of coronary heart disease, stroke, congestive heart failure, and mortality in an elderly cohort (the Cardiovascular Health Study). *Am J Cardiol.* 2001;87(9):1051-7.
98. Gradman AH, Alfayoumi F. From left ventricular hypertrophy to congestive heart failure: management of hypertensive heart disease. *Prog Cardiovasc Dis.* 2006;48(5):326-41.
99. Lenk K, Schur R, Linke A, Erbs S, Matsumoto Y, Adams V, Schuler G. Impact of exercise training on myostatin expression in the myocardium and skeletal muscle in a chronic heart failure model. *Eur J Heart Fail.* 2009;11(4):342-8.
100. Herold, Gerd (Hg.) (2014): *INNERE MEDIZIN 2015*. Köln: Herold, Gerd.
101. Anker SD, Negassa A, Coats AJ, Afzal R, Poole-Wilson PA, Cohn JN, Yusuf S. Prognostic importance of weight loss in chronic heart failure and the effect of treatment with angiotensin-converting-enzyme inhibitors: an observational study. *Lancet.* 2003;361(9363):1077-83.
102. Evans WJ, Morley JE, Argiles J, Bales C, Baracos V, Guttridge D, Jatoi A, Kalantar-Zadeh K, Lochs H, Mantovani G, Marks D, Mitch WE, Muscaritoli M, Najand A, Ponikowski P, Rossi Fanelli F, Schambelan M, Schols A, Schuster M, Thomas D, Wolfe R, Anker SD. Cachexia: a new definition. *Clin Nutr.* 2008;27(6):793-9.

103. Anker SD, Sharma R. The syndrome of cardiac cachexia. *Int J Cardiol.* 2002;85(1):51-66.
104. Anker SD, Clark AL, Teixeira MM, Hellewell PG, Coats AJ. Loss of bone mineral in patients with cachexia due to chronic heart failure. *Am J Cardiol.* 1999;83(4):612-5, A10.
105. Mancini DM, Walter G, Reichel N, Lenkinski R, McCully KK, Mullen JL, Wilson JR. Contribution of skeletal muscle atrophy to exercise intolerance and altered muscle metabolism in heart failure. *Circulation.* 1992;85(4):1364-73.
106. Anker SD, Ponikowski P, Varney S, Chua TP, Clark AL, Webb-Peploe KM, Harrington D, Kox WJ, Poole-Wilson PA, Coats AJ. Wasting as independent risk factor for mortality in chronic heart failure. *Lancet.* 1997;349(9058):1050-3.
107. Cicoira M, Kalra PR, Anker SD. Growth hormone resistance in chronic heart failure and its therapeutic implications. *J Card Fail.* 2003;9(3):219-26.
108. Delafontaine P, Akao M. Angiotensin II as candidate of cardiac cachexia. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2006;9(3):220-4.
109. Warren RS, Starnes HF, Jr., Gabrilove JL, Oettgen HF, Brennan MF. The acute metabolic effects of tumor necrosis factor administration in humans. *Arch Surg.* 1987;122(12):1396-400.
110. Anker SD, Steinborn W, Strassburg S. Cardiac cachexia. *Ann Med.* 2004;36(7):518-29.
111. Zumbach MS, Boehme MW, Wahl P, Stremmel W, Ziegler R, Nawroth PP. Tumor necrosis factor increases serum leptin levels in humans. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997;82(12):4080-2.
112. Shyu KG, Ko WH, Yang WS, Wang BW, Kuan P. Insulin-like growth factor-1 mediates stretch-induced upregulation of myostatin expression in neonatal rat cardiomyocytes. *Cardiovasc Res.* 2005;68(3):405-14.
113. Shyu KG, Lu MJ, Wang BW, Sun HY, Chang H. Myostatin expression in ventricular myocardium in a rat model of volume-overload heart failure. *Eur J Clin Invest.* 2006;36(10):713-9.
114. Gaussin V, Depre C. Myostatin, the cardiac chalone of insulin-like growth factor-1. *Cardiovasc Res.* 2005;68(3):347-9.
115. George I, Bish LT, Kamalakkannan G, Petrilli CM, Oz MC, Naka Y, Sweeney HL, Maybaum S. Myostatin activation in patients with advanced heart failure and after mechanical unloading. *Eur J Heart Fail.* 2010;12(5):444-53.

116. Wang BW, Chang H, Kuan P, Shyu KG. Angiotensin II activates myostatin expression in cultured rat neonatal cardiomyocytes via p38 MAP kinase and myocyte enhance factor 2 pathway. *The Journal of endocrinology*. 2008;197(1):85-93.
117. Gruson D, Ginion A, Lause P, Ketelslegers JM, Thissen JP, Bertrand L. Urotensin II and urocortin trigger the expression of myostatin, a negative regulator of cardiac growth, in cardiomyocytes. *Peptides*. 2012;33(2):351-3.
118. Gruson D, Ahn SA, Ketelslegers JM, Rousseau MF. Increased plasma myostatin in heart failure. *Eur J Heart Fail*. 2011;13(7):734-6.
119. Zamora E, Simo R, Lupon J, Galan A, Urrutia A, Gonzalez B, Mas D, Valle V. Serum myostatin levels in chronic heart failure. *Rev Esp Cardiol*. 2010;63(8):992-6.
120. Lenk K, Erbs S, Holtriegel R, Beck E, Linke A, Gielen S, Winkler SM, Sandri M, Hambrecht R, Schuler G, Adams V. Exercise training leads to a reduction of elevated myostatin levels in patients with chronic heart failure. *Eur J Prev Cardiol*. 2012;19(3):404-11.
121. Dschietzig TB. Myostatin - From the Mighty Mouse to cardiovascular disease and cachexia. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2014;433:216-24.
122. Biesemann N, Mendler L, Kostin S, Wietelmann A, Borchardt T, Braun T. Myostatin induces interstitial fibrosis in the heart via TAK1 and p38. *Cell and tissue research*. 2015.
123. Wintgens KF, Dschietzig T, Stoeva S, Paulsson M, Armbruster FP. Plasma myostatin measured by a competitive ELISA using a highly specific antiserum. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2012;413(15-16):1288-94.
124. Groha P, Schunkert H. [Management of arterial hypertension]. *Herz*. 2015;40(6):929-40; quiz 41-2.
125. van Heerebeek L, Hamdani N, Falcao-Pires I, Leite-Moreira AF, Begieneman MP, Bronzwaer JG, van der Velden J, Stienen GJ, Laarman GJ, Somsen A, Verheugt FW, Niessen HW, Paulus WJ. Low myocardial protein kinase G activity in heart failure with preserved ejection fraction. *Circulation*. 2012;126(7):830-9.
126. Janardhanan R, Daley WL, Naqvi TZ, Mulvagh SL, Aurigemma G, Zile M, Arnold JM, Artis E, Purkayastha D, Thomas JD, Solomon SD, Investigators V. Rationale and design: the VALsartan In Diastolic Dysfunction (VALIDD) Trial: evolving the management of diastolic dysfunction in hypertension. *American heart journal*. 2006;152(2):246-52.

127. Welle S, Burgess K, Mehta S. Stimulation of skeletal muscle myofibrillar protein synthesis, p70 S6 kinase phosphorylation, and ribosomal protein S6 phosphorylation by inhibition of myostatin in mature mice. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism*. 2009;296(3):E567-72.
128. Sartori R, Milan G, Patron M, Mammucari C, Blaauw B, Abraham R, Sandri M. Smad2 and 3 transcription factors control muscle mass in adulthood. *American journal of physiology Cell physiology*. 2009;296(6):C1248-57.
129. Lee SJ, Reed LA, Davies MV, Girgenrath S, Goad ME, Tomkinson KN, Wright JF, Barker C, Ehrmantraut G, Holmstrom J, Trowell B, Gertz B, Jiang MS, Sebald SM, Matzuk M, Li E, Liang LF, Quattlebaum E, Stotish RL, Wolfman NM. 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*. 2005;102(50):18117-22.
130. Wagner KR, Fleckenstein JL, Amato AA, Barohn RJ, Bushby K, Escolar DM, Flanigan KM, Pestronk A, Tawil R, Wolfe GI, Eagle M, Florence JM, King WM, Pandya S, Straub V, Juneau P, Meyers K, Csimma C, Araujo T, Allen R, Parsons SA, Wozney JM, Lavallie ER, Mendell JR. A phase I/II trial of MYO-029 in adult subjects with muscular dystrophy. *Annals of neurology*. 2008;63(5):561-71.
131. Mendell JR, Sahenk Z, Malik V, Gomez AM, Flanigan KM, Lowes LP, Alfano LN, Berry K, Meadows E, Lewis S, Braun L, Shontz K, Rouhana M, Clark KR, Rosales XQ, Al-Zaidy S, Govoni A, Rodino-Klapac LR, Hogan MJ, Kaspar BK. A phase 1/2a follistatin gene therapy trial for becker muscular dystrophy. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*. 2015;23(1):192-201.
132. Oshima Y, Ouchi N, Shimano M, Pimentel DR, Papanicolaou KN, Panse KD, Tsuchida K, Lara-Pezzi E, Lee SJ, Walsh K. Activin A and follistatin-like 3 determine the susceptibility of heart to ischemic injury. *Circulation*. 2009;120(16):1606-15.
133. Panse KD, Felkin LE, Lopez-Olaneta MM, Gomez-Salinerio J, Villalba M, Munoz L, Nakamura K, Shimano M, Walsh K, Barton PJ, Rosenthal N, Lara-Pezzi E. Follistatin-like 3 mediates paracrine fibroblast activation by cardiomyocytes. *Journal of cardiovascular translational research*. 2012;5(6):814-26.
134. Nakatani M, Takehara Y, Sugino H, Matsumoto M, Hashimoto O, Hasegawa Y, Murakami T, Uezumi A, Takeda S, Noji S, Sunada Y, Tsuchida K. Transgenic expression of a myostatin inhibitor derived from follistatin increases skeletal muscle mass and ameliorates dystrophic pathology in mdx mice. *FASEB journal : official*

publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology.
2008;22(2):477-87.

135. McCroskery S, Thomas M, Platt L, Hennebry A, Nishimura T, McLeay L, Sharma M, Kambadur R. Improved muscle healing through enhanced regeneration and reduced fibrosis in myostatin-null mice. *Journal of cell science*. 2005;118(Pt 15):3531-41.

136. Bogdanovich S, Krag TO, Barton ER, Morris LD, Whittemore LA, Ahima RS, Khurana TS. Functional improvement of dystrophic muscle by myostatin blockade. *Nature*. 2002;420(6914):418-21.

137. Lakshman KM, Bhasin S, Corcoran C, Collins-Racie LA, Tchistiakova L, Forlow SB, St Ledger K, Burczynski ME, Dorner AJ, Lavallie ER. Measurement of myostatin concentrations in human serum: Circulating concentrations in young and older men and effects of testosterone administration. *Molecular and cellular endocrinology*. 2009;302(1):26-32.

138. Breitbart A, Scharf GM, Duncker D, Widera C, Gottlieb J, Vogel A, Schmidt S, Brandes G, Heuft HG, Lichtinghagen R, Kempf T, Wollert KC, Bauersachs J, Heineke J. Highly specific detection of myostatin prodomain by an immunoradiometric sandwich assay in serum of healthy individuals and patients. *PloS one*. 2013;8(11):e80454.

139. Yoshida T, Tabony AM, Galvez S, Mitch WE, Higashi Y, Sukhanov S, Delafontaine P. Molecular mechanisms and signaling pathways of angiotensin II-induced muscle wasting: potential therapeutic targets for cardiac cachexia. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2013;45(10):2322-32.

7. Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

ACE –	Angiotensin Converting Enzyme
ACT –	activated clotting time
ActR –	Activin Receptor
aHTN –	arterielle Hypertonie
ALK –	Activin-like Kinase
Art –	arterielle Myostatin-Konzentration
BMI –	Body Mass Index
BMP –	Bone morphogenetic Protein
BNP –	B-Type Natriuretic Peptide
CHF –	Chronic Heart Failure
CS –	Coronarvenensinus
DCMP –	Dilatative Kardiomyopathie
DD –	Diastolische Dysfunktion
DEAH –	Dehydroepiandrosteron
DHI –	Diastolische Herzinsuffizienz
ELISA –	Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay
ERK –	Extracellular-signal regulated kinases
EZM –	Extrazellulärmatrix
FLGR –	Follistatin-related gene
FOXO –	Forkhead Box O
FSH –	Follikel-stimulierendes Hormon
FSTL –	Follistatin-related protein
GASP –	Growth and Differentiation Factor associated Serum Protein
GDF –	Growth Differentiation Factor
HCT –	Hydrochlorothiazid
HFpEF –	Heart failure with preserved ejection fraction
HFrEF –	Heart failure with reduced ejection fraction
HOcm –	Hypertrophe obstruktive Kardiomyopathie
hSGT –	Human small glutamine-rich tetratricopeptide repeat-containing protein
ICMP –	Ischämische Kardiomyopathie

IGF –	Insulin-like Growth Factor
KHK –	Koronare Herzkrankheit
KO –	Knock Out
LAO –	left anterior oblique
LAVI –	Linksatrialer Volumenindex
LTBP –	Latent TGF- β Binding Protein
LV –	Linker Ventrikel
LVAD –	Left Ventricular Assist Device
LVEDP –	Left Ventricular enddiastolic Pressure
LVEDVI –	enddiastolischer Volumenindex
LVEF –	Linksventrikuläre Ejektionsfraktion
LVH –	Linksventrikuläre Hypertrophie
LVMI –	Linksventrikulärer Masse-Index
MAPK –	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
M-LVDP –	Mean Left Ventricular Diastolic Pressure
MMP –	Matrix-Metallo Proteinase
mPCW –	Pulmonalkapillärer Verschlussdruck
mRNA –	Messenger RNA
MSTN –	Myostatin (v.a. in Bezug auf den Genlocus)
mTOR –	mammalian Target of Rapamycin
MURF –	Muscle RING finger Protein
NYHA –	New York Heart Association
PVI –	Pulmonalvenenisolation
RAO –	right anterior oblique
SHI –	Systolische Herzinsuffizienz
TAC –	Transverse Aortic Constriction
TD –	Tissue Doppler
TEE –	Transoesophageale Echokardiographie
TGF –	Transformation Growth Factor
TMB –	Tetramethylbenzidin
Ven –	venöse Myostatin-Konzentration
VHF –	Vorhofflimmern
WHO –	World Health Organization

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Proteolytische Spaltung des Myostatins	10
Abbildung 2 Diagnose der Herzinsuffizienz mit erhaltener Ejektionsfraktion	26
Abbildung 3 Sondierung des Sinus coronarius zur Blutentnahme im Rahmen einer Pulmonalvenenisolation	40
Abbildung 4 Darstellung der Myostatinkonzentrationen in Bezug auf die Patientengruppen.....	48
Abbildung 5 Koronargradient und AV-Gradient in Bezug auf Kohorten	48
Abbildung 6 Univariate lineare Regression zwischen E/E' und der absoluten MSTN- Konzentration im CS	52
Abbildung 7 Univariate lineare Regression zwischen der relativen LV-Masse und der absoluten MSTN-Konzentration im CS.....	52

7.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Ein- und Ausschlusskriterien für Studienteilnahme	35
Tabelle 2 Kohorteneinteilung	36
Tabelle 3 Geräte und Materialien für ELISA	42
Tabelle 4 Baseline-Charakteristika.....	47
Tabelle 5 Signifikante Korrelation von E/E' als Marker der diastolischen Dysfunktion mit Kovariaten und Faktoren	49
Tabelle 6 Generalisiertes Lineares Modell mit der Zielvariable E/E' und den signifikant korrelierenden Faktoren und Kovariaten.	50
Tabelle 7 Generalisiertes Lineares Modell mit der Zielvariable E/E' und den signifikant korrelierenden Faktoren und Kovariaten (exklusive Myo Art, Myo CS).....	50
Tabelle 8 Generalisiertes Lineares Modell mit der Zielvariable E/E' und den signifikant korrelierenden Faktoren und Kovariaten (exklusive Myo Ven, Myo CS).....	50
Tabelle 9 Signifikante Korrelationen von LV-Masse mit Kovariaten und Faktoren	51

7.4 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Christian Georgi, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: *Die Koronarbilanz von Myostatin am menschlichen Herzen: myokardiale Freisetzung oder Extraktion bei Patienten mit Herzinsuffizienz und erhaltener Ejektionsfraktion* selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

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

Datum 16.02.2017

Unterschrift

Anteilerklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Christian Georgi hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Kongressbeitrag

1) 2015 AACC Annual Meeting & Clinical Lab Expo, 26.07-30.07.2015, Atlanta, Georgia (USA); Poster, Dschietzig TB, Georgi C, Fahlenkamp U, Ruppert J, Armbruster FP, Diaz I *Circulating Myostatin Levels in heart failure with preserved ejection fraction*

Beitrag im Einzelnen: Organisation und Durchführung der Patientenaquise, Mitarbeit an Probenentnahme- und Myostatin-Konzentrationsbestimmung, statistische Auswertung, inhaltliche Mitgestaltung

Prof. Dr. med. Thomas Bernd Dschietzig
Medical Sciences
Unterschrift, Datum und Stempel
des betreuenden Hochschullehrers

Christian Georgi
Unterschrift des Doktoranden

7.5 Lebenslauf

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

7.6 Publikationsverzeichnis:

Kongressbeiträge

1) 2015 AACC Annual Meeting & Clinical Lab Expo, 26.07-30.07.2015, Atlanta, Georgia (USA); Poster, Dschietzig TB, Georgi C, Fahlenkamp U, Ruppert J, Armbruster FP, Diaz I *Circulating Myostatin Levels in heart failure with preserved ejection fraction*

2.) CardioStim/EHRA Europace 2016, 08.-11.06.2016, Nizza, Frankreich; Poster, M. Seifert, V. Möller, C. Georgi, C. Butter *Prognosis of second CRT implantation after complete device extraction CardioStim/Europace 2016*

7.7 Danksagung

Zunächst möchte ich dem Institutsleiter Prof. Dr. Baumann und seinem Nachfolger Prof. Dr. Karl Stangl dafür danken, dass sie mir ermöglichten diese Promotion an Ihrem Institut durchzuführen.

Zum Gelingen dieser Arbeit jedoch trug an erster Stelle mein Doktorvater Prof. Dr. Thomas Dschietzig bei, der durch seine konstruktiven Kommentare und Verbesserungsvorschläge diese Arbeit inhaltlich hervorragend betreute und immer wieder entscheidend voran brachte. Besonders für seine engmaschige Betreuung und stetige Erreichbarkeit möchte ich ihm ausdrücklich danken.

Weiterhin danke ich meinem Betreuer Dr. Ivan Diaz, der mir erste Einblicke in die Elektrophysiologie gewährte und damit meine weitere ärztliche Laufbahn bis zu diesem Zeitpunkt nicht unerheblich mitprägte.

Ich danke Frau Christina Büttner, die mich in die Kunst des Pipettierens/ELISAs einwies und mir ermöglichte die gewonnenen Blutproben selbstständig auszuwerten und ebenso Frau Ute Fahlenkamp für die zügige Auswertung der CT-Bilder.

Meinen lieben Freunden Jonas und Jonas bin ich sehr dankbar dafür ihr bruchstückhaftes Wissen über Statistik mit mir geteilt und dabei einige langwierige Stunden vor ihnen unverständlichen Begriffen und Zusammenhängen geduldig ausgehalten zu haben.

Von Herzen danke ich meiner Freundin Carla dafür, dass sie trotz einigem unverschuldeten Pech mit ihrer eigenen Promotion mir stets mit Rat und Tat zur Seite stand und mich motivierte an den Schreibtisch zurückzukehren.

Dank geht an meinen Vater, der mir mit seiner fast 10 Jahre andauernden Promotion stets ein Ansporn war, zumindest etwas schneller damit fertig zu werden und ebenso an meine Mutter, die zugesandte Zwischenexemplare innerhalb weniger Tage mit Akribie auf Rechtschreibfehler und zweifelhafte Formulierungen überprüfte.

Letztlich möchte ich meinen beiden Eltern für ihre aufopferungsbereite, liebevolle Erziehung in den vergangenen fast 30 Jahren danken. Ihr habt mir alle Möglichkeiten gegeben, meine eigenen Wege zu gehen und seid dennoch stets unverzichtbarer Rückhalt und Berater.