

Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt für
Kardiologie und Angiologie am Campus Mitte
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Myostatin –
seine Koronarbilanz und
zirkulierende Serumspiegel in Abhängigkeit von
kardialem Status und Therapie

Myostatin –
its coronary balance and
circulating serum levels depending on
cardiac status and therapy

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Malte Hofmann

aus Berlin

Datum der Promotion: 21.06.2020

Für Lisa

1 Inhaltsverzeichnis

1	Inhaltsverzeichnis	3
2	Abstrakt.....	5
3	Einleitung	9
3.1	Physiologie und Pathophysiologie von Myostatin.....	10
3.1.1	Die Bedeutung von Myostatin im veterinären Bereich.....	14
3.1.2	Die Bedeutung von Myostatin beim Menschen.....	15
3.1.3	Genexpression, Translation und posttranslationale Modifizierung von Myostatin..	16
3.1.4	Zirkulation von Myostatin	17
3.1.5	Zielzellen-Rezeptor und Signaltransduktion durch Smad	19
3.1.6	Intranukleäre Transkription	21
3.2	Linksventrikuläre Hypertrophie und Herzinsuffizienz	22
4	Material und Methode	27
4.1	Patientenkollektive.....	28
4.1.1	20 Patienten ohne Herzinsuffizienz, mit Vorhofflimmern	28
4.1.2	16 Patienten aus CHF.RLX.001.....	28
4.2	Probengewinnung	29
4.2.1	Probenaufbereitung und Lagerung.....	29
4.2.2	Probenanalyse: kompetitiver Enzymimmunoassay für Myostatin	29
4.2.3	Bestimmung von NT-proBNP	30
4.2.4	Bestimmung der linksventrikulären Herzmasse mittels Cardio-CT der Patienten der Gruppe unter 5.1.1	30
4.3	Statistische Analyse	31
5	Ergebnisse.....	33
5.1	Patienten ohne Herzinsuffizienz, mit Vorhofflimmern	33
5.1.1	Charakteristika	33
5.1.2	Myostatin-Konzentration in Arterie, Vene und Coronarsinus.....	34
5.1.3	NT-proBNP-Konzentration.....	35
5.1.4	Myostatin und Bestimmung der linksventrikulären Herzmasse mittels Cardio-CT ..	35
5.2	Patienten aus RLX.CHF.001.....	39
5.2.1	Charakteristika	39
5.2.2	Vergleich der Ausgangswerte von RLX.CHF.001	40
5.2.3	Konzentrationsveränderungen von Myostatin und NT-proBNP in RLX.CHF.001 ..	41
5.2.4	Korrelationsanalyse nach Pearson zwischen Myostatin und NT-proBNP in RLX.CHF.001	43
6	Diskussion	45
7	Zusammenfassung	55
8	Literatur.....	56
9	Anhang	67
10	Abkürzungsverzeichnis.....	76

Inhaltsverzeichnis

11 Eidesstattliche Versicherung	79
12 Lebenslauf	80
13 Danksagung	82

2 Abstrakt

Einleitung: Myostatin, ein transforming growth factor- β (TGF- β), wird vorwiegend in der Skelett-, aber auch in der Herzmuskulatur gebildet. Als wichtiger Regulator der Myogenese inhibiert es lokal und systemisch Muskelproliferation und -hypertrophie und nimmt eine regulative Funktion im Pathomechanismus der Herzinsuffizienz ein.

Ziel der Arbeit ist erstens die Etablierung einer Methode zur Quantifizierung myokardialer Myostatinsekretion in vivo mit Korrelation zur indirekt bestimmten Herzmasse beim erwachsenen Menschen.

Zweitens wird die Beziehung zwischen peripher-venöser Myostatinkonzentration und klinischen, hämodynamischen und laborchemischen Parametern einer systolisch-chronischen Herzinsuffizienz in ihrem Verlauf untersucht.

Methode: 1. Teil: Bei Patienten mit Vorhofflimmern ohne Herzinsuffizienz und erhaltener LV-Funktion werden im Rahmen einer elektrophysiologischen Untersuchung Myostatin-Konzentrationen aus A. femoralis, peripherer Vene und Coronarsinus zur Berechnung eines Myostatin-Koronargradienten bestimmt. Zusätzlich erfolgt die indirekte Bestimmung der Herzmasse mittels Cardio-CT.

2. Teil: In einer Dosis-Eskalations-Studie werden Patienten mit stabiler systolischer Herzinsuffizienz (NYHA II-III) unter invasivem hämodynamischen Langzeit-Monitoring mit vasodilatatorischem Relaxin-2 behandelt, 24h nachbeobachtet und je einer Gruppe mit oder ohne klinisch-hämodynamischer Verbesserung zugeordnet. Über den gesamten Verlauf werden seriell venös-systemisch NT-proBNP und Myostatin bestimmt.

Ergebnisse: Nach Bestimmung der Myostatin-Konzentrationsgradienten zwischen Vene/Arterie, Coronarsinus/Arterie und Coronarsinus/Vene zeigt sich ein signifikant positiver Gradient zwischen Coronarsinus und Arterie, sowie zwischen Vene und Arterie.

Die Patientengruppe mit hämodynamischer Verbesserung unter Relaxin-2 zeigt sowohl einen signifikanten Abfall der Myostatin- und NT-proBNP-Konzentrationen über die Zeit, als auch eine schwache, aber signifikante konkordante Korrelation zwischen Myostatin und NT-proBNP. Dies war in der hämodynamisch nicht ansprechenden Patientengruppe nicht nachweisbar.

Diskussion: Der Nachweis eines positiven Myostatin-Koronargradienten bei Patienten mit Vorhofflimmern, normaler LV-Funktion ohne Zeichen einer Herzinsuffizienz oder linksventrikulären Hypertrophie ermöglicht die Untersuchung, welchen Einfluss der in in-vitro-Untersuchungen gezeigte Fibrose-induzierende und anti-hypertrophe Effekt von myokardialem Myostatin auf die Entstehung von linksventrikulärer Hypertrophie und Vorhofflimmern hat. Es bleibt zu untersuchen, ob diese kardiale Myostatin-Sekretion auch bei herzgesunden Individuen besteht.

Im 2. Teil der Arbeit wird erstmalig nachgewiesen, dass im Rahmen der Behandlung mit Relaxin-2 die Verbesserung der hämodynamischen Situation innerhalb eines kurzen Zeitabschnittes, konkordant mit der Konzentrationsänderung von NT-proBNP, zu einer signifikanten Abnahme der Myostatinkonzentration führt.

Abstract

Introduction: Myostatin, a transforming growth factor- β (TGF- β), is predominantly formed in the skeletal muscles but also in the myocardium. As an important regulator of the myogenesis it inhibits locally and systematically muscle proliferation and muscle hypertrophy and assumes a regulative function in the pathomechanism of cardiac insufficiency. The aim of this study is firstly to establish a method for quantifying myocardial Myostatin secretion in vivo with correlation to indirectly determined heart mass in adults.

Second, the correlation between peripheral-venous Myostatin concentration and clinical, hemodynamic and laboratory parameters of systolic-chronic myocardial insufficiency in its course is studied.

Methods: Part 1: In patients with atrial fibrillation without cardiac insufficiency and sustained LV-function the Myostatin concentrations of femoral artery, peripheral vein and coronary sinus are determined in the course of an electrophysiological study to calculate a Myostatin coronary gradient. In addition the cardiac mass is indirectly determined using Cardio-CT.

Part 2: In a dose-escalation study patients with stable systolic cardiac insufficiency (NYHA II-III) are treated with vasodilating Relaxin-2 under invasive hemodynamic long-term-monitoring, thereafter they are observed for 24 hours and allocated to a group with or without clinical hemodynamic improvement. Over the entire course serial venoussystemic NT-proBNP and Myostatin levels are determined.

Results: The determination of the Myostatin-concentration gradient between vein/artery, coronary sinus/artery and coronary sinus/vein shows a significant positive gradient between coronary sinus and femoral artery, as well as between vein and femoral artery.

The patient group with hemodynamic improvement under Relaxin-2 shows a significant decrease of Myostatin and NT-proBNP concentrations over time, as well as a weak, however significant, concordant correlation between Myostatin and NT-proBNP. This could not be demonstrated in the hemodynamical unresponsive patient group.

Discussion: The proof of a positive Myostatin-coronary gradient in patients with atrial fibrillation, normal LV-function with no signs of cardiac insufficiency or left ventricular hypertrophy enables to study, which influence the in-vitro demonstrated fibrose inducing

Abstract

and anti-hypertrophic effect of myocardial Myostatin exerts on the development of left ventricular hypertrophy and atrial fibrillation. It remains up to future studies whether this cardiac Myostatin secretion exists also in individuals with normal cardiac function.

In the second part of this study it is demonstrated for the first time that in the course of treatment with Relaxin-2 the improvement of the hemodynamic situation within a short period of time, concordant with the change of the concentration of NT-proBNP, leads to a significant decrease on the concentration of Myostatin.

3 Einleitung

Myostatin gehört zur großen Gruppe der transforming growth factor- β (TGF- β)-Superfamilie. Das sind Wachstums- und Differenzierungsfaktoren, die eine wichtige regulatorische Funktion bei der embryonalen Entwicklung und dem Aufrechterhalten der Gewebemöostase beim Menschen spielen.

Die systematische Analyse des hereditären Defektes von schon lange bekannten Rindern mit einem „double muscle“-Phänotyp, wie den Piedmonteser und den Belgian Blue, führte 1997 zur transgenen Kreierung einer Maus mit einem gezielten Gendefekt für die Codierung eines dann Myostatin genannten Proteins, der sogenannten „mighty mouse“. Diese hat eine 2-3 fach höhere Muskelmasse als der Mauswildtyp [77][78]. Der ähnliche muskuläre Phänotypus der Myostatin-null-Maus entspricht ebenso einer Mutation am Myostatin-Genlocus wie es bei den obengenannten Rindern, weiteren anderen Säugetieren und Fischen [90] sowie, 2004 entdeckt, beim Menschen [97] der Fall ist.

Myostatin spielt eine zentrale Rolle als negativer Regulator der Myogenese. Ein Fehlen des Proteins führt zu einem deutlichen Muskelwachstum. Entsprechend kommt es bei hohen Myostatinkonzentrationen zu einem Muskelschwund. So gibt es Hinweise auf eine eigenständige Mitbeteiligung von Myostatin an der Entwicklung einer Sarkopenie im Alter und der Kachexie bei einer Anzahl chronischer Erkrankungen [85][89][94][124]. Myostatin inhibiert abhängig vom Ziel-Zelltyp lokal und systemisch [118] die Muskelproliferation und -hypertrophie und hat Einfluss auf den Insulin- und Fettstoffwechsel [53]. Es gehört funktionell zu den 1962 von Bullough postulierten Chalonen [17][18]. Phylogenetisch zählt Myostatin zu den konservativen Proteinen, das in verschiedenen Spezies der Vertebraten, von Fischen bis Säugetieren identifiziert wurde [90].

Der 1997 zuerst entdeckte und auch quantitativ bedeutendste Bildungsort ist die Skelettmuskelzelle.

1999 gelang der Nachweis, dass auch die Herzmuskelzellen Myostatin exprimieren [98].

Zahlreiche Untersuchungen stellen die verschiedenen Einflussfaktoren dar, die zu einer erhöhten Myostatin-Serumkonzentration führen. Es werden Myostatin-Spiegeländerungen unterschieden, die durch die überwiegende Bildung in der

Skelettmuskulatur, dann aber auch durch ihre Exprimierung in der Herzmuskulatur bedingt sind.

So kommt es im Myokard nach einer Infarzierung zu einer erhöhten Myostatinexpression in den benachbarten Kardiomyozyten der Infarktzone [98]. Bei chronischer Herzinsuffizienz ist die Myostatinexpression erhöht [9]. Bei einer aufgrund von Volumenbelastung entstandenen Herzinsuffizienz ist die erhöhte myokardiale Myostatinexpression nach Behandlung mit einem beta-Blocker in ihrem Anstieg begrenzt [100]. Bei Patienten mit einer chronischen Herzinsuffizienz sind die initial erhöhten Myostatin Spiegel nach Trainingsübungen rückläufig [64].

Im Rahmen der hier zur Darstellung kommenden in vivo Untersuchungen mittels der Methode eines direkt vor dem Eintritt des Sinus coronarius in den rechten Vorhof zu liegen kommenden Katheters wird nachgewiesen, dass das Herz eigenständiger Bildungsort von Myostatin beim erwachsenen Menschen ist.

Nach indirekter Bestimmung der Herzmasse mittels Cardio-CT zeigt sich bei Probanden mit normaler Herzmasse ein Myostatin-Konzentrationsgradient zwischen arteriellem und Sinus coronarius-Serum.

Es wird ebenso nachgewiesen, dass eine Korrelation zwischen klinisch-hämodynamischer Besserung einer systolischen chronischen Herzinsuffizienz und venös gemessenen Myostatin-Spiegeln besteht, und sich dies in einer konkordanten Korrelation zwischen Myostatin- und NT-proBNP-Serumkonzentration widerspiegelt.

Myostatin scheint somit im Pathomechanismus der Herzinsuffizienz eine regulative Funktion einzunehmen.

3.1 Physiologie und Pathophysiologie von Myostatin

Myostatin gehört als growth and differentiation factor-8 (GDF-8) zur bisher über 30 Mitglieder umfassenden [38][53] transformation growth factor- β - Superfamilie (TGF- β) [77][78].

Die Mitglieder der TGF- β -Superfamilie spielen bei der Regulation der Embryonalentwicklung und der Aufrechterhaltung der Gewebemöostase bei erwachsenen Organismen eine wichtige Rolle [17][38][53].

Die Bereitstellung der genetischen Zellprogramme eines multizellulären Organismus muss, um der Aufrechterhaltung des Gesamtorganismus willen, streng überwacht werden [71].

Seit den 1980er Jahren hat sich eine wachsende Anzahl verschiedener, aber strukturell verwandter sekretorischer Polypeptide als bedeutende Quelle von Modulatoren, die diesen Anforderungen der Überwachung und Regulation entsprechen, herausgestellt. Nahezu jede Zelle im menschlichen Organismus kann sie produzieren bzw. ihre Signale beantworten [49]. Diese vielseitigen Zytokine regulieren zumeist parakrin Zellwachstum, Differenzierung, Morphogenese und die Homöostase von Geweben während der Entwicklungsphase. Bei vielen Zellarten geschieht dies auch im ausgewachsenen Zustand über die gesamte Lebensspanne des Organismus hindurch. Auch wird die Apoptose beeinflusst [33][44][72][73].

Zu ihnen gehören TGF- β 1 bis 3, bone morphogenetic protein 2 bis 15, growth differentiation factors 1 bis 15 mit GDF-8 als Myostatin und seinem strukturell nächstverwandten GDF-11, Aktivin, Inhibin, Nodals und, weiter entfernt verwandt, Lefty sowie Anti-Müller-Hormon [38].

Im kardiovaskulären System sind überwiegend Mitglieder der TGF- β - und BMP-Subgruppe an der Entwicklung des Herzens, wie z.B. des Endokardkissens und der Bildung der Herzklappen und an der Angiogenese beteiligt. TGF- β 1 bis 3-Knockout-Mäuse überleben schon die Embryonalphase nicht, da es zu einer exzessiven Inflammation mit massiver Leukozyteninfiltration in Herz und Lunge, zu einem Ventrikelseptumdefekt, einer Myokardausdünnung und einer fehlerhaften Entwicklung der Koronargefäße kommt [38]. Bei myokardialer Infarzierung und bei kardialer Druck- und Volumenbelastung kommt es zu einer Expression der TGF- β Subgruppe. Es ist offen, ob es sich dabei um Adaptationsvorgänge handelt oder ob diese Expression Teil des pathologischen Prozesses ist [12][24]. Die TGF- β 1- und auch BMP-7-Exprimierung am Herzen wird jedoch als ein protektiver Mechanismus aufgefasst, da es aufgrund der Prävention von Neutrophilenadhärenz an das Endothelium zu einer Reduktion der myokardialen Nekrose nach Infarzierung kommt [61][62][63]. Eine Rolle im Remodeling wird vermutet [14][38].

Alle diese Polypeptide besitzen einen ähnlichen strukturellen Aufbau und werden jeweils als großes Vorläuferpolypeptid mit einer N-terminalen Signalsequenz und einer sich anschließenden Pro-Domäne synthetisiert. Es kommt dann an der dibasischen Prozessierungsstelle RXXR zu einer Aufspaltung und der Bildung einer C-terminalen reifen phylogenetisch hoch stabilen Domäne. Typisch ist in ihr der sogenannte Cystein-

Knoten mit mehreren, zwischen sechs bis neun, Disulfidbrücken. Dieser sorgt für höhere Stabilität. Die Cystein-Reste bilden über eine zusätzliche Disulfidbrücke aus zwei Monomeren ein Dimer.

In der Zirkulation wird die reife Domäne durch die nicht kovalente Bindung mit der Prodomäne, dem latency associated peptide (LAP), inhibiert [54][73].

Weiter ist allen gemeinsam die Signalübertragung an der Zielzelle über einen membrangebundenen heteromeren Serin-Threonin-Kinasen-Rezeptorkomplex, der aus zwei Typ 1- und zwei Typ 2-Rezeptoren besteht [73]. Es sind dies beim Menschen die einzigen Zelloberflächenrezeptor-Serin-Threonin-Kinasen [73]. Die Bindung des Liganden an diesen Rezeptorkomplex bewirkt über den Typ1-Rezeptor die Phosphorylierung von intrazellulären Transkriptionsaktivatoren (Smad) zu einer Kaskade, die nach Translokation des Smad-Heterooligomers in den Nucleus in Verbindung mit zusätzlichen Transkriptions-Co-Faktoren zur entsprechenden Genaktivierung und damit zur Induktion der Proteinbiosynthese führt [71].

Die genetischen Strukturen gehören in der evolutionären Entwicklung zu den konservativen Regionen und sind in Vertebraten, Insekten und bereits Würmern nachweisbar. In Protozoen existieren sie nicht. Die TGF- β -Superfamilie scheint sich mit dem Aufkommen der ersten Tierarten entwickelt zu haben. Wahrscheinlich dient sie der interzellulären Koordination und Kontrolle von Mehrzellern [49][73].

Diese multifunktionalen Zytokine werden nach dem zuerst entdeckten Vertreter, nämlich dem TGF- β , unter der Sammelbezeichnung TGF- β - Superfamilie zusammengefasst [14][38][44][54][55][71][72][73][77].

Bei Vertebraten werden viele verschiedene TGF- β -Superfamilien-Liganden genetisch codiert. Mit nur einigen verschiedenen Typ1- und Typ2- Rezeptorunterarten verbinden sich diese Liganden. Die Rezeptoren aktivieren wiederum nur wenige Smad-Transkriptionsfaktoren, die dann die vielfältigen biologischen Antworten hervorrufen. Dieser Signalweg hat von Beginn seiner Entdeckung an die zentrale Frage aufgeworfen: Wie bestimmt bei einer fast uniformen intrazellulären Endstrecke des Signalweges der Zellkontext die verschiedenen teilweise gegensinnigen und mitunter auch völlig andersartigen Wirkungen der TGF- β -Superfamilien Mitglieder [33][73] ?

1997 konnte Myostatin als neues Mitglied der TGF- β -Superfamilie bei der Maus identifiziert werden. Es wird besonders in sich entwickelnder und ausgewachsener Skelettmuskulatur exprimiert [77]. Zur Bestimmung der biologischen Funktion von Myostatin wurden durch gezielte Genmodifikation Myostatin-null Mäuse generiert. Diese Tiere sind im Vergleich zu ihren Wildtyp-Verwandten signifikant größer mit einer größeren und 2 bis 3 mal schwereren Muskelmasse. Letzteres ist die Folge nicht nur einer Muskelhypertrophie, sondern auch ihrer Hyperplasie. Diese Mäuse erhielten den Spitznamen mighty mice [77].

Exzessives Muskelwachstum bei bestimmten Rindern, sogenannten „double muscle“ Rinder, ist schon seit über 200 Jahren bekannt und wurde erstmals 1807 von Culley G. wissenschaftlich beschrieben [28]. Zu ihnen gehören unter anderem die Piedmonteser Rinder, die sich über Jahrhunderte in lokaler Isoliertheit entwickelten und die Weißblauen Belgier (Belgian Blue), eine belgische Rinderrasse. In den Jahren 1985 und 1995 konnte ein autosomal-rezessiver Erbgang als Ursache identifiziert werden und als Genlocus wurde ein sogenanntes mh Gen auf dem bovinen Chromosom 2 ausgemacht [22][41][42][103]. Die Entwicklung einer Myostatin-KO-Maus durch McPherron et al. 1997 führte zur systematischen Aufdeckung der verschiedenen Mutationen am Myostatin-Genlocus mit einem ähnlichen Phänotyp [90]. Das Myostatin-Gen und der mh-Locus befinden sich in einer ähnlichen Position [51][78].

Für die Belgian Blue-Myostatinsequenz konnte auf dem bovinen Chromosomen 2, in direkter Nähe des mh-Allels, eine 11-Nucleotid-Deletion am 3. Exon mit darauffolgender Rastermutation detektiert werden - dadurch wird fast die komplette reife Molekülregion beseitigt. Die Piedmontese-Myostatinsequenz enthält ebenfalls am Exon 3 eine non-sense Mutation, bei dieser wird Cystein durch Tyrosin in der aktiven Molekülregion ersetzt. Das führt zu einem Funktionsverlust des Zytokin [51][60][77][78].

Das an diesem Genlocus generierte Myostatin führt zu einer Hemmung des Muskelwachstums [85][89][124]. Im Gegenzug führt seine Inhibition zu vermehrter Muskelmasse [89].

Myostatin ist somit ein negativer Regulator des Skelettmuskelwachstums [29][60][77][78] und verdankt dieser Eigenschaft seinen Namen. Nach einem von Bullough WS 1962 geprägten Terminus kann Myostatin als Chalon begriffen werden. Chalone werden diejenigen Signalstoffe genannt, die entsprechend dem von Bullough WS entwickelten Konzept das Gewebewachstum durch Inhibitoren der Mitose kontrollieren [17][19]. „Denn die Bedeutung besteht darin, dass nicht nur der funktionelle

Status eines Gewebes, sondern die gesamte Struktur eines erwachsenen Säugetieres es zu jeder Zeit nötig hat, gegen die Möglichkeit eines Kollapses in einer anarchischen Mitose instand gehalten zu werden.“ [18]

Myostatin gilt als erster Nachweis für die lang gesuchten Chalone, die Regulatoren für die Skelettmuskelmasse sind [29][60].

Wie schon die TGF- β -Superfamilie als Ganzes, so ist auch Myostatin im Besonderen in seiner genetischen Struktur sehr konservativ. Ein Vergleich der Myostatinsequenzen, insbesondere der C-terminalen, d.h. biologisch aktiven Region, verschiedener Spezies zeigt eine 100% Identität beim Menschen, Schwein, Huhn, bei der Maus, Ratte und Pute. Beim Pavian, Rind und Schaf sind eine bis drei Aminosäuren in der C-terminalen Region verschieden, beim Zebrafisch besteht immerhin noch eine 88% Übereinstimmung zu der Myostatinsequenz vom Menschen bis Pute [78]. Das dem Myostatin am nächsten verwandte TGF- β -Familienmitglied ist GDF-11.

Phylogenetische Analysen sprechen dafür, dass der Genlocus MSTN für Myostatin bereits vor 350 Millionen Jahren bestand. Alle untersuchten Vertebraten haben eine ähnliche Genom-Organisation von MSTN mit 3 ähnlich großen Exons, die durch 2 Introns getrennt sind [90].

Seitdem Myostatin 1997 identifiziert und analysiert wurde, gibt es eine zunehmende Anzahl an Studien über dieses und ein breites Interesse an diesem Protein, welches eine wichtige regulatorische Rolle überwiegend bei der Entwicklung und dem Wachstum der quergestreiften Skelettmuskulatur, aber auch der Herzmuskulatur spielt.

3.1.1 Die Bedeutung von Myostatin im veterinären Bereich

Die größere Muskelmasse der zur Fleischverarbeitung gezüchteten Rinder und auch Schafe (z.B. das Texel-Schaf) ist ein deutlicher Anreiz zur weiteren wissenschaftlichen Auseinandersetzung mit Myostatin. Denn auch wenn die Möglichkeit der vermehrten Fleischproduktion offensichtlich ist, so doch um den Preis einer oft nicht möglichen natürlichen Geburt der zu großen Kälber von Piedmonteser- und Belgian Blue-Rindern. Problematisch ist ferner, dass das Fleisch einiger Tierrassen zu zäh und von schlechtem Geschmack ist [90]. Einige der jedoch nicht zur Fleischproduktion transgen

veränderten Tiere waren infertil [83]. Ohne Blick auf Nahrungsmittelproduktion sind Myostatin mutierte Windhunde muskelkräftiger und damit beim kommerziellen Wettrennen schneller [90].

Große Erwartungen an weitere Forschungen zu Myostatin hat man auf dem Gebiet der Geflügel- und Fischzucht, da ein besseres Verhältnis zugunsten des Muskelgewebes zwischen Muskel- und Nicht-Muskelgewebe besteht. Jedoch exprimieren insbesondere bei Fischen nicht nur Muskelgewebe, sondern auch viele Nicht-Muskelgewebearten wie Augen, Kiemenfilamente, Milz, Ovarien, Darm, Gehirn und Hoden [70][92] Myostatin. Die Auswirkungen einer Myostatin-Inhibierung auf diese Gewebe sollen bekannt sein [90].

3.1.2 Die Bedeutung von Myostatin beim Menschen

Bei Erkrankungen, die mit einem Skelettmuskelschwund einhergehen, wie Muskeldystrophien, amyotrophe Lateralsklerose, Kachexie unterschiedlicher Genese, aber auch die Sarkopenie im Alter [85][94][106][115] stellt eine Myostatin-Inhibition einen therapeutischen Ansatz dar, der sehr ernsthaft untersucht wird.

Unter den Bedingungen der erhöhten Myostatinexpression wie sie z.B. bei Herzinsuffizienz und postinfarziell beobachtet wird, kommt der Inhibition eine muskelstimulierende Rolle am Herzen zu. Anders als beim Skelettmuskel ist die anabole Wirkung der Myostatinhemmung ansonsten unter physiologischen Bedingungen gering [90][91].

Der indirekte Effekt einer Myostatinhemmung besteht auch in einer reduzierten Fettgewebsbildung und einer verbesserten Glukosetoleranz, sodass sie auch in der Behandlung der Adipositas und des Diabetes mellitus² einsetzbar wäre [90].

Wenn auch deutlich untergeordnet, gibt es ebenso eine sportlich-ästhetische Komponente an der wissenschaftlichen Durchdringung der Wirkung von Myostatin beim Menschen. Wie double-muscle Windhunde nur schneller rennen sollen, ist die mit der Myostatin-Inhibierung verbundene Beobachtung „mehr Muskel, weniger Fett“ ein Ausgangspunkt für eine weitere Beschäftigung, die in eine nicht-medizinische, nicht-therapeutische, sogar rein kosmetische Richtung führt [90]. Anlässlich der Olympischen Spiele 2008 in China wurden Befürchtungen geäußert, dass es im Leistungssport zu

Gendoping im weiteren Sinne mittels Blockierung von Myostatin durch Antisense-RNA komme [101][113].

3.1.3 Genexpression, Translation und posttranslationale Modifizierung von Myostatin

Beim Menschen ist die genetische Information für Myostatin auf dem Chromosom 2 (2q32.2) lokalisiert. Es ist ein relativ schmales Gen, kodiert durch 7,8 kb, mit einer einfachen molekularen Organisation: Drei Exons mit zwei dazwischen liegenden Introns. Bei der Prozessierung des Gens wird eine ca. 3,1 kb große mRNA gebildet. Northern-Blot- und RT-PCR-Analysen können die Myostatinexpression überwiegend im Skelettmuskel, in geringem Maße in den Fettgewebszellen (Adipozyten), aber auch im Herz- und Brustdrüsengewebe nachweisen [37][50][77][85][98].

Menschliches Myostatin wird zu Beginn als eine einzige Polypeptidkette in seiner vollständigen Sequenz des Präpropeptids vom N-terminalen Anfang bis zum C-terminalen Ende aus 375 Aminosäuren in den Ribosomen synthetisiert [77][78]. Beginnend mit dem Signalpeptid, das aus 23 AS mit einem theoretischen MW von 2,6 kDa besteht und als erstes intrazellulär abgespalten wird, schließt sich das Propeptid, das latency associated peptide (LAP), mit seinen 243 AS (theoretisches MW 27,7 kDa) an. Seine letzten 4 AS (AS 263-266) bilden die RSRR (Arg-Ser-Arg-Arg)-Prozessierungsstelle. Dort wird in einer 2. Spaltung [45] ebenso noch intrazellulär im Golgi-Apparat [79] mit einer Furin-ähnlichen Endopeptidase das C-terminale reife, bioaktive Peptid mit seinen 109 AS (theoretisches MW 12,4 kDa) vom Propeptid (LAP) abgespalten. Über eine Disulfid-Brücke liegt das biologisch aktive C-terminale Peptid bereits nach der Translation des Präpropeptids als Dimer vor und zusammen mit den 9 Cysteinresten entwickelt sich die Faltung in eine Cysteinknotenstruktur [29][60][79]. In einer nicht kovalenten Bindung bleiben dann das Propeptid und das bioaktive Peptid extrazellulär bis zur endgültigen Aktivierung am Zielort als biologisch inaktiver LAP-Myostatin-Komplex, bestehend aus 2 LAP und dem Myostatin-Dimer, aneinander gebunden [20][58][59][60].

3.1.4 Zirkulation von Myostatin

Myostatin zirkuliert systemisch, übt darüber seine Regulation des Gesamtmuskelwachstums aus, entfaltet seine Wirksamkeit aber lokal. Dies erfordert ein abgestimmtes Wechselspiel zwischen Inhibitoren und Aktivatoren, um eine vorzeitige Bindung von Myostatin an die Rezeptoren der Zielzelle zu verhindern.

Mit Übertritt in den extrazellulären Raum bzw. in die systemische Blutzirkulation ist das C-terminale reife Dimer Myostatin durch die nicht kovalente Bindung mit dem LAP inhibiert. Über 70% ist der Anteil vom zirkulierenden Myostatin in vivo, den das LAP bindet [45]. Jedoch spielen noch weitere Inhibitoren eine Rolle, so das Follistatin, das FLRG und GASP-1.

Auch wenn seine namensstiftende Wirkung durch Bindung an ein anderes Mitglied der TGF- β -Superfamilie, Activin, in der Inhibition der Activin-vermittelten Freisetzung des Follikel-stimulierenden Hormons besteht [32][86][92], ist Follistatin über seine FS-Domäne auch ein ausgeprägter Inhibitor von Myostatin. Es wird zeitgleich zur Myostatinexpression in Myotomzellen und sich entwickelnden Muskelzellen exprimiert. Seine experimentelle Hemmung bzw. seine Überexpression führt entsprechend zur Muskelatrophie bzw. deutlichem Muskelwachstum [59][60]. Follistatin interagiert mit Myostatin direkt [29][93] und verhindert so die Bindung an die Effektorzellrezeptoren.

FLRG (follistatin-related gene) und GASP-1 (growth and differentiation factor-associated serum protein 1) sind in der Lage mit einer hohen Affinität über eine FS-Domäne auch direkt an das C-terminale Myostatin-Dimer zu binden und seine Aktivität zu inhibieren [15][60]. Insbesondere für GASP-1 und FLRG werden diskutiert, dass sie zusammen mit dem LAP eine tertiäre Struktur mit dem C-terminalen Myostatin-Dimer bilden und somit die Latenz-Form aufrechterhalten [60]. So interagiert GASP-1 direkt sowohl mit LAP wie mit dem C-terminalen Dimer Myostatin und es enthält viele zusätzliche inhibitorische Domänen für Proteinasen [46]. Es inhibiert die biologische Aktivität von reifem Myostatin und seinem nahen Verwandten GDF-11, nicht aber von Activin und TGF- β 1 [29]. Es wird angenommen, dass LAP, GASP-1 und FLRG [45] sich wechselseitig nach jeweiliger Dissoziation vom C-terminalen Myostatin in der Inhibition ablösen – ein Ausdruck für verschiedene physiologische Stimuli Myostatin im Organismus zu regulieren. FLRG und / oder GASP-1 sollen bei der Terminierung des

Myostatin-Rezeptor-Komplexes und damit bei der Beendigung der Rezeptorstimulation eine Rolle spielen [45][46][60]. LAP vermag jedoch nicht durch eine erneute Verbindung mit Myostatin dieses wieder zu deaktivieren, nachdem LAP die Bindung mit Myostatin einmal beendet und dieses aktiviert hat. Für FLRG wird jedoch ein feed back beschrieben. Die gleichen Transkriptionsfaktoren, die durch Myostatin aktiviert werden, nämlich Smad2 und Smad3, aktivieren zusammen mit einem Smad-Bindungselement auch die FLRG-Promoterregion. Dies führt letztlich zu einer vermehrten Proteinbiosynthese des FLRG. Es wird angenommen, dass FLRG mit Myostatin eine zur erneuten Inhibition führende Bindung einzugehen vermag.

Es besteht somit keine einfache Korrelation zwischen mRNA-Myostatin- und Protein-Myostatin-Konzentrationen auf der einen und der aktuellen Aktivität von Myostatin auf der anderen Seite [60].

Neben den in der Zirkulation agierenden Inhibitoren besteht noch ein großer extrazellulärer Pool von unprozessiertem Myostatin in der Skelettmuskulatur, der zum Teil durch die Assoziation vom LAP-Myostatin-Komplex mit einem Glucoprotein, dem latent TGF- β -binding protein (LTBP), vermittelt wird. LTBP bindet sich über eine Disulfid-Brücke kovalent mit dem LAP. Zusammen mit dem LAP-Myostatin-Komplex wird die Verbindung mit LTBP large latent complex genannt, der sich an die extrazelluläre Matrix (ECM) bindet. Wird LTBP und der LAP-Myostatin-Komplex zusammen aus der Zelle sezerniert, sondert sich Myostatin innerhalb der extrazellulären Matrix ab und seine Bioaktivität wird dadurch abgeschwächt. Die ECM besteht aus Makromolekülen wie Kollagen, Proteoglycanen und Glucoproteinen. Sie stellt nicht nur ein Strukturgerüst dar, sondern dient auch als Depot für die verschiedenen growth factor-Familien und moduliert ihren Aktivitätsstatus. So bindet ein anderes Matrix-assoziiertes Protein, Decorin (ein Leucin-reiches Proteoglycan), nur Myostatin, nicht aber LAP, in einem Verhältnis von 1:1 und einer hohen Affinität und verhindert so die Rezeptoraktivität. [4][55][79]

Für das sich in der Zirkulation befindliche Myostatin gilt als ein Aktivator an der Zielzelle das bone morphogenetic protein (BMP-1/tolloid family of metalloproteinases). Es vermag durch eine proteolytische Spaltung des LAP zwischen der AS 75 (Arg) und AS 76 (Asp) das LAP vom C-terminalen Myostatin zu trennen und damit Myostatin zu aktivieren [93][120].

3.1.5 Zielzellen-Rezeptor und Signaltransduktion durch Smad

Die Rezeptoren der TGF- β -Superfamilien-Mitglieder sind strukturell ähnlich. Sie sind transmembranöse Tetramere, die sich aus zwei verschiedenen Homodimeren zusammensetzen. Zu diesen Rezeptoren gehören Rezeptor-Serin-Threonin-Kinasen.

Die Rezeptoren der Zielzelle setzen sich aus dem Homodimer Typ 2 (gewöhnlich Activin-Rezeptor II B (ActRIIb) genannt) und dem Homodimer Typ 1 (auch als activin receptor-like kinase 4 oder 5 (ALK4/ALK5) bezeichnet) mit seiner regulatorischen Schlüsselregion zusammen. Die Schlüsselregion heißt aufgrund einer charakteristischen TTSGSGSG-Sequenz auch GS-Domäne. Diese Rezeptoren haben eine erhöhte Affinität zu Myostatin, aber auch anderen Mitgliedern der TGF- β -Familie wie Aktivin A und GDF-11. Zu anderen wie z.B. BMP-2 und BMP-7 haben sie eine niedrigere Bindungsfähigkeit [31][72].

Es kommt nach der Aktivierung des Dimers Myostatin aus seinem latenten Status zuerst zu einer Interaktion zwischen Myostatin und ActRIIb. Dies führt zu einer Annäherung von ALK4 (bei Myozyten) bzw. ALK5 (bei Nicht-Myozyten) an ActRIIB mit dem Dimer Myostatin als Ligand für beide Teilrezeptoren. So kommt es zu einer Konformationsänderung des Typ-2-Homodimers und es bildet sich ein Heterotetramer-Rezeptor-Komplex. Das aktiviert wiederum das Homodimer Typ 1 durch die Phosphorylierung der Serin- und Threonin-Reste an seiner GS-Region. Dadurch können dann direkt die Signaltransduktoren Smad 2 und 3 phosphoryliert werden. Diese werden zuvor über ein Smad anchor for receptor activation (SARA)-Protein rekrutiert [20][72][109]. Das setzt die im nächsten Abschnitt beschriebene Kaskade in Gang.

Einen spezifischen sogenannten Myostatin-Rezeptor gibt es jedoch nicht [29]. Je nach Rezeptorart werden unterschiedliche Transkriptionsfaktoren der Smad-Mitglieder aktiviert und danach werden die Rezeptorarten unterschieden. Die Rezeptorart für die TGF- β -Superfamilien-Untergruppe, zu der auch Myostatin gehört, phosphoryliert die Smad-Mitglieder 2 und 3 [20].

Die Aktivierung der Rezeptor-Untereinheit, des Homodimers Typ 1 (ALK 4 oder ALK 5), nach der Bildung des Myostatin-Rezeptor-Komplexes führt zur vorübergehenden Anlagerung von receptor-regulated R-Smad2 und R-Smad3 und ihrer Phosphorylierung von zwei Serin-Resten an der C-terminalen-MH2-Domäne der Smad. Diese Anlagerung kommt durch die Vermittlung von Smad anchor for receptor activation (SARA)-Protein zustande. SARA ist ein Smad Co-Faktor, der zwischen Smad2 und Smad3 interagiert und Smad2/3 für den Typ1-Rezeptor rekrutiert [109][110]. Nach der Phosphorylierung löst sich dieser R-Smad2/3-Komplex von der intrazellulären Rezeptorregion und es kommt so anschließend zur Vereinigung des Smad2/3-Komplexes mit dem common-mediator Co-Smad, Smad4, zu einem Heterodimer. Dieses ist in der Lage zum Nucleus zu translozieren [31][56][68][71][85].

Smad-Proteine sind die ersten zwischen 1995 bis 1997 entdeckten Substrate der Typ1-Rezeptor-Kinasen, die der Signalübertragung von den Serin-Threonin-Kinasen zum Nucleus dienen. Das Wort Smad ist ein zusammengesetztes Akronym aus der Bezeichnung zweier homologer Gene der Taufliege, *Drosophila melanogaster*, MAD (mothers against decapentaplegic) und des Fadenwurms *Caenorhabditis elegans*, Sma (small body size), die beide diese Proteine codieren. Sie wurden nachgewiesen in Würmern, Insekten und Vertebraten [44][72][73].

Smad-Proteine bestehen aus zwei phylogenetisch hoch konservativen Domänen, der MH1- und MH2-Domäne, und einer sie verbindenden Region. Im ursprünglichen Zustand sind Smad durch Interaktion zwischen den MH1- und MH2-Domänen inaktiv. Durch die Typ1-Rezeptor vermittelte Phosphorylierung am C-terminalen Ende der MH2-Domäne werden die R-Smad2 und 3 aktiviert. Über die MH2-Domäne interagieren sie mit Co-Smad4 und mit DNS-Bindungsproteinen. Die MH1-Domäne nimmt an der DNS-Bindung teil, während die MH2-Domäne an der Transkriptionsaktivierung beteiligt ist. Eine Inhibierung der Smad-Nucleus-Akkumulation findet über die Phosphorylierung an der Verbindungsregion durch Kinasen (MAPKinase) statt [29][72].

Eine im Genom sehr häufig vorkommende DNS-Signalsequenz CAGAC wird von den Smad-Transkriptionsfaktoren mit einer sehr hohen Affinität erkannt. Smad-Proteine würden so das gesamte Chromosom auskleiden können, wenn nicht verschiedene Bindungs-Co-Faktoren zusätzlich nötig wären [95].

Es erfolgt die Aktivierung der entsprechenden Gen-Sequenzen über die Assoziation der R-Smads (dem Smad2,3/4-Komplex) mit zusätzlichen Co-Faktoren und mit Ubiquitin-

Ligasen. Letztere unterstützen die Degradation der Transkriptionsrepressoren, dadurch wird die Ziel-Gen-Regulation durch die TGF- β erleichtert [83].

Ubiquitin ist ein mit 8,5 kDa kleines, im Verlauf der Evolution konservativ gebliebenes Protein. Es ist das zentrale Protein in dem Ubiquitination genannten post-translationalen Prozess der Proteindegradation.

Die meisten intrazellulären Proteine werden im Rahmen ihrer Homöostase, aufgrund fehlerhafter Faltungen ihrer Proteinstruktur oder eben zur Förderung beziehungsweise Unterbrechung von Protein-Interaktionen durch das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) proteolysiert. Dieser ATP-abhängige multienzymatische Prozess beginnt mit der Konjugation der zu degradierenden Proteine mit Ubiquitin. Dafür muss Ubiquitin durch das Ubiquitin Aktivierungsenzym (E1) aktiviert werden. Es folgt die Transferierung an ein Ubiquitin Konjugationsenzym (E2). Die anschließende kovalente Verbindung von Ubiquitin mit dem zur Degradation bestimmten Protein an einen Lysin-Rest wird durch Substrat-spezifische Ubiquitin Ligasen (E3) katalysiert. Das so mit einer Polyubiquitin-Kette versehene Protein wird dann von Proteasomen de-ubiquitiniert, entfaltet und degradiert. Proteasome können als spezialisierte Organellen für gezielte Degradation der meisten zellulären Proteine angesehen werden. Sie werden im Zytosol und auch im Nucleus von eukaryotischen Zellen gefunden.[87][117][123]

Smads selber werden im Verlauf ebenso ubiquitiniert und durch Proteasomen abgebaut.

Myostatin ist in der Lage die Transkription des inhibitorischen I-Smad 7 zu aktivieren. Smad 7 inhibiert dann die Verbindung von R-Smad2/3 mit dem Co-Smad4 und blockiert die Phosphorylierung der R-Smad durch die Rezeptoren und unterstützt zusammen mit Smurf, einer spezifischen E3 Ubiquitin-Ligase, die Ubiquitination und den Abbau des Act11b/Act1-Rezeptorkomplexes und inhibiert dadurch die Signalwirkung [83]. Die Smad-Leitungsbahn wird so durch eine feedback-Kontrolle reguliert.

3.1.6 Intranukleäre Transkription

Über diesen oben prinzipiell beschriebenen Signalweg werden die unterschiedlichen Myostatinwirkungen generiert.

Eine grundlegende Wirkung von Myostatin besteht in der Inhibierung der Myoblastenprogression im Zellzyklus von der G1- zur S-Phase [3][79][111]. Weiter

erfolgt eine Inhibierung der terminalen Myoblastendifferenzierung durch die Herunterregulierung der MyoD/Myogenin-Expression [57]. Beides ist assoziiert mit einer Protektion vor Apoptose [29][90].

In der Entwicklungsphase der Organismen begrenzt die Wirkung der Myostatin-Expression die Muskelgröße gemeinsam mit multiplen Faktoren, die die Gliedmaßen in Beziehung zum Skelett, Gefäßsystem und zum ektodermalen Wachstumsmuster formen [8]. Myostatin bewirkt in den myogenen Zellen ein Herunterregulieren der Expression von wichtigen Transkriptionsregulatoren der myogenen Zellproliferation, Pax-3 und Myf-5, und weiteren Transkriptionsfaktoren für eine frühe Muskeldifferenzierung, MyoD [93]. Myostatin führt bei Fibroblasten zu ihrer Proliferation und zur Produktion von Proteinen der extrazellulären Matrix.

Die Myostatingenexpression wird durch Glucokortikoide gesteigert. Sogenannte glucocorticoid response elements (GRE) innerhalb des Myostatin-Promoters tragen in Anwesenheit von Glucokortikoiden zur Steigerung der Myostatinexpression bei [29].

Am Herzen konnte die Myostatinexpression sowohl am fetalen wie adulten Herzmuskelgewebe besonders in den Kardiomyozyten im Ventrikel und Atrium und im Klappenapparat wie auch in den Purkinjefasern nachgewiesen werden [98][99][108][114]. Myostatin inhibiert die Kardiomyozytenproliferation durch die Blockierung der Transition des Zellzyklus von der G1- zur S-Phase. Es induziert auch eine kardiale Fibrose [15][75][81].

3.2 Linksventrikuläre Hypertrophie und Herzinsuffizienz

Die LV-Hypertrophie ist ein Ansteigen der myokardialen Muskelmasse resultierend aus einer Hypertrophie der Myozyten. Es ist ein kompensatorischer Mechanismus auf einen erhöhten arteriellen Blutdruck oder eine Volumenüberladung. Dieser Prozess besteht aus einer Zunahme der muskulären, vaskulären und kollagenen Anteile des Myokards.

Die pathologische LV-Hypertrophie zeichnet sich hingegen durch ein Missverhältnis aus, in dem das extrazelluläre Bindegewebe stärker zunimmt im Vergleich zu den Myozyten und das Wachstum der kapillären Gefäße mit dem der Myozyten nicht Schritt hält. Die Entstehung einer myokardialen Fibrose ist eine führende Komponente, die zur kardialen Dysfunktion führt. Im weiteren Verlauf der Erkrankung kommt es dann zur systolischen Herzinsuffizienz [21].

Schätzungsweise 1-2% der erwachsenen Bevölkerung in den entwickelten Ländern hat eine Herzinsuffizienz. Der prozentuale Anteil steigt bei den über 70jährigen auf $\geq 10\%$. Mindestens die Hälfte der Herzinsuffizienzpatienten hat eine systolische Herzinsuffizienz mit einer reduzierten LV- Ejektionsfraktion (HF-REF). Die koronare Herzerkrankung ist zu 66% die Ursache davon. Eine bestehende arterielle Hypertonie und ein Diabetes mellitus sind wichtige Ko-Faktoren in der Entwicklung einer Herzinsuffizienz.

Die Herzinsuffizienz mit erhaltener linksventrikulärer Ejektionsfraktion (LV-EF $\geq 50\%$) (HF-PEF) hebt sich epidemiologisch und ätiologisch von der HF-REF ab. Die Patienten sind meist älter und weiblich und häufiger übergewichtig. Ätiologisch stehen weniger häufig die KHK als vielmehr die arterielle Hypertonie und das Vorhofflimmern im Vordergrund. Die Patienten mit HF-PEF haben eine nur wenig bessere Prognose als diejenigen mit HF-REF [76].

Bei Patienten mit HF-REF ist das pathologische Remodeling des Ventrikels mit Dilatation und verminderter Kontraktilität die Folge der fehlangepassten Veränderungen der überlebenden Myozyten und des Extrazellularraumes nach Myokardinfarkt. Die weitere Verschlechterung ist dann Folge von Ereignissen, die zu einem weiteren Zelluntergang von Myozyten führen, wie rezidivierende Myokardinfarkte und Folge der systemischen Antwort auf eine sich reduzierende systolische Funktion, insbesondere in Form einer neurohumoralen Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) und des sympathischen Nervensystems [76].

Die Mechanismen, die einer HF-PEF zu Grunde liegen, sind nicht so eindeutig beantwortet wie bei der HF-REF. Sicher tragen die gestörte LV-Relaxation, die abnehmende LV-Compliance, die zunehmende LV-enddiastolische Steifheit und die perikardiale und rechtsventrikuläre Restriktion mit zur Entwicklung einer diastolischen Dysfunktion bei. Sie entsteht höchst wahrscheinlich aus einem Zusammenspiel von gestörter extrazellulärer Matrix, pathologisch veränderten Kardiomyozyten und ihren Myofilamenten [13].

An der Ausbildung einer kardialen Hypertrophie ist die intrazelluläre Serin-Threonin-Kinase Akt (i.e. Protein Kinase B) maßgeblich mit beteiligt. Diese Kinase, die sich phylogenetisch konservativ verhält und sich in der Entwicklung vom Insekt bis zum

Säugetier kaum veränderte, spielt für die positive Regulation der Zellgröße bei diesen verschiedenen Spezies eine wichtige Rolle. Sie induziert die Proteinsynthese und inhibiert den Prozess der Apoptose [23]. Sie ist das Schlüsselenzym für den Akt-Signalweg mit dem Insulin-growth-factor-1 (IGF-1) als einem der stärksten Aktivatoren. Nach der Bindung von IGF-1 an den IGF-Rezeptor (IGF-R) kommt es über einen Zwischenschritt zur Aktivierung der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K), die wiederum die Kinase Akt aktiviert [35].

Faktoren, die eine kardiale Hypertrophie bewirken, wie zum Beispiel eine chronische neurohormonale Stimulation oder mechanische Belastung der Kardiomyozyten, führen zu einer Aktivierung des IGF-1/PI3K/Akt-Signalweges.

IGF-1 ist bei pathologischen Veränderungen des Myokards wie einer Linksherzhypertrophie und nach Myokardinfarkt erhöht [99].

2002 konnte nachgewiesen werden, dass es im Rahmen einer chronischen Akt-Aktivierung mit Ausbildung einer kardialen Hypertrophie zu einer zeit- und intensitätsabhängigen ausgeprägten Expression von Myostatin kommt. Das ist jedoch nicht der Fall bei einer nur kurzfristigen Akt-Stimulation [27].

Diese Induktion von Myostatin erfolgt indirekt durch die Aktivierung der Serin-Threonin Kinase Akt. Der IGF-1/PI3K/Akt-Signalweg vermittelt über die Kaskade, die von der mitogen-activated protein kinase (MAPK) p38 initiiert wird, die Aktivierung des Transkriptionsfaktors myocyte enhancer factor 2 (MEF-2). Dieser trägt zur Myostatinexpression bei [35][99]. Ebenso führt Angiotensin II, ein wichtiger Faktor beim kardialen Remodeling und der Hypertrophie, über die gleiche Kaskade der durch MAPK p38 initiierten Aktivierung von MEF-2 zu einer Myostatinexpression, die durch eine Blockade des Angiotensin II-Rezeptors wieder aufgehoben wird [116]. Auch der Tumor Nekrose Faktor (TNF)-alpha, bei chronischer Herzinsuffizienz erhöht, trägt über den zur Myostatin-Promoterregion affinen Transkriptionsfaktor nuclear faktor kappa B (NF-kB) und den oben beschriebenen MAPK p38-Signalweg zu einer Myostatinexpression bei [65].

Transkriptionsfaktoren aus der Forkhead box Klasse O (FoxO)-Familie, die die Expression von Ubiquitin-Ligasen (atrogen-1/muscle atrophy F box (MAFbx), muscle RING-finger protein 1 (MuRF1)) hervorrufen und damit zur Proteindegradation beitragen, induzieren ebenso eine Myostatinexpression, wie sie auch als Smad Co-

Faktoren bei der Transkription die Myostatinwirkung unterstützen. Durch den Akt-Signalweg wird FoxO inhibiert [2][27][74][95].

Myostatin wiederum hemmt das Kardiomyozytenwachstum nicht durch eine direkte Inhibierung von MAPK p38 oder der Serin-Threonin-Kinase Akt, sondern über die Hemmung vorgeschalteter Kinasen (Mitogen-activated protein kinase kinase (MKK)). Da MAPK p38 die Phosphorylierung von Akt mit induziert, führt die Hemmung der MKK somit zu einer Inhibierung sowohl der MAPK p38 wie von Akt [80].

MAPK p38 spielt als Mediator für eine pathologische Hypertrophie im Rahmen der Druck- und Volumenüberladung eine wichtige Rolle, während über Akt eher die physiologische Hypertrophie vermittelt wird [35].

Der IGF-1 Signalweg aktiviert bei exzessiven Akt-Konzentrationen vermittelt durch die p38 MAPK indirekt die Expression von Myostatin [35][99].

Die chronische Akt-Aktivierung führt zu einem signifikanten Anstieg der Myostatin-Expression, wohingegen die vorübergehende Akt-Aktivierung zu keinem Anstieg von Myostatin führt [27].

Die vermehrte Bildung von Myostatin nach Entwicklung einer kardialen Hypertrophie wird als negativer Rückkopplungsmechanismus angesehen [99].

Nach einer myokardialen Infarzierung kommt es im periinfarziellen Myokard bis zu 30 Tagen nach dem Infarkt zu einer deutlich erhöhten Myostatinexpression. Das vom Infarkt nicht betroffene myokardiale Gewebe zeigt dieses Muster nicht, sondern bleibt bei einer niedrigen Expression. Myostatin wird eine wichtige Rolle im postinfarziellen Erholungsprozess zugeschrieben [98]. Ebenso kommt es bei einer volumen- und druckbedingten Herzinsuffizienz zu einem Anstieg der myokardialen Myostatinexpression [43][100]. Beim Menschen sind mit Ausnahme einer Studie [122] erhöhte Myostatinkonzentrationen im Serum [39], der Skelettmuskulatur [64] und am Herzen [34] im Rahmen einer Herzinsuffizienz nachgewiesen. Es gibt keinen Unterschied in der Myostatinexpression in Bezug auf eine ischämische oder nicht-ischämische Ätiologie der Herzinsuffizienz [36].

Übungsstraining beim gesunden Menschen, wie bei Patienten mit Übergewicht, Diabetes, Niereninsuffizienz [1] sowie im Rattenmodell mit chronischer Herzinsuffizienz [65] führt in der Regel zu einer Abnahme der erhöhten Myostatinkonzentrationen. So wäre die Entwicklung einer physiologischen Hypertrophie während und durch das Training möglich [9].

In allen bisherigen Studien werden die Myostatinkonzentrationen beim Menschen entweder im Serum oder am Herzen durch Biopate bestimmt.

Ist es möglich beim Menschen in vivo Hinweise dafür zu finden, dass das Herz eigenständiger Bildungsort oder ein Ort des erhöhten Verbrauchs für Myostatin ist?

In dieser Studie wird die Myostatinkonzentration beim Menschen im Serum aus dem venösen Abstrom der kardialen Durchblutung bestimmt.

Es gibt wenige Studien, die Biomarker und Myostatin zueinander korrelieren. Die Ergebnisse sind teilweise diskrepant [39][122].

Die positive Korrelation zwischen der Konzentration von Biomarkern und Myostatin wurde gezeigt [39].

Eine zweite Fragestellung wird in dieser Untersuchung aufgeworfen: Besteht eine Korrelation zwischen klinisch-hämodynamischer Besserung einer systolischen chronischen Herzinsuffizienz und peripher-venös gemessenen Myostatin-Spiegeln, und spiegelt sich dies in einer konkordanten Korrelation zwischen Myostatin- und NT-proBNP-Serumkonzentration wieder?

In dieser Studie wird bei Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz über einen zeitlichen Verlauf die klinische Änderung in Korrelation zur Änderung des Biomarkers NT-proBNP und von Myostatin gesetzt.

4 Material und Methode

Es werden stationär aufgenommene Patienten mit Vorhofflimmern für die Studie „Myostatin-Metabolismus am menschlichen Herzen“ (Antragsnummer: Ethikantrag 1/143/10; Berlin, Charite-Universitätsklinikum Berlin) rekrutiert.

Diese Patienten haben keine Herzinsuffizienz. Bei 20% der Patienten dieser Gruppe besteht eine koronare Herzerkrankung. Alle Patienten haben eine erhaltene LV-Funktion.

Bei allen Patienten wird aufgrund ihres Vorhofflimmerns eine Elektrophysiologische Untersuchung (EPU) durchgeführt. Der besondere diagnostisch-therapeutische Rahmen der EPU, der eine Sondenplatzierung an der venösen Drainage des Herzmuskels, dem Sinus coronarius, neben der Anlage von peripher-venösen und arteriellen Zugängen erforderlich macht, gestattet es, ein der Herzmuskulatur zuzuordnendes Serumanalysat zu gewinnen.

Nach der Bestimmung der Myostatinkonzentrationen in den durch Arterie, Vene und Coronarsinus drainierten Kompartimenten lassen Abweichungen der lokalen kardialen Myostatinkonzentration im Vergleich zu denen, die aus system-venösen und -arteriellen Serumanalysaten bestimmt werden, Rückschlüsse auf das Herz als Bildungs- oder Verbrauchsort für Myostatin zu. Besonderes Augenmerk ruht auf dem Gradienten der Myostatinkonzentrationen zwischen Coronarsinus und Arterie, dem Myostatin-Koronargradienten.

Um die zweite Fragestellung zu beantworten, werden Myostatinwerte aus dem peripher-venösen Serum von Patienten der Studie RLX.CHF.001 (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00259116, EudractCT 2005-001674-27) [30] gemessen. In dieser Studie [30] wurden Patienten unter invasivem hämodynamischen Monitoring (pulmonalarterieller Einschwemmkatheter, arterielle Blutdruckmessung) in einer Dosis-Eskalations-Studie über 24 h mit dem vasodilatatorischen Peptid Relaxin-2 behandelt und weitere 24 h nachbeobachtet.

Klinisch sind sie stabil und im NYHA Stadium II-III mit einer reduzierten linksventrikulären Ejektionsfraktion von <35%.

Die Patienten werden unter invasivem hämodynamischen Monitoring bei gleichbleibender oraler Herzinsuffizienztherapie zusätzlich einer intravenösen Therapie mit dem Vasodilatator Relaxin in unterschiedlicher Dosierung unterzogen. Dabei kristallisiert sich heraus, dass die Gruppe mit den niedrigsten (10, dann 30, dann 100 µg/kg/d) und die mit den höchsten RLX-Dosierungen (konstant 960 µg/kg/d) hämodynamisch ansprechen, während die Gruppe mit mittleren Relaxindosierungen (240, dann 480, dann 960 µg/kg/d) keine Besserung der Hämodynamik zeigt. Die möglichen Ursachen dafür sind unter [30] erörtert.

Es werden seriell venös-systemisch NT-proBNP- und Myostatin-Konzentrationen zu den Zeitpunkten 1 Stunde vor, sowie 8, 16, 24, 26, 32, 48 und 240 Stunden nach Beginn der intravenösen Therapie mit dem Vasodilatator Relaxin bestimmt.

4.1 Patientenkollektive

4.1.1 20 Patienten ohne Herzinsuffizienz, mit Vorhofflimmern

Die Charakteristika werden unter „Ergebnisse“ in Kapitel 5.1.1 dargestellt.

4.1.2 16 Patienten aus CHF.RLX.001

mit einer stabilen systolischen Herzinsuffizienz unterschiedlicher Genese unter invasivem hämodynamischen Monitoring bei gleichbleibender oraler Herzinsuffizienztherapie, zusätzlich behandelt mit Relaxin in unterschiedlicher Dosierung. Die Charakteristika werden unter „Ergebnisse“ in Kapitel 5.2.1 dargestellt.

Das Studiendesign entspricht der Deklaration von Helsinki von 1964 und ihren letzten Revisionen, dem Ethikcode der World Medical Association für Versuche bei denen Menschen beteiligt sind. Alle Probanden haben vor Beginn aller studienbezogenen Prozeduren schriftlich ihre Einwilligung (Informed Consent) gegeben.

4.2 Probengewinnung

Bei den Patienten der Gruppe unter 5.1.1 erfolgt die Implementierung intravasaler Katheter.

Die Vena femoralis wird zur Einführung eines Schleusen-Katheters Radiofocus® Introducer II, 8 F, Fa. Terumo, punktiert. Darüber wird ein diagnostischer Katheter AL II, 6 F, 110 cm, 38 inch, Fa. Cordis, unter Bildwandlerkontrolle bis zum Sinus coronarius eingeführt. Die Arteria femoralis wird zur Anlage eines arteriellen Zugangs mit einem Arterienkatheter nach Seldinger, REF.115.710, Fa. Vygon, punktiert. Ein venöser Zugang besteht über eine angelegte Flexüle BD Venflow™ Pro Safety, 18 GA, Fa. Becton Dickinson Therapy.

Die Patienten der Gruppe unter 5.1.2 erhalten als peripher-venösen Zugang ebenso die oben beschriebene Flexüle.

Über diese intravasalen Zugangswege werden 3 bzw. 1 BD Vacutainer®, REF 367864, 6,0 ml, Fa. BD Plymouth, mit je 6ml Vollblut gefüllt.

4.2.1 Probenaufbereitung und Lagerung

Das die Herz- und Skelettmuskulatur drainierende venöse sowie das arterielle Blut werden in der Megafuge 1.0 R, Fa. Heraeus sepatech, bei +4°C, unter 4000 U/min (3220g) über 15 Minuten zentrifugiert. Der so gewonnene seröse Überstand wird mit der Pipette pipetman, Fa. Gibson, und den aufgesetzten Biosphere Quality Tips 1000µl blue, Fa. Sarstedt, mit 2 x 1000µl abpipettiert und in den MicroTubes, 2,0 ml, Fa. Sarstedt, aufgefangen.

Die Proben werden bis zur Analyse bei -81°C im Kühler, Fa. Heraeus Instruments, tiefgefroren.

4.2.2 Probenanalyse: kompetitiver Enzymimmunoassay für Myostatin

Die humanen Serumproben (verdünnt 1:5v/v in einem proteinhaltigen Phosphatpuffer) und das Myostatin-Antiserum (verdünnt 1:10000), das heißt, polyklonale Kaninchen-Antikörper gegen humanes Promyostatin, werden unter Raumtemperatur in Glasfläschchen (Endvolumen 300 µl) über 2 Stunden vorinkubiert. 100 µl von dieser Mischung werden dann auf Nunc™Maxisorb Mikrotiterplatten transferiert, die mit 50 ng/ml humanem Myostatin beschichtet sind

und erneut bei Raumtemperatur für 2 Stunden inkubiert. Nach 5 Waschschrritten werden 100 µl von verdünnten (1:10000) sekundären Peroxidase-markierten Antikörpern auf die Platten pipettiert. Nach anschließender 1-stündiger Inkubation und 5 folgenden Waschschrritten wird das Peroxidasesubstrat, Tetramethylbenzidin, hinzugefügt und für 10 min. inkubiert. Die Reaktion wird dann beendet und die Extinktion bei 450 nm (mit einer Referenzwellenlänge von 620 nm) gemessen.[nach [119]] . Die Bestimmung der humanen Serumproben wurde durch die Mitarbeiter des Labors der Fa. Immundiagnostik AG (Bensheim) durchgeführt.

4.2.3 Bestimmung von NT-proBNP

NT-proBNP wird durch einen Elektrochemilumineszenz-Immunoassay (Elecsys® NT-proBNP sandwich immunoassay, Roche Diagnostics, Basel, Schweiz) mittels einer automatisierten Prozedur durch Elecsys® 2010 Roche bestimmt [84] und durch die Mitarbeiter des Zentrallabors der Charité Berlin durchgeführt.

4.2.4 Bestimmung der linksventrikulären Herzmasse mittels Cardio-CT der Patienten der Gruppe unter 5.1.1

Zur Einbindung in die räumliche Darstellung der Herzhöhlen mittels Carto-Merge®-System im Rahmen des Mapping bei der elektrophysiologischen Untersuchung erfolgt die CT-angiographische Darstellung des Herzens. Carto-Merge® ermöglicht ein Mapping, das heißt eine Darstellung der kardialen elektrischen Erregungsleitung mittels eines unter dem Patienten erzeugten elektromagnetischen Feldes und einem Sensor an der Spitze eines Katheters, der die verschiedenen Feldstärken erfasst. So ist eine elektroanatomische räumliche Darstellung der Herzhöhlen und die Erfassung von Herzrhythmusstörungen in Echtzeit möglich, die dann mit den Bilddaten der CT zu dreidimensionalen Bildern verbunden werden.

Die CT-Angiographie des Herzens erfolgt nach einem bestimmten Protokoll [16]. Die Ziel-Herzrate beträgt 50-60 Schläge pro Minute und wird, wenn erforderlich, durch die Gabe von Beta-Rezeptorenblocker p.o. oder i.v. erreicht. Nach intravenöser Applikation von 60 ml Ultravist® 370 i.v. mit einer Infusionsrate von 5ml/sec und anschließender Gabe von 30 ml NaCl 0,9% i.v. findet mittels DualSource-Multislice-Technik (2x64x0,6mm) die EKG-synchronisierte Untersuchung statt. Für Patienten

≥85kg wird ein Energieeinstellwert von 120 kVp benutzt. Bei Patienten <85kg wird eine Energieeinstellung von 100 kVp ausgewählt. Der Röhrenstrom beträgt 200 bis 770 mA, abhängig vom individuellen Körperhabitus und Gewicht. Die absolute Scan-Zeit beträgt ca. 5-6 Sekunden [16].

Es erfolgt die retrospektive Rekonstruktion der Bilddaten bei prospektiver EKG-Triggerung. Das rekonstruierte Blickfeld ist schmal (12-17 cm, mean:15 cm) mit einer Voxelgröße von $29 \times 0,29 \times 0,6 \text{ mm}^3$ [16].

Zur Bestimmung der linksventrikulären Masse werden die epikardialen und endokardialen Grenzen des linken Ventrikels manuell bestimmt. Von jeder Schnittfolge werden dafür 8-12 axiale Schichtstufen bestimmt. Die übrig gebliebenen Schichten werden automatisch vermessen. Die so gemessenen Volumina sind das linksventrikuläre Höhlenvolumen (LVV) und das totale linksventrikuläre Volumen (TLV). Letzteres schließt das LVV und das vom Epikard begrenzte und an das Endokard anschließende linksventrikuläre Myokard (LVM) mit ein ($\text{TLV} = \text{LVV} + \text{LVM}$). Das Volumen wird mittels einer modifizierten Simpson-Methode errechnet. Es werden hierbei die einzelnen Querschnittsflächen mit der entsprechenden Schichtdicke multipliziert und anschließend aufsummiert. Die linksventrikuläre Herzmuskelmasse (in Gramm) wurde mit folgender Formel kalkuliert:

LV-Masse [g]: $1,05 \text{ g/ml} \times (\text{TLV} - \text{LVV})$. [16][26][88]

Zur besseren interindividuellen Vergleichbarkeit wird die linksventrikuläre Herzmasse auf die Körperoberfläche [82] bezogen.

Nach [69] liegt die normale relative Herzmasse (LV-Herzmasse/KOF) für Männer bei 91 ± 11 (70-113) $[\text{g}/\text{m}^2]$, die für Frauen bei 79 ± 8 (63-95) $[\text{g}/\text{m}^2]$.

Nach [16] wird die obere Grenze für eine normale relative LV-Herzmasse bezogen auf die Körperoberfläche mit $103 \text{ g}/\text{m}^2$ für Männer und mit $89 \text{ g}/\text{m}^2$ für Frauen angegeben.

4.3 Statistische Analyse

Die Daten der Konzentrationen von NT-proBNP und Myostatin und der LV-Herzmassenbestimmung mit Cardio-CT sind Median-Werte (Interquartilsabstand). Andere Daten wie Patientencharakteristika liegen als Mittelwerte (\pm Standardabweichung) vor.

Die Myostatinwerte in den Kompartimenten Arterie, Vene und Coronarsinus bei den 20 Patienten mit erhaltener LV-Funktion (Patientenkollektiv 5.1.1) werden verglichen durch die nicht-parametrische Friedman-ANOVA für wiederholte Messungen. Wenn der Globaltest signifikante Unterschiede ausweist, erfolgt post hoc eine multiple paarweise Testung mit dem Wilcoxon-Test.

Die Charakteristika der herzinsuffizienten Patienten (Patientenkollektiv 5.1.2) werden bei kontinuierlichen Variablen mit dem Mann-Whitney-U-Test, bei nicht kontinuierlichen Variablen mit dem Binomialtest oder dem Chi-Quadrat-Test verglichen. Die Myostatin- und NT-proBNP-Ausgangsdaten zur Stunde minus 1 werden bezüglich ihrer Verteilungen verglichen mit einem Mann-Whitney-U-Test.

Die Effekte der Relaxin-Therapie auf die venösen Serumspiegel von Myostatin und NT-proBNP werden analysiert mittels der Friedman-ANOVA für wiederholte Messungen, post hoc gefolgt von einem Vorzeichenrangtest für Wertepaare nach Wilcoxon.

Eine Korrelationsanalyse nach Pearson wird zur Bestimmung des Zusammenhanges zwischen relativer LV-Herzmasse ($\text{LV-Herzmasse}[\text{g}]/\text{KOF}[\text{m}^2]$) und der Myostatinkonzentration im Coronarsinus sowie dem Gradienten der Myostatinkonzentrationen von Coronarsinus zu Arterie, dem Myostatin-Koronargradienten, und zur Bestimmung des Zusammenhanges zwischen Myostatin und NT-proBNP durchgeführt.

Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p \leq 0,05$ gilt als signifikant [119].

Bei allen multiplen Post-hoc-Paarvergleichen wird eine Korrektur der alpha-Fehler-Wahrscheinlichkeit mit der Bonferroni-Holm-Methode vorgenommen [48].

5 Ergebnisse

5.1 Patienten ohne Herzinsuffizienz, mit Vorhofflimmern

5.1.1 Charakteristika

Patienten ohne Herzinsuffizienz, mit Vorhofflimmern

Anzahl der Patienten	20
männliches Geschlecht	16 (80%)
Alter [Jahr]	60,35 [\pm 9,82]
Gewicht [kg]	87,45 [\pm 18,28]
BMI	27,85 [\pm 4,76]
Begleiterkrankungen	
Diabetes mellitus	2 (10%)
KHK	4 (20%)
Arterielle Hypertonie	15 (75%)
ischämische CMP	0 (0%)
zusätzliche Therapie	
Plättchenhemmung	3 (15%)
β -Blocker	16 (80%)
Diuretika	6 (30%)
ACE-Hemmer / AT1-Rez.Blocker	10 (50%)
mittlere LVEF (%) (min - max)	58% (50% - 65%)
n (%) oder Mittelwert [\pm SD]	

Tabelle 1: Patientencharakteristika, Begleiterkrankungen und zusätzliche Therapie

5.1.2 Myostatin-Konzentration in Arterie, Vene und Coronarsinus

Die individuellen Myostatin-Konzentrationen [ng/ml] der Probanden (n=20) aus den Seren der durch Arterie, Vene und Coronarsinus drainierten Kompartimente werden tabellarisch im Anhang dargestellt. Tabelle 2 und Abbildung 1 fassen die an den verschiedenen Lokalisationen bestimmten Myostatinkonzentrationen zusammen. Dabei zeigt sich arteriell eine signifikant niedrigere Konzentration als venös ($p = 0,015$) und als im Coronarsinus ($p = 0,001$). Einzelheiten zu den statistischen Tests sind im Anhang Kapitel 9, Tabelle 9, 10 und 11 detailliert dargestellt.

Myostatin-Konzentration [ng/ml]

N	Entnahmeort	Minimum	25.Perzentile	Median	75.Perzentile	Maximum
20	A	2,93	13,88	25,38	36,89	68,79
20	V	21,48	25,44	32,46	42,17	88,02
20	CS	12,57	23,37	32,22	47,87	92,82

A = Arterie; V = Vene; CS = Coronarsinus

Tabelle 2: Median (IQR)-Werte der Myostatin-Konzentrationen aus Arterie, Vene und Coronarsinus

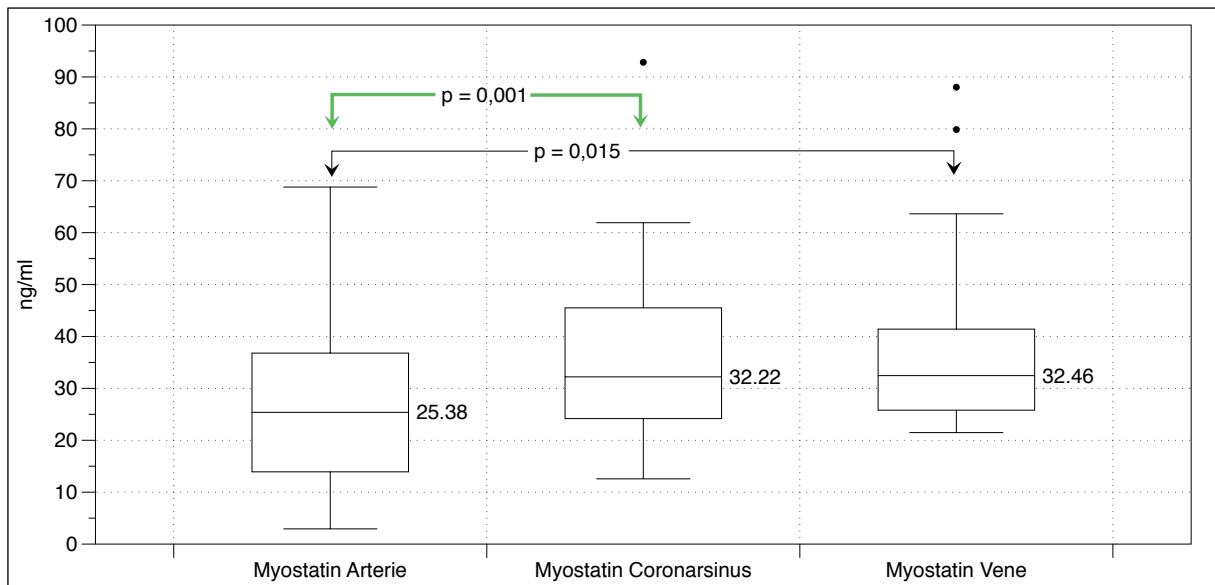


Abbildung 1: Verteilung der Myostatin-Konzentrationen aus Arterie, Coronarsinus und Vene, Median (IQR)-Werte. [•] Maximum Coronarsinus bzw. Vene

Signifikanz im Konzentrationsunterschied zwischen Arterie und Coronarsinus ($p = 0,001$) sowie zwischen Arterie und Vene ($p = 0,015$).

5.1.3 NT-proBNP-Konzentration

Die individuellen NT-proBNP-Konzentrationen [pg/ml] der Probanden (n=20) aus den peripher-venösen Seren werden tabellarisch im Anhang dargestellt.

Tabelle 3 fasst die NT-proBNP Werte der 20 Probanden zusammen; die Einzelwerte finden sich im Anhang Kapitel 9, Tabelle 12.

N	Entnahmeort	Minimum	25.Perzentile	Median	75.Perzentile	Maximum
20	V	99,00	311	532	842,25	1023

V = Vene

Tabelle 3: Median (IQR)-Werte der NT-proBNP-Konzentration

5.1.4 Myostatin und Bestimmung der linksventrikulären Herzmasse mittels Cardio-CT

5.1.4.1

Die linksventrikuläre Herzmasse [g] wird mittels Cardio-CT bestimmt.

Die linksventrikuläre Herzmasse beträgt im Median 133,50 g mit einer 25.Perzentile von 103,25 g und einer 75.Perzentile von 150,91 g.

N	Minimum	25.Perzentile	Median	75.Perzentile	Maximum
20	92	103,25	133,50	150,91	181

Tabelle 4: Median (IQR) - Werte der LV-Herzmasse [g] mittels Cardio-CT

Zur besseren interindividuellen Vergleichbarkeit wird die linksventrikuläre Herzmasse auf die Körperoberfläche [61] bezogen.

N	Minimum	25.Perzentile	Median	75.Perzentile	Maximum
20	47,60	55,11	62,70	72,05	85,00

Tabelle 5: Median (IQR) - Werte der relativen LV-Herzmasse [g/m²]

Ergebnisse

Nach [52] liegt die normale relative Herzmasse (LV-Herzmasse/KOF) für Männer bei 91 ± 11 (70-113) [g/m²], die für Frauen bei 79 ± 8 (63-95) [g/m²].

Nach [9] wird die obere Grenze für eine normale relative LV-Herzmasse bezogen auf die Körperoberfläche mit 103 [g/m²] für Männer und mit 89 [g/m²] für Frauen angegeben. Eine linksventrikuläre Hypertrophie besteht bei keinem der eingeschlossenen Patienten.

ID	Alter [Jahre]	Geschlecht	Körperoberfläche [m ²]	LV-Masse CT [g]	relative LV-Herzmasse [LV-Herzmasse / KOF [g/m ²]]	Myostatin A [ng/ml]	Myostatin CS [ng/ml]	Δ CS (CS-A) [ng/ml]
1	54	W	1,53	92	60,13	2,93	30,00	27,07
2	71	M	2,26	112	49,56	11,16	22,56	11,40
3	51	M	2,07	131	63,29	14,01	31,23	17,22
4	69	M	2,19	136	62,10	8,16	18,03	9,87
5	60	M	2,11	116	54,98	15,39	12,57	-2,82
6	64	M	1,87	100	53,48	11,04	16,77	5,73
7	73	M	1,82	101	55,49	31,44	37,80	6,36
8	69	M	2,09	137	65,55	30,06	33,21	3,15
9	72	M	2	120	60,00	25,86	50,22	24,36
10	49	M	1,96	151	77,04	67,89	92,82	24,93
11	41	M	2,56	170	66,41	36,99	53,34	16,35
12	72	W	2,01	99	49,25	19,98	17,97	-2,01
13	54	M	2,59	181	69,88	13,83	25,80	11,97
14	66	W	1,98	110	55,56	68,79	53,52	-15,27
15	43	M	2,35	171	72,77	18,66	30,54	11,88
16	58	M	2,08	99	47,60	44,73	61,92	17,19
17	53	M	2,03	173	85,00	29,10	38,4	9,30
18	59	M	1,83	139	75,96	40,16	40,73	0,57
19	68	M	2,17	140	64,52	36,6	40,80	4,20
20	61	W	1,86	151	81,00	24,90	31,20	6,30

W = weiblich; M = männlich; A = Arterie; CS = Coronarsinus

Tabelle 6: Individuelle absolute [g] und relative LV-Herzmasse in Bezug auf die Körperoberfläche [g/m²] sowie Angaben über Alter und Geschlecht. Individuelle Myostatin-Konzentrationen in A und CS sowie Myostatin-Koronargradient

5.1.4.2

Korrelation der relativen linksventrikulären Herzmasse [g/m²] zur Myostatinkonzentration im CS und dem Myostatin-Koronargradienten

5.1.4.2.1

relative LV-Herzmasse zur Myostatinkonzentration CS

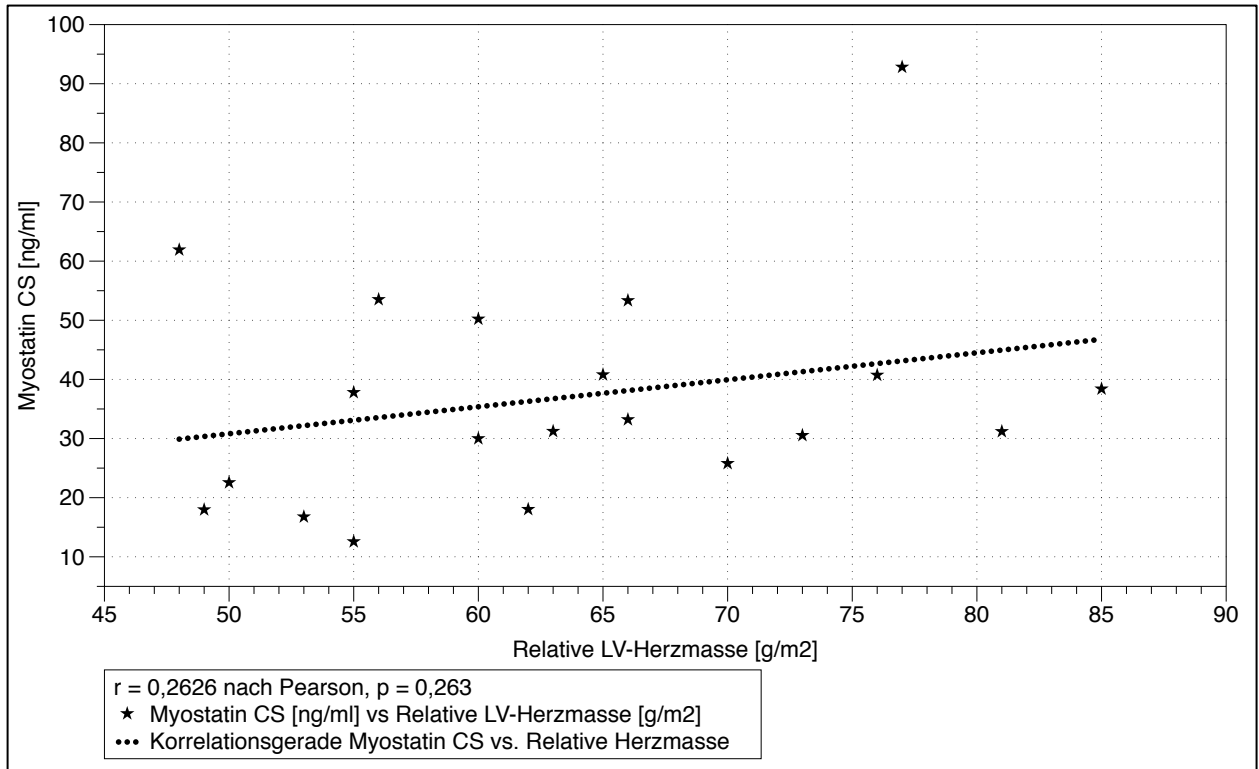


Abbildung 2: Fehlende Korrelation nach Pearson zwischen der Coronarsinus-Myostatinkonzentration und der relativen LV-Herzmasse. $r = 0,2626$; $p = 0,263$

5.1.4.2.2

relative LV-Herzmasse zum Myostatin-Koronargradient

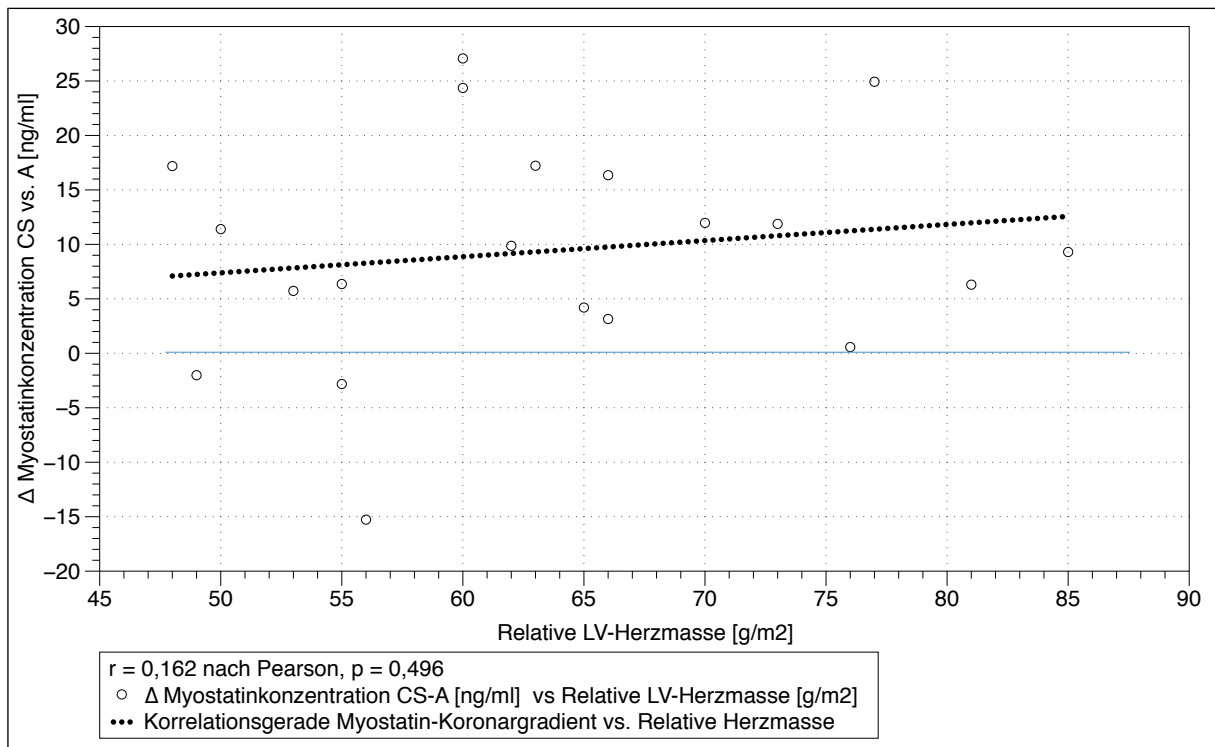


Abbildung 3: Fehlende Korrelation nach Pearson zwischen dem Myostatin-Koronargradienten und der relativen LV-Herzmasse. $r = 0,162$; $p = 0,496$

Es besteht zwischen der relativen LV-Herzmasse und der absoluten Myostatinkonzentration im CS ($p = 0,263$) sowie zwischen der relativen LV-Herzmasse und dem Myostatin-Koronargradienten ($p = 0,496$) keine signifikante Korrelation nach Pearson.

5.2 Patienten aus RLX.CHF.001

5.2.1 Charakteristika

Patienten aus RLX.CHF.001 unter invasivem hämodynamischen Monitoring mit gleichbleibender oraler Herzinsuffizienztherapie, zusätzlich mit Relaxin in unterschiedlicher Dosierung behandelt und nach hämodynamischem Effekt stratifiziert

	Therapeutischer Effekt Gruppe A	Kein therapeutischer Effekt Gruppe B	P<0,05
Anzahl der Patienten	10	6	
männliches Geschlecht	9 (90%)	6 (100%)	NS
Alter [Jahr]	71,4 [±6,6]	61 [± 10]	NS
Gewicht [kg]	80,8 [±15,9]	91 [± 12]	NS
BMI	28,12 [±2,3]	29,0 [± 2,0]	NS
Diabetes mellitus	3 (30%)	2 (33%)	NS
NYHA Klasse II	5 (50%)	3 (50%)	NS
NYHA Klasse III	5 (50%)	3 (50%)	NS
Ätiologie der Herzinsuffizienz			
KHK	7 (70%)	2 (33%)	NS
Arterielle Hypertonie	2 (20%)	3 (50%)	NS
ischämische CMP	1 (10%)	1 (17%)	NS
zusätzliche Therapie			
Plättchenhemmung	10 (100%)	6 (100%)	NS
β-Blocker	10 (100%)	6 (100%)	NS
Diuretika	10 (100%)	6 (100%)	NS
ACE-Hemmer / AT1-Rez.Blocker	10 (100%)	6 (100%)	NS
mittlere LVEF (%) (min - max)	27% (20-33%)	26%(22-30%)	NS
n (%) oder Mittelwert [± SD]			

Tabelle 7: Patientencharakteristika, Ätiologie der Herzinsuffizienz und zusätzliche Therapie

5.2.2 Vergleich der Ausgangswerte von RLX.CHF.001

Tabelle 7 zeigt die Ausgangswerte (eine Stunde vor Beginn der RLX-Infusion) für Myostatin und NT-proBNP in den beiden Gruppen A und B der Studie RLX.CHF.001. Dabei lassen sich keine Unterschiede zwischen beiden Gruppen feststellen. Die Test-Details sind im Anhang Kapitel 9, Tabelle 13 zusammengefasst.

Perzentile						
	N	Minimum	Maximum	25	50. (Median)	75
RLX.CHF Gruppe A Myostatin- Ausgangswert [ng/ml]	10	47	89	50,25	60,5	71,25
RLX.CHF Gruppe B Myostatin- Ausgangswert [ng/ml]	6	33	72	48	61,5	67,5
RLX.CHF Gruppe A NT-proBNP- Ausgangswert [pg/ml]	10	936	6697	1875,25	2871	3804
RLX.CHF Gruppe B NT-proBNP- Ausgangswert [pg/ml]	6	1000	3787	1156	2500,5	2929

Tabelle 8: Ausgangswerte für Myostatin und NT-proBNP in den beiden Gruppen der Studie RLX.CHF.001

5.2.3 Konzentrationsveränderungen von Myostatin und NT-proBNP in RLX.CHF.001

Die Abbildungen 4 und 5 fassen die venösen Serum-Konzentrationen von Myostatin und NT-proBNP der Teilnehmer von RLX.CHF.001 zusammen. Dabei fand sich in Gruppe A ein signifikanter Abfall der Myostatinkonzentrationen zu den Zeitpunkten Stunde 16 bis zur Stunde 240. Ebenso fielen in dieser Gruppe die NT-proBNP-Werte signifikant ab, und zwar zu den Zeitpunkten Stunde 8, 16, 24, 26 und 32.

In Gruppe B dagegen kam es weder zu einem signifikanten Abfall der Myostatin- noch der NT-proBNP-Konzentrationen im Verlauf der folgenden 240 Stunden.

Einzelheiten zu den Ergebnissen der statistischen Untersuchungen finden sich im Anhang Kapitel 9, Tabelle 14, 15, 16, 17, 18 und 19.

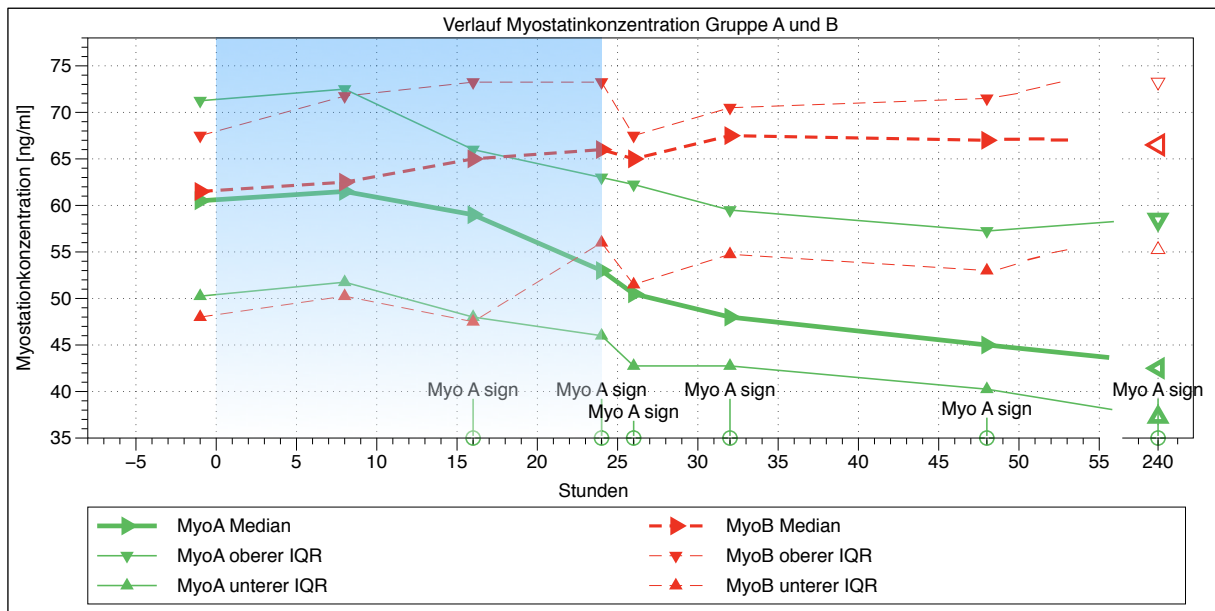


Abbildung 4: Median (IQR)-Werte der Myostatinkonzentrationen in ng/ml der Gruppen A und B im Zeitverlauf. Signifikanter Abfall im zeitlichen Verlauf der Myostatinkonzentration zum Ausgangswert der RLX.CHF.001 Gruppe A zu den Zeitpunkten Stunde 16, 24, 26, 32, 48 und 240. Kein signifikanter Abfall im zeitlichen Verlauf der Myostatin-Konzentration der RLX.CHF.001 Gruppe B. Kein signifikanter Abfall im zeitlichen Verlauf der Myostatin-Konzentration der RLX.CHF.001 Gruppe B. Blau markiert ist der Infusionszeitraum von Relaxin.

Ergebnisse

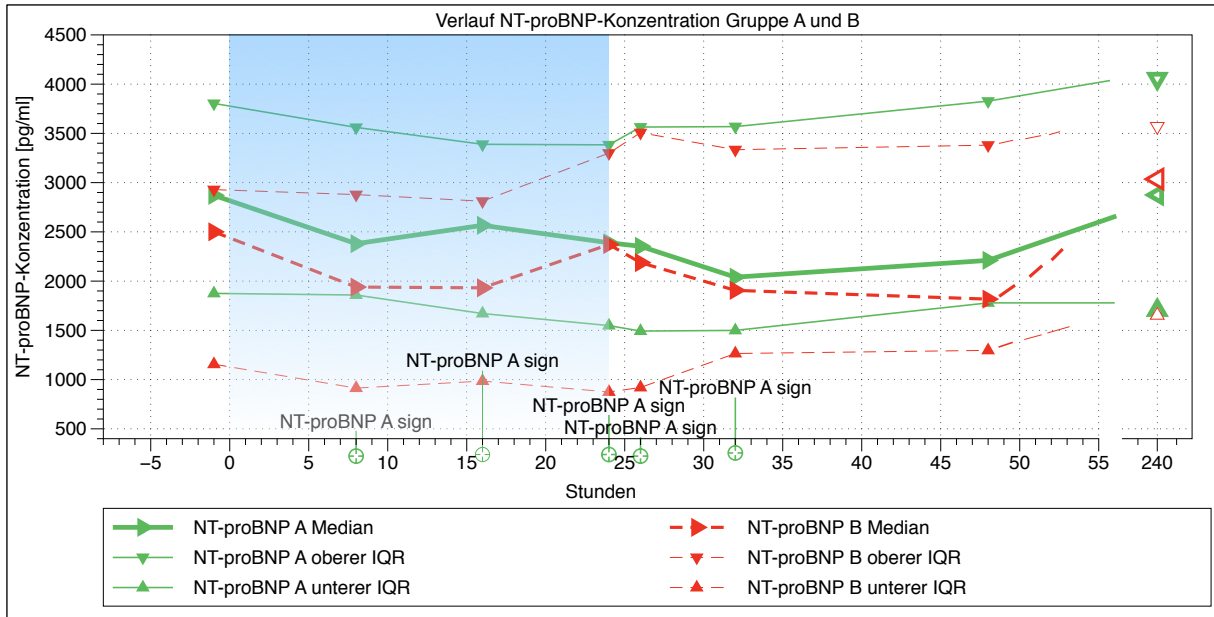


Abbildung 5: Median (IQR)-Werte der NT-proBNP-Konzentrationen in pg/ml der Gruppen A und B im Zeitverlauf. Signifikanter Abfall im zeitlichen Verlauf der NT-proBNP-Konzentration zum Ausgangswert der Stunde 1 vor Infusionsbeginn (-1. Stunde) der RLX.CHF.001 Gruppe A zu den Zeitpunkten Stunde 8, 16, 24, 26 und 32. Kein signifikanter Abfall im zeitlichen Verlauf der NT-proBNP-Konzentration der RLX.CHF.001 Gruppe B. Blau markiert ist der Infusionszeitraum von Relaxin.

5.2.4 Korrelationsanalyse nach Pearson zwischen Myostatin und NT-proBNP in RLX.CHF.001

In Gruppe A der RLX.CHF.001-Patienten fand sich eine schwache, aber signifikante Korrelation zwischen den korrespondierenden Myostatin- und NT-proBNP-Werten ($r = 0,257$ nach Pearson, $p = 0,021$), während in Gruppe B beide Parameter nicht korrelierten (Abbildungen 6 und 7). Einzelheiten zu den Ergebnissen der statistischen Untersuchungen finden sich im Anhang Kapitel 9, Tabelle 20 und 21.

Korrelationsanalyse nach Pearson: RLX.CHF.001, Gruppe A

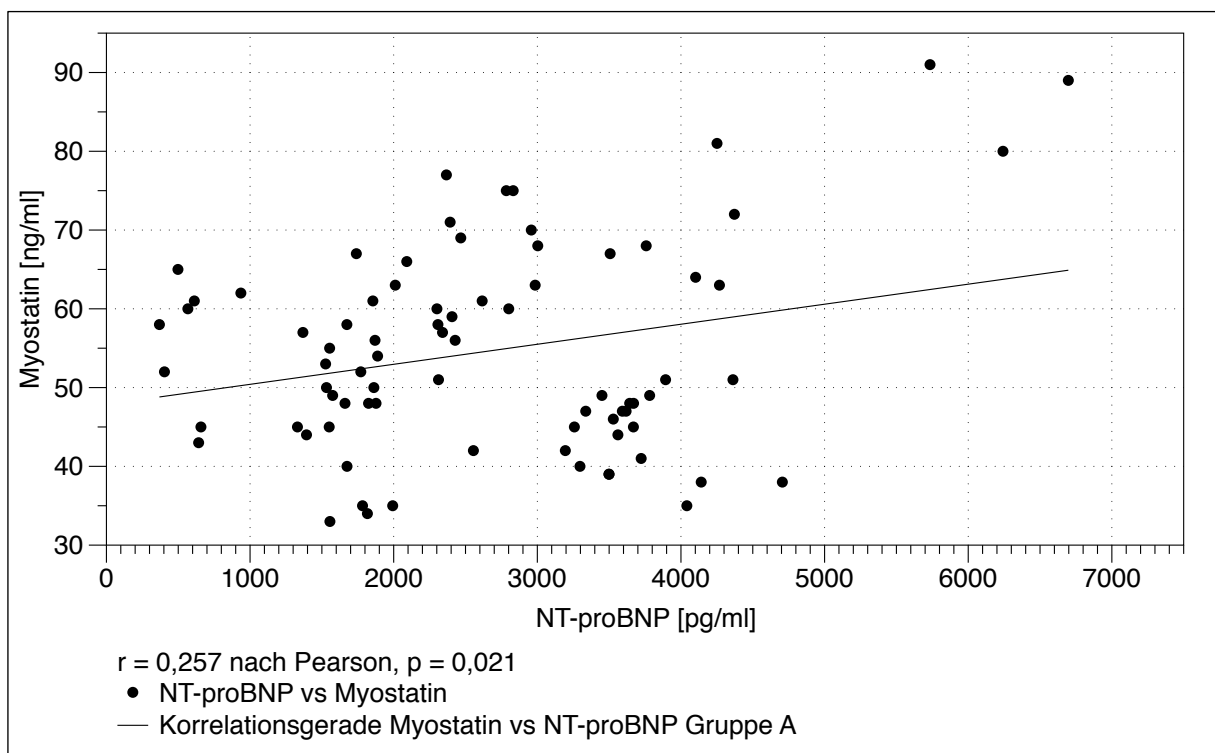


Abbildung 6: Signifikante Korrelation [$p = 0,021$] zwischen Myostatin und NT-proBNP in der RLX.CHF.001-Gruppe A

Korrelationsanalyse nach Pearson: RLX.CHF.001, Gruppe B

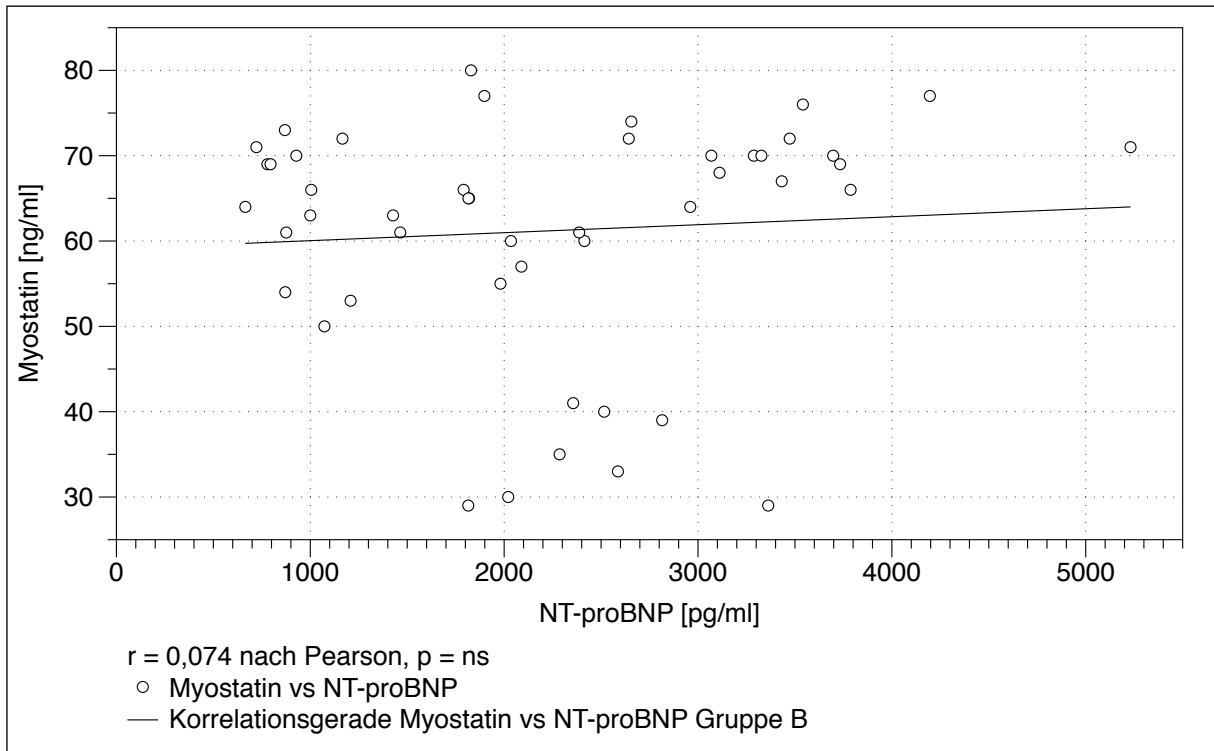


Abbildung 7: Fehlende Korrelation [$p = 0,616$] zwischen Myostatin und NT-proBNP in der RLX.CHF.001-Gruppe B

6 Diskussion

In dieser Arbeit wird in ihrem ersten Teil die Hypothese formuliert, dass das Herz Bildungs- oder Verbrauchsort von Myostatin ist.

Erstmalig wird nun durch lokale Myostatinmessungen in vivo beim Menschen ein auf den Bildungs- oder Verbrauchsort Herz hinweisender Myostatin-Koronargradient untersucht. Ein Myostatin-Koronargradient beschreibt eine signifikante positive oder negative Konzentrationsdifferenz zwischen Coronarsinus und Arterie.

Es wird ein signifikanter positiver Koronargradient für Myostatin nachgewiesen.

Somit ist das Herz in der hier untersuchten Patientenkohorte ein Bildungsort für Myostatin.

Seit die Arbeitsgruppe von Sharma et al. 1999 [98] erstmalig die Expression von Myostatin im fetalen und erwachsenen Herzmuskel von Säugetieren nachgewiesen hatte und feststellte, dass die normalerweise geringe Expression von Myostatin in Kardiomyozyten an der Grenze zur nekrotischen Infarktzone in einem Schafherzen stark stieg, sind zahlreiche Untersuchungen veröffentlicht worden, die sich auf die Rolle des Herzmuskels als Bildungsstätte für Myostatin konzentrieren. In der Mehrzahl der Fälle wurden Tiermodelle sowie in vitro Zellkultur-Modelle verwendet [6][7][11][15][25][27][34][35][36][43][65][75][80][91][99][100][116]. In einem kleineren Anteil stehen Biopate aus menschlichen Herzen zur Untersuchung zur Verfügung [9][36]. In ihnen allen wird das Myokard als eigenständiger Bildungsort von Myostatin identifiziert.

2002 postulierten Cook et al. [27], dass es in transgen modifizierten Mäuseherzen, wie auch in Kardiomyozyten-Kultur nach Entwicklung einer durch die Serin-Threonin-Kinase Akt vermittelten linksventrikulären Hypertrophie, nicht zu einer direkten durch Akt induzierten, sondern zu einer sekundären Erhöhung von Myostatin als negativer Regulator des Muskelwachstums im Sinne einer negativen Feedback-Schleife kommt.

Einen negativen Feedback-Mechanismus auf das Muskelwachstum zwischen dem IGF-1, einem wichtigen Vermittler von Zellwachstum und Differenzierung, und Myostatin postulieren auch Shyu et al. [99] 2005 und deckten einen pathophysiologischen Mechanismus der Myostatin-Erhöhung auf. So vermittelt IGF-1 die dehnungsinduzierte Hochregulation der Myostatin-Expression in neonatalen Kardiomyozyten von Ratten.

Sowohl IGF-1, der Signalweg über die p38-MAP-Kinase als auch der MEF2-Transkriptionsfaktor sind an der Induktion von Myostatin beteiligt. Myostatin wird sowohl zeit- als auch belastungsabhängig durch zyklische Dehnung hochreguliert.

Es bestehen unterschiedliche intrazelluläre Signalwege über ERK und Akt wie über p38MAPK, die jeweils zu einer kardiomyozytären Hypertrophie führen. 2005 beschrieben Gaussin et al. [35], dass der Signalweg über ERK und Akt bei der durch Ausdauertraining induzierten physiologischen Hypertrophie im Vordergrund steht, während es sich bei einer durch Druck- und Volumenbelastung verursachten pathologischen Hypertrophie um den Signalweg über p38MAPK handelt

Moderate Konzentrationen von IGF-1 induzieren eine angepasste Hypertrophie, wohingegen exzessive IGF-1-Konzentrationen p38MAPK stimulieren und darüber die Hypertrophie durch die Produktion des Chalons Myostatin limitieren.

2006 zeigt Morrisette et al. [80], dass Myostatin das Kardiomyozytenwachstum oder die wachstumsvermittelnde Akt-Phosphorylierung, welches durch IGF-1 induziert wird, nicht direkt über den IGF-1-Signalweg inhibiert, sondern das Kardiomyozytenwachstum über den p38-MAP-Kinase-Signalweg hemmt, der durch einen Katecholamin-induzierten und eine Hypertrophie verursachenden Stress initialisiert wird. Myostatin hat eine regulatorische Funktion auf die Herzmuskulatur. Im gleichen Jahr zeigten Shyu et al. [100], dass die Myostatin-Expression im ventrikulären Myokard nach einer durch Volumenbelastung induzierten Herzinsuffizienz im Rattenmodell unter der Therapie mit Carvedilol reversibel war. Auffällig in dieser Arbeit war auch die Entwicklung einer Kachexie bei einem Teil der Versuchstiere. Diese Kachexie bildete sich nach der Carvediloltherapie zurück [100].

Hoening MR et al. [47] vermuteten deshalb 2007, dass das Herz als Myostatin sezernierendes Organ an der Entwicklung einer kardialen Kachexie beteiligt ist. Heineke et al. [43] gelingt 2010 am Mäusemodell der Beweis einer eigenständigen Beteiligung des Herzens an der Entwicklung einer Kachexie im Sinne einer „spill-over“-These. So kommt es unter normalen physiologischen Bedingungen nicht dazu, dass das Herz genug Myostatin sezerniert, um die Skelettmuskulatur zu beeinflussen. Erst unter pathologischen Bedingungen wie einer druckbelastungsinduzierten kardialen Hypertrophie steigt die Myostatin-Expression im Herzen in dem Maße, dass sie dann signifikant zur Myostatin-Plasma-Konzentration beiträgt und sekundär die Skelettmuskulatur beeinflusst [43][104].

Den ersten klinischen Beweis führen 2010 George et al. [36] und zeigten, dass die Myostatin-Konzentrationen beim Menschen bei Herzinsuffizienz ansteigen.

Auch wenn es diskrepante Ergebnisse von Zamora et al. [121][122] gab, konnten Gruson et al. [39] diese positive Korrelation zwischen der Höhe der Myostatinkonzentration und der Schwere der Herzinsuffizienz an einem größeren Kollektiv 2011 bestätigen. Im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe hat die Gruppe mit stabiler chronischer Herzinsuffizienz und einer linksventrikulären Ejektionsfraktion von kleiner 35% signifikant höhere Plasma-Myostatinkonzentrationen. In diesem Patientenkollektiv mit einer chronischen Herzinsuffizienz ohne signifikante Unterschiede zwischen ischämischer und nicht-ischämischer Genese besteht eine positive signifikante Korrelation zwischen dem Anstieg der Plasma-Myostatinkonzentration und dem klinischen Schweregrad der Herzinsuffizienz mit ihren steigenden NYHA-Klassen. Die Konzentrationen von NT-proBNP korrelieren positiv mit denen von Myostatin im Plasma [39].

Aus dem vorher Geschilderten ist es inhaltlich plausibel den gemessenen signifikant positiven Koronargradienten von Myostatin im Serum als Ausdruck der eigenständigen Myostatinbildung durch das Myokard zu werten und somit die These vom Myokard als einem endokrinen Organ für Myostatin [43] zu unterstützen.

Da in dieser Arbeit eine gesunde Kontrollgruppe fehlt, ist es aber nicht möglich eindeutig zu entscheiden, ob der positive Myostatin-Koronargradient Ausdruck einer erhöhten kardialen Myostatinkonzentration ist.

Es gibt zwar zwei Studien [39][107], die ein größeres Kollektiv von gesunden Probanden auf peripher-venöse Myostatinkonzentrationen hin untersuchen. Doch geht es in diesen Untersuchungen um Korrelationen mit anderen Attributen wie Alter, Body Mass Index, Fettmasse, Rauchen und 25-Hydroxy-Vitamin D-Spiegel sowie jahreszeitlichen Schwankungen mit höchsten Myostatin-Konzentrationen im Frühling in einem gesunden Kollektiv [107]. Oder es wurde dieses gesunde Probandenkollektiv mit Herzinsuffizienz-Patienten verglichen [39], und es standen in beiden Arbeiten keine Blutproben aus dem Sinus coronarius zu Verfügung.

Die Skelettmuskulatur hat unter physiologischen Bedingungen den größten Anteil an der Bildung von Myostatin [43]. Auch in dieser Arbeit konnte ein signifikanter Myostatin-konzentrationsgradient zwischen peripher-venösem und arteriellem Serum nachgewiesen werden.

Bei Herzinsuffizienz hat jedoch das in der kardialen Muskulatur gebildete Myostatin einen bedeutenden, aber nicht den höchsten Anteil am Serum-Myostatin-Spiegel, denn diesen steuert zu 60 bis 70% die Skelettmuskulatur bei [15].

In einem anderen Herzinsuffizienz-Tiermodell beträgt die Steigerung der Myostatin-Proteinexpression im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe in der Skelettmuskulatur das 2,4-fache, während sie im Myokard um das 4-fache erhöht ist. Die mRNA-Myostatin-Konzentrationen ändern sich jedoch in der Skelettmuskulatur wie im Myokard im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe nicht signifikant [65].

In einem Modell zur Untersuchung des abnehmenden Skelettmuskeltrophismus bei Herzinsuffizienz wird nur die Skelettmuskulatur analysiert. Die Expressionen von Myostatin-Protein und Myostatin-mRNA im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe sind darin gleich, wohingegen aber die Konzentration des Myostatin-Inhibitors Follistatin in der Herzinsuffizienz-Gruppe abnimmt [67].

Die katabole Wirkung von Myostatin in einem Mausmodell bei Herzinsuffizienz auf die Skelettmuskulatur kann durch die Blockade der Myostatin-Bildung am Herzen aufgehoben werden, nicht jedoch durch eine Blockade der Myostatin-Bildung in der Skelettmuskulatur. Die systemische Wirkung, vermittelt über den Myostatin-Anteil im Plasma, wird auch durch seine vermehrte Bildung in den Kardiomyozyten bei Herzinsuffizienz verursacht. Unter physiologischen Bedingungen sezerniert das Herz jedoch nicht genug Myostatin, um die Skelettmuskulatur zu beeinflussen [43].

Ein Myostatin-Koronar-Konzentrationsgradient wurde in keinen der vorhergenannten Arbeiten ermittelt.

Diese Arbeit konnte in ihrem ersten Teil einen Myostatin-Koronargradienten nachweisen und dies bei Probanden, die keine Zeichen der Herzinsuffizienz aufwiesen.

Die approximative Schätzung der linksventrikulären Herzmasse mittels der bildgebenden Cardio-CT gibt dem gemessenen Myostatin-Koronargradienten ein zusätzliches Attribut. In dieser Arbeit ist die relativ zum Körpergewicht ermittelte linksventrikuläre Herzmasse normal.

Die Referenzwerte unterschieden sich in den zitierten Arbeiten und betragen als obere Grenze für Normalwerte für Frauen zwischen 68 g/m² [105], 79 g/m² [69] und 89 g/m² bis 110 g/m² [16] sowie für Männer 86 g/m² [105], 91 g/m² [69] und 103 g/m² bis 124 g/m² [16].

Korrelationen nach Pearson zwischen der relativen linksventrikulären Herzmasse und der Coronarsinus-Myostatin-Konzentration beziehungsweise dem Myostatin-Koronargradienten bestehen nicht.

Der festzustellende Myostatin-Koronargradient, das heißt die nachweisbare myokardiale Myostatin-Produktion, kann einen Faktor für das Fehlen einer linksventrikulären Hypertrophie in dieser Kohorte darstellen. Die Tatsache, dass Myostatin die Proliferation von Muskelfibroblasten stimuliert sowie die Differenzierung von myogenen Zellen in Myofibroblasten induziert und Myofibroblasten wiederum Myostatin exprimieren [66][90], kann für einen Beitrag des Myostatins zu dem bestehenden Vorhofflimmern in dieser Kohorte stehen. In einem Modell mit älteren Mäusen konnte im Myokard eine Fibrose nachgewiesen werden, die in der Myostatin-Knock out-Gruppe signifikant geringer als in der Wild-Typ-Kontrolle ausfiel [15][81].

In einer zukünftig durchzuführenden Untersuchung mit Probanden, bei denen eine linksventrikuläre Hypertrophie vorliegt, kann eine eventuelle Änderung des Myostatin-Koronargradienten zur weiteren Hypothesengenerierung dienen.

Im ersten Teil dieser Arbeit sind die NT-proBNP-Werte der meisten Probanden im Bereich der sogenannten „Grauzone“ [112] oder unterhalb des unteren Grenzbereiches. Nur 20 % der Probanden weisen altersabhängig erhöhte NT-proBNP-Werte auf ohne klinische Zeichen einer Herzinsuffizienz.

Nach den Empfehlungen der ESC (European Society of Cardiology) von 2012 liegt der Grenzbereich für NT-proBNP, unter dem eine akute Dyspnoe mit Ursache einer akuten Herzinsuffizienz unwahrscheinlich ist bei <300 pg/ml. Der Konzentrationsbereich, ab dem bei gleicher Symptomatik eine akute Herzinsuffizienz als Grund wahrscheinlich ist, ist altersabhängig und liegt für Menschen mit einem Alter bis 50 Jahren bei >450 pg/ml und einem Alter zwischen 50 und 75 Jahren bei >900 pg/ml. Dabei besteht der entscheidende Pathomechanismus, der zur Freisetzung des natriuretischen Peptids führt, in der zunehmenden enddiastolischen Wandspannung. Bei Patienten mit Vorhofflimmern werden erhöhte natriuretische Peptid-Werte aufgrund der erhöhten Vorhofwandspannung gefunden. [5][112]

Der Einfluss der Arrhythmie auf die Höhe der NT-proBNP-Konzentration deckt sich mit

den Untersuchungen von Schnabel et al. [96], die im Vergleich zu klinischen und echokardiographischen Risikoindikatoren nur eine bescheidene Korrelation zwischen erhöhten NT-proBNP-Werten und Herzinsuffizienz bei Patienten mit Vorhofflimmern finden, so dass trotz eines Anteils von 50% Herzinsuffizienz-Patienten in der Kohorte die Höhe von NT-proBNP das Vorhanden- oder Nicht-Vorhandensein einer Herzinsuffizienz nicht eindeutig diskriminierte [96].

Zusammengefasst besteht ein positiver Koronargradient, also eine myokardiale Sekretion von Myostatin, bei einem Patientenkollektiv mit normaler LV-Funktion und Vorhofflimmern, aber klinisch ohne Zeichen einer Herzinsuffizienz und ohne linksventrikuläre Hypertrophie. Im Ergebnis dieser Untersuchung wird die Hypothese aufgestellt, dass diese Myostatinsekretion durch Fibrose-Induktion des Vorhofflimmern befördert, gleichzeitig aber infolge seiner anti-hypertrophen Wirkung die linksventrikuläre Hypertrophie verhindert. Es bleibt zu untersuchen, ob diese kardiale Myostatin-Sekretion auch bei herzgesunden Individuen besteht.

Im zweiten Abschnitt dieser Arbeit wird die Hypothese überprüft, ob eine Verbesserung der hämodynamischen Situation mittels Relaxin-Therapie unter den Bedingungen einer stabilen systolischen Herzinsuffizienz zu einer Beeinflussung der peripher-venösen Myostatinkonzentration führt und ob diese Konzentrationsveränderungen von Myostatin mit denen von NT-proBNP im Verlauf korrelieren.

In dieser Arbeit kann erstmalig nachgewiesen werden, dass in der Gruppe mit einer besseren hämodynamischen Ansprechbarkeit während der Behandlung mit Relaxin in der Studie RLX.CHF.001 [30] (Gruppe A) auch die peripher-venösen Myostatinkonzentrationen innerhalb eines kurzen Zeitabschnittes von 240 Stunden signifikant zur Ausgangskonzentration abnehmen.

Es wird nicht untersucht, ob die Ausgangskonzentrationen von Myostatin erhöht sind, da entsprechende Kontrollgruppen fehlen.

In dieser Arbeit bestehen 2 Kollektive, die unterschiedlich auf die hämodynamische Wirkung von Relaxin ansprechen.

In verschiedenen Arbeiten nehmen die Myostatin-Konzentrationen im Rahmen von Volumen- oder Druckbelastung oder durch einen Katecholamin-induzierten und eine Hypertrophie verursachenden Stress zu. Unter Maßnahmen, die im weitesten Sinne eine Verbesserung der Hämodynamik bewirken, wie sie durch die Gabe von

Angiotensin II-Rezeptor-Blockern, Beta-Blockern oder moderatem Ausdauertraining zu erreichen sind, sinkt die Myostatin-Konzentration [1][64][65][80][100][116].

In unserer Arbeit bestimmen wir die Myostatin-Konzentration in einem Kollektiv mit stabiler systolischer Herzinsuffizienz, deren NT-proBNP-Werte deutlich erhöht waren. Wir stellen fest, dass ein besseres hämodynamisches Ansprechen auf Relaxin zu einer signifikanten Reduktion der venösen Serum-Myostatin-Konzentration innerhalb eines kurzen Zeitraumes von 240 Stunden führt.

Es gibt bis zum jetzigen Zeitpunkt keine experimentellen Studien, die auf eine Interaktion zwischen Relaxin und Myostatin am Herzen abzielen [40].

Doch werden die bisher bekannten Wirkmechanismen von Relaxin am Herzen auch über intrazelluläre Signalwege vermittelt, die auch in der intrazellulären Enzymkaskade von Myostatin eine wichtige Rolle spielen. So konnte gezeigt werden, dass sowohl humanes Relaxin wie auch humanes Relaxin-3 beide die p38MAPKinase aktivieren können. Eine p38-MAPK-Inhibition blockiert eine Relaxin-Antwort [31][36][40][90][116].

Ebenso führt eine Relaxinstimulation zu einer steigenden Aktivierung von ERK1/2 und Akt nach 30 Minuten [40]. Myostatin wiederum wird stressbedingt in einem ERK-abhängigen Maße hochreguliert und beeinflusst negativ das Kardiomyozytenwachstum sowohl in einem Kultur- wie einem Mausmodell [11][90].

Theoretisch kann so ein gewisser Synergismus mit Myostatin in der Dämpfung einer Hypertrophie postuliert werden.

Dagegen werden die profibrotischen Eigenschaften von TGF- β , einschließlich Myostatin, durch Relaxin gehemmt [40][90].

Eine weitere mögliche Interaktion liegt in der Eigenschaft von Relaxin Glukokortikoide vom Glukokortikoidrezeptor zu verdrängen [40]. Glukokortikoide wiederum induzieren, vermittelt über Glukokortikoidrezeptoren, eine dosisabhängige endogene Myostatin-Transkription [29]. Somit ist es denkbar, dass Relaxin die Myostatin-Synthese über diesen Weg beeinflusst.

Nur wenige Studien vergleichen die peripher-venösen Konzentrationen von NT-proBNP mit Myostatin bei Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz. Sie kommen teilweise zu diskrepanten Ergebnissen. Die Arbeitsgruppe Zamora et al. [121][122] konnte keine positive Korrelation zwischen Myostatin und NT-proBNP feststellen, wohingegen in den

Arbeiten von Bish et al. [10] und Gruson et al. [39] eine positive Korrelation besteht. Ursachen dafür wurden in der Arbeit von [10] diskutiert.

So ist es möglich, wie die Arbeitsgruppe um Zamora einräumt, dass die unterschiedlichen Ergebnisse deshalb erzielt wurden, weil zwei verschiedene Assays zur Myostatin-Quantifizierung benutzt wurden. Beim ersten Assay waren die Antikörper gegen die N-terminale Domäne von Myostatin gerichtet und deshalb fähig Pro-Myostatin, den Myostatin-Latent-Komplex (LAP) und freies Myostatin-Propeptid, das vom LAP dissoziiert ist, zu detektieren [10]. Beim zweiten Assay waren die Antikörper gegen das Pro-Myostatin gerichtet und deshalb fähig alle Formen von Myostatin zu detektieren, einschließlich des Myostatin-Latent-Komplexes (LAP) und des freien Myostatin-Propeptids, das vom LAP dissoziiert ist, sowie des freien Myostatin-C-Dimers [10]. Eine andere Möglichkeit, die von den Autoren in [10] diskutiert wird, ist, dass der Myostatin-Wert der gesunden Kontrollgruppe in Zamoras Studie, aufgrund eines systematischen Probenfehlers bei zu kleiner Proben-Stichprobe, nicht den wirklichen Myostatin-Serumwert bei gesunden Menschen reflektiert [10].

Da aber ähnliche Mechanismen, die zur Erhöhung von Myostatin führen, wie beispielsweise die mechanische Dehnung in Folge von Druck- und Volumenbelastung [99], sowie die neurohumoralen Stimulationen, wie sie unter der Einwirkung von Phenylephrin, TNF-alpha oder Angiotensin II erfolgen [65][116], auch einen Anteil an der NT-proBNP-Bildung haben [39], wurde in dieser Arbeit die Hypothese formuliert, dass zwischen Myostatin und NT-proBNP eine positive Korrelation besteht.

Die Ergebnisse dieser Arbeit stehen in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Arbeitsgruppen von Bish et al. [10] und Gruson et al. [39] und zeigen eine positive Korrelation zwischen NT-proBNP und Myostatin auf.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass in einem zeitlich kurzen Intervall im Rahmen einer stabilen systolischen Herzinsuffizienz die Verbesserung der hämodynamischen Situation durch Relaxin zu einer signifikanten Abnahme der peripher-venösen Myostatin-Konzentration führt, die mit dem Verlauf der NT-proBNP-Konzentration konkordant korreliert.

In der anderen Gruppe mit stabiler systolischer Herzinsuffizienz, deren hämodynamische Situation sich unter der Relaxin-Therapie nicht ändert, kommt es dagegen zu keiner signifikanten Änderung der peripher-venösen Myostatin- und NT-proBNP-Konzentration.

Eine wichtige Limitierung dieser Arbeit besteht in der kleinen Anzahl von Probanden und Patienten.

Auch die Abwesenheit von weiteren pathologischen Veränderungen wie Linksventrikuläre Hypertrophie (LVH) oder chronische Herzinsuffizienz bei einer statistisch angemessenen Probandenzahl im ersten Abschnitt dieser Arbeit lässt Fragen zur Verteilung der Myostatin-Konzentrationen in den verschiedenen Kompartimenten und ihrer relativen und absoluten Größe offen.

Im Patientenkollektiv des 2. Abschnittes dieser Arbeit fehlen die mit bildgebenden Methoden wie einer Cardio-CT geschätzten Angaben der individuellen Herzmassen der Patienten.

Die von mehreren Autoren beschriebenen geschlechtsabhängigen Myostatin-Konzentrations-Unterschiede [52][89] mit geringeren Myostatin-Konzentrationen beim weiblichen Geschlecht können in dieser Arbeit aufgrund der zu kleinen Stichprobe analytisch nicht abgehandelt werden.

Eine weitere wichtige Limitierung besteht in der analytischen Phase des Assays selbst. Basierend auf polyklonalen Kaninchen-Antikörpern gegen rekombinantes humanes Myostatin werden die Serum-Proben des Studienkollektives mit einem kompetitiven ELISA bestimmt. Das zur Immunisierung verwendete rekombinante humane Myostatin ist ein Pro-Myostatin mit seinem N-terminalen Propeptid und dem C-terminalen biologisch aktiven Myostatin. Die polyklonalen Kaninchen-Antikörper detektieren alle Untereinheiten des Pro-Myostatins.

Die so ermittelten Myostatin-Konzentrationen fallen höher aus als bei spezifischeren Messungen des C-terminalen Dimers.

Es handelt sich um relative Konzentrationswerte, die untereinander im gleichen Assay vergleichbar sind, aber nicht zur Absolutwert-Bestimmung geeignet sind.

Die so ermittelten Konzentrationsangaben sind Ausdruck der Synthese- und Sekretionsrate von Myostatin, sie beschreiben nicht seine biologische Aktivität.

Eine spezifischere Größe zur Bestimmung der Syntheserate, die zwar nur über die lokale Situation Aufschluss gibt, ist die Konzentration von mRNA-Myostatin [25][64][75][100][116]. Diese Bestimmung findet in dieser Arbeit nicht statt.

Nicht untersucht wird die Frage, welchen Einfluss die Inhibitoren von Myostatin, Follistatin, FLRG, GASP-1 und LAP, sowohl systemisch wie lokal haben [15][29].

Beschrieben wird zum Beispiel für Follistatin, dass ein potentiell negativer Feedback-Mechanismus mit extrazellulärer Modulation von Mitgliedern der TGF- β -Superfamilie durch FS am Hühner-Herzen besteht [114]. Myostatin wird nicht nur systemisch neutralisiert durch einen stabilen Komplex mit FLRG im Serum, sondern auch durch lokal exprimiertes FS am Herzen [108]. Als ein Ausdruck für die Interaktion von Myostatin und FS bei chronischer Herzinsuffizienz beschreiben Lima et al. bei Ratten eine unveränderte Myostatin-Expression in der Skelettmuskulatur, jedoch eine reduzierte FS-Expression [67]. Rodgers et al. beschreiben eine höhere FS-Expimierung am Herzen in der Infarkt- und seiner Grenzzone als in der Nicht-Infarkt-Zone [91].

Ebenso wird die Rolle des Aktivators von Myostatin BMP-1 aus der Tolloid-Metalloproteinase-Familie [15][31][36][102][120] nicht untersucht.

In der Arbeit von Wolfman et al. wurde gezeigt, dass Mitglieder der Bone morphogenic protein-1 (BMP-1) aus der Tolloid-Metalloproteinase-Familie notwendig für die Aktivierung von Myostatin sind. Sie spalten die Myostatin-Propeptidbindung zwischen Arg-75 und Asp-76 und aktivieren somit den Latentkomplex durch Freisetzen des C-terminalen Dimers [120].

Durch die proteolytische Spaltung am inhibitorischen N-terminalen Ende von Pro-Myostatin durch BMP-1 kommt es zur Freisetzung des so aktivierten C-terminalen Dimers Myostatin und damit zur Stimulation des ActIIB-Rezeptors mit Ingangsetzen der Aktivierungskaskade für Myostatin. Es zeigte sich, dass die Expression von BMP-1-Isoformen in myokardialem Gewebe von Gruppen mit ICMP und DCMP verglichen mit einer normalen Kontrollgruppe signifikant erhöht waren. Die Höhe der BMP-1-Expression korrelierte mit einer gestiegenen Aktivierung von Myostatin bei Herzinsuffizienz [36].

Zur Beurteilung der biologischen Aktivität am Rezeptor müssten Effekte der verschiedenen Inhibitoren und Aktivatoren einbezogen werden – es ist sehr gut vorstellbar, dass das System zu einem großen Teil über die Inhibition oder De-Inhibition der biologischen Aktivität und weniger über die pure Syntheserate reguliert wird. Eine derartige Methode existiert jedoch zum jetzigen Zeitpunkt nicht.

7 Zusammenfassung

Zusammenfassend kann festgehalten werden,

dass erstens ein positiver Koronargradient als Ausdruck einer myokardialen Sekretion von Myostatin bei einem Patientenkollektiv mit normaler LV-Funktion und Vorhofflimmern, aber klinisch ohne Zeichen einer Herzinsuffizienz nachgewiesen wird und,

dass zweitens in einem anderen Patientenkollektiv mit einer stabilen systolischen Herzinsuffizienz die peripher-venöse Myostatin-Konzentration, die mit dem Verlauf der NT-proBNP-Konzentration konkordant korreliert, in einem zeitlich kurzen Intervall mit Verbesserung der hämodynamischen Situation durch Relaxin signifikant abnimmt.

8 Literatur

- 1 Allen DL, Hittel DS, McPherron AC. Expression and Function of Myostatin in Obesity, Diabetes, and Exercise Adaptation. *Med Sci Sports Exerc* 2011 doi:10.1249/MSS.0b013e3182178bb4.
- 2 Allen DL, Unterman TG. Regulation of myostatin expression and myoblast differentiation by FoxO and Smad transcription factors. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007;292:C188-C199.
- 3 Amthor H, Otto A, Macharia R, McKinnel I, Patel K. Myostatin imposes reversible quiescence on embryonic muscle precursors. *Dev Dyn* 2006;235:672-80.
Anderson SB, Goldberg AL, Whitman M. Identification of a novel pool of extracellular pro-myostatin in skeletal muscle. *J Biol Chem* 2008; 283:7027-35.
- 4 Anderson SB, Goldberg AL, Whitman M. Identification of a novel pool of extracellular pro-myostatin in skeletal muscle. *J Biol Chem* 2008; 283:7027-35.
- 5 Angermann CE, Ertrl G. Natriuretic peptides - new diagnostic markers in heart disease. *Herz* 2004;29:609-17.
- 6 Argiles JM, Orpi M, Busquets S, Lopez-Soriano FJ. Myostatin: more than just a regulator of muscle mass. *Drug Discov Today* 2012;17:702-9.
- 7 Artaza JN, Reisz-Porszasz S, Dow JS, Kloner RA, Tsao J, Bhasin S, Gonzales-Cadavid NF. Alterations in myostatin expression are associated with changes in cardiac left ventricular mass but not ejection fraction in the mouse. *J Endocrinol* 2007;194:63–76.
- 8 Bass J, Oldham J, Sharma M, Kambadur R. Growth factors controlling muscle development. *Domest Anim Endocrinol* 1999;17(2-3):191-7.
- 9 Bish LT, George I, Maybaum S, Yang J, Chen JM, Sweeney HL Myostatin is elevated in congenital heart disease and after mechanical unloading. *PLoS One*. 2011;6(9):e23818. DOI:10.1371/journal.pone.0023818.
- 10 Bish LT, George I. Myostatin serum levels in heart failure: reply. *Eur J Heart Fail*. 2010;12:1379-80. DOI:10.1093/eurjhf/hfq191.
- 11 Bish LT, Morine KJ, Sleeper MM, Sweeney HL. Myostatin is upregulated following stress in an erk-dependent manner and negatively regulates cardiomyocyte

growth in culture and in a mouse model. PLoS ONE 2010 5(4):e10230. DOI:10.1371/journal.pone.0010230.

12 Bobik A, Agrotis A, Kanellakis P, Dilley R, Krushinsky A, Smirnov V, Tararak E, Condrón M, Kostolias G. Distinct patterns of transforming growth factor-beta isoform and receptor expression in human atherosclerotic lesions. Colocalization implicates TGF-beta in fibrofatty lesion development. *Circulation* 1999;99:2883-91.

13 Borbély A, Papp Z, Édes I, Paulus WJ. Molecular determinants of heart failure with normal left ventricular ejection fraction. *Pharmacol Rep* 2009;61:139-41.

14 Brand T, Schneider MD. The TGF- β superfamily in myocardium: ligands, receptors, transduction and function. *J Mol Cell Cardiol* 1995;27:5-18.

15 Breitbart A, Auger-Messier M, Molkentin JD, Heineke J. Myostatin from the heart: local and systemic actions in cardiac failure and muscle wasting. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2011;300:H1973-82.

16 Budoff MJ, Ahmadi N, Sarraf G, Gao Y, Chow D, Flores F, Mao SS. Determination of left ventricular mass on cardiac computed tomographic angiography. *Acad Radiol* 2009;16(6):726-32.

17 Bullough WS. Growth control in mammalian skin. *Nature* 1962;193:520-3.

18 Bullough WS. Mitotic and functional homeostasis: A speculative review. *Cancer Res* 1965;25:1683-727.

19 Bullough WS. The control of mitotic activity in adult mammalian. *Biol Rev Camb Philos soc* 1962;37:307-42.

20 Burks TN, Cohn RD. Role of TGF- β signaling in inherited and acquired myopathies. *Skelet Muscle* 2011;1:19.

21 Cacciapuoti F. Molecular mechanism of left ventricular hypertrophy (LHV) in systemic hypertension (SH) - possible therapeutic perspectives. *J Am Soc Hypertens*. 2011;5(6):449-55.

22 Charlier C, Coppieters W, Farnir F, Grobet L, Leroy PL, Michaux C, Mni M, Schwers A, Vanmanshoven P, Hanset R, Georges M. The mh gene causing double-muscling in cattle maps to bovine Chromosome 2. *Mamm Genome* 1995;6:788-92.

23 Chen WS, Xu PZ, Gottlob K, Chen ML, Sokol K, Shiyanova T, Roninson I, Weng W, Suzuki R, Tobe K, Kadowaki T, Hay N. Growth retardation and increased apoptosis in mice with homozygous disruption of the Akt1 gene. *Genes Dev*. 2001;15:2203-8.

- 24 Cipollone F, Fazia M, Mincione G, Iezzi A, Pini B, Cucurullo C, Uchino S, Spigonardo F, DiNisio M, Cucurullo F, Mezzetti A, Porreca E. Increased expression of transforming growth factor beta1 as a stabilizing factor in human atherosclerotic plaques. *Stroke* 2004;35:2253-7.
- 25 Cohn RD, Liang H-Y, Shetty R, Abraham T, Wagner KR. Myostatin does not regulate cardiac hypertrophy of fibrosis. *Neuromuscul Disord* 2007;17(4):290-6.
- 26 Collins KA, Korcarz CE, Shroff SG, Bednarz JE, Fentzke RC, Lin H, Leiden JM, Lang RM. Accuracy of echokardiographic estimates of left ventricular mass in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001;280:1954-62.
- 27 Cook SA, Matsui T, Li L, Rosenzweig A. Transcriptional effects of chronic Akt activation in the heart. *J Biol Chem* 2002;277:22528-33.
- 28 Culley G. Observations on livestock. London: Woodfall,G.;1807.
- 29 Dominique J-E, Gérard C. Myostatin regulation of muscle development: Molecular basis, natural mutations, physiopathological aspects. *Exp Cell Res.* 2006;312:2401-14.
- 30 Dschietzig TB, Teichman S, Unemori E, Wood S, Boehmer J, Richter C, Baumann G, Stangl K. Intravenous Recombinant Human Relaxin in Compensated Heart Failure: A Safety, Tolerability, and Pharmacodynamic Trial. *J Card Fail.* 2009;15(3):182-90.
- 31 Elkina Y, Haehling SV, Anker SD. The role of myostatin in muscle wasting: an overview. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* 2011;2:143-51.
- 32 Esch FS, Shimasaki S, Mercado M, Cooksey K, Ling N, Ying S, Ueno N, Guillemin R. Structural characterization of follistatin: a novel follicle-stimulating hormone release-inhibiting polypeptide from the gonad. *Mol Endocrinol* 1987;1:849-55.
- 33 Feng XH, Derynck R. Specificity and versatility in TGF-beta signaling through Smads. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2005;21:659-93.
- 34 Fernandez-Sola J, Lluís M, Sacanella E, Estruch R, Antunez E, Urbano-Marquez A. Increased Myostatin Activity and Decreased Myocyte Proliferation in Chronic Alcoholic Cardiomyopathy. *Alcohol Clin Exp Res.* 2011 doi: 10.1111/j.1530-0277.2011.01456.x.
- 35 Gaussin V, Depre C. Myostatin, the cardiac chalone of insulin-like growth factor-1. *Cardiovasc Res.* 2005;68:347-9.

- 36 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.
- 37 Gonzalez-Cadavid NF, Taylor WE, Yarasheski K, Sinha-Hikim I, Ma K, Ezzat S, Shen R, Lalani R, Asa S, Mamita M, Nair G, Arver S, Bhasin S. Organization of the human Myostatin gene and expression in healthy men and HIV-infected men with muscle wasting. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:14938-43.
- 38 Gordon KJ, Blobel GC. Role of transforming growth factor-beta superfamily signaling pathways in human disease. *Biophys Acta* 2008;1782:197-228.
- 39 Gruson D, Ahn SA, Ketelslegers JM, Rousseau MF. Increased plasma myostatin in heart failure. *Eur J Heart Fail* 2011; DOI:10.1093/eurjhf/hfr024.
- 40 Halls ML, Bathgate RAD, Sutton SW, Dschietzig TB, Summers RJ. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. XCV. Recent Advances in the Understanding of the Pharmacology and Biological Roles of Relaxin Family Peptide Receptors 1–4, the Receptors for Relaxin Family Peptides. *Pharmacol Rev* 2015;67:389–440.
- 41 Hanset R, Michaux C. On the genetic determinism of muscular hypertrophy in the Belgian White and Blue cattle breed. I.Experimental data. *Genet Sel Evol* 1985;17:359-68.
- 42 Hanset R, Michaux C. On the genetic determinism of muscular hypertrophy in the Belgian White and Blue cattle breed. II.Population data. *Genet Sel Evol* 1985;17:369-86.
- 43 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.
- 44 Heldin CH, Miyazono K, ten Dijke P. TGF-beta signaling from cell membrane to nucleus through Smad proteins. *Nature* 1997;390:465-71.
- 45 Hill JJ, Davies MV, Pearson AA, Wang JH, Hewick RM, Wolfman NM, Qui Y. The myostatin propeptide and the follistatin-related gene are inhibitory binding proteins of myostatin in normal serum. *J Biol Chem* 2002;277:40735-41.
- 46 Hill JJ, Qui Y, Hewick RM, Wolfman NM. Regulation of myostatin in vivo by growth and differentiation factor-associated serum protein-1: A novel protein with proteinase inhibitor and follistatin domains. *Mol Endocrinol* 2003;17:1144-54.

- 47 Hoenig MR. Hypothesis: Myostatin is a mediator of cardiac cachexia. *Int J Cardiol.* 2008;124:131-3.
- 48 Holm S. Simple sequentially rejective multiple test procedure. *Scand J Statist* 1979;6:65-70.
- 49 Huminiecki L, Goldovsky L, Freilich S, Moustakas A, Ouzounis C, Heldin CH. Emergence, development and diversification of the TGF- β signalling pathway within the animal kingdom. *BMC Ecol Biol* 2009;9:28.
- 50 Ji S, Losinski RL, Cornelius SG, Frank GR, Willis GM, Gerrard DE, Depreux FFS, Spurlock ME. Myostatin expression in porcine tissues: tissue specificity and developmental and postnatal regulation. *Am J Physiol* 1998;275:R1265-73.
- 51 Kambadur R, Sharma M, Smith TPL, Bass JJ. Mutations in myostatin (GDF8) in double muscled Belgian Blue and Piedmontese cattle. *Genome Res* 1997;7:910-5.
- 52 Karlowatz R-J, Scharhag J, Rahnenführer J, Schneider U, Jakob E, Kindermann, W, Zang KD. Polymorphism in the IGF1 signalling pathway including the myostatin gene are associated with left ventricular mass in male athletes. *Br J Sports Med* 2011;45:36-41.
- 53 Kemaladewi DU, de Gorter DJJ, Aartsma-Rus A, van Ommen G-J, ten Dijke P, 't Hoen PAC, Hoogaars WM. Cell-type specific regulation of Myostatin signaling. *FASEB J* 2012;26:1462-72.
- 54 Kingsley DM. The TGF- β superfamily new members, new receptors and new genetic tests of function in different organisms. *Genes Dev* 1994;8:133-46.
- 55 Koli K, Saharinen J, Hyytiainen M, Penttinen C, Keski-Oja J. Latency, activation and binding proteins of TGF- β . *Microsc Res Tech* 2001;52:354-62.
- 56 Kollias HD, McDermott JC. Transforming growth factor-beta and myostatin signaling in skeletal muscle. *J Appl Physiol* 2008;104:579-87.
- 57 Langley B, Thomas M, Bishop A, Sharma M, Gilmour S, Kambadur R. Myostatin inhibits myoblast differentiation by down-regulating MyoD expression. *J Biol Chem.* 2002;277:49831-40.
- 58 Lee SJ, McPherron AC. Regulation of myostatin activity and muscle growth. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:9306-11.
- 59 Lee SJ. Quadrupling muscle mass in mice by targeting TGF- β signaling pathways. *PLoS One.* 2007;2(8):e789. DOI:10.1371/journal.phone.0000789.

- 60 Lee SJ. Regulation of muscle mass by Myostatin. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2004;20:61–86.
- 61 Lefer AM, Ma XL, Weyrich AS, Scalia R. Mechanism of the cardioprotective effect of transforming growth factor beta 1 in feline myocardial ischemia and reperfusion. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:1018-22.
- 62 Lefer AM, Tsao PS, Aoki N, Palladino MAJ. Mediation of cardioprotection by transforming growth factor-beta. *Science* 1990;249:61-4.
- 63 Lefer AM, Tsao PS, Ma XL, Sampath TK. Antiischaemic and endothelial protective actions of recombinant human osteogenic protein (hOP-1). *J Mol Cell Cardiol* 1992;24:585-93.
- 64 Lenk K, Erbs S, Höllriege 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 Cardiovasc Prev Rehabil* 2012;19:404-11.
- 65 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.
- 66 Li ZB, Kollias HD, Wagner KR. Myostatin directly regulates skeletal muscle fibrosis. *J Biol Chem* 2008;283:19371-8.
- 67 Lima ARR, Martinez PF, Okoshi K, Guizoni DM, Zornoff LAM, Campos DHS, Oliveira Jr SA, Bonomo C, Pai-Silva MD, Okoshi MP. Myostatin and follistatin expression in skeletal muscles of rats with chronic heart failure. *Int J Exp Pathol* 2010;91(1):54–62.
- 68 Lo RS, Chen Y-G, Shi Y, Pavletich NP, Massagué J. The L3 loop: a structural motif determining specific interactions between Smad proteins and TGF- β receptors. *EMBO Journal* 1998;17(4):996–1005.
- 69 Lorenz CH, Walker ES, Morgan VL, Klein SS, Graham TP Jr. Normal human right and left ventricular mass, systolic function, and gender differences by cine magnetic resonance imaging. *J Cardiovasc Magn Reson.* 1999;1(1):7-21.
- 70 Maccatrozzo L, Bargelloni L, Radaelli G, Mscarello F, Patarnello T. Characterization of the myostatin gene in the gilthead seabream (*Sparus aurata*): sequence, genomic structure and expression pattern. *Marine Biotechnol* 2001;3:224-30.
- 71 Massagué J, Wotton D. Transcriptional control by the TGF- β /Smad signaling system. *EMBO Journal* 2000;19(8):1745-54.

- 72 Massague J. TGF- β signal transduction. *Annu Rev Biochem* 1998;67:753-91.
- 73 Massague J. TGF- β signalling in context. *Nature* 2012;13:616-30.
- 74 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- κ B-Independent, FoxO1-Dependent Mechanism. *J Cell Physiol* 2006;209:501–14.
- 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, 304-12.
- 76 McMurray JJV, Adamopoulos S, Anker SD, Auricchio A, Böhm M, Dickstein K, Falk V, Filippatos G, Fonseca C, Gomez-Sanchez MA, Jaarsma T, Køber L, Lip GY, Maggioni AP, Parkhomenko A, Pieske BM, Popescu BA, Rønnevik PK, Rutten FH, Schwitter J, Seferovic P, Stepinska J, Trindade PT, Voors AA, Zannad F, Zeiher A. ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012. *Eur Heart J* 2012;33:1787-847.
- 77 McPherron AC, Lawler AM, Lee SJ. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. *Nature* 1997;387:83-90.
- 78 McPherron AC, Lee SJ. Double muscling in cattle due to mutations in the Myostatin gene. *Proc Natl Acad Sci* 1997;94:12457-61.
- 79 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. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;340:675-80.
- 80 Morissette MR, Cook SA, Foo SY, 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;99:15-24.
- 81 Morissette MR, Stricker JC, Rosenberg MA, Buranasombati C, Levitan EB, Mittleman MA, Rosenzweig A. Effects of myostatin deletion in aging mice. *Aging Cell* 2009;8:573–83.
- 82 Mosteller RD. Simplified calculation of body-surface area. *N Engl J Med* 1987;317:1098-9.
- 83 Moustakas A, Souchelnytski S, Heldin CH. Smad regulation in TGF-beta signal transduction. *J Cell Sci* 2001;114:4359-69.

- 84 Mueller T, Gegenhuber A, Poelz W, Haltmayer M. Comparison of the Biomedica NT-proBNP enzyme immunoassay and the Roche NT-proBNP chemiluminescence immunoassay: implications for the prediction of symptomatic and asymptomatic structural heart disease. *Clin Chem* 2003;49: 976–9.
- 85 Patel K, Amthor H. The function of Myostatin and strategies of Myostatin blockade-new hope for therapies aimed at promoting growth of skeletal muscle. *Neuromuscul Disord* 2005;15(2):117-26.
- 86 Phillips DJ, de Kretser DM. Follistatin: a multifunctional regulatory protein. *Front Neuroendocrinol* 1998;19:287–322.
- 87 Razeghi P, Baskin KK, Sharma S, Young ME, Stepkowski S, Essop MF, Taegtmeyer H. Atrophy, hypertrophy, and hypoxemia induce transcriptional regulators of the ubiquitin proteasome system in the heart. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;342:361-4.
- 88 Reichek N, Helak J, Plappert T, Sutton MS, Weber KT. Anatomic validation of left ventricular mass estimates from clinical two-dimensional echocardiography: initial results. *Circulation* 1983;67:348-52.
- 89 Reisz-Porszasz S, Bhasin S, Artaza JN, Shen R, Sinha-Hikim I, Hogue A, Fielder TJ, Gonzalez-Cadavid NF. Lower skeletal muscle mass in male transgenic mice with muscle-specific overexpression of myostatin. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003;285:E876–88.
- 90 Rodgers BD, Garikipati DK. Clinical, agricultural, and evolutionary biology of Myostatin: a comparative review. *Endocr Rev* 2008;29:513-34.
- 91 Rodgers BD, Interlichia JP, Garikipati DK, Mamidi R, Chandra M, Nelson OL, Murry CE, Santana LF. Myostatin represses physiological hypertrophie of the heart and excitation-contraction coupling. *J Physiol* 2009;587(20):4873-86.
- 92 Rodgers BD, Weber GM, Sullivan CV, Levine MA. Isolation and characterization of the myostatin complementary deoxyribonucleic acid clones from two commercially important fish: *Oreochromis mossambicus* and *Morone chrysops*. *Endocrinology* 2001;142:1412-8.
- 93 Rodino-Klapac LR, Haidet AM, Kota J, Handy C, Kaspar BK, Mendell JR. Inhibition of Myostatin with emphasis on Follistatin as a therapy for muscle disease. *Muscle Nerve* 2009;39(3):283-96.

- 94 Sakuma K, Yamaguchi A. Sarcopenia and cachexia: the adaptations of negative regulators of skeletal muscle mass. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* 2012;DOI 10.1007/s13539-011-0052-4.
- 95 Sartori R, Milan G, Patron M, Mammucari C, Blaauw B, Abraham R, Sandri M. Smad2 and 3 transcription factors control muscle mass in adulthood. *Am J Physiol Cell Physiol* 2009;296:C1248-57.
- 96 Schnabel RB, Wild PS, Wilde S, Ojeda FM, Schulz A, Zeller T, Sinning CR, Kunde J, Lackner KJ, Munzel T, Blankenberg S. Multiple Biomarkers and Atrial Fibrillation in the General Population. 2014;PLoS ONE 9(11): e112486. doi:10.1371/journal.pone.0112486.
- 97 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;350:2682-8.
- 98 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.
- 99 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;68:405-14.
- 100 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.
- 101 Siegmund-Schultze N. Doping Im Reich der Mittel. *Dtsch Ärztebl* 2008;34-35:A1785.
- 102 Silljé HHW, de Boer RA. Myostatin: an overlooked player in heart failure? *Eur J Heart Fail* 2010;12:420-2.
- 103 Smith TP, Lopez-Corrales NL, Kappes SM, Sonstegard TS. Myostatin maps to the interval containing the bovine mh locus. *Mamm Genome* 1997;8:742-4.
- 104 Springer J, Adams V, Anker SD. Myostatin: regulator of muscle wasting in heart failure and treatment target for cardiac cachexia. *Circulation* 2010;121:354-6.
- 105 Stolzmann P, Scheffel H, Leschka S, Schertler T, Frauenfelder T, Kaufmann PA, Marincek B, Alkadhi H. Reference values for quantitative left ventricular

and left atrial measurements in cardiac computed tomography. *Eur Radiol* 2008;18(8):1625-34.

106 Strassburg S, Springer J, Anker SD. Muscle wasting in cardiac cachexia. *Int J Biochem Cell Biol* 2005;37:1938-47.

107 Szulc P, Schoppet M, Goettsch C, Rauner M, Dschietzig T, Chapurlat R, Hofbauer LC. Endocrine and clinical correlates of myostatin serum concentration in men - the STRAMBO study. *J Clin Endocrinol Metab* 2012;97(10):3700-8.

108 Takehara-Kasamatsu Y, Tsuchida K, Nakatani M, Murakami T, Kurisaki A, Hashimoto O, Ohuchi H, Kurose H, Mori K, Kagami S, Noji S, Sugino H. Characterization of follistatin-related gene as a negative regulatory factor for activin family members during mouse heart development. *J Med Invest* 2007;54:276-88.

109 Tang WB, Ling GH, Sun L, Liu FY. Smad anchor for receptor activation (SARA) in TGF-beta signaling. *Front Biosci (Elite Ed)*. 2010;2:857-60.

110 ten Dijke P, Heldin CH. Signal transduction: An anchor for activation. *Nature* 1999;397:109-11 doi:10.1038/16357.

111 Thomas M, Langley B, Berry C, Sharma M, Kirk S, Bass J, Kambadur R. Myostatin, a negative regulator of muscle growth, functions by inhibiting myoblast differentiation. *J Biol Chem*. 2000;275:40235-43.

112 Thygesen K, Mair J, Mueller C, Huber K, Weber M, Plebani M, Hasin Y, Biasucci LM, Giannitsis E, Lindahl B, Koenig W, Tubaro M, Collinson P, Katus H, Galvan M, Venge P, Alpert JS, Hamm C, Jaffe AS. Recommendations for the use of natriuretic peptides in acute cardiac care. *Eur Heart J* 2012;33, 2001-6.

113 Tug S, Lauer UM, Simon P. Gendoping Nachweis prinzipiell möglich. *Dtsch Ärztebl* 2012;3:A80-3.

114 Van den Berg G, Somi S, Buffing AA, Moorman AF, Van Den Hoff MJ. Patterns of expression of the follistatin and follistatin-like 1 genes during chicken heart development: a potential role in valvulogenesis and late heart muscle cell formation. *Anat Rec (Hoboken)* 2007;290:783-7.

115 Walsh FS, Celeste AJ. Myostatin: a modulator of skeletal-muscle stem cells. *Biochem Soc Trans* 2005;33(6):1513-7.

116 Wang BW, Chang H, Kuan P, Shyu K-G. Angiotensin II activates myostatin expression in cultured rat neonatal cardiomyocytes via p38 MAP kinase and myocyte enhance factor 2 pathway. *J Endocrinol* 2008;197:85-93.

- 117 Wang X, Robbins J. Proteasomal and lysosomal protein degradation and heart disease, *J Mol Cell Cardiol* 2013;dx.doi.org/10.1016/j.yjmcc.2013.11.006.
- 118 Williams NG, Interlichia JP, Jackson MF, Hwang D, Cohen P, Rodgers BD. Endocrine actions of myostatin: Systemic regulation of the IGF and IGF binding protein axis. *Endocrinology* 2011;152:172-80.
- 119 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* 2012;413:1288-94.
- 120 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. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2003;100:15842-6.
- 121 Zamora E, Lupón J, Simó R, Galán A. Myostatin serum levels in heart failure. *Eur J Heart Fail.* 2010;12:1379. DOI:10.1093/eurjhf/hfq190.
- 122 Zamora E, Simó R, Lupón J, Galán A, Urrutia A, González B, Mas D, Valle V. Serum myostatin levels in chronic heart failure. *Rev Esp Cardiol* 2010;63(8):992-6.
- 123 Zhang W, Sidhu SS. Development of inhibitors in the ubiquitination cascade. *FEBS Letters* 2014;588:356-67.
- 124 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;296:1486–8.

9 Anhang

Zu 5.1.2

Myostatin-Konzentration in Arterie, Vene und Coronarsinus von Patienten mit erhaltener LV-Funktion und bestehendem Vorhofflimmern

Myostatin-Konzentration [ng/ml]					
ID	Alter	Geschlecht	Myostatin A	Myostatin V	Myostatin CS
1	54	W	2,93	42,93	30
2	71	M	11,16	33,24	22,56
3	51	M	14,01	24,51	31,23
4	69	M	8,16	35,85	18,03
5	60	M	15,39	25,08	12,57
6	64	M	11,04	21,48	16,77
7	73	M	31,44	54,72	37,8
8	69	M	30,06	79,86	33,21
9	72	M	25,86	39,9	50,22
10	49	M	67,89	88,02	92,82
11	41	M	36,99	63,63	53,34
12	72	W	19,98	26,52	17,97
13	54	M	13,83	27,81	25,8
14	66	W	68,79	32,52	53,52
15	43	M	18,66	21,81	30,54
16	58	M	44,73	27,18	61,92
17	53	M	29,1	24	38,4
18	59	M	40,16	35,42	40,73
19	68	M	36,6	28,8	40,8
20	61	W	24,9	32,4	31,2

W = weiblich; M = männlich; A = Arterie; V = Vene; CS = Coronarsinus

Tabelle 9: Individuelle Myostatin-Konzentrationen [ng/ml] mit Angaben des Alters [Jahr] und Geschlechts

Friedman-Test

Entnahmeort	Ränge
	Mittlerer Rang
A	1,4
V	2,3
CS	2,3
Teststatistiken	
N	20
Chi-Quadrat	10,80
df	2
Exakte Signifikanz	0,004

A = Arterie; V = Vene; CS = Coronarsinus df = degree of freedom

Tabelle 10: Friedman-Test: Signifikanter Unterschied ($p = 0,004$) zwischen den Myostatin-Konzentrationen Arterie, Vene und Coronarsinus.

Wilcoxon-Test

Ränge			
Myostatin-Konzentrationen	Häufigkeit	Mittlerer Rang	Summe der Ränge
V < A	5	8,20	41
V > A	15	11,27	169
V = A	0		
Gesamtsumme	20		
CS < A	3	6,33	19
CS > A	17	11,24	191
CS = A	0		
Gesamtsumme	20		
CS < V	11	10,27	113
CS > V	9	10,78	97
CS = V	0		
Gesamtsumme	20		
Teststatistiken			
	V / A	CS / A	CS / V
Exakte Signifikanz (2-seitig)	p = 0,015	p = 0,001	0,784
nach Bonferroni-Holm-Korrektur	p < 0,025	p < 0,0166	p > 0,05

A = Arterie; V = Vene; CS = Coronarsinus

Tabelle 11: Wilcoxon-Test: Signifikanter Unterschied zwischen den Myostatin-Konzentrationen Coronarsinus / Arterie ($p = 0,001$) sowie Vene / Arterie ($p = 0,015$).

Zu 5.1.3

NT-proBNP-Konzentration in Vene von Patienten mit erhaltener LV-Funktion und bestehendem Vorhofflimmern

NT-proBNP- Konzentration [pg/ml]			
ID	Alter	Geschlecht	NT-proBNP V
1	54	W	456
2	71	M	387
3	51	M	128
4	69	M	301
5	60	M	200
6	64	M	187
7	73	M	672
8	69	M	712
9	72	M	897
10	49	M	901
11	41	M	341
12	72	W	99
13	54	M	1023
14	66	W	945
15	43	M	856
16	58	M	555
17	53	M	479
18	59	M	801
19	68	M	509
20	61	W	646

W = weiblich; M = männlich; V = Vene

Tabelle 12: Individuelle venöse NT-proBNP-Konzentrationen [pg/ml] mit Angaben des Alters [Jahr] und Geschlechts

Zu 5.2.2

Vergleich der Ausgangswerte von RLX.CHF.001 Gruppe A mit Gruppe B

Mann-Whitney U-Test**deskriptive Statistik**

	N	Minimum	Maximum	Perzentile		
				25	50. (Median)	75
RLX.CHF Gruppe A und B Myostatin- Ausgangswert [ng/ml]	16	33	89	51,5	61,00	69,25
RLX.CHF Gruppe A und B NT-proBNP- Ausgangswert [pg/ml]	16	936	6697	1871,75	2615	3590,25

	Gruppe	H	Mittlerer Rang	Summe der Ränge
RLX.CHF Myostatin- Ausgangswert	A	10	8,7	87
	B	6	8,17	49
	Gesamtsumme	16		
RLX.CHF NT-proBNP- Ausgangswert	A	10	9,3	93
	B	6	7,17	43
	Gesamtsumme	16		

Teststatistik		
	RLX.CHF Myostatin-Ausgangswert	RLX.CHF NT-proBNP-Ausgangswert
Exakte Signifikanz (2-seitig)	p = 0,875	p = 0,428

Tabelle 13: Mann-Whitney U-Test für die Ausgangswerte für Myostatin und NT-proBNP in den beiden Gruppen der Studie RLX.CHF.001

Zu 5.2.3

Konzentrationsveränderungen von Myostatin und NT-proBNP in RLX.CHF.001

Myostatin-Konzentration der Gruppe A

Friedman-Test

Ränge

	Mittlerer Rang
Myostatin-Ausgangswert (-1 h (pre dose))	7,15
Myostatin-Konzentration (8 h)	7,7
Myostatin-Konzentration (16 h)	5,85
Myostatin-Konzentration (24 h)	5,2
Myostatin-Konzentration (26 h (2 h post dose))	3,6
Myostatin-Konzentration (32 h (8 h post dose))	2,85
Myostatin-Konzentration (48 h (24 h post dose))	2,2
Myostatin-Konzentration (240 h (9 d post dose))	1,45
Teststatistiken	
N	10
Chi-Quadrat	63,437
df	7
Asymptotische Signifikanz	p < 0,001

df: degrees of freedom

Tabelle 14: Friedman-Test: Myostatin-Konzentration RLX.CHF.001 Gruppe A

Zeitabhängige Myostatin-Konzentration RLX.CHF.001 Gruppe A

Wilcoxon-Test

Teststatistik

	Myostatin-Konzentration (8 h) - Myostatin-Ausgangswert (-1 h)	Myostatin-Konzentration (16 h) - Myostatin-Ausgangswert (-1 h)	Myostatin-Konzentration (24 h) - Myostatin-Ausgangswert (-1 h)	Myostatin-Konzentration (26 h) - Myostatin-Ausgangswert (-1 h)	Myostatin-Konzentration (32 h) - Myostatin-Ausgangswert (-1 h)	Myostatin-Konzentration (48 h) - Myostatin-Ausgangswert (-1 h)	Myostatin-Konzentration (240 h) - Myostatin-Ausgangswert (-1 h)
Exakte Signifikanz (2-seitig)	0,094	0,008	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002
nach Bonferroni-Holm-Korrektur	p > 0,05	p < 0,025	p < 0,0071	p < 0,0083	p < 0,01	p < 0,0125	p < 0,0166

Tabelle 15: Wilcoxon-Test: Myostatin-Konzentration RLX.CHF.001 Gruppe A

Myostatin-Konzentration der Gruppe B

Friedman-Test

Ränge

	Mittlerer Rang
Myostatin-Ausgangswert (0 h)	2,58
Myostatin-Konzentration (8 h)	4,42
Myostatin-Konzentration (16 h)	5,08
Myostatin-Konzentration (24 h)	6,08
Myostatin-Konzentration (26 h (2 h post dose))	3,33
Myostatin-Konzentration (32 h (8 h post dose))	4,92
Myostatin-Konzentration (48 h (24 h post dose))	4,42
Myostatin-Konzentration (240 h (9 d post dose))	5,17
Teststatistiken	
N	6
Chi-Quadrat	8,669
df	7
Asymptotische Signifikanz	p = 0,277

df: degrees of freedom

Tabelle 16: Friedman-Test: Myostatin-Konzentration RLX.CHF.001 Gruppe B

NT-proBNP-Konzentration der Gruppe A

Friedman-Test

Ränge

	Mittlerer Rang
NT-proBNP-Ausgangswert (-1 h)	6,80
NT-proBNP-Konzentration (8 h)	4,50
NT-proBNP-Konzentration (16 h)	4,90
NT-proBNP-Konzentration (24 h)	3,40
NT-proBNP-Konzentration (26 h (2 h post dose))	3,55
NT-proBNP-Konzentration (32 h (8 h post dose))	2,35
NT-proBNP-Konzentration (48 h (24 h post dose))	5,30
NT-proBNP-Konzentration (240 h (9 d post dose))	5,20
Teststatistiken	
N	10
Chi-Quadrat	22,218
df	7
Asymptotische Signifikanz	p = 0,002

df: degrees of freedom

Tabelle 17: Friedman-Test: NT-proBNP-Konzentration RLX.CHF.001 Gruppe A

Zeitabhängige NT-proBNP-Konzentration RLX.CHF.001 Gruppe A

Wilcoxon-Test

Teststatistik							
	NT-proBNP-Konzentration (8 h) - NT-proBNP-Ausgangswert (-1 h)	NT-proBNP-Konzentration (16 h) - NT-proBNP-Ausgangswert (-1 h)	NT-proBNP-Konzentration (24 h) - NT-proBNP-Ausgangswert (-1 h)	NT-proBNP-Konzentration (26 h) - NT-proBNP-Ausgangswert (-1 h)	NT-proBNP-Konzentration (32 h) - NT-proBNP-Ausgangswert (-1 h)	NT-proBNP-Konzentration (48 h) - NT-proBNP-Ausgangswert (-1 h)	NT-proBNP-Konzentration (240 h) - NT-proBNP-Ausgangswert (-1 h)
Exakte Signifikanz (2-seitig)	0,004	0,01	0,002	0,01	0,004	0,049	0,695
nach Bonferroni-Holm-Korrektur	p < 0,0083	p < 0,0125	p < 0,0071	p < 0,0166	p < 0,01	p > 0,025	p > 0,05

Tabelle 18: Wilcoxon-Test: NT-proBNP-Konzentration RLX.CHF.001 Gruppe A

NT-proBNP-Konzentration der Gruppe B

Friedmann-Test**Ränge**

	Mittlerer Rang
NT-proBNP-Ausgangswert (-1 h)	6,00
NT-proBNP-Konzentration (8 h)	3,50
NT-proBNP-Konzentration (16 h)	3,83
NT-proBNP-Konzentration (24 h)	4,33
NT-proBNP-Konzentration (26 h (2 h post dose))	3,83
NT-proBNP-Konzentration (32 h (8 h post dose))	3,67
NT-proBNP-Konzentration (48 h (24 h post dose))	3,83
NT-proBNP-Konzentration (240 h (9 d post dose))	7,00
Teststatistiken	
N	6
Chi-Quadrat	11,556
df	7
Asymptotische Signifikanz	p = 0,116

df: degrees of freedom

Tabelle 19: Friedman-Test: NT-proBNP-Konzentration RLX.CHF.001 Gruppe B

Zu 5.2.4

Korrelationsanalyse nach Pearson zwischen Myostatin und NT-proBNP

Korrelationsanalyse nach Pearson RLX.CHF.001 Gruppe A

deskriptive Statistik			
	Mittelwert	Standardabweichung	N
NT-proBNP	2646,45	1306,92	80
Myostatin	54,6	12,94	80
Korrelationen			
		NT-proBNP	Myostatin
NT-proBNP	Pearson-Korrelation	1	0,257
	Signifikanz (2-seitig)		p = 0,021
	N	80	80
Myostatin	Pearson-Korrelation	0,257	1
	Signifikanz (2-seitig)	p = 0,021	
	N	80	80
	p < 0,05		

Tabelle 20: Signifikante Korrelation [$p = 0,021$] zwischen Myostatin und NT-proBNP in der RLX.CHF.001-Gruppe A

Korrelationsanalyse nach Pearson RLX.CHF.001 Gruppe B

deskriptive Statistik			
	Mittelwert	Standardabweichung	N
NT-proBNP	2225,19	1091,83	48
Myostatin	61,19	13,74	48
Korrelationen			
		NT-proBNP	Myostatin
NT-proBNP	Pearson-Korrelation	1	0,074
	Signifikanz (2-seitig)		p = 0,616
	N	48	48
Myostatin	Pearson-Korrelation	0,074	1
	Signifikanz (2-seitig)	p = 0,616	
	N	48	48
	p > 0,05		

Tabelle 21: fehlende Korrelation [$p = 0,616$] zwischen Myostatin und NT-proBNP in der RLX.CHF.001-Gruppe B

10 Abkürzungsverzeichnis

A	Arterie, arteriell
ActRIIB	Activin - Rezeptor IIB Acvr2b
Akt	PkB Name für Proteinkinase B
ALK4	activin receptor-like kinase 4 ActR IB
ALK5	activin receptor-like kinase 5 TßR I
ALS	amyotrophe Lateralsklerose
Arg	Arginin
AS	Aminosäure
Asp	Asparaginsäure
Atrogen	atrophy-related gen
atrogin-1 / MAFbx	atrogin-1 / muscle atrophy F box Muskel-spezifische Ubiquitin-Ligase
bHLH	basic Helix-Loop-Helix- Familie myogenic transcriptionfactors u.a. myoD, myf5, Myogenin, mrf4
BMP	bone morphogenetic protein
Cdk2	Cyclin - dependent kinase 2
CHF	congestive heart failure
Co-Smad	Common - mediator-Smad, collaborating - Smad Smad 4
CS	Coronarsinus
CT	Computertomographie
DCMP	Dilatative Kardiomyopathie
EPU	elektrophysiologische Untersuchung
ERK 1/2	extracellular signal - regulated kinase 1/2 eine MAP-Kinase
FLRG	Follistatin - related gene FSTL-3
FoxO	Forkhead box O
FS	Follistatin
FSTL-3	Follistatin - like-3 FLRG
G-Phase	Gap - Phase
GASP-1	growth and differentiation factor -associated serum protein 1
GDF-11	growth and differentiation factor - 11 BMP-11
GDF-8	growth and differentiation factor - 8 Myostatin
GRE	glucocorticoid response - element

Abkürzungsverzeichnis

GS	Glycin - Serin
GSK-3 β	Glykogen Synthase Kinase 3 β
HF-PEF	heart failure - preserved ejection fraction
HF-REF	heart failure - reduced ejection fraction
I-Smad	Inhibitory - Smad Smad 7
ICMP	Ischämische Kardiomyopathie
IGF- 1	Insulin - like growth factor 1
kb	kiloBasenpaare
kDa	kiloDalton
kVp	KiloVoltpeak Röhrenspannung
LAP	latency associated peptide
lefty	Left - right determination factor 1
LTBP	latent TGF β binding protein
LV	Linksventrikulär
MAD	mothers against decapentaplegic
MAPK	Mitogen - activated protein kinase
MH - Domäne	MAD - homology – Domäne im Smad-Protein
mhGen	muscle hypertrophie gen
MRF	myogenic (oder: muscle) regulatory factor
mRNA	messenger Ribonucleinacid
MSTN	Myostatin - Genlocus
mTOR	mammalian Target Of Rapamycin
MuRF1	muscle RING - finger protein 1 Muskel-spezifische Ubiquitin - Ligase
MW	Molekulargewicht
Myf5	Myogenic factor5 wichtiger Transkriptionsregulator der myogenen Zellproliferation
MyoD	MyogenicDifferentiation wichtiger Transkriptionsregulator der myogenen Zellproliferation
Myogenin	wichtiger Transkriptionsregulator der myogenen Zellproliferation
NS	nicht signifikant
NT-proBNP	N-terminales pro brain natriuretic peptide
p21	Cdk-Inhibitor 1, Cdk-Inhibitor 2 Inhibitor Cyclin-abhängiger Kinasen
p38-MAPK	MAP Kinase p38
Pax-3	Paired - box - gen wichtiger Transkriptionsregulator der myogenen Zellproliferation
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase
ProMyo	Promyostatin
R-Smad	Receptor – regulated - Smad Smad 2, Smad 3
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RLX	Relaxin
RSRR	Arginin-Serin-Arginin-Arginin

Abkürzungsverzeichnis

RT-PCR	reverse transcriptase - polymerase chain reaction
RXXR	Arginin-unbekannte Aminosäure-unbekannte Aminosäure-Arginin
S-Phase	Synthese - Phase
SARA	Smad anchor for receptor activation
Sma	small body size
Smad	small mothers against decapentaplegic
Smurf	Smad ubiquitination regulatory factor Smad-specific E3 ubiquitin - protein ligase
TAK-1	TGF- β activated kinase 1
TGF- β	transformation growth factor - β
TNF- α	Tumornekrosefaktor - α
UPS	Ubiquitin-proteasome System
V	Vene; venös
v/v	Volumenanteil pro Volumenanteil

11 Eidesstattliche Versicherung

Ich, Malte Hofmann, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema:

Myostatin – seine Koronarbilanz und zirkulierende Serumspiegel in Abhängigkeit von kardialem Status und Therapie | Myostatin – its coronary balance and

circulating serum levels depending on cardiac status and therapy selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

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

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

Datum

Unterschrift

12 Lebenslauf

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

Lebenslauf

13 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all jenen danken, die mich durch ihre Aufmunterung und Zuversicht bei meiner Promotion unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Thomas Dschietzig, für die Möglichkeit diese Dissertation unter seiner wissenschaftlichen Leitung anfertigen zu dürfen, sowie seiner anhaltenden Unterstützung und Zielklarheit.

Danken möchte ich Herrn Dr. Ivan Diaz Ramirez für die inhaltlichen Diskussionen über elektrophysiologische Untersuchungen.

Herrn PD Dr. Alexander Lembcke danke ich für die Beratung und Unterstützung bei der Aufarbeitung der Cardio-CT-Daten zur Bestimmung der linksventrikulären Herzmasse.

Für die Unterstützung meiner wissenschaftlichen Arbeit danke ich Herrn Prof. Dr. Gert Baumann.