

Aus dem Institut für molekulare Kardiologie  
der Medizinischen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
eingereicht  
über das Institut für Veterinär-Physiologie  
des Fachbereiches Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

Die Bedeutung der IGF-1 Signaltransduktion für die  
Funktion und Struktur des adulten Mäuseherzens

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Veterinärmedizin  
an der  
Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
Claudia Kessels

Tierärztin  
aus Mönchengladbach

Berlin 2010

Journal-Nr.: 3385

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Leo Brunnberg  
Erster Gutachter: Prof. Dr. Heike Tönhardt  
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Axel Gödecke  
Dritter Gutachter: Univ.- Prof. Dr. Dr. Ralf Einspanier

*Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):*

mice; heart; receptor protein-tyrosin-kinase; insulin-like growth factor;  
hypertrophy; insulin; transgenic animal; Isoproterenol

Tag der Promotion: 26.11.2010

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

ISBN: 978-3-86664-897-5

**Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2010**

Dissertation, Freie Universität Berlin

**D 188**

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2011

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

[verlag@menschundbuch.de](mailto:verlag@menschundbuch.de) – [www.menschundbuch.de](http://www.menschundbuch.de)

1	Einleitung .....	5
1.1	Der insulinartige Wachstumsfaktor 1 (IGF1).....	6
1.2	Charakteristika des insulinartigen Wachstumsfaktor-1-Rezeptors (IGF1R) .....	6
1.3	Die IGF-Bindungsproteine (IGFBP) .....	7
1.4	IGF1R induzierte Signaltransduktion .....	7
1.5	IGF1 vermittelte Effekte.....	9
1.5.1	Apoptoseschutz.....	9
1.5.2	Positiv inotroper Effekt .....	11
1.5.3	Hypertrophie .....	12
1.5.4	IGF1 und Alterung.....	12
1.6	Ziel der Arbeit.....	13
2	Material und Methoden.....	14
2.1	Material .....	14
2.1.1	Geräte und Hersteller .....	14
2.1.2	Chemikalien .....	14
2.1.3	Antikörper.....	14
2.1.4	Enzyme, Lösungen und Reagenzien.....	14
2.1.5	Sonstige Materialien.....	16
2.1.6	Verwendete Software .....	16
2.2	Versuchstiere .....	17
2.3	Methoden .....	18
2.3.1	Induktion des konditionalen Knock Out .....	18
2.3.2	Genotypisierung .....	18
2.3.3	Überprüfung des Exon-3 Ausschnitts nach OHTX Behandlung .....	19
2.3.4	Echokardiographie .....	20
2.3.5	Herzkathetermessungen .....	23
2.3.6	Induktion einer kardialen Hypertrophie mittels Isoproterenol .....	24
2.3.7	Magnetresonanztomographie (MRT).....	25
2.3.8	Präparation von Herz und Lunge.....	27
2.3.9	Histologie .....	28
2.3.9.1	Anfertigung histologischer Schnitte.....	28
2.3.9.2	Kernfärbung mittels DAPI (4`- 6- Diamidino-2`-phenylindol) .....	28
2.3.9.3	Siriusrot-Färbung.....	30
2.3.9.4	Weizenkeimagglutinin - Färbung (Wheat Germ Agglutinin = WGA) .....	31
2.3.10	Immunhistologie .....	33
2.3.10.1	Charakteristika verwendeter HL-1 (Heart Like-1) Zellen .....	33
2.3.10.2	Staurosporin induzierte Apoptose an HL-1 Zellen und Detektion mittels Caspase-3 Antikörper .....	34

2.3.10.2.1	Cleaved Caspase-3-Antikörper Anwendung an Histologieschnitten transgener IGF1R Knock Out Mäusen.....	35
2.3.11	TUNEL- Methode .....	35
2.3.11.1	TUNEL assay an HL-1 Zellen .....	35
2.3.11.2	TUNEL assay an Histologieschnitten.....	37
2.3.12	Statistik .....	38
3	Ergebnisse .....	39
3.1	Genotypisierung.....	39
3.2	Überprüfung des kardiomyozytenspezifischen Exon-3 Ausschnitts nach OHTX Behandlung .....	39
3.3	Bedeutung der IGF1-Signaltransduktion im adulten Herz unter basalen Bedingungen und Altersabhängigkeiten.....	41
3.3.1	Gruppe junger erwachsener Tiere (3 Monate).....	41
3.3.1.1	Ergebnisse der transthorakalen Echokardiographie.....	42
3.3.1.2	Ergebnisse der MRT-Messung .....	44
3.3.1.3	Ergebnisse der intrakardialen Druck-Volumen-Messung .....	45
3.3.1.4	Morphologie des Myokards.....	47
3.3.1.5	Detektion apoptotischer Zellen .....	49
3.3.1.6	Beurteilung der Lunge .....	52
3.3.2	Gruppe gealterter Tiere (10 Monate).....	54
3.3.2.1	Ergebnisse transthorakaler Echokardiographie .....	54
3.3.2.2	Ergebnisse der MRT-Messung .....	56
3.3.2.3	Ergebnisse der intrakardialen Druck-Volumen-Messung .....	58
3.3.2.4	Morphologie des Myokards.....	60
3.3.2.5	Detektion apoptotischer Zellen .....	62
3.3.2.6	Beurteilung der Lunge .....	62
3.3.3	Gruppe gealterter Tiere (10 Monate) unter Isoprotenerol .....	62
4	Diskussion.....	66
4.1	Beeinflussung der kardialen Funktion nach induziertem, herzspezifischem IGF1R KO (iCMIGF1RKO) .....	66
4.2	Weiterführende Arbeiten .....	75
5	Zusammenfassung.....	76
6	Summary.....	78
7	Tabellenanhang .....	80
8	Abkürzungsverzeichnis .....	82
9	Literaturverzeichnis .....	86
10	Danksagung.....	90
11	Selbständigkeitserklärung .....	91

## 1 Einleitung

Herzschwäche, Herzversagen und Herzinsuffizienz sind Synonyme eines Krankheitsbildes, welches aufgrund des gehäuften und immer weiter zunehmenden Auftretens auch als dominierende Herz-Kreislaufkrankung des 21. Jahrhunderts angesehen wird. Ungefähr 1,4 Millionen Einwohner in Deutschland leiden an einer chronischen Herzinsuffizienz und jährlich gibt es 160000 Neuerkrankungen mit einer Inzidenz von 0,2% (54 – 56). Die Prävalenz der Erkrankung steigt mit dem Alter deutlich an und erreicht bei Patienten über 65 Jahre 6-10%. (1, 2). Aufgrund dessen steigt sowohl das öffentliche als auch das wissenschaftliche Interesse, die Grundlagen der Herzinsuffizienz zu erforschen.

Unter dem Begriff Herzinsuffizienz wird nach Definition des „American College of Cardiology Heart Association“ zunächst ein Symptomkomplex verstanden, der durch die Unfähigkeit des Herzens verursacht wird, trotz ausreichendem venösen Blutangebots und trotz Entwicklung kardialer Kompensationsmechanismen für eine ausreichende Organdurchblutung zu sorgen. Die Ursachen dieses Symptomkomplexes sind sehr vielfältig und umfassen sowohl angeborene und erworbene Strukturabnormalitäten des Herzens als auch multifaktorielle Ursachen unter anderem in Kombination mit bekannten Risikofaktoren wie Herzinfarkt, Rauchen, Bluthochdruck, Adipositas und Diabetes mellitus. Mit der Entstehung einer Herzinsuffizienz gehen häufig strukturelle Umbauprozesse einher, die als kardiales Remodeling bezeichnet werden. In Übereinkunft mit dem „International Forum on Cardiac Remodeling“ umfasst der Begriff „Kardiales Remodeling“ alle molekularen, zellulären und interstitiellen Veränderungen, die sich klinisch in einer Veränderung der Größe, Funktion und Gestalt des Herzens manifestieren und mit progressivem Herzversagen einhergehen. Auf zellulärer und molekularer Ebene kann es zur Kardiomyozytenhypertrophie, Nekrose, Apoptose, Fibrose, Fibroblastenproliferation und Zunahme an fibrillärem Kollagen (Typ I, II, III, V, XI) kommen. Funktionell zeichnen sich Veränderungen systolischer und diastolischer Volumina und Druckparameter ab. Morphologisch können sich Formveränderungen des Herzens zeigen, die durch Zunahme der ventrikulären Masse in Form einer Hypertrophie bedingt sind (3).

Herzhypertrophie bedeutet allgemein zunächst eine Herzvergrößerung infolge einer Zunahme der Muskelmasse durch Vergrößerung der Herzmuskelfasern. Da adulte Herzmuskelzellen terminal differenzierte Zellen sind, die sich nicht mehr teilen können, kann eine Zunahme der myokardialen Masse zur Adaption an eine erhöhte Herzarbeit nur durch Größenzunahme bereits vorhandener Zellen ermöglicht werden. Die Ursache einer erhöhten Herzarbeit, welche mit einer Hypertrophie der Herzmuskelzellen beantwortet wird, kann physiologischer und pathologischer Natur sein. Physiologische Hypertrophien sind durch eine physiologische Herzstruktur, ein normales Expressionsmuster und durch eine erhaltene oder sogar verbesserte kontraktile Herzfunktion charakterisiert (4). Die physiologische Hypertrophie ist in der Regel durch eine vollständige Reversibilität und dem Ausbleiben von

Folgekrankheiten gekennzeichnet (5). Pathologische Hypertrophien können dagegen mit verstärkter interstitieller Fibrose, einem veränderten Bild kardialer Genexpression und einer Progression zu linksventrikulärer Dilatation mit Herzinsuffizienz verbunden sein.

Nach heutigem Kenntnisstand geht man davon aus, dass IGF1 (Insulin-like Growth Factor 1) neben seinen metabolischen Effekten im Glukose- und Fettstoffwechsel und seiner Funktion als Wachstumsfaktor auch eine bedeutende Rolle im Rahmen kardiovaskulärer Prozesse spielt (6). Aufgrund seiner beschriebenen hypertrophen Wirkung (4, 7-9) ist IGF1 maßgeblich am Prozess der myokardialen Umstrukturierung beteiligt. IGF1 soll rezeptorvermittelt hauptsächlich über den Phosphoinositid-3 Kinase (PI3Kinase) /AKT (=Proteinkinase B,PKB) Signaltransduktionsweg eine physiologische kardiale Hypertrophie induzieren, die pathologische dagegen soll hauptsächlich über auto- und parakrine Freisetzung neurohormonaler Faktoren durch den Gq/Phospholipase C Signaltransduktionsweg vermittelt werden, bei denen unter anderem Calcineurin, Inositol 1,4,5-trisphosphat ( $IP_3$ ) und verschiedene Isoformen der Proteinkinase C (PKC) involviert sein sollen. PKC kann über  $IP_3$  den PI3Kinase/AKT Signalweg ebenfalls aktivieren. Dadurch kommt es zur Interaktion beider Signalwege (4, 10). Darüber hinaus wird dem IGF1/IGF1R Signalweg eine positiv inotrope Wirkung nachgesagt (11-13), welche bedeutenden Einfluss auf die Leistungsfähigkeit des Herzens nehmen kann. Der postulierte antiapoptotische Effekt des IGF1 (14-16) spielt im Rahmen von Kardiomyopathien als „Survivalfaktor“ eine wichtige Rolle. Betrachtet man die durch IGF1 vermittelten protektiven kardialen Effekte, so könnten GH (Growth Hormon) als positiver Stimulator der IGF1 Sekretion und IGF1 selber als potentielle Kandidaten im Rahmen von Therapien bei Herzinsuffizienz eine Rolle spielen (4, 6).

### 1.1 Der insulinartige Wachstumsfaktor 1 (IGF1)

IGF1 oder auch Somatomedin C ist ein ca. 7,5 kDa kleines Peptid, welches strukturelle Ähnlichkeit mit dem Proinsulin hat (6). 75% des zirkulierenden IGF1 wird unter der Kontrolle des Wachstumshormons (GH) aus der Hypophyse auf endogenem Wege in der Leber gebildet und ins Blut sezerniert, der restliche Anteil wird von anderen Geweben lokal autokrin oder auch parakrin in die Zirkulation abgegeben (6, 17). Die IGF1 Sekretion der Leber wird über eine negative Rückkopplung mit der Hypophyse über GH reguliert. Auf zellulärer Ebene kann IGF1 unter anderem durch Bindung an den membranständigen IGF1-Rezeptor über komplexe Signaltransduktionswege seine verschiedenen Wirkungen entfalten.

### 1.2 Charakteristika des insulinartigen Wachstumsfaktor-1-Rezeptors (IGF1R)

Der IGF1R ist ein membranständiger Rezeptor. Er besteht aus zwei ligandenbindenden  $\alpha$ - (~135 kDa) und zwei transmembranalen  $\beta$ -Untereinheiten (~90 kDa) mit Thyrosin-Kinase-Aktivität. Die Bindungen des IGF1 an die  $\alpha$ -Untereinheit des Rezeptors triggert zum einen die Autophosphorylierung des Rezeptors, zum anderen die Aktivierung der zellulären Signaltransduktionskaskade (18). Der IGF1R weist zum Insulinrezeptor (IR) eine 85%ige Homologie der  $\beta$ -Untereinheit-Tyrosinkinase-Domäne, eine 64-67%ige Homologie zur  $\alpha$ -

Untereinheit der cysteinreichen Domäne und eine 27 %ige Homologie zur  $\beta$ -Untereinheit der transmembranalen Domäne auf (19). Aufgrund dieser Strukturhomologie sind IGF1 und Insulin in der Lage, an den jeweils anderen Rezeptor in Form einer Kreuzreaktion zu binden, jedoch mit 100-fach geringerer Affinität (20, 21). IGF1 und IGF2 binden mit gleich hoher, Insulin dagegen nur mit geringer Affinität an den IGF1R (6). IGF2 bindet den IR mit einer 10-50-fachen, IGF1 mit einer 100-500-fachen geringeren Affinität als Insulin selber (21). In der Literatur wird von der Existenz eines Hybridrezeptors aus IR und IGF1R berichtet, der in verschiedenen Säugetiergeweben, einschließlich des Herzens vorkommen soll. IGF1 soll eine höhere Affinität zu diesem besitzen als Insulin. Bis heute weiß man jedoch nur sehr wenig über dessen physiologische Bedeutung. Eine Gruppe glaubt eine Erklärung darin zu finden, dass durch das alleinige Vorhandensein des IR oder des IGF1R in braunen Fettzelllinien die Möglichkeit eröffnet wird, Zielproteine wie AKT und Mitogen-Activated-Protein-Kinase (MAPK) über beide Metabolite Insulin und IGF1 aktivieren zu können (22). Der IGF1R selbst kommt mit unterschiedlicher Häufigkeit in nahezu fast allen Geweben vor, im Gegensatz zum IR ist er jedoch in Leber- und Fettgewebe vertreten. (6, 23). Die Wirkung von IGF1 über seinen Rezeptor wird durch IGF-Bindungsproteine (IGFBPs) im Plasma moduliert, von denen derzeit sechs verschiedene bekannt sind (24, 25).

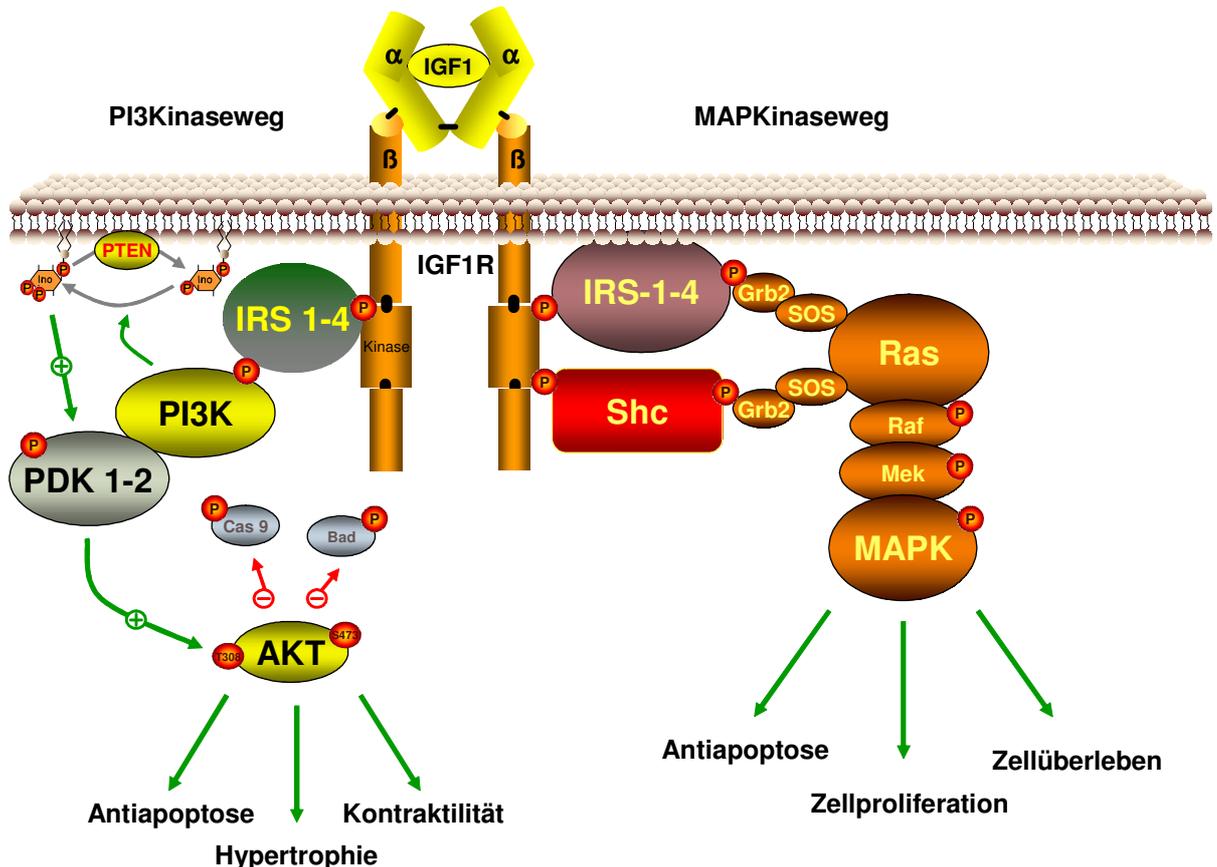
### 1.3 Die IGF-Bindungsproteine (IGFBP)

Die Bindungsproteine, von denen man bis heute sechs (IGFBP1-6) charakterisiert hat, fungieren als Transportproteine der IGFs in der Blutbahn und in anderen Körperflüssigkeiten. Dadurch können sie entscheidend auf die Bioverfügbarkeit und Aktivität dieser Wachstumsfaktoren Einfluss nehmen. Nur ungebundenes IGF1 kann über seinen Rezeptor eine Signaltransduktion und damit auch eine IGF1-Wirkung auslösen (26). IGFBP-3 ist das am häufigsten vorkommende Bindungsprotein, welches aufgrund seiner Größe als einziges IGFBP die Kapillarmembran nicht passieren kann und daher 75%-80% der Gesamttransportkapazität im Blut ausmacht (27). Darüber hinaus hat es im Vergleich zu den anderen Bindungsproteinen die höchste Affinität zu IGF1 und IGF2, wobei die Affinität stark von der Umgebung bzw. dem Kompartiment abhängig ist. Die Affinität von IGF zu IGFBP3 soll sogar größer sein als zu seinem eigenen Rezeptor (16, 17). IGFBP-5 hat z.B. zu IGF1 eine hohe Affinität in interstitieller Flüssigkeit, in extrazellulärer Matrix jedoch sinkt sie auf das 8-15fache (6). Insgesamt liegt IGF1 zu weniger als 1% ungebunden und zu mehr als 99% in Form eines dreifachen Komplexes [IGF1-IGFBP3-ALS (= Acid-Labile Subunit = säurelabile Untereinheit)] vor (17), wodurch zum einen die Lebensdauer in der Zirkulation von 15min auf 16h ansteigt und zum anderen der Wachstumsfaktor vor Proteolyse geschützt wird (24, 28).

### 1.4 IGF1R induzierte Signaltransduktion

Der klassische Weg der Aktivierung durch Rezeptor-Tyrosinkinasen induzierte Signaltransduktion erfolgt im Allgemeinen durch Rekrutierung der Interaktionspartner an den

aktivierten Rezeptor über die Phosphorylierung dieser Bindungspartner an Tyrosinresten. Dadurch entstehen Bindungsstellen für weitere Signalproteine, die dann über die Aktivierung intrazellulärer Signaltransduktionskaskaden zelluläre Effekte auslösen können. Wie Abbildung 1 zeigt, verläuft auch die Weiterleitung IGF1 induzierter Signale nach diesem Prinzip.



**Abbildung 1:** Schematischer Überblick des durch IGF1 vermittelten PI3Kinase- und MAPKinase Signalweges (modifiziert nach (23)).

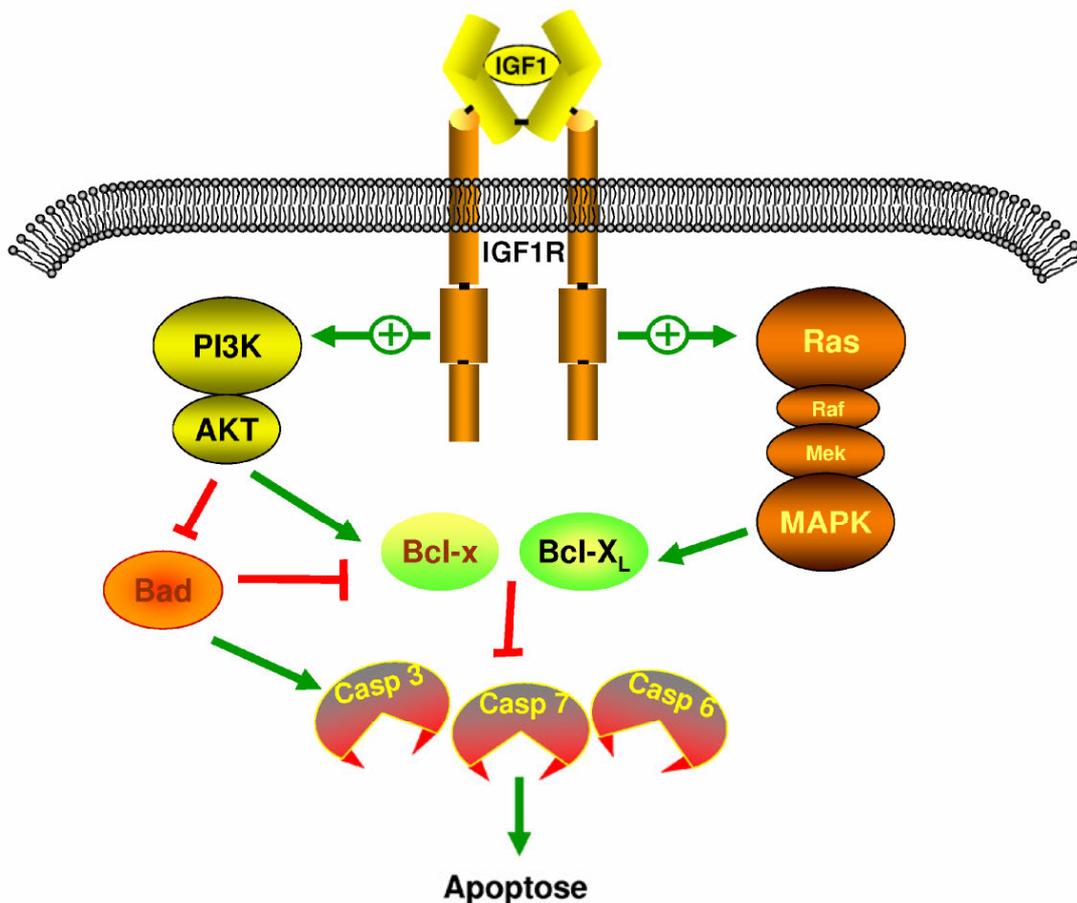
Nach Bindung des IGF1 an den IGF1R kommt es zur Autophosphorylierung des Rezeptors. Dadurch ist die intrinsische Tyrosinkinase des Rezeptors aktiviert und kann verschiedene intrazelluläre Substrate phosphorylieren. Kommt es zur Rekrutierung von Insulinrezeptorsubstrat (IRS)- und Adapter (SHC)- Proteinen an die Membran nahe dem Rezeptor, werden ihre Tyrosinreste phosphoryliert. Damit stellen sie Bindungsstellen für die Src Homologie Domäne (SH-Domäne) des Adaptermoleküls Grb2 dar, welches das SOS Protein (Son Of Sevenless Protein) über seine SH-Domänen koppelt und dadurch zur Membran rekrutiert. SOS katalysiert dort den Austausch von Guanosindiphosphat (GDP) zu Guanosintriphosphat (GTP) in dem GTP-bindenden Protein Ras (Rat sarcoma), welches dadurch aktiviert wird. Dies wiederum aktiviert das Protein Raf (Rapidly growing fibrosarcoma protein) und Mitogen-Activated-Protein-Kinasen (MAPKinasen) und setzt die

Signaltransduktion auf Ebene der Mitose fort. Über diesen Weg vermittelt IGF1 hauptsächlich Zellproliferation, Zelldifferenzierung, Zellüberleben und damit auch einen antiapoptotischen Effekt (29). Alternativ bindet das aktivierte IRS Protein an die p85 Untereinheit der PI3Kinase  $\alpha$  und aktiviert diese. In der Folge wird das membranständige Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat ( $\text{PIP}_2$ ) durch PI3Kinase phosphoryliert und kann in seiner aktiven Form als Phosphatidylinositoltrisphosphat ( $\text{PIP}_3$ ) 3-Phosphoinositid-Dependent Protein Kinase 1 (PDK1) und AKT-Isoformen zur Membran rekrutieren. Ein wichtiger Effektor dieses Signalweges ist die Proteinkinase AKT, welche eine Vielzahl weiterer Zielproteine phosphoryliert und so Proteinsynthese, Apoptose und Metabolismus in Antwort auf IGF1 reguliert. Wird  $\text{PIP}_3$  durch die Phosphatase PTEN (Phosphatase and Tensin homolog) oder SHIP2 zu  $\text{PIP}_2$  dephosphoryliert oder dephosphoryliert SHIP2 IRS-1 und die  $\beta$ -Untereinheit des IGF1R, ist der Signalweg unterbrochen (10, 22, 23, 30).

## 1.5 IGF1 vermittelte Effekte

### 1.5.1 Apoptoseschutz

Der programmierte Zelltod ist ein für die Entwicklung und Aufrechterhaltung eines vielzelligen Organismus lebenswichtiger Mechanismus. Er ist ein aktiver und definierter Prozess, der eine wichtige Rolle in der Regulation der Zellpopulation im Gewebe unter physiologischen und pathologischen Bedingungen spielt. Der Vorgang der Apoptose kann sowohl durch externe, todesrezeptorvermittelte Signale, durch interne mitochondrialvermittelte Signale als auch durch beide Signalwege je nach Zelltyp kombiniert ausgelöst werden. Dabei fungieren die Caspasen als zentrale Initiatoren und Effektoren, die zunächst in ihrer inaktiven Form als Procaspasen synthetisiert werden. Caspase 2,8,9 und 10 zählt man zu den Initiatoren, 3,6 und 7 zu den Effektoren. Die Caspase 3 nimmt eine besondere Stellung ein, da sie als Schlüsselenzym sowohl die über Caspase 8 und 10 externen, rezeptorvermittelten als auch die über Caspase 9 und 2 internen Signale weiterleitet und so in beiden Fällen die Caspasen-Kaskade auslösen kann.



**Abbildung 2:** IGF1 Signaltransduktion und Apoptose. Durch Aktivierung von AKT über den PI3Kinaseweg und Raf über den MAPKinaseweg können proapoptische Proteine der Familie Bcl-2 wie Bad, Bcl-xL und Bcl-x inhibiert werden. Dadurch wird die Aktivierung von Caspasen gehemmt und der antiapoptische IGF1 Effekt vermittelt (modifiziert nach (16)).

Neben der bedeutenden Rolle des IGF1 für Zellwachstum und Zelldifferenzierung wird diesem Faktor auch eine antiapoptische Wirkung zugesprochen. Durch *in vivo* Experimente an Ratten (15) und Mäusen (14) als auch an kultivierten Kardiomyozyten *in vitro* (16) konnte ein antiapoptischer Effekt des IGF1 nachgewiesen werden. Es sind bis heute noch nicht alle Proteine und Interaktionen bis ins Detail identifiziert, welche an diesem protektiven Effekt des IGF1 beteiligt sind. In der Literatur spricht man von dem antiapoptischen Effekt, welcher durch Hemmung des proapoptischen Signalweges durch IGF1 bewerkstelligt wird. IGF1 scheint eine Expression von Proteinen zu induzieren, welche wiederum proapoptische Proteine wie Bad, Bcl-xL etc. in ihrer apoptotischen Wirkung hemmen (31). Bekannt sind jedoch die Schlüsselreaktionen dieser komplexen Signaltransduktionskaskaden. Insbesondere inhibiert die durch IGF1 vermittelte Aktivierung von AKT die Aktivität proapoptischer Initiatorer wie z.B. Bad und Effektoren wie Caspasen. Auch durch die MAPKinasen werden Initiatorer und Effektoren der Apoptosekaskade in ihrer Wirkung gehemmt (32). Umgekehrt konnte dagegen eine IGF1 induzierte Abschwächung der Apoptose durch Hemmung der PI3K verhindert werden (33). In kultivierten Kardiomyozyten

konnte durch Zugabe von Doxorubicin Apoptose ausgelöst werden, die sich durch eine rasche Aktivierung des proapoptotischen Proteins Bax und Caspase 3 bemerkbar machte. Durch Zugabe von IGF1 konnte diese Aktivierung abgeschwächt und so auch der apoptotische Effekt reduziert werden (16). Nach Streptozotizin-induzierter diabetischer Kardiomyopathie transgener Mäuse mit IGF1 Überexpression wurde eine ausgeprägte antiapoptotische Wirkung nachgewiesen, die auf Synthesehemmung von Angiotensin II beruht, einhergehend mit der dadurch bedingten Hemmung der Entstehung spezieller, reaktiver O<sub>2</sub> Radikale (ROS) wie z. B. Nitrotyrosin (15).

### 1.5.2 Positiv inotroper Effekt

Die Kontraktion des Herzmuskels und damit auch eine Steigerung in Form eines positiven inotropen Effektes erfolgt über den komplexen Weg der elektromechanischen Kopplung. Wenn das Aktionspotential (AP) entlang des transversalen Tubulussystems in die Tiefe der Herzmuskelfaser gelangt, kommt es an den dort befindlichen Dihydropyridinrezeptoren (DHPR), welche im Vergleich zu denen der Skelettmuskelfaser Teil eines spannungsgesteuerten Ca<sup>2+</sup>-Kanals sind, zur Öffnung und damit zu einem geringen intrazellulär Ca<sup>2+</sup> Einstrom ins Zytosol. Dieses freigesetzte Ca<sup>2+</sup> triggert eine weitere intrazelluläre Kalziumfreisetzung aus dem Sarkoendoplasmatischen Retikulum (SR) über den myokardialen Ryanodinrezeptor 2 (RYR2), der ebenfalls die Funktion eines Kalziumkanals besitzt. Dieses bezeichnet man als „Calcium Induced Calcium Release (CICR) – Mechanismus“. Die Folge ist eine erhöhte zytoplasmatische Kalziumkonzentration, eine Sättigung der Kalziumbindungsstellen von Troponin C und, dadurch bedingt, eine Aufhebung des Troponin-vermittelten Hemmeffektes des Tropomyosins auf das Filamentgleiten. Die Erschlaffung der Muskelfaser setzt wieder ein, sobald die aktivierte, ATP verbrauchende Kalziumpumpe des Sarkoendoplasmatischen Retikulums (SR-Ca-ATPase) die freien Ca<sup>2+</sup> Ionen wieder aus dem Zytosol ins SR entfernt (57, 58). Durch experimentelle *in vitro* und *in vivo* Studien konnten bis heute einige Erkenntnisse bezüglich des Effektes von IGF1 und GH auf die Kontraktilität des Myokards gewonnen werden. Es konnte an isolierten Rattenherzen gezeigt werden, dass IGF1, nicht aber GH einen direkten positiven inotropen Effekt auf das Myokard hat und die akute IGF1 Wirkung nicht durch eine Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration durch Verlängerung des Einstroms erfolgt, sondern durch eine Steigerung der Affinität des Aktinfilaments bzw. des Troponin C zu Kalzium in Form einer Erhöhung der Ca<sup>2+</sup> Ansprechbarkeit. Weiterhin wurde eine Hemmung der inotropen Wirkung von IGF1 durch Blockade der Interaktion zwischen IGF1 und seinem Rezeptor an isolierten Kardiomyozyten beobachtet. Durch Wortmanningabe konnte der IGF1 abhängige positive inotrope Effekt am isolierten, perfundierten Rattenherzen aufgehoben werden, welches als Hinweis auf eine Beteiligung des durch Wortmannin vermittelten Signalwegs gewertet wird. An diesem Signalweg scheinen neben der PI3K einige bekannte Proteine wie IRS-1, Shc und Crk an der Vermittlung des kontraktiven Effektes beteiligt zu sein

(11, 34). Andere experimentelle Studien beobachteten eine positive Korrelation zwischen dem intrazellulären Kalziumanstieg und der Kontraktilität (12) sowie eine Steigerung des positiven inotropen Effektes durch Synthesesteigerung kontraktiler Proteine mit Beteiligung verschiedener intrazellulärer Enzyme wie Tyrosinkinase, Tyrosinkinasephosphatase, PI3K und Proteinkinase C (13).

### 1.5.3 Hypertrophie

Durch *in vivo* Modelle an Mäusen und Ratten konnte ein durch IGF1 vermittelter hypertropher Effekt am Herzen beobachtet werden (7-9). Es stellt sich jedoch die Frage, wie auf der einen Seite eine physiologische Hypertrophie wie z.B. Herzmuskelwachstum während der Embryogenese und Ausbildung eines Sportlerherzens, auf der anderen Seite aber auch die pathologische kardiale Hypertrophie mit der Folge einer Herzinsuffizienz vermittelt werden. Durch experimentelle Studien wurde die Hypothese aufgestellt, dass die physiologische Hypertrophie größtenteils über den IGF1 induzierten PI3K/AKT Signalweg, die pathologische dagegen durch auto- und parakrine Freisetzung neurohormonaler Faktoren über den Gq/Phospholipase C Signalweg vermittelt wird. Jedoch kommunizieren diese beiden Signalwege auf der Ebene von  $\text{PIP}_2$  und Glykogensynthasekinase-3 (GSK-3), so dass eine genauere Abgrenzung dieser beiden Signalwege schwierig erscheint (5, 7). Zusätzlich konnte durch intensives Schwimmtraining bei Ratten eine Hochregulation des IGF1R sowie eine Erhöhung des IGF1 Serumspiegels beobachtet werden, welches die Bedeutung des IGF1 im Rahmen trainingsbedingter, physiologischer Hypertrophien deutlich macht. Umgekehrt konnte im IGF1R Knock Out (KO) Modell eine erhöhte Aktivität der Adenosinmonophosphat aktivierten Proteinkinase (AMPK) gemessen werden, welche den AKT Signalweg antagonisiert und dadurch den durch IGF1 induzierten hypertrophen Effekt über den PI3Kinase Weg aufhebt. Dies könnte auch die fehlende hypertrophe Antwort der herzspezifischen IGF1R KO Mäuse trotz unveränderter AKT Aktivität erklären (7).

### 1.5.4 IGF1 und Alterung

Wie alle Organe ist auch das Herz im Alter vielfältigen morphologischen und funktionellen Veränderungen unterworfen, die zu einer Abnahme der jugendlichen Belastungsfähigkeit und damit zur Beeinträchtigung der Funktion führen (59). Dem IGF1 Signalweg soll eine bedeutende Rolle im Zusammenhang mit altersbedingten Veränderungen des Herzens zukommen. In epidemiologischen Studien an Menschen unterschiedlichen Alters konnte eine Korrelation zwischen der Zunahme des Alters und einem reduziertem IGF1 Spiegel beobachtet werden (35, 36). Darüber hinaus wird von einer zunehmenden Resistenz der IGF1 Sekretion gegenüber der GH (Somatotropin) Stimulation sowie von einer verminderten Aktivität des GHRH (Growth-Hormon-Releasing-Hormon) mit zunehmendem Alter berichtet, wodurch die GH- und damit auch die IGF1-Sekretion negativ beeinflusst werden. Gleichzeitig soll es zur Zunahme des Somatostatins (GIH) kommen, welches als Gegenspieler des GHRH im Hypothalamus die GH Freisetzung hemmt (37). Eine IGF1 Defizienz wird mit

einem zunehmenden Risiko, an kongestivem Herzversagen zu erkranken, in Zusammenhang gebracht und daraus resultierend mit einer Verkürzung der Lebenserwartung (36, 38). Klinische Studien, wie die Rotterdam Studie, wiesen bei Probanden im Alter zwischen 55 und 75 Jahren eine signifikante Korrelation reduzierter IGF1 Spiegel mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung einer Herzinsuffizienz im Alter nach (35). Auch die Framingham Studie, ebenfalls eine Kohortenstudie mit 717 Personen mit einem Durchschnittsalter von 78,5 Jahren unterstreicht den inversen Zusammenhang zwischen dem IGF1-Serumspiegel älterer Menschen und der Gefahr an kongestiven Herzversagen zu erkranken (36). Bis heute ist allerdings auf Grund der Datenlage noch nicht gesichert, ob IGF1 nun eine Alterung beschleunigt oder verzögert.

### 1.6 Ziel der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war zunächst die Etablierung und Anwendung eines transgenen Mausmodells, bei dem eine zeitliche und zelltypspezifische Deletion des IGF1-Rezeptors (iCMIGF1RKO) in Kardiomyozyten ermöglicht wird, um die herzspezifische und entwicklungsunabhängige IGF1 Wirkung am Herzen überprüfen zu können. Mit diesem Modell sollte zum einen die Fragestellung geklärt werden, welche Rolle die IGF1 Signaltransduktion im adulten Herzen (3 Monate) unter basalen Bedingungen spielt! Im Hinblick auf eine in der Literatur beschriebene und durch klinische Studien belegte IGF1 altersabhängige Funktionseinschränkung des Herzens sollte weiter an einer Gruppe alter Tiere (ca. 10 Monate) untersucht werden, inwieweit sich diese altersabhängigen Effekte bemerkbar machen und ob kardiale Kompensationsmechanismen bestehen! Da die kardiale Hypertrophie als ein Adaptionsmechanismus an veränderte mechanische Belastung des Herzens verstanden wird, sollte nach Induktion einer pathologischen Hypertrophie durch chronische Isoproterenolinfusion mit der Folge einer andauernden  $\beta$ -adrenergen Stimulation der Frage nachgegangen werden, inwieweit IGF1 abhängige Prozesse die Entwicklung einer pathologischen Hypertrophie modulieren!

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte und Hersteller

Fluoreszenzmikroskop Olympus BX50	Olympus, Deutschland
Hellfeldkamera	Sony, Deutschland
Fluoreszenzkamera, F- View UT-TV0,5xC-3	Sony, Deutschland
Mikroskop Stemi 2000	Zeiss, Deutschland
Philips Sonos 5500	Philips, Deutschland
Kryostat/Mikrotom Leica CM 1850	Leica, Deutschland
Beatmungssystem MiniVent Typ 845	Hugo Sachs Elektronik, Deutschland
Kontrolleinheit ARIA™ <sup>1</sup>	Millar® instruments, USA
MICRO-TIP®-Ultra-Miniature Pressure-Volume catheter 1.4 F	Millar® instruments, USA
Thermocycler	Eppendorf, Deutschland
Bruker DRX Widebore Spektrometer	Bruker, USA

#### 2.1.2 Chemikalien

Direct Red (Sigma, Deutschland), Dimethylsulfoxid (Sigma, Deutschland), Essigsäure (Merck, Deutschland), Ethanol (Merck, Deutschland), Isofluran (ABOTT, Deutschland), Isopropanol (Merck, Deutschland), NaCl, Paraformaldehyd (Merck, Deutschland), Ketamin (Ketanest®, Parke-Davis, Deutschland), Pikrinsäure (Merck, Deutschland), Saponin (Roth, Deutschland), SDS (Roth, Deutschland), Staurosporin (Sigma, Deutschland), 4-Hydroxytamoxifen (Sigma, Deutschland), Triton X 100 (Sigma, Deutschland), Xylazin (Rompun®, Bayer, Deutschland), Xylol (Roth, Deutschland)

#### 2.1.3 Antikörper

Primäre Antikörper: Cleaved Caspase-3 (Cell Signaling, USA), Sekundäre Antikörper: FITC-conjugated AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (Jackson Immuno Research, USA), TRITC-conjugated AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (Jackson Immuno Research, USA)

#### 2.1.4 Enzyme, Lösungen und Reagenzien

Ziegenserum (Biozol, Deutschland), Eukitt® (Kindler GmbH & Co, Deutschland), Pro Long® Gold (Invitrogen, Großbritannien), Citifluor (Agar scientific, Großbritannien), Einbettmedium (Jung, Deutschland), Weizenkeimagglutinin FITC markiert (Sigma, Deutschland), ApoAlert®

DNA Fragmentation Assay Kit (Proteinase K, Äquilibrierungspuffer, Nukleotid-Mix (dUTP = 2'-desoxyuridine-5' trisphosphat mit Fluorochrom FITC, Clontech, USA)

### **HL1-Medium**

Claycomb Medium, 10% Fetal bovine serum, 100U/ml:100µg/ml Penicillin/Streptomycin, 0,1mM Norepinephrin, 2mM L-Glutamin

### **Isoproterenol-Lösung**

20µg/g/d in 12µl einer 0,05% igen Ascorbinsäure / PBS-Lösung gelöst

### **PBS (Phosphate Buffered Saline)**

1,3m NaCl, 70mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 30mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

### **Primer**

Die Primer wurden von der Firma Invitrogen bezogen (siehe 2.3.2./2.3.3.)

### **Proteinase K Lösung**

2µl Proteinase K, 998µl 100mM Tris-HCL (pH=8)

### **Proteinase K Puffer**

1% SDS, 50mM Tris (pH = 7,5), 10mM EDTA, 100mM NaCl, 50µg Proteinase K/ml

### **1x SSC (Sodium Chlorid –Sodium Acetat – Sodium Citrat)**

0,15M NaCl, 0,015M Na-Citrat; pH-Wert von 7,0 wird mit HCl oder NaOH eingestellt

### **Staurosporin – Lösung**

1mM in DMSO (10µg/214µL), 0,2µm filtriert

### **Tamoxifen-Lösung (OHTX)**

Stocklösung: 0,5mg 4-Hydroxytamoxifen/ml Erdnussöl

### **Taq DNA Polymerase Kit**

250 Einheiten Taq DNA Polymerase, 10x PCR Puffer, 10x CoralLoad PCR Puffer, 5x Q-Solution, 25mM MgCl<sub>2</sub>;

### **TdT (Terminal-desoxynucleotidyl-Transferase) – Puffer**

45µl Äquilibriumspuffer, 5µl Nukleotid Mix, 1µl TdT-Enzym; in der Negativkontrolle wird das Enzym durch Aqua dest. ersetzt.

### **Tris- HCL**

1M Tris (121g/1L H<sub>2</sub>O); pH-Wert von 7,4 wird mit HCl eingestellt

### **Zamboni – Fixativ**

4% Paraformaldehyd, 15% Pikrinsäure, 0,1M Natriumphosphatpuffer (pH 7,4)

## **2.1.5 Sonstige Materialien**

Lab Tek® II Chamber Slide System (Nalge Nunc International, Dänemark), Deckgläser, Feuchtkammer, Glasküvetten, Kanülen (Braun, Deutschland), Objektträger (Roth, Deutschland), Ultraschall-Kontaktgel (Wasserfuhr, Deutschland), Liquid Blocker pap pen (Plano, Deutschland), Medizinischer Sauerstoff (Linde, Deutschland), Flüssiger Stickstoff (Linde, Deutschland), osmotische Minipumpen (Mini-osmotic pump, Model 2002, alzet®, USA).

## **2.1.6 Verwendete Software**

Enconcert-Anwendung „Diagnose“ Version B. 2.2 (Agilent Technologies, USA)

Cell F Anwendung (Soft Imaging System, Olympus, Deutschland)

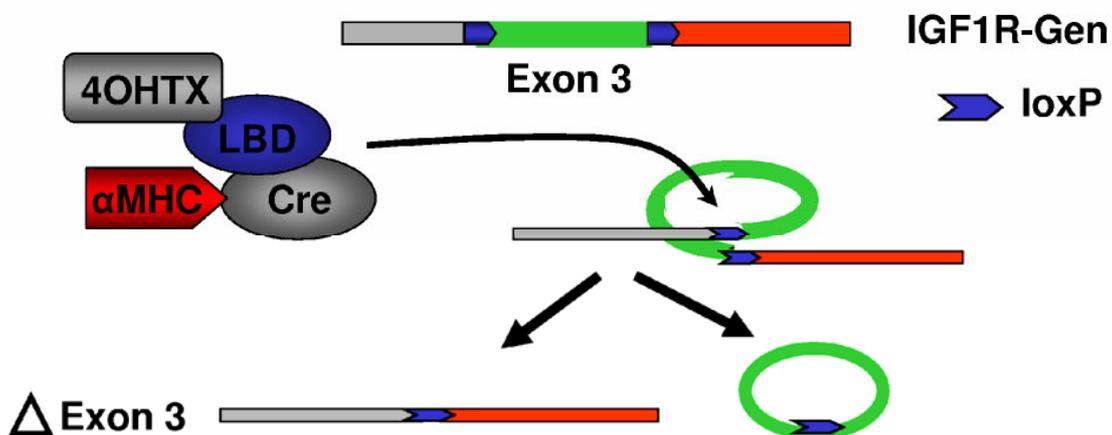
IOX (EMKA Technologies, Frankreich)

Bruker Paravision (USA)

Graphpad software (Graphpad Software Inc., USA)

## 2.2 Versuchstiere

In dieser Studie kam ein transgenes Mausmodell mit einem konditionalen, herzspezifischen IGF1R-KO zum Einsatz (CreloxP-Model). Im Folgenden sei hier noch einmal kurz das Prinzip einer konditionalen IGF-1 Rezeptor Inaktivierung erläutert. Es werden seit einiger Zeit Rekombinasen in der transgenen Technologie zur Erzeugung Gewebe-spezifischer Knock-outs benutzt. Rekombinasen wie Cre katalysieren eine Sequenz-spezifische Rekombination, die bei einer bestimmten Anordnung der Rekombinase-Erkennungs-Stelle (loxP) zur Deletion des zwischen den loxP-Stellen liegenden genetischen Materials führt (siehe Abb. 3). Exprimiert man die Rekombinase Cre nun unter der Kontrolle des kardiomyozytenspezifischen  $\alpha$ -MHC-Promotors, so erfolgt die Expression der Rekombinase und damit auch die Deletionsreaktion nur in Kardiomyozyten. Fusioniert man darüber hinaus die Cre Rekombinase mit einer mutagenisierten Liganden-Bindungs-Domäne (LBD) des humanen Östrogen-Rezeptors, wird diese modifizierte Rekombinase zwar in Kardiomyozyten exprimiert, kann aber die Deletionsreaktion nicht durchführen, da sie unter der Kontrolle der LBD steht und nicht in den Zellkern wandern kann. Erst bei Gabe des Östrogen-Antagonisten 4-OH-Tamoxifen (OHTX), der die mutagenisierte LBD hochaffin bindet, erfolgt ein Transfer der Rekombinase in den Zellkern, wo dann die Deletion erfolgt. Dadurch ist es möglich, ein Gen zeit- und gewebespezifisch zu inaktivieren.



**Abbildung 3: Schema zur konditionalen Inaktivierung des IGF1R Gen.**

Für die konditionale Inaktivierung des IGF1R-Gens bedeutet dies, dass man eine Maus benötigt, in der das Exon 3, das die Liganden-Bindungsstelle der Kinase kodiert, von loxP Stellen flankiert wird (IGF1R-loxP Maus) und eine weitere Maus, die die modifizierte 4-OHTX-regulierbare Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des  $\alpha$ -MHC-Promotors exprimiert (mercremer Maus). (39-43) Beide Linien wurden uns von kooperierenden Arbeitsgruppen zur Verfügung gestellt (Prof. Brünning, Zentrum für Molekulare Medizin der Universität zu Köln, Prof. D Molquentin, Children`s Hospital Medical Center in Cincinnati). Durch Kreuzung beider

Mäuse erhält man doppelt-transgene Tiere, in denen das IGF1R-Gen nach Gabe von OHTX inaktiviert wird. Diese Tiere werden in dieser Arbeit auch als Tg (transgen) oder iCMIGF1RKO Mäuse (induzierter, herzspezifischer IGF1RKO) bezeichnet. Als Kontrollgruppe (Kontr.) dienten Geschwistertiere, die entweder nur für die Cre-Rekombinase oder für die loxP-Stellen positiv getestet wurden. Bei diesen Tieren kann nach OHTX-Gabe kein Ausschnitt des Exon-3 erfolgen.

Die für die Versuche verwendeten Tiere entstammten der 7. Rückkreuzungsgeneration aus dem Stamm C57BL/6. Alle Tiere wurden unter SPF-Bedingungen (Spezifiziert-Pathogen-Frei) gehalten und hatten freien Zugang zu Trinkwasser und Standardfutter. Die Mäuse wurden durch Ohrlochnummern gekennzeichnet und 3 Wochen nach der Geburt abgesetzt. Für diese Studie wurden sowohl weibliche als auch männliche Mäuse verwendet, die in 3 bzw. 10 Monate alte Gruppen eingeteilt wurden. Während des Versuches wurde der Gesundheitsstatus der Tiere überwacht. Das Versuchsvorhaben wurde durch das Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz NRW (LANUV) genehmigt.

## 2.3 Methoden

### 2.3.1 Induktion des konditionalen Knock Out

Zur Induktion des kardiomyozytenspezifischen IGF1RKO wurde als synthetischer Ligand 4-Hydroxytamoxifen (OHTX) verwendet. Mit Hilfe des OHTX, welches zur Gruppe der Antiöstrogene gehört, konnte eine Aktivierung der Cre-Rekombinase und damit der gewebespezifische Knock Out ausgelöst werden. Dazu erhielten alle Versuchstiere 10 intraperitoneale Injektionen von je 100µl (50µg OHTX) im Intervall von 24h. Nur im Falle der doppelt transgenen Versuchstiere führte die OHTX Behandlung zum Ausschnitt des Exons 3 des IGF1R und damit zu einem Funktionsverlust.

### 2.3.2 Genotypisierung

Die Bestimmung des Genotyps aller Versuchstiere erfolgte durch Isolierung genomischer DNA aus der Schwanzspitze. Den Mäusen wurden dafür direkt nach dem Absetzen ca. 2-3mm der Schwanzspitze abgeschnitten, diese in Proteinase K Puffer gegeben und die DNA präpariert. Dazu wurden die Proben über Nacht mit Proteinase K Puffer bei 55°C inkubiert. Die Proteine wurden mit Phenol/Chloroform (1:1) extrahiert und die Phasen durch Zentrifugation getrennt. Aus der wässrigen Phase wurde die DNA mit Isopropanol und 10min bei 14.000rpm bei 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde dann verworfen und das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde kurz getrocknet und über Nacht in 10mM Tris (pH=7,8), 1mM EDTA und 10µg/ml RNase gelöst. Im Anschluss daran erfolgte die DNA Amplifizierung mit insgesamt 40 Zyklen (30sec bei 94°C, 1min bei 55°C, 1min bei 72°C) mittels PCR im Eppendorf Thermocycler mit den komplementären Primern zu den jeweiligen Enden der definierten Sequenz der DNA-Matrize (siehe Tab. 1). Die Kontrolle der amplifizierten DNA Fragmente wurde mit Hilfe der Gelelektrophorese in 1%igem Agarosegel

mit 0,003% Ethidiumbromid vorgenommen, mit der eine Auftrennung von DNA in Abhängigkeit von ihrer Größe möglich ist. Dabei hängt die Wanderungsgeschwindigkeit der DNA Fragmente durch die Gelmatrix zum einen von der Molekülgröße und –konformation, zum anderen von Stromstärke, Porengröße und Pufferbedingungen ab. Die anschließende Identifizierung der resultierten Banden wurde unter UV-Licht durchgeführt, da das verwendete Ethidiumbromid mit der DNA interkaliert und fluoreszierende Komplexe bildet, welche unter UV Licht sichtbar gemacht werden können.

Charakterisierungsziel	Oligonukleotid	
	Sense	Antisense
loxPsite	TTCACCAGTACCATGGGCTCC	TCGTTGTTCTCGGTGCAGGCT
Cre	GTCTGACTAGGTGTCCTTCT	CGTCCTCCTGCTGGTATAG

**Tabelle 1:** Darstellung der Nukleotidsequenzen verwendeter Primer für die Genotypisierung mittels Schwanzspitze.

### 2.3.3 Überprüfung des Exon-3 Ausschnitts nach OHTX Behandlung

Die DNA Präparation und die PCR wurden nach demselben Prinzip wie unter 2.3.2 beschrieben durchgeführt. Der Ausschnitt des Exon 3 des IGF1R in Kardiomyozyten wurde anhand von Gesamtherzextrakten überprüft. Um die Gewebespezifität des KO zu prüfen, wurden von den zu testenden Tieren stichprobenartig weitere Gewebe (Leber, Milz, Niere) entnommen, die DNA präpariert und die entsprechende PCR mit den passenden Primern (siehe Tab. 2) durchgeführt.

Charakterisierungziel	Oligonukleotid	
	Sense	Antisense
loxP flankiertes Exon3	TTCACCAGTACCATGGGCTCC	CTTCAGCTTTGCAGGTGCACG

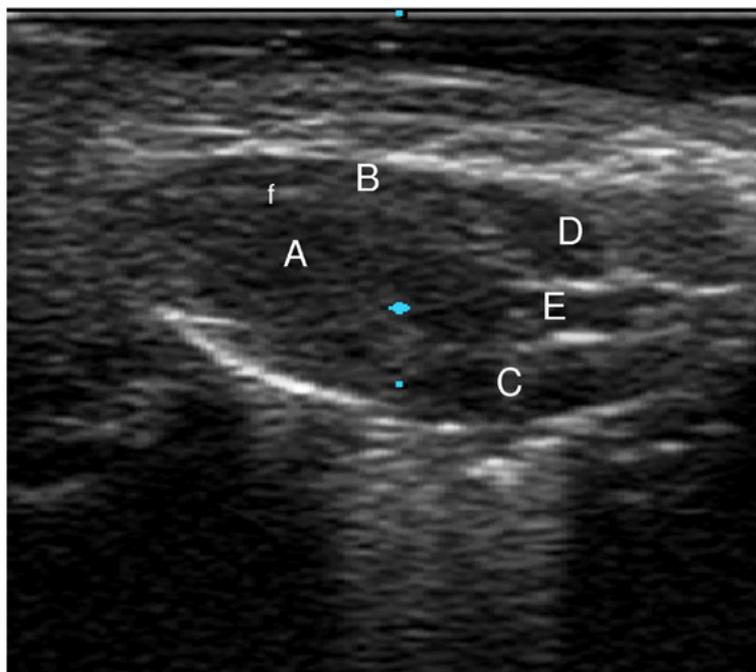
**Tabelle 2:** Darstellung der Primersequenzen zur Überprüfung des Exon 3 Ausschnitts

Diese PCR führte für Wildtyp-Sequenzen (WT) zu einem Fragment von 881bp. Für einfach transgene Tiere mit integrierten loxP-Stellen und ohne Expression der Cre-Rekombinase konnte kein Ausschnitt des Exon 3 erfolgen. Die PCR generierte in diesem Fall ein Fragment von 956bp. Diese Tiere konnten als Kontrolltiere verwendet werden. In doppelt transgenen Tieren, die gleichzeitig die Cre-Rekombinase exprimieren, führt eine OHTX Behandlung zur Aktivierung der Rekombinase und in der Folge zum Ausschnitt des 600bp großen Fragments, das das Exon 3 beinhaltet. Anhand des ca. 356bp großen PCR-Produkts konnte die erfolgreiche Exzision identifiziert werden.

### 2.3.4 Echokardiographie

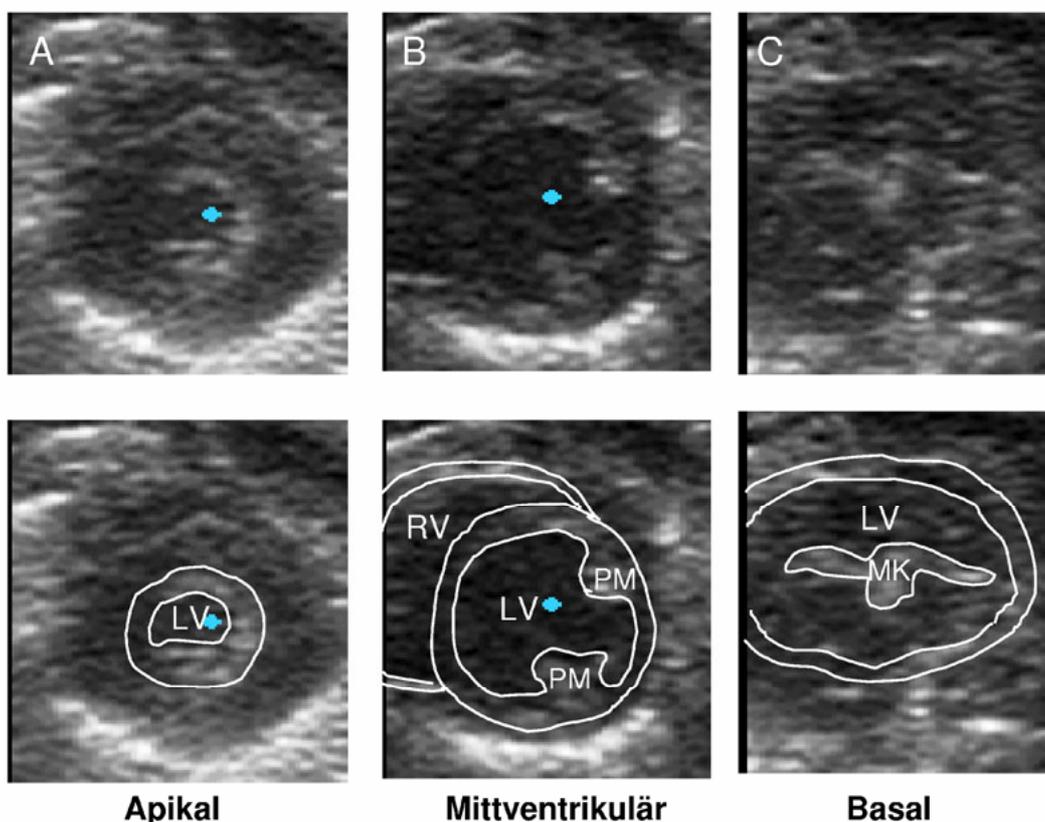
Zur funktionellen Analyse des Herzens wurde ein Ultraschallgerät der Firma Philips (Sonos 5500) verwendet, welches mit einem hochfrequenten, linearen 15,0-6,0MHz Schallkopf (Modell 21390 A) ausgestattet war. Vor jeder Ultraschallmessung wurde das Gewicht der Tiere überprüft und vermerkt. Anschließend wurde jedes Tier separat in eine Narkosebox umgesetzt und zur Narkoseeinleitung mit 3% Isofluran und einem O<sub>2</sub> Fluss von 250ml/min begast. Sobald das Tier keine Mobilisation mehr zeigte, wurde die Isoflurankonzentration auf 1,5% reduziert und das Tier unter Beibehaltung der Narkose auf eine 38°C warme Heizplatte verlegt und weiter über eine Narkosemaske begast. Die Narkosetiefe wurde während der gesamten Untersuchungsdauer mit dem Schwanz- und Zwischenzehenreflex kontrolliert. Für die Untersuchung wurden die Gliedmaßen des Tieres in Rückenlage fixiert, die Haare im Bereich des Thorax mit einem Nassrasierer entfernt und Kontaktgel aufgetragen.

Zur anatomischen Orientierung wurde das Herz zunächst in der parasternalen langen Achse (standardisierte Nomenklatur für Herzbildgebung nach Cardiac Imaging Committee of the American Heart Assoziation (44) im B-Mode (Brightness-Mode) mit einer Eindringtiefe von 2cm und einer Bildwiederholfrequenz (framerate) von 96Hz als Übersichtsaufnahme dargestellt. Mit Hilfe des Tiefenreglers TGC (Time Gain Compensation) konnte das Empfangssignal im jeweiligen Tiefenbereich des Bildes selektiv verstärkt werden und so eine Schallabschwächung im Gewebe kompensiert werden. Dargestellt wurde hier der linke Ventrikel in seiner ganzen Länge mit abgehender Aorta, der dazugehörige Vorhof, das Kammerseptum und je nach Schnitt auch der rechte Ventrikel mit Vorhof (siehe Abb.4).



**Abbildung 4:** Darstellung der parasternalen, langen Achse im B-Mode zur anatomischen Orientierung. A Linker Ventrikel, B Rechter Ventrikel, C Linkes Atrium, D rechtes Atrium, E Aorta und f Kammerseptum.

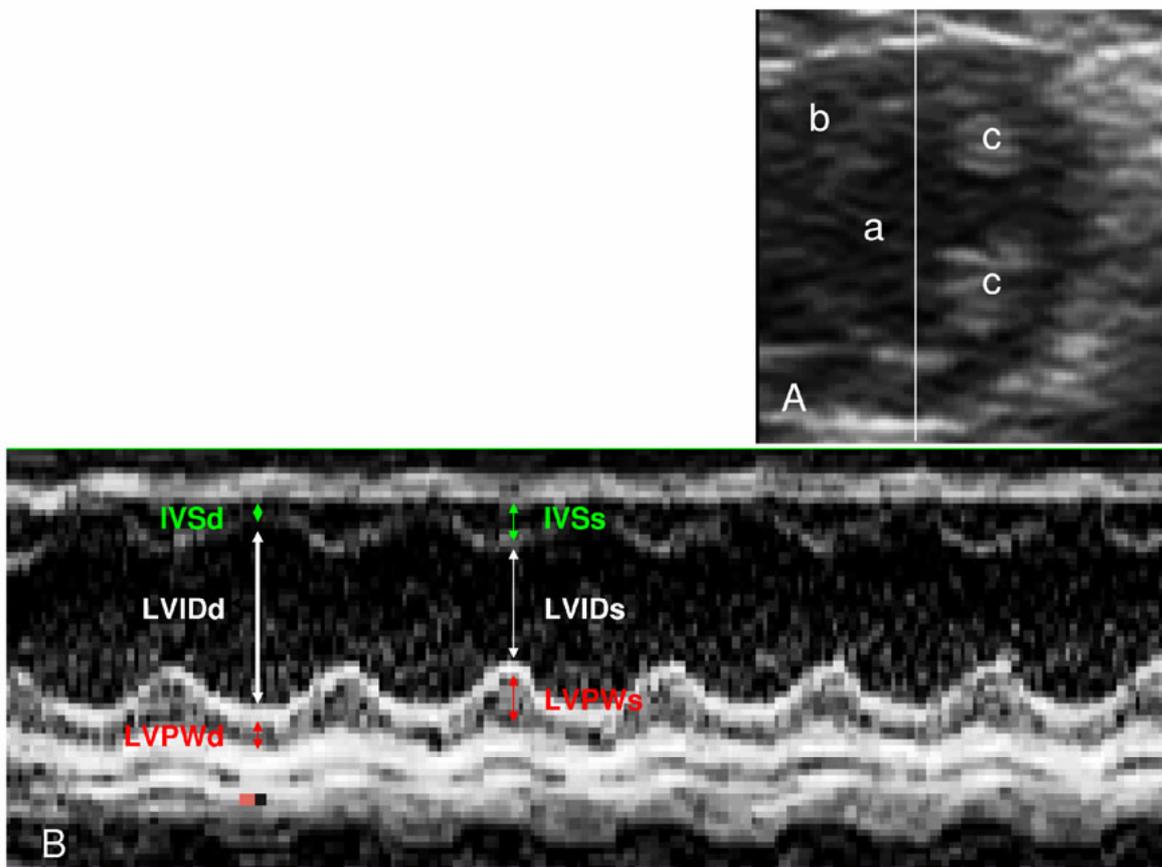
Nach Aufsuchen der genannten Strukturen wurde das Herz dann in der parasternalen, kurzen Achse geschnitten, so dass man einen Querschnitt durch das gesamte Herz erhielt. Um später daraus ermittelte Parameter vergleichen zu können, war es notwendig, die gleiche Ebene innerhalb des Querschnittes zu identifizieren. Das *Committee of the American Heart Association* teilt den Herzquerschnitt in eine apikale Ebene (apical), lokalisiert kurz vor Ende des Kammerlumens in eine mittlere Kammerebene (mid-cavity), charakterisiert durch die Darstellung der beiden prominenten Papillarmuskeln der zweizipfeligen Bikuspidalklappe des linken Ventrikels und in eine basale Ebene (basal), darstellbar durch die Mitralklappe (siehe Abb. 5). In der vorliegenden Studie wurde die mittlere Kammerebene zur Auswertung herangezogen, da sich hier die untersuchten Parameter am deutlichsten darstellten.



**Abbildung 5:** Darstellung der parasternalen kurzen Achse im B-Mode in drei Ebenen nach Nomenklatur des *Committee of the American Heart Association*. A Apikale Ebene, kurz vor Ende des Kammerlumens (apikal), B Mittlere Kammerebene mit den zwei prominenten Papillarmuskeln (PM) der zweizipfeligen Segelklappe (mittventrikulär) und C Basale Ebene des linken Ventrikels mit Abbildung der Mitralklappe (MK) (basal).

Nach Aufsuchen der beiden Papillarmuskeln auf etwa 2 und 5 Uhr im B-Mode wurde dann parallel zu diesem der M-Mode (motion-mode) mit einer Penetration von 2cm und einer Bildwiederholffrequenz von 68Hz aufgezeichnet. Im M-Mode wird im Gegensatz zum zweidimensionalen B-Mode lediglich entlang eines einzelnen Ultraschallstrahls die Bewegung des Herzens dargestellt. Der Schallstrahl für die M-Mode Registrierung wird quer durch den linken Ventrikel gelegt ohne dabei die Papillarmuskeln zu schneiden. Mit Hilfe des

computergestützten Auswertprogramm (Enconcert-Anwendung „Diagnose“ Version B.2.2. von Agilent Technologies) wurde dann anhand des M-Mode Bildes manuell die Grenzen des Kammerseptums (IVSd, IVSs), des linken Ventrikels (LVIDd, LVIDs) und der linksventrikulären Hinterwand (LVPWd, LVPWs) sowohl in der Diastole als auch in der Systole markiert. Um eine größere Genauigkeit der einzelnen Parameter zu erzielen, wurden bei jedem Tier pro Messung 4 verschiedene M-Mode Bilder ausgewertet und aus diesen ein Mittelwert gebildet.



**Abbildung 6:** A Parasternale kurze Achse der mittleren Kammerebene im B-Mode. Die weiße Linie stellt den Schallstrahl zur Registrierung des M-Mode quer durch den Ventrikel dar; a linker Ventrikel, b rechter Ventrikel, c Papillarmuskeln. B M-Mode Darstellung zur Bestimmung linksventrikulärer Parameter; Interventrikuläres Septum in Diastole und Systole (IVSd,IVSs), linker Ventrikelinnendurchmesser in Diastole und Systole (LVIDd,LVIDs) und linke Ventrikelrückwand in Diastole und Systole (LVPWd, LVPWs).

Aus diesen Parametern konnten abgeleitete Größen wie Ejektionsfraktion (EF= ejection fraction), Enddiastolisches Volumen (EDV), Endsystolisches Volumen (ESV) sowie das Schlagvolumen (SV) berechnet werden.

Das Enddiastolische bzw. Endsystolische Volumen ist das Volumen in  $\mu\text{l}$ , welches am Ende der Diastole bzw. der Systole als Restblut im Ventrikel verbleibt. Die angegebenen Werte wurden mit Hilfe der Teichholzformel berechnet:

$$1) EDV = \left( \frac{7}{2,4 + LVIDd} \right) \cdot LVIDd3$$

$$2) ESV = \left( \frac{7}{2,4 + LVIDs} \right) \cdot LVIDs3$$

Die Ejektionsfraktion ist die Menge an Blut in %, die mit jeder Herzaktion aus dem Herzen ausgeworfen wird. Sie wurde nach folgender Formel berechnet:

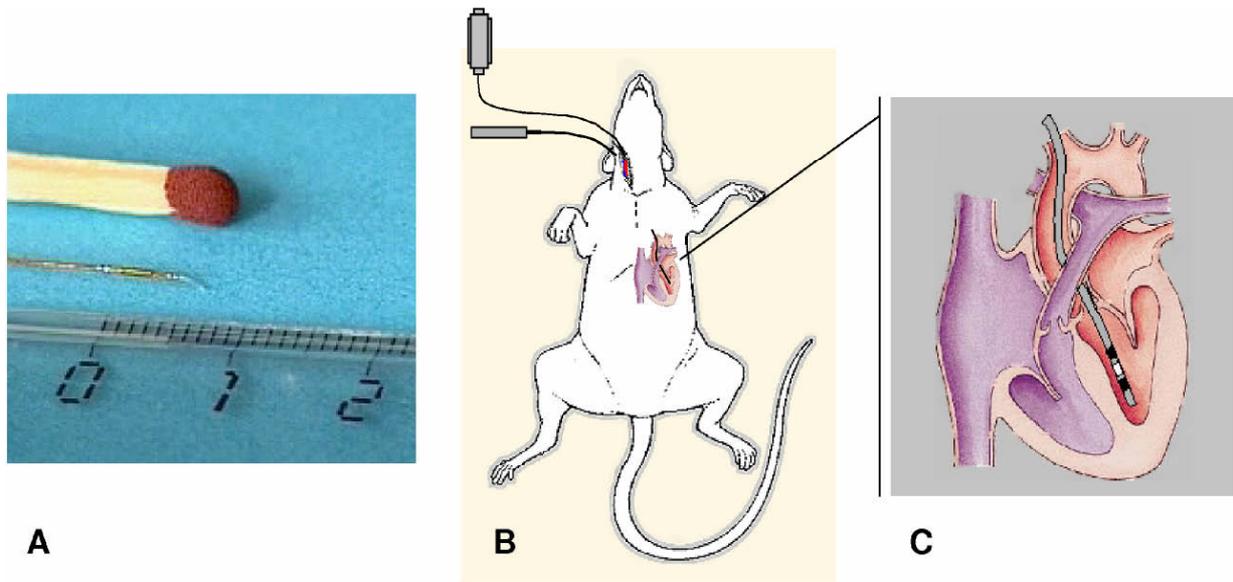
$$3) EF = \left( \frac{EDV - ESV}{EDV} \right) \cdot 100$$

Das Schlagvolumen ist die Differenz aus EDV und ESV und die Menge an Blut in  $\mu$ l, die pro Herzschlag aus dem Herzen gepumpt wird.

$$4) SV = EDV - ESV$$

### 2.3.5 Herzkathetermessungen

Um die Druckentwicklung des linken Ventrikels *in vivo* zu bestimmen, wurde ein miniaturisierter 1.4 F (= 0,42 mm äußerer Durchmesser des Drucksensors) Druck-Volumen Katheter eingesetzt. Die Platzierung des Katheters im linken Ventrikel der Maus erlaubt eine kontinuierliche Aufzeichnung von Druck-Volumenkurven. Dazu wurden die Tiere zunächst anästhesiert und in Rückenlage auf einer 38°C Wärmeplatte fixiert. Nach Inzision der Haut im Halsbereich wurde durch stumpfes Freipräparieren die rechte Arteria (A.) carotis und rechte Vena (V.) jugularis freigelegt. Danach wurde durch einen kleinen Schnitt in die A. carotis der Mikrokatheter durch diese in den linken Ventrikel vorgeschoben (schematisch dargestellt in Abb. 7 B). Sobald die Messwerte stabil waren, wurden sie über eine Minute gemittelt. Die Messung kardialer Blutvolumina mittels Katheter beruht auf einem elektrischen Feld, welches durch die äußere Elektrode des Katheters im linken Ventrikel aufgebaut wird. Die Potentialunterschiede an den inneren Elektroden des Katheters wurden kontinuierlich aufgezeichnet und so die Leitfähigkeit (Konduktanz) zwischen den Elektroden gemessen. Da jedoch die gemessenen Volumina sowohl aus Konduktanz des Blutes als auch des Gewebes (Parallele Leitfähigkeit) ermittelt werden, müssen diese korrigiert werden. Zur Volumenkorrektur wurde einmalig eine hypertone 15%ige NaCl-Lösung über die V. jugularis am Ende jedes Versuchs intravenös injiziert.



**Abbildung 7:** A Größenordnung des 1.4 F Druck-Volumen Katheters; B und C Demonstration der Positionierung des Mikrokatheters durch die A. carotis über den Aortenbogen in die Spitze des linken Ventrikels.

Die kontinuierliche Aufzeichnung der Druck-Volumen Daten erfolgte über die IOX-Software (EMKA Tech, F). Diese Software erlaubte eine online Auswertung folgender Parameter: Herzfrequenz (HF), Schlagvolumen (SV), endsystolischer Druck (Pes), enddiastolischer Druck (Ped), maximale Druckanstiegs- bzw. Druckabfallsgeschwindigkeit ( $dP/dt_{max}$ ,  $dP/dt_{min}$ ), wobei  $dP/dt_{max}$  als Parameter der Kontraktilität und  $dP/dt_{min}$  als Maß für die Relaxationsfähigkeit des linken Ventrikels gilt. Die Zeitkonstante der isovolumetrischen Relaxation Tau wurde durch IOX nach der von Weiss (45) veröffentlichten Methode berechnet.

Aus dem Schlagvolumen ( $SV=$ Stroke volume) kann unter Einbeziehung der Herzfrequenz ( $HR=$  Heart rate) das Herzminutenvolumen ( $CO=$  Cardiac Output) berechnet werden.

### 2.3.6 Induktion einer kardialen Hypertrophie mittels Isoproterenol

Zur Induktion einer kardialen Hypertrophie wurde der  $\beta$ -Rezeptoragonist Isoproterenol verwendet. Isoproterenol (Iso) ist ein synthetisches, nicht selektives Sympathomimetikum, welches sowohl über  $\beta_1$ - als auch über  $\beta_2$ - Adrenozeptoren seine Wirkung entfalten kann. Durch eine rezeptorvermittelte Aktivierung der Adenylatzyklase mit der Folge einer gesteigerten Konzentration des zyklischen Adenosinmonophosphats (cAMP), einer Phosphorylierung spannungsabhängiger  $Ca^{2+}$ -Kanäle und, damit verbunden, einer Zunahme des langsamen  $Ca^{2+}$ -Einstroms während der Depolarisationsphase des AP, wird der positiv inotrope Effekt am Herzen erklärt. Darüber hinaus bewirkt Iso einen positiv chronotropen Effekt, eine Steigerung des Herzminutenvolumens sowie eine Senkung des Blutdrucks. Im Rahmen experimenteller, kardialer Stressmodelle soll die Isoprotenerolapplikation über einen längeren Zeitraum mit einer erhöhten Dosis eine Hypertrophie induzieren. Um eine konstante Abgabe von Isoproterenol zu gewährleisten, wurden den Tieren osmotische Minipumpen

(alzet®) eingesetzt. Die Pumpen bestehen aus einer semipermeablen äußeren Membran, einem Salzmantel und einer inneren impermeablen Membran, die den Füllraum umschließt. Die Osmose bewirkt den Fluss von Körperflüssigkeit durch die semipermeable Membran zum Salzmantel, der durch kontinuierliche Volumenzunahme die im Füllraum vorhandene Flüssigkeit über den Flussregulator nach außen drückt. Vor Implantierung der osmotischen Pumpen wurden diese entsprechend dem Mausegewicht mit einer Dosierung von 20µg/g/d Isoproterenol in 12µl einer 0,05% igen Ascorbinsäure/PBS-Lösung gelöst befüllt. Mit einer Pumprate von 0,5µl/h wurden 12µl dieser Lösung pro Tag über 14 Tage durch Osmose kontinuierlich abgegeben. Die erfolgreiche Befüllung dieser Pumpen wurde durch Wiegen kontrolliert. Zur subkutanen Platzierung der osmotischen Pumpen wurden die Tiere mittels Isoflurannarkose (siehe Kapitel 2.3.4.) narkotisiert, ein kleiner Hautschnitt interskapulär vorgenommen und die Haut vorsichtig von darunterliegendem Muskelgewebe getrennt. Die Pumpen wurden dann mit dem Flussregulator voran durch die kleine Öffnung geschoben und die Haut vernäht.

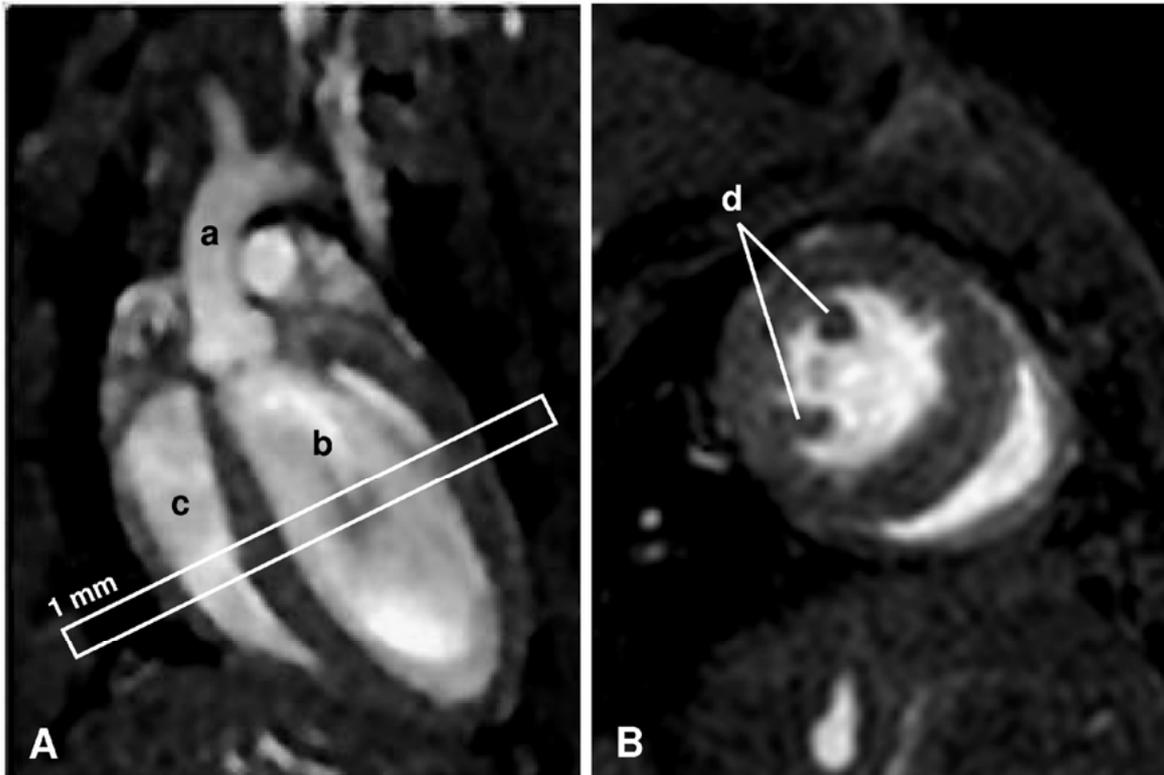
### 2.3.7 Magnetresonanztomographie (MRT)

Neben der Berechnung von Volumina auf der Grundlage eindimensionaler Bestimmung linksventrikulärer Durchmesser mittels Echokardiographie wurden MRT-Messungen durchgeführt, die auf einer kontinuierlichen, tomographischen Vermessung des Herzens in Transversalschnitten beruhen und damit eine dreidimensionale Rekonstruktion des Herzens ermöglichen. Beide Methoden werden als Standardverfahren zur Diagnostik linksventrikulärer Dysfunktionen angewendet (3).

Die Magnetresonanztomographie basiert auf der physikalischen Grundlage elektromagnetischer Anregung von Atomkernen, die sich in Anwesenheit eines Magnetfeldes aufgrund ihres magnetischen Moments, bedingt durch den Eigendrehimpuls (Spin) von Protonen und Neutronen auf bestimmte Art und Weise ausrichten lassen. Gemessen werden die Signale, welche die Kerne während ihres Rückgangs vom angeregten in den Grundzustand erzeugen. Dabei bestimmen u.a. die Anzahl örtlich vorhandener Kerne und auch die Relaxationszeit die Intensität des erzeugten Messsignals. Der hohe Wassergehalt des Körpers liefert Wasserstoffatome, welche als geeignete Protonenspender genutzt werden können.

Für die durchgeführten Herzmessungen an den einzelnen Tiergruppen wurde ein 400MHz Bruker DRX Widebore Spektrometer mit einer Magnetfeldstärke von 9.4Tesla mit einem 40mm Gradientenset verwendet. Vor Messbeginn wurden die Tiere mittels eines Gemischs aus 1,5% Isofluran, 20% med. O<sub>2</sub> und 80% N<sub>2</sub> mit einem Fluss von 75ml/min narkotisiert und die Narkose den gesamten Zeitraum der Messung aufrechterhalten. Nach Platzierung des Tieres im Probenkopf wurden an den vorderen und der linken, hinteren Gliedmaße Elektroden zur Aufzeichnung eines Elektrokardiogramms (EKG) angelegt sowie mittels Drucksensor die Atmung registriert. Die Bildsequenz wurde so getriggert, dass sie genau auf

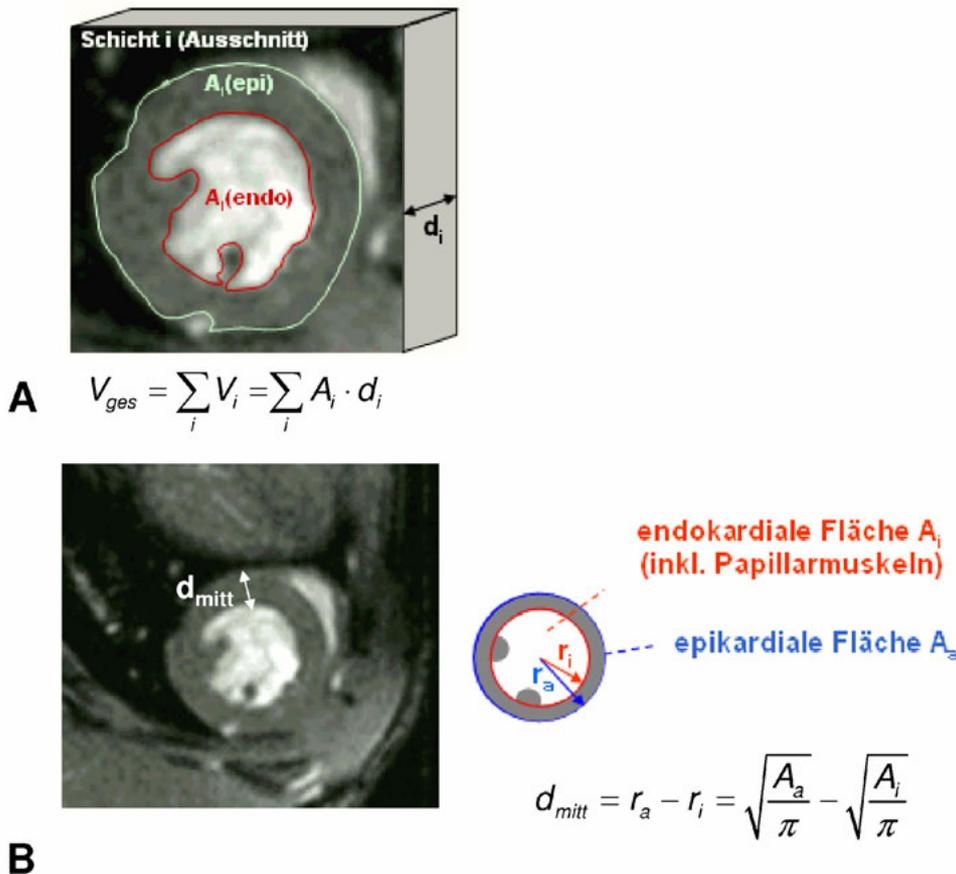
den QRS-Komplex und auf die Expirationsphase fiel, um atem- und EKG-abhängige Artefakte zu unterdrücken. Zur Triggerung der Bildgebungssequenz wurde ein speziell konstruiertes Gerät (SA Instruments M 1025) verwendet. Dann wurde das gesamte Herz durch Transversalschnitte (siehe Abb. 8 B) von 1mm Dicke kontinuierlich tomographisch vermessen und zur späteren Volumenkorrektur ein coronaler Herzschnitt angelegt (siehe Abb. 8 A).



**Abbildung 8:** A Coronaler Herzschnitt mit abgehendem Aortenbogen (a), linkem (b) und rechtem Ventrikel (c); die schwarze Linie zeigt die Schnittebene eines 1mm dicken mittventrikulären Transversalschnittes. B Mittventrikulärer Transversalschnitt mit den zwei prominenten Papillarmuskeln (d) der Bikuspidalklappe des linken Ventrikels.

Die Auswertung der Bilder erfolgte mit der Computersoftware Bruker Paravision. Mit Hilfe des ROI Werkzeugs (Region Of Interest) wurden in der Enddiastole und -systole die endokardialen Flächen  $A_i(\text{endo})$  des linken Ventrikels (siehe Abb. 9 A – rote Markierung) planimetrisch bestimmt und durch Multiplikation dieser Flächen mit der Schichtdicke  $d_i$  die jeweiligen Teilvolumina ermittelt. Durch Summation über alle Schichten wurde das linksventrikuläre enddiastolische und endsystolische Gesamtvolumen  $V_{\text{ges}}$  nach der in Abb. 11 A beschriebenen Formel berechnet. Die Differenz dieser beiden Volumina ergibt das Schlagvolumen. Bezieht man dieses auf das EDV, erhält man die EF. Das Herzzeitvolumen errechnet sich aus der Multiplikation von Herzfrequenz, welche anhand des EKGs abgelesen werden konnte, und dem Schlagvolumen. Für die Berechnung der linksventrikulären Masse wird das Gesamtvolumen des linken Ventrikels benötigt, das durch Bestimmung der epikardialen Außenfläche  $A_i(\text{epi})$  im enddiastolischen Bild rekonstruiert wird (siehe Abb. 9 A – grüne Markierung). Die Differenz zwischen Außen- und Innenvolumen des linken

Ventrikels ergibt das reine Myokardvolumen, aus dem sich dessen Masse ermitteln lässt. Die myokardiale Wanddicke wurde anhand eines mittventrikulären Kurzachsenschnittes, wie er in Abb. 9 B zu sehen ist, bestimmt und lässt sich durch Differenz des epikardialen und endokardialen Radius einschließlich der Papillarmuskeln nach der in Abb. 9 B dargestellten Formel errechnen. Da die letzte, gelegte Herzschicht i.d.R. < 1mm dick ist und somit nicht genau mit der Herzspitze endet, muss die Dicke dieser Schicht mit Hilfe des coronalen Herzschnitts korrigiert bzw. berechnet werden.



**Abbildung 9:** A Berechnung der Gesamtvolumina in Diastole und Systole durch Bestimmung endokardialer  $A_i$  (endo) Flächen (rote Markierung) mit anschließender Summation über alle Schichten unter Berücksichtigung der Schichtdicke  $d_i$ . B Bestimmung der myokardialen Wanddicke  $d_{mitt}$  durch Differenzbildung des epikardialen und endokardialen Radius.

Neben diesen Parametern wurde noch zusätzlich das relative LV-Gewicht (LV-Gewicht/Körpergewicht) in mg/g bestimmt.

### 2.3.8 Präparation von Herz und Lunge

Die Tiere wurden am Ende der Kathetermessung in Narkose getötet. Nach Fixation der Tiere wurde der Brustkorb entlang des Rippenbogens beidseitig eröffnet und nach oben verlagert. Mit wenigen Schnitten wurde das Herz samt dem Lungengewebe vollständig herauspräpariert und sofort in einer physiologischen Pufferlösung das Blut ausgewaschen.

Nach Trennung von Herz und Lungengewebe wurden die Herzvorhöfe abgetrennt und sowohl Herz als auch Lunge gewogen. Nach Bestimmung des Lungenfeuchtgewichtes wurde diese dann für 1-2 Tage zur Ermittlung der Trockenmasse an der Luft getrocknet. Stellt man das Körpergewicht ins Verhältnis zum Herzgewicht, so erhält man das relative Herzgewicht in mg/g. Das Herz wurde dann zur Protein- und DNA Bestimmung sowie für weitere histologische Untersuchungen quer zur Längsachse dreigeteilt.

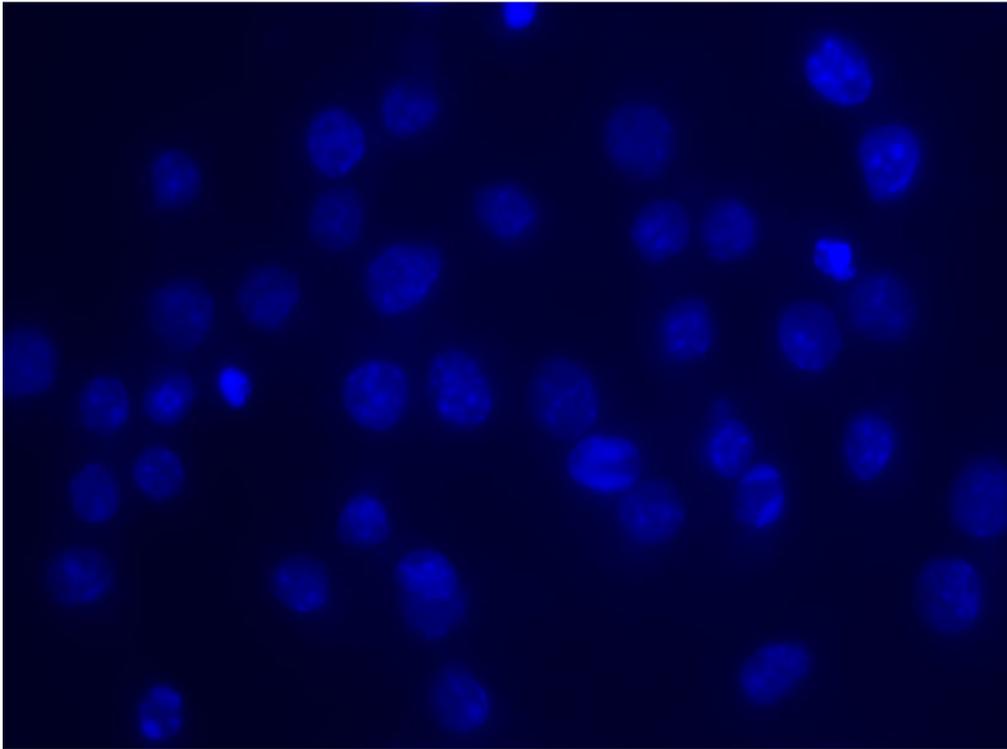
### **2.3.9 Histologie**

#### **2.3.9.1 Anfertigung histologischer Schnitte**

Nach Herausnahme und Dreiteilung des Herzens wurde der mittlere Herzabschnitt für die Histologie vorgesehen. Dieser wurde dann unverzüglich mit Hilfe eines wasserlöslichen Einbettmediums für Gefrierschnitte, einer vorgefertigten Halterung aus Aluminiumfolie und flüssigem Stickstoff eingefroren. Nach Lagerung in einem -80°C Gefrierschrank wurden die Proben zur Weiterverarbeitung mindestens 1h auf -20°C im Kryostaten erwärmt. Nach Aufbettung der Probe wurde mit Hilfe des Mikrotoms die Probe angetrimmt und in der Ebene, in der sowohl linker als auch rechter Ventrikel sichtbar waren, 10µm dicke Schnitte angefertigt. Die Schnitte wurden auf Objektträger überführt, mit einem Fön getrocknet und mikroskopisch kontrolliert. Die fertigen Schnitte wurden im Kühlschrank gelagert.

#### **2.3.9.2 Kernfärbung mittels DAPI (4'-6-Diamidino-2'-phenylindol)**

Das Prinzip der DAPI Färbung beruht auf der Fähigkeit des DAPI Farbstoffes mit der DNA zu interkalieren. Dabei bindet der Farbstoff selektiv an doppelsträngige DNA und bildet stark fluoreszierende DNA-DAPI-Komplexe mit hoher Spezifität (siehe Abb. 10). DAPI wird von Zellen sehr rasch in die DNA aufgenommen, wodurch stark fluoreszierende Zellkerne entstehen, während eine zytoplasmatische Fluoreszenz nicht nachweisbar ist.



**Abbildung 10:** DAPI Färbung an Kernen von HL-1 Zellen nach STS induzierter Apoptose in 1000-facher Vergrößerung; deutlich sichtbar ist hier der stark blau fluoreszierende DNA-Anteil des Chromatins innerhalb des Zellkerns, welches insgesamt aus DNA und Proteinen wie Histonen, Phospholipiden, Glykoproteinen und geringen Mengen an RNA besteht. Abhängig vom Generations- und Zellzyklus wie auch in Apoptose können Chromosomen, wie hier sichtbar, in unterschiedlich strukturellen Organisationsformen auftreten.

Zur Kernfärbung wurde in dieser Arbeit ProLong®Gold (Invitrogen) mit DAPI als gebrauchsfertiges Eindeckmedium verwendet. Dazu wurde nach Aufwärmung des Mediums auf Raumtemperatur ein Tropfen auf jeden Schnitt gegeben und mit einem Deckglas ohne Luftpneinschluss eingedeckt. Die Ränder des Deckglases wurden auf dem Objektträger mit Nagellack fixiert und die Schnitte im Anschluss mit dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet.

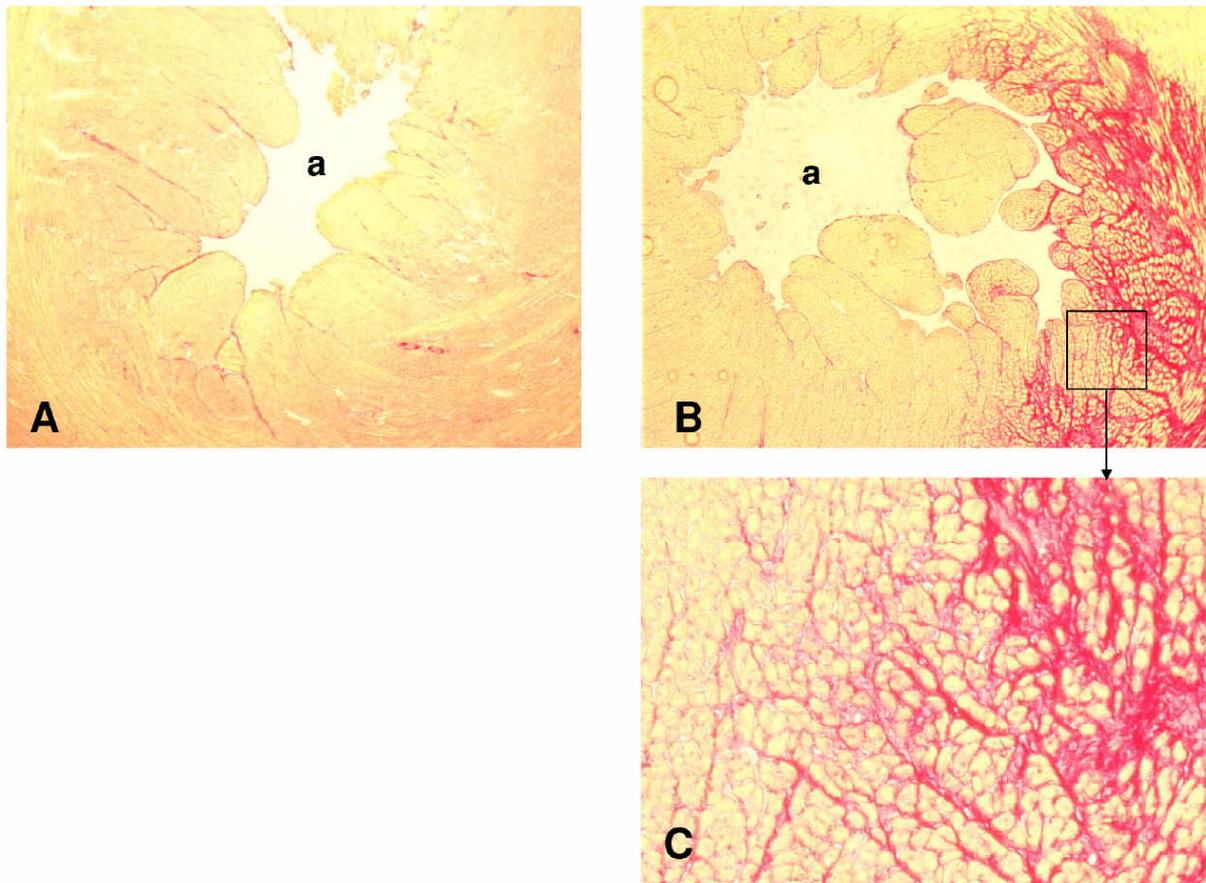
Das Prinzip der Fluoreszenzmikroskopie beruht auf der Fähigkeit von Licht spezieller Wellenlänge, bei Auftreffen auf Fluorochrome durch Absorption von Anregungsphotonen Elektronen aus dem Grundzustand in einen energetisch höheren zu heben. Bei der Rückkehr zum Grundniveau wird die freiwerdende Energie als Fluoreszenzphotonen emittiert. Die geeignete Wellenlänge zur Anregung von Fluorochromen bezeichnet man als Exzitationswellenlänge, die Wellenlänge, bei der eine maximale Absorption von Photonen stattgefunden hat, als Absorptionsmaximum. Fallen nach Anregung die Elektronen wieder in ihren ursprünglichen Zustand zurück, wird diese freiwerdende Energie zum einen als Wärme, zum anderen in Form von Photonen stammendem Fluoreszenzlicht abgegeben. Die Wellenlänge dieses Fluoreszenzlichtes bezeichnet man als Emissionswellenlänge.

Die für das Fluorochrom DAPI geeignete Anregungswellenlänge liegt im ultravioletten Bereich von 350-370nm, die Emissionswellenlänge im sichtbaren blauen Bereich bei 450nm.

Mit den entsprechenden Filtern konnten die Kerne im Fluoreszenzmikroskop dargestellt werden.

### 2.3.9.3 Siriusrot-Färbung

Zur Darstellung möglicher fibrotischer Veränderungen des Myokards wurde die Siriusrotfärbung verwendet. Kollagene Fasern stellen sich bei dieser Färbung rot, andere Gewebeelemente, hier größtenteils Muskelgewebe, leuchtend gelb dar (siehe Abb. 11 A, B, C).



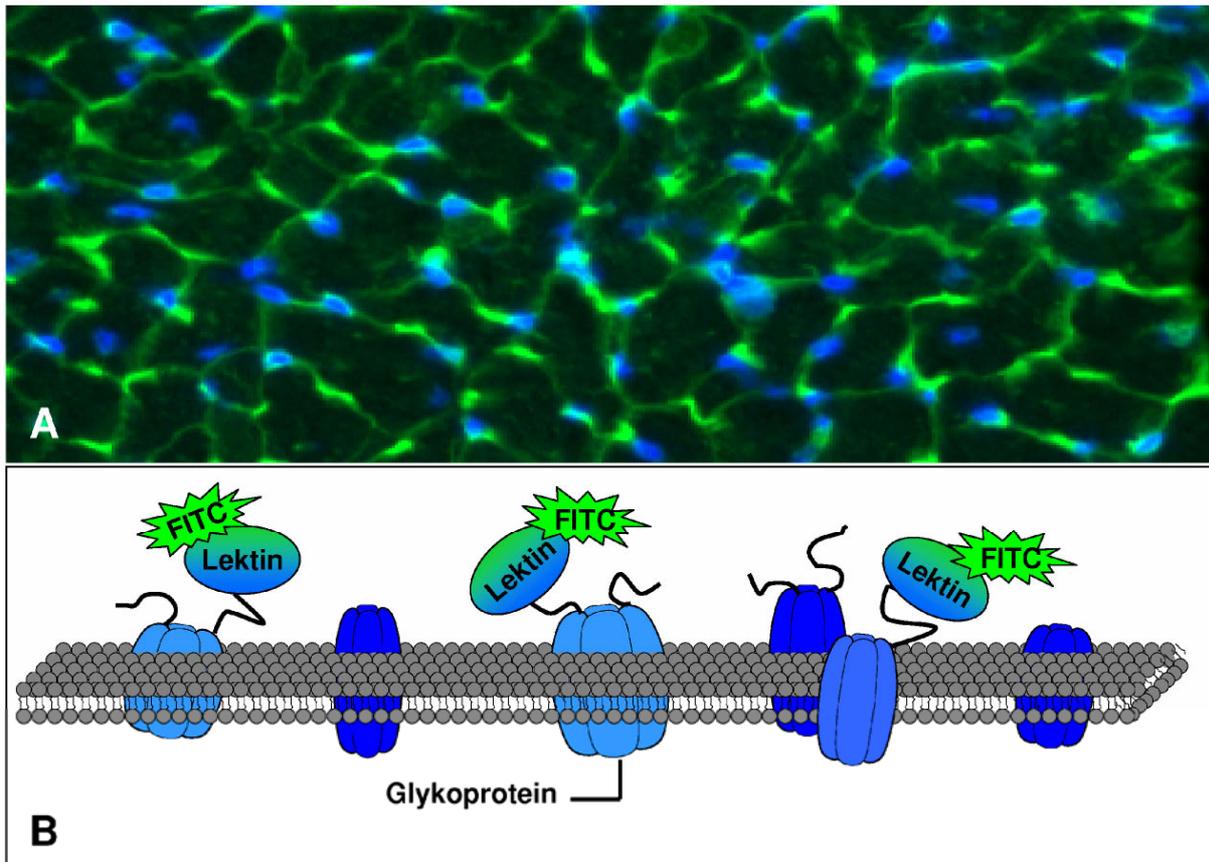
**Abbildung 11:** Sirius Rot Färbung eines 10 $\mu$ m dicken Myokardschnittes in Region des linken Kammerlumens (a) eines Kontrolltieres (A) und eines Herzens mit Troponin I induzierter Myokarditis und Linkswandinfarkt (B) in 40facher Vergrößerung; C 100-fache Vergrößerung des Infarktareals; hier sieht man deutlich eine Verdickung bzw. Zunahme der bindegewebigen Hüllen um die einzelnen Muskelzellen (Endomysium) bzw. um die Muskelbündel (Perimysium).

Die zu färbenden Schnitte wurden zunächst 1h vor Färbungsbeginn bei Raumtemperatur gelagert. Die Färbareale wurden dann zur Minimierung der anzuwendenden Substanzen mit einem Fettstift eingekreist und für 10min mit einer 3% igen Formaldehydlösung in einer Feuchtkammer fixiert. Danach wurde die Fixationslösung verworfen, die Schnitte in einen Färbekasten nach Helledahl überführt und kurz mit Leitungswasser gewaschen. Anschließend wurden die Schnitte noch 2x für je 10min in Leitungswasser inkubiert und dabei auf einem Schüttler bei mittlerer Geschwindigkeit geschüttelt. Zur Herstellung der Färbelösung wurden 0,1g Direct Red und 100ml einer 0,1% konzentrierten Pikrinsäure

verwendet. Es ist darauf zu achten, dass die Säure den festen Stoff vollständig löst. Dann wurde die Färbelösung auf die Schnitte aufgebracht und unter mikroskopischer Kontrolle die Intensität der Färbung bereits nach 1min überprüft. Für 10µm dicke, histologische Schnitte reicht eine Inkubationszeit von 1-5min aus. Danach wurden die Schnitte in eine 0,5% ige Essigsäure überführt und so lange inkubiert bzw. die Essigsäure ausgetauscht, bis die gewünschte Farbintensität unter mikroskopischer Kontrolle vorhanden war. Für die anschließende Entwässerung wurde eine aufsteigende Alkoholreihe benutzt, d.h. die Schnitte wurden für 1min in 80%, 1min in 95% und 2x 10min in 100% Ethanol eingetaucht. Nach der Entwässerung wurden die Schnitte kurz in Xylol gelegt und mit einem speziellen Einbettmedium (Eukitt Kindler GmbH & Co) behandelt. Anschließend wurde jeder Schnitt mit einem Deckgläschen eingedeckt und die Ränder mit Nagellack versiegelt.

### **2.3.9.4 Weizenkeimagglutinin - Färbung (Wheat Germ Agglutinin = WGA)**

Zur histologischen Darstellung der Kardiomyozytenmembran und zur Ermittlung des Kardiomyozytendurchmessers wurde Weizenkeimagglutinin, ein 36kDa großes Pflanzenlektin-Dimer, bestehend aus zwei identischen Glycin- und Cysteinrestuntereinheiten verwendet, welches die Fähigkeit besitzt, an Glykoproteine von Membranen zu binden (siehe Abb. 12 B). Durch Konjugation der Lektine mit dem Fluorochrom FITC kann die Kardiomyozytenmembran im Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden (siehe Abb. 12 A)

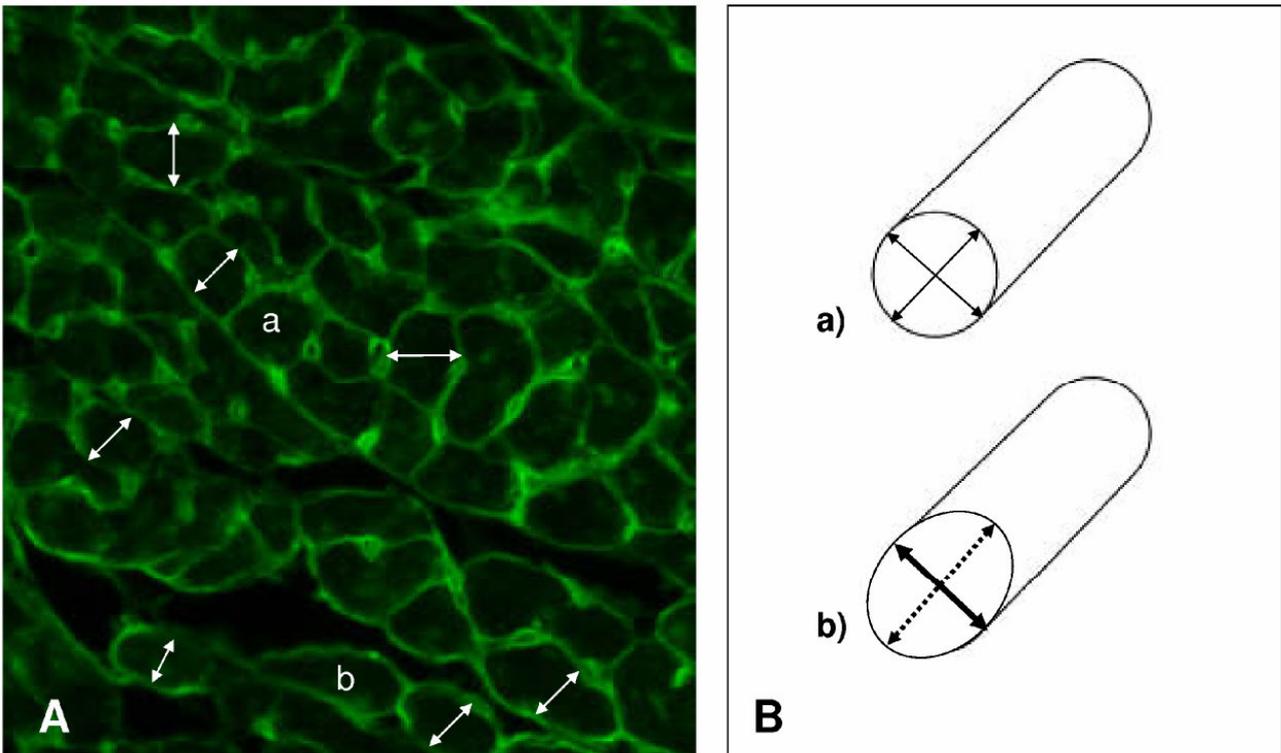


**Abbildung 12:** A Darstellung der grün fluoreszierenden Kardiomyozytenmembran und der blauen Zellkerne mittels WGA und DAPI Färbung, aufgenommen in 200-facher Vergrößerung; B Schema einer Lipiddoppelschicht mit transmembranen Glykoproteinen, welche Bindungspartner für das FITC konjugierte Weizenkeimagglutinin darstellen.

Histologische Schnitte (s.o.) wurden nach einstündigem Lagern bei Raumtemperatur mit einem Fettstift eingekreist und für 10min mit Zamboni-Fixativ inkubiert. Danach wurde einmal kurz mit PBS in einer Glasküvette auf dem Schüttler und danach noch zweimal für je 10min gewaschen und vor dem Auftragen der Färbelösung vorsichtig abgetrocknet. WGA wurde im Verhältnis 1:200 mit PBS und 2% Ziegenserum (Normal Goat Serum = NGS) verdünnt, auf die Schnitte gegeben und für 2h in einer feuchten, abgedunkelten Kammer inkubiert. Danach wurde erneut mehrmals mit PBS in einer mit Aluminiumfolie abgedunkelten Glasküvette gewaschen, die Schnitte getrocknet und mit dem Eindeckmedium ProLong®Gold mit DAPI versehen. Nach dem Auflegen des Deckglases wurden die Ränder mit Nagellack versiegelt. Die Schnitte wurden anschließend mit dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Die Detektion der Färbung erfolgte mittels Fluoreszenzmikroskopie, wie Abb. 14 A entsprechend der Eigenschaften des Fluorochroms FITC mit einer Exzitationswellenlänge von 490nm und Emmissionswellenlänge im grünen, sichtbaren Bereich von 525nm zeigt.

Von jedem Tier wurden insgesamt je 2 Schnitte in einer 200-fachen Vergrößerung aufgenommen, pro Schnitt 50 Kardiomyozyten, davon 25 kleinere und 25 größere nach dem Zufallsprinzip im jeweils kürzesten Durchmesser mit Hilfe der Cell-F-Software manuell

ausgewertet. Das Prinzip der Vermessung ist exemplarisch in Abb. 13 B dargestellt. Aus allen 100 gemessenen Zellen eines Tieres wurde dann der Mittelwert gebildet.



**Abbildung 13:** A Vermessung der Kardiomyozyten in ihrem kürzesten Durchmesser in 200-facher Vergrößerung in der WGA Färbung; B a) Schematisch Darstellung des genauen Querschnitts, B b) des schrägen Anschnitts der Zelle; in diesem Fall wird der kürzere Durchmesser (durchgezogene Linie) angenommen

### 2.3.10 Immunhistologie

#### 2.3.10.1 Charakteristika verwendeter HL-1 (Heart Like-1) Zellen

Zur Überprüfung der im Folgenden beschriebenen Apoptosedetektion mittels Caspase-3 Antikörper und TUNEL assay wurde an HL-1-Zellen durch Staurosporininkubation gezielt Apoptose induziert. HL-1 Zellen wurden von der Forschergruppe Claycomb et al. (46) aus subkutanem Tumorgewebe einer adulten, B6 (Black 6) Maus isoliert und als unsterbliche Zelllinie mit kardiomyozytentypischen Eigenschaften etabliert. Diese Zellen zeigen eine den adulten Kardiomyozyten entsprechende Genexpression, weisen kontraktile Aktivität auf und sind den Kardiomyozyten phänotypisch, physiologisch und pharmakologisch sehr ähnlich. Für die experimentelle Forschung der Herzfunktion nehmen sie eine besonders wichtige Stellung ein, da sie in Zellkultur sowohl nach mehrfacher Passagierung, als auch nach Einfrierung, ihre volle Funktion und Struktur erhalten.

### 2.3.10.2 Staurosporin induzierte Apoptose an HL-1 Zellen und Detektion mittels Caspase-3 Antikörper

Caspase-3, auch bekannt als CPP32, YAMA oder Apopain ist eine Cystein-Protease, die in ihrer inaktiven Form in apoptotischen Zellen synthetisiert wird. In ihrer aktivierten, gespaltenen Form spaltet und aktiviert sie selber als Schlüsselenzym weitere Caspasen, Zielproteine wie DFF und PARP und ist selbst am Abbau der Zellmembran und Teilen des Zytoskeletts aktiv beteiligt. Zur Überprüfung der Spezifität des cleaved Caspase-3 Antikörpers zur Detektion von intrazellulärer Caspase-3 als Indiz für Apoptose und der angewendeten Methode wurden zunächst einige Vorversuche an HL-1 Zellen durchgeführt. HL-1 Zellen wurden auf Fibronectin beschichteten Objektträgern mit aufgesetzter Kammer (LabTec Chamberslides) ausgesät und mit verschiedenen Staurosporinkonzentrationen (STS) inkubiert. Der aus dem Bakterium *Streptomyces staurosporeus* isolierte Naturstoff Staurosporin ist ein unspezifischer Proteinkinase-Inhibitor und hat aufgrund dessen neben seiner fungiziden und antihypertensiven auch eine stark zytotoxische Wirkung. Daher wird er häufig zur Induktion von Apoptose in Säugetierzellen eingesetzt. Es wurden doppelte Konzentrationsreihen von 0 $\mu$ M (HL-1 Medium+DMSO), 0,1 $\mu$ M, 0,314 $\mu$ M, 0,5 $\mu$ M, 1,0 $\mu$ M, 3,14 $\mu$ M, 5,0 $\mu$ M und 10,0 $\mu$ M STS (HL-1 Medium+STS) mit Inkubationszeiten von 24h, 4h und 2h angesetzt. Zur Überprüfung der Spezifität und Intensität des Sekundärantikörpers (TRITC-konjugierter Antikörper im Verhältnis 1:400 mit PBS / Saponin / 2% NGS) wurden Zellen ohne Caspase-3 Antikörper inkubiert. Nach Inkubation bei 37°C im Brutschrank wurde das Medium abgenommen, die gekammerten Objektträger einmal vorsichtig mit PBS gewaschen und für 10min mit Zamboni-Fixativ inkubiert. Nach der Fixierung wurde dann noch zweimal kurz und einmal für 1min mit PBS und dann zur Permeabilisierung der Zellen einmal für 5min mit PBS / 0,1% Saponin gewaschen. Der cleaved Caspase-3 Antikörper wurde im Verhältnis 1:200 mit PBS / 0,1% Saponin / 2% NGS verdünnt und für 1h bei Raumtemperatur aufgetragen. Anschließend wurde der Antikörper verworfen und dreimal mit PBS / 0,1% Saponin gewaschen. Der Sekundärantikörper wurde wie oben beschrieben verdünnt und wirkte nach Auftragen für 3h in einer Dunkelbox ein. Danach wurde die Kammer abgetrennt, erneut mehrmals mit PBS / 0,1% Saponin und zum Schluss nur noch einmal mit PBS für 5min gewaschen. Die Einbettung erfolgte in ProLong®Gold Eindeckmedium.

Im Anschluss an die Immunhistologie wurden Aufnahmen mit dem Fluoreszenzmikroskop angefertigt. Das Fluorochrom Tetramethylrhodamin isothiocyanate (TRITC) hat eine Exzitationswellenlänge von 557nm und ein Emissionsmaximum von 576nm im roten, sichtbaren Bereich. Bei den Zellen wurde der Grad der Apoptose, die Spezifität und Intensität des Sekundärantikörpers sowie die spezifische Bindung des cleaved Caspase-3 Antikörpers beurteilt.

### **2.3.10.2.1 Cleaved Caspase-3-Antikörper Anwendung an Histologieschnitten transgener IGF1R Knock Out Mäusen**

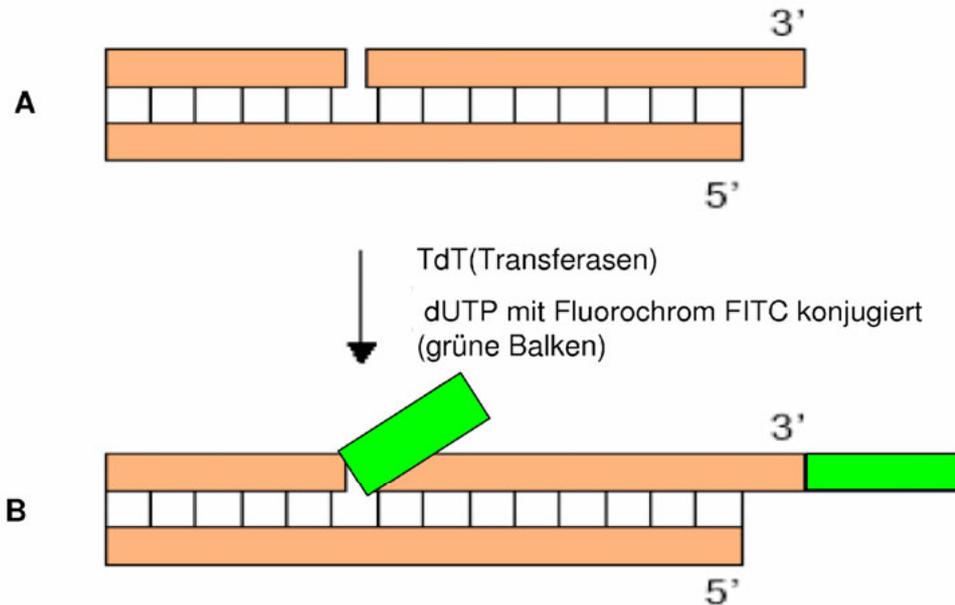
Zur Etablierung der Methode an Histologieschnitten wurde zunächst ein Modell gesucht, bei dem eine erhöhte Apoptoserate zu erwarten war. In dieser Arbeit wurde ein Mausmodell verwendet, bei dem durch Troponin I eine Myokarditis induziert wurde (47). Nach histologischer Präparation (s.o.) wurde für 10min mit Zamboni-Fixativ inkubiert, mehrmals für 10min mit PBS gewaschen und dann zum Permeabilisieren für 5min PBS / 0,1% Saponin aufgetragen. Danach wurde für 15min mit einem Blockierserum, bestehend aus PBS / 0,1% Saponin und 10% NGS, inkubiert. Der Primärantikörper wurde, wie oben beschrieben, 1:200 verdünnt, auf die Schnitte aufgebracht und über Nacht im Kühlschrank gelagert. Nach erneutem Waschen mit PBS / 0,1% Saponin am nächsten Tag, wurde der zweite Antikörper im Verhältnis 1:400 (s.o.) verdünnt, aufgetragen und für 3h in einer Dunkelkammer inkubiert. Nach Waschen mit PBS / 0,1% Saponin und alleinigem PBS wurden die Schnitte mit dem Eindeckmedium eingedeckt. Nach diesem oben beschriebenen Färbevorgang wurde auch mit den Schnitten der IGF1R Knock Out Tiere verfahren. Die angefertigten Schnitte wurden dann unter dem Fluoreszenzmikroskop mit den bereits oben beschriebenen Anregungs- und Emissionswellenlängen der Fluorochrome TRITC und DAPI begutachtet.

Zur Auswertung wurden jeweils pro Tier ein Schnitt und ein Kontrollschnitt, d.h. ohne Primärantikörper verwendet. Als Positivkontrolle dienten Schnitte des Myokarditis-Maus-Modells. Hier wurden exemplarisch in einem Gesichtsfeld in einer 1000-fachen Vergrößerung alle positiven Signale gezählt und mit Hilfe der DAPI Färbung und der Kontrolle geprüft, ob diese Signale mit apoptotischen Zellen deckungsgleich waren oder es sich um Artefakte handelte.

### **2.3.11 TUNEL- Methode**

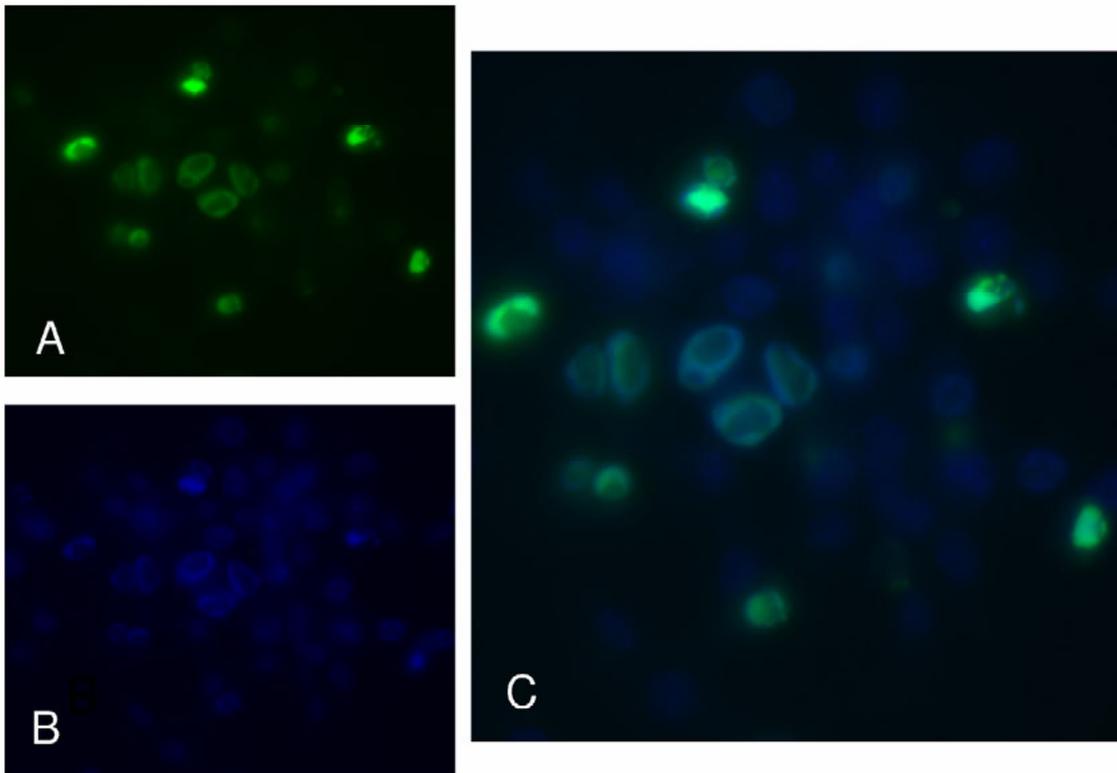
#### **2.3.11.1 TUNEL assay an HL-1 Zellen**

Der TUNEL assay (Terminal-desoxynucleotidyl-Transferase mediated dUTP nick end labeling assay) ist, neben der immunhistologischen Caspase-3 Detektion mittels Antikörper, eine weitere Methode zur Darstellung apoptotischer Zellen. Hierbei wird mit Hilfe des Enzyms TdT fluoreszenzmarkierte dUTP (2'-desoxy-Uridin-5'-Tri-Phosphat) an freie 3'-OH-Enden degradierter DNA apoptotischer Zellen gehangen und diese mittels Fluoreszenz sichtbar gemacht (siehe Abb. 14 A, B).



**Abbildung 14:** Schematische Darstellung der TUNEL-Methode. A Während des Vorgangs der Apoptose kommt es zur Fragmentierung der DNA. Bei diesen Strangbrüchen werden 3'OH-Enden frei. B Das Enzym Terminale-desoxynukleotidyl-Transferase (TdT) katalysiert den Einbau von Fluorochrom konjugierten Nukleotiden 2'-desoxy-Uridin-5'-Tri-Phosphat (dUTP) an die freien OH-Enden fragmentierter DNA, welche im Fluoreszenzmikroskop sichtbar werden.

Parallel zu den Vorversuchen der Immunhistologie mit Caspase-3-Antikörper wurden die HL-1 Zellen hier nach dem gleichen Schema mit Staurosporin inkubiert. Nach Abwaschen des STS und Abtrennen der Kammer wurde einmal für 5min mit PBS gewaschen und die Zellen für 25min bei 4°C mit 4% Formaldehyd in PBS fixiert. Danach wurde erneut zweimal für 5min mit PBS gewaschen und die Zellen für 5min mit 0,2% Triton X-100 in PBS auf Eis permeabilisiert. Nach erneutem mehrmaligen Auswaschen mit PBS wurden die Zellen mit einem Äquilibriumspuffer (ApoAlert® DNA Fragmentation Assay Kit) bedeckt und 10min. bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde dann auf allen Zellen mit Ausnahme der Kontrolle der TdT-Puffer, bestehend aus Äquilibriumspuffer, Nukleotid-Mix und dem Enzym TdT selber aufgetragen. Der Puffer der Kontrolle enthielt an Stelle des Enzyms eine gleiche Menge an deionisiertem Wasser. Für 60min wurden die Zellen dann in einer abgedunkelten, feuchten Kammer bei 37°C in den Brutschrank gestellt. Anschließend wurde die enzymatische Reaktion durch 15 minütiges Waschen der Zellen mit SSC gestoppt. Nach Waschen mit PBS und zum Schluss mit deionisiertem Wasser, wurden die Zellen in ProLong®Gold mit DAPI eingedeckt und unter dem Fluoreszenzmikroskop begutachtet. Abb. 15 A zeigt die tunnelpositiven Signale, die mit Zellkernen z. T. apoptotischer Zellen (15 B) deckungsgleich sind (15 C).



**Abbildung 15:** A Darstellung grüner, positiver Signale, die mittels TUNEL Methode in einer 1000-fachen Vergrößerung an HL-1 Zellen detektiert wurden; B Anfärbung von Kernen mit DAPI; hier erkennt man, dass Chromatin kondensiert und sich randständig an die Kernmembran angelagert hat. C Die positiven Signale sind mit den veränderten Kernen deckungsgleich.

### 2.3.11.2 TUNEL assay an Histologieschnitten

Das an HL-1 Zellen etablierte Protokoll wurde auf Gewebeschnitte der Maus übertragen. Nach 15 minütiger Fixation mit 4% Formaldehyd in PBS und Waschen in PBS wurden die Schnitte mit einer Proteinase K-Lösung (20µg/ml 100mM Tris-HCl, ph=8) für 5min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde erneut mit 4% Formaldehyd für 5min fixiert, wieder mit PBS gewaschen und die Schnitte für 10min mit Äquilibrierungspuffer bedeckt. Der weitere Ablauf entspricht genau dem, welcher auch bei den HL-1 Zellen angewendet wurde (s.o.).

Die bearbeiteten Schnitte wurden wieder unter dem Fluoreszenzmikroskop mit den passenden Anregungs- und Emissionswellenlängen der Fluorochrome FITC und DAPI gemustert. Zur Auswertung wurden pro Tier jeweils ein Schnitt und ein Kontrollschnitt verwendet. Als Positivkontrolle dienen Schnitte des Myokarditis-Maus-Modells. Hier wurden exemplarisch in einem Gesichtsfeld in einer 1000-fachen Vergrößerung alle positiven Signale gezählt und mit Hilfe der DAPI- Färbung und der Kontrolle geprüft, ob es sich hier um fragmentierte DNA bzw. um Zellen in Apoptose oder um Artefakte handelte.

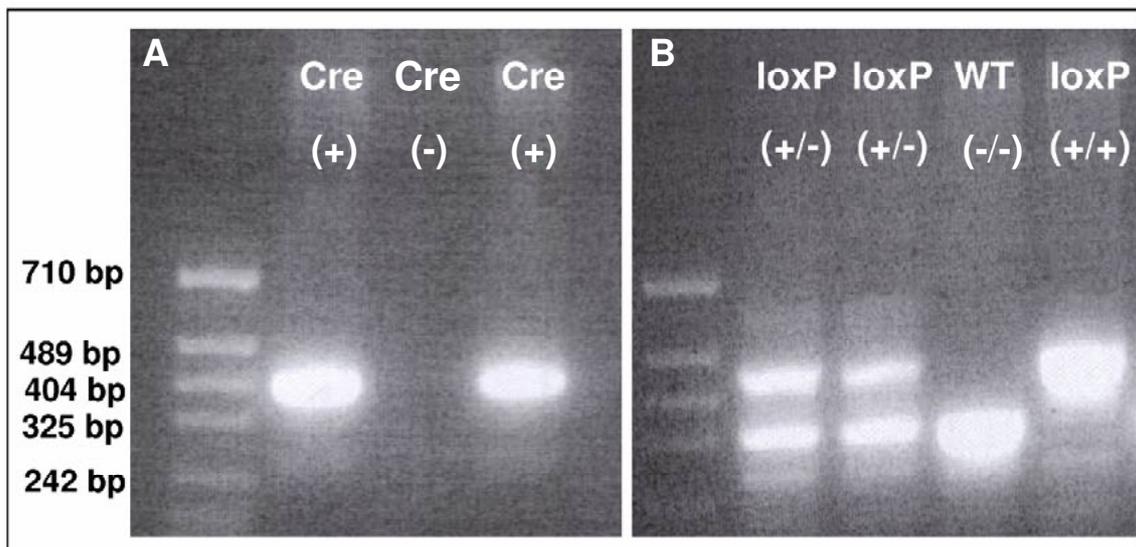
### **2.3.12 Statistik**

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm Graphpad prism (Graphpad Software Inc., USA). Alle funktionellen Parameter wurden auf statistische Signifikanz überprüft. Ein p-Wert von  $<0,05$  wurde als signifikant betrachtet. Die Unterschiede bei der echokardialen Verlaufsuntersuchung sowie bei der MRT Messung zwischen Kontroll- und iCMIGF1RKO Tieren wurden mit Hilfe der zweifaktoriellen ANOVA (Analysis Of Variance) analysiert. Die Daten der einmaligen Druck-Volumen-Kathetermessung sowie einiger morphologischer Parameter wurden mit dem unpaarigen t-Test analysiert. Die arithmetischen Mittelwerte wurden mit Standardabweichung angegeben. Alle Daten wurden von Dipl.-Math. Dr. Dieter Hafner aus dem Institut für Pharmakologie und klinische Pharmakologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf auf statistische Richtigkeit überprüft.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Genotypisierung

Direkt nach dem Absetzen wurden die Tiere, wie in Kapitel 2.3.2. beschrieben, anhand von Schwanzspitzenbiopsien genotypisiert. Überprüft wurde das Vorhandensein der Cre-Rekombinase und der beiden LoxP Stellen. Aus der PCR zur Charakterisierung der Cre-Rekombinase konnte die Aussage getroffen werden, ob die Tiere Cre positiv (Cre+) oder Cre negativ (Cre-) waren (siehe Abb. 16 A). Im Falle der LoxP-Stellen konnte über die entsprechende PCR sowohl die wildtypische Situation (WT = LoxP<sup>-/-</sup>) als auch das Vorhandensein einer LoxP-(LoxP<sup>+/-</sup>) bzw. beider LoxP-Stellen (LoxP<sup>+/+</sup>) dargestellt werden (siehe Abb. 16 B). Nur in Tieren, die sowohl die Cre-Rekombinase als auch beide LoxP-Stellen besitzen, kann der KO induziert werden. Diese Tiere repräsentieren die Versuchsgruppe. Tiere, die ausschließlich positiv für die Cre-Rekombinase sind oder solche, die nur die LoxP-Stellen besitzen, wurden in dieser Arbeit als Kontrolltiere genutzt. Da die LoxP-Stellen in den Introns lokalisiert sind, entsprechen diese Tiere vom Genexpressionsmuster wildtypischen Tieren.

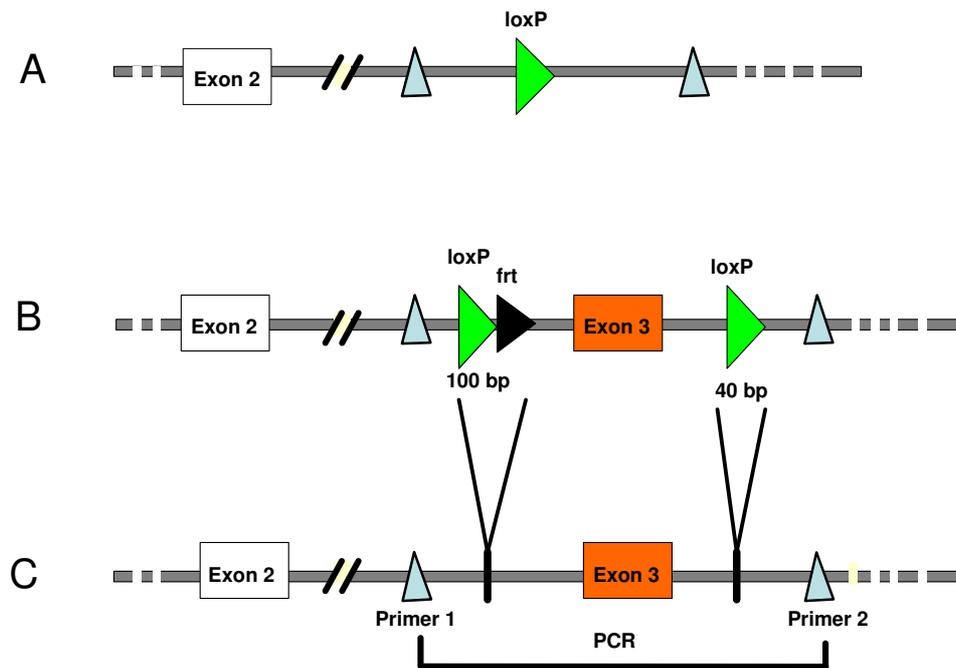


**Abbildung 16:** Auftrennung von Fragmenten mittels Gelelektrophorese. Links ist die Ladekontrolle mit den entsprechenden Basenpaaren (bp) dargestellt. Cre (+) repräsentiert das Fragment eines Tieres mit exprimierter Cre-Rekombinase, loxP (+/-) ist das Fragment eines Tieres mit einer, loxP (+/+) eines mit zwei vorhandenen loxP Stellen sowie das Wildtypfragment WT loxP (-/-)

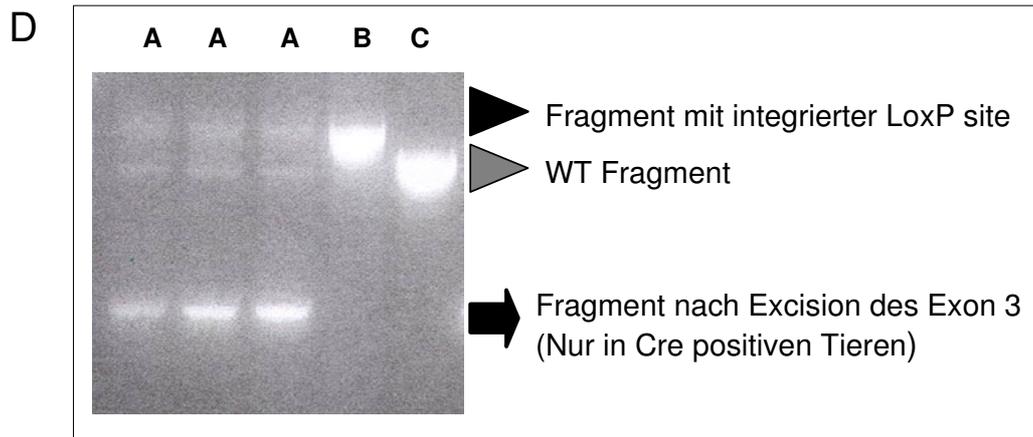
#### 3.2 Überprüfung des kardiomyozytenspezifischen Exon-3 Ausschnitts nach OHTX Behandlung

Die Überprüfung der erfolgreichen Gendeletion nach OHTX Behandlung erfolgte mittels PCR und Gelelektrophorese (siehe Abb. 18). In WT Mäusen führte die PCR zur Amplifizierung eines 881bp Fragments (siehe Abb. 18; Laufspur C), welches in Abb. 17 C schematisch

dargestellt ist. Durch die Insertion der loxP- und einer zusätzlichen frt- Stelle (flippase recognition target) wird dieses Fragment bei den loxP-flankierten Exon 3 Sequenzen um 75bp vergrößert (siehe Abb. 17 B und 18; Laufspur B). Bei erfolgreicher Exzision des Exon 3 Ausschnitts resultiert ein 356bp Fragment (siehe Abb. 17 A und 18; Laufspur A), welches die doppeltransgenen Mäuse (Tg oder iCMIGF1RKO) repräsentiert. Tiere ohne Exon 3 Ausschnitt, wie hier anhand der PCR in Abb. 18 Laufspur B und C identifiziert, wurden als Kontrolltiere (Kontr.) benutzt.



**Abbildung 17:** A zeigt schematisch den Genabschnitt nach Exzision der geflochten Exon 3 Sequenz. Dieses DNA Segment wird nur bei einer geflochten Zielmaus, die Cre gewebespezifisch nur in Kardiomyozyten exprimiert, nach Aktivierung des Promotors, unter dessen Kontrolle Cre steht, herausgeschnitten. In B ist der loxP flankierte Genabschnitt dargestellt, welcher das Exon 3 des Zielgens enthält. C repräsentiert die Gensequenz eines WT Tieres.

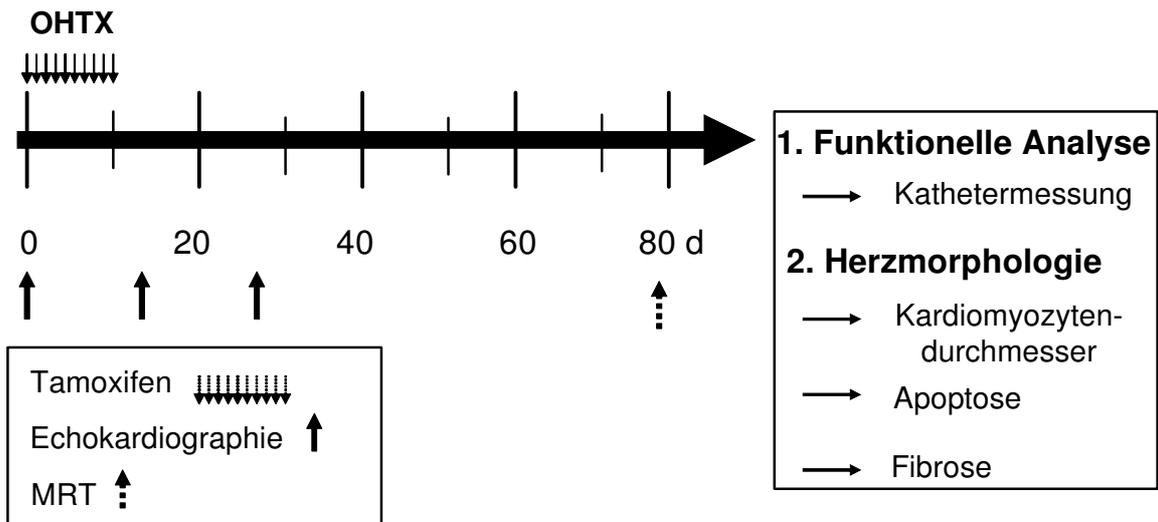


**Abbildung 18:** D Durch Amplifizierung des interessierenden Genabschnitts mittels PCR und Auftragung der Fragmente auf eine Gelmatrix kann eine Gendeletion überprüft werden. Dabei zeigen die Laufspuren A ein kleines Fragment, bei dem das loxP flankierte DNA Segment herausgeschnitten wurde (doppelt transgene Tiere). Laufspur B zeigt ein großes, loxP flankiertes Fragment ohne Exzision des Exons 3 eines transgenen Tieres und Bande C das Fragment eines Wildtypen.

### 3.3 Bedeutung der IGF1-Signaltransduktion im adulten Herz unter basalen Bedingungen und Altersabhängigkeiten

#### 3.3.1 Gruppe junger erwachsener Tiere (3 Monate)

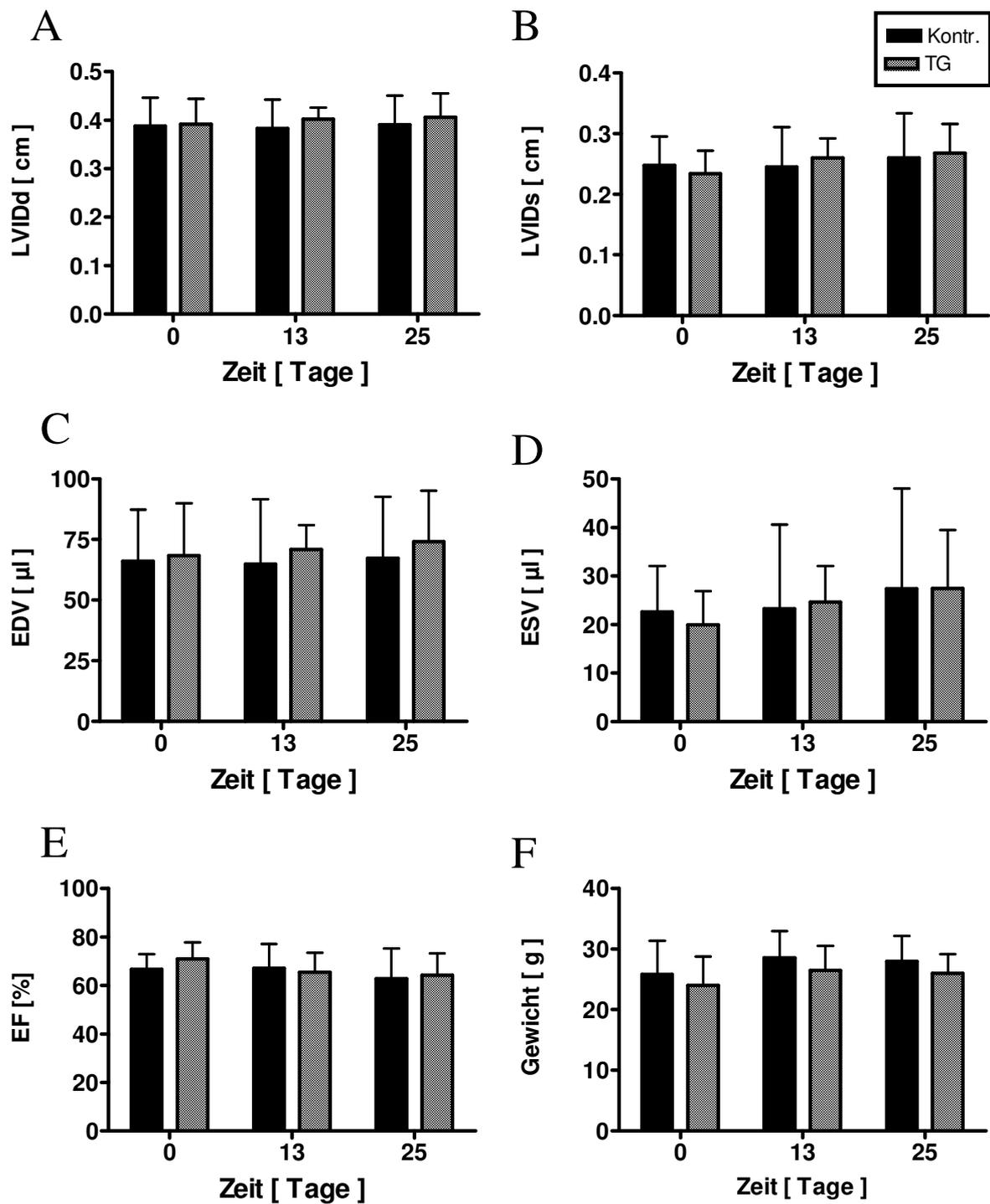
In einer ersten Gruppe wurden die Auswirkungen der IGF1 Deletion auf die basale Herzfunktion und –struktur an jungen adulten Tieren, die zu Versuchsbeginn 3 Monate alt waren, untersucht. Um mögliche funktionelle Einschränkungen der Herzfunktion nach IGF1R KO im Verlauf beobachten zu können, wurde die Echokardiographie genutzt. Die Tiere wurden nach dem in Abb. 19 dargestellten Protokoll behandelt. Bei Behandlungsbeginn mit OHTX am Tag 0 wurde die erste Herzultraschalluntersuchung durchgeführt. Im weiteren Verlauf erfolgten Messungen an den Tagen 13 und 25. Abb. 21 fasst die Ergebnisse aus den Ultraschallmessungen zusammen. Man erkennt, dass die OHTX-Behandlung in der Kontrollgruppe weder am Tag 13 noch am Tag 25 eine Veränderung der Ventrikelgeometrie auslöste, denn die Parameter LVIDs und LVIDd wiesen keinen Unterschied auf. Ebenso ergab sich kein Unterschied hinsichtlich der enddiastolischen und endsystolischen Volumina, sodass die Ejektionsfraktion (EF) unverändert blieb. Ferner hatte die OHTX-Behandlung keinen Einfluss auf das Gewicht der Tiere. Für die Tiere mit IGF1R-Deletion wurden unter Ausgangsbedingungen gleiche Werte gemessen wie für die WT Tiere. Wie bei den WT Tieren veränderten sich die untersuchten Parameter nicht, sodass kein Einfluss der IGF1R-Deletion auf die Ventrikelgeometrie und Funktion mittels Ultraschall festgestellt werden konnte. Da nach Tag 25 sich sowohl innerhalb der Gruppe, als auch zwischen beiden keine signifikanten Veränderungen zeigten, erfolgte am Tag 80 zur genaueren Überprüfung der Ventrikelvolumina eine MRT Messung.



**Abbildung 19:** Schematische Darstellung des Versuchsprotokolls junger erwachsener Tiere

### 3.3.1.1 Ergebnisse der transthorakalen Echokardiographie

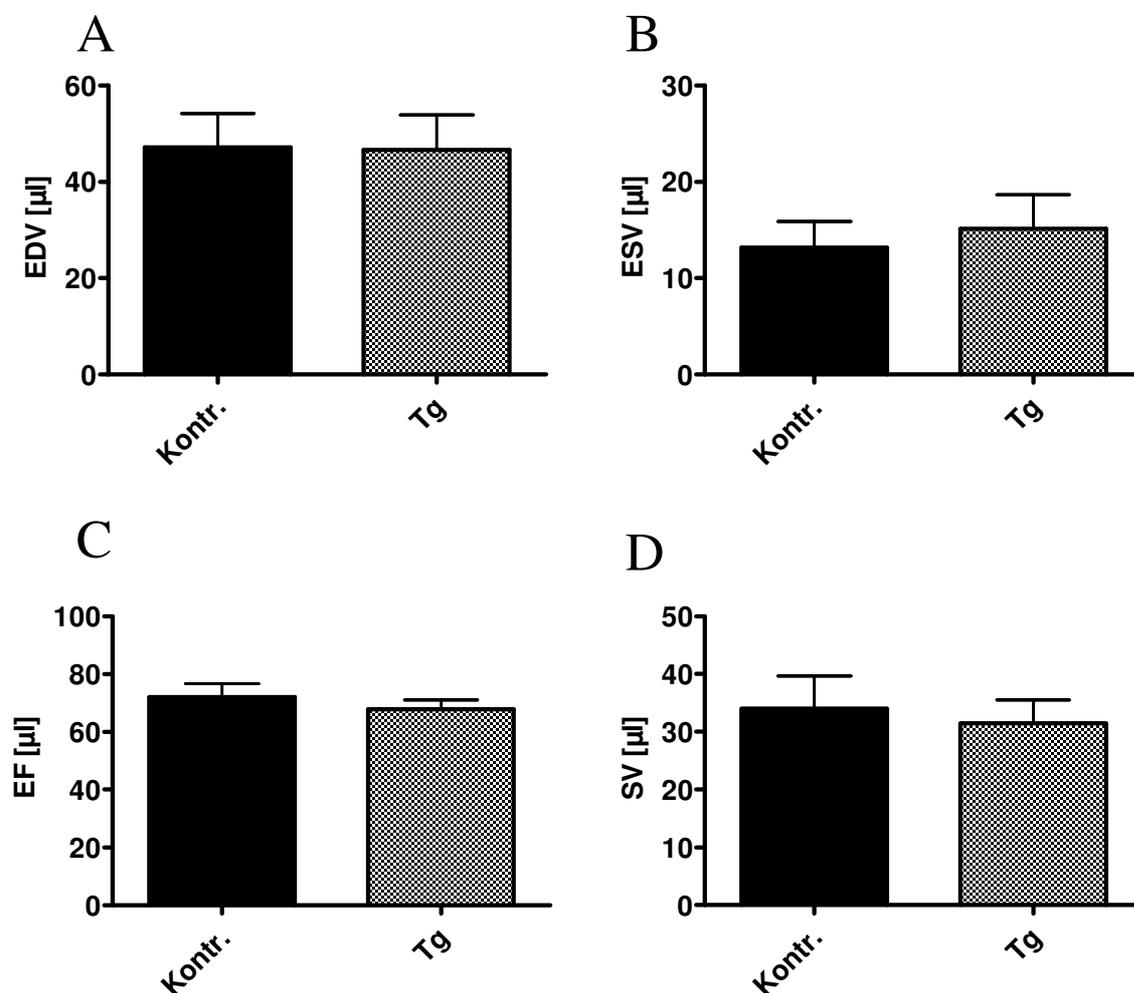
Aus dem M-Mode wurden die linksventrikulären Durchmesser in Systole und Diastole (LVIDs bzw. LVIDd) direkt bestimmt (Abb. 20 A, B). Auf der Grundlage dieser Werte konnten mittels der Teichholzformel die entsprechenden Volumina EDV und ESV (siehe Abb. 20 C, D) und im Folgenden daraus die Ejektionsfraktion berechnet werden (Abb. 20 E). Darüber hinaus wurden die Körpergewichte (siehe Abb. 20 F) im Gruppenvergleich dargestellt.



**Abbildung 20:** Graphische Darstellung der mittels transthorakaler Echokardiographie ermittelten Parameter der Gruppe junger, erwachsener Tiere (Kontrolle n=6, Tg n=9). Linksventrikulärer Innendurchmesser in Diastole (LVIDd) und Systole (LVIDs), Enddiastolisches Volumen (EDV), Endsystolisches Volumen (ESV), Ejektionsfraktion (EF).

### 3.3.1.2 Ergebnisse der MRT-Messung

Da in den ersten Wochen nach Induktion des KO anhand der Echokardiographie keine Veränderungen der Herzfunktion zu detektieren war, wurde die Herzfunktion dieser Gruppe zu einem deutlich späteren Zeitpunkt (nach ca. 11 Wochen) mittels MRT ermittelt. Im Gegensatz zur Echokardiographie, bei der die Volumina aus zweidimensional ermittelten Daten mittels Teichholz-Formel berechnet werden, wird das Herz im Rahmen der MRT-Messung in kontinuierlichen Schichten tomographisch vermessen, sodass eine dreidimensionale Rekonstruktion möglich ist. Die Ergebnisse der MRT Messung in Abb. 21 zeigen, dass auch längere Zeit nach der IGF1R Inaktivierung in jungen, adulten Tieren keine Veränderungen der gemessenen Parameter EDV, ESV, EF und SV auftreten.

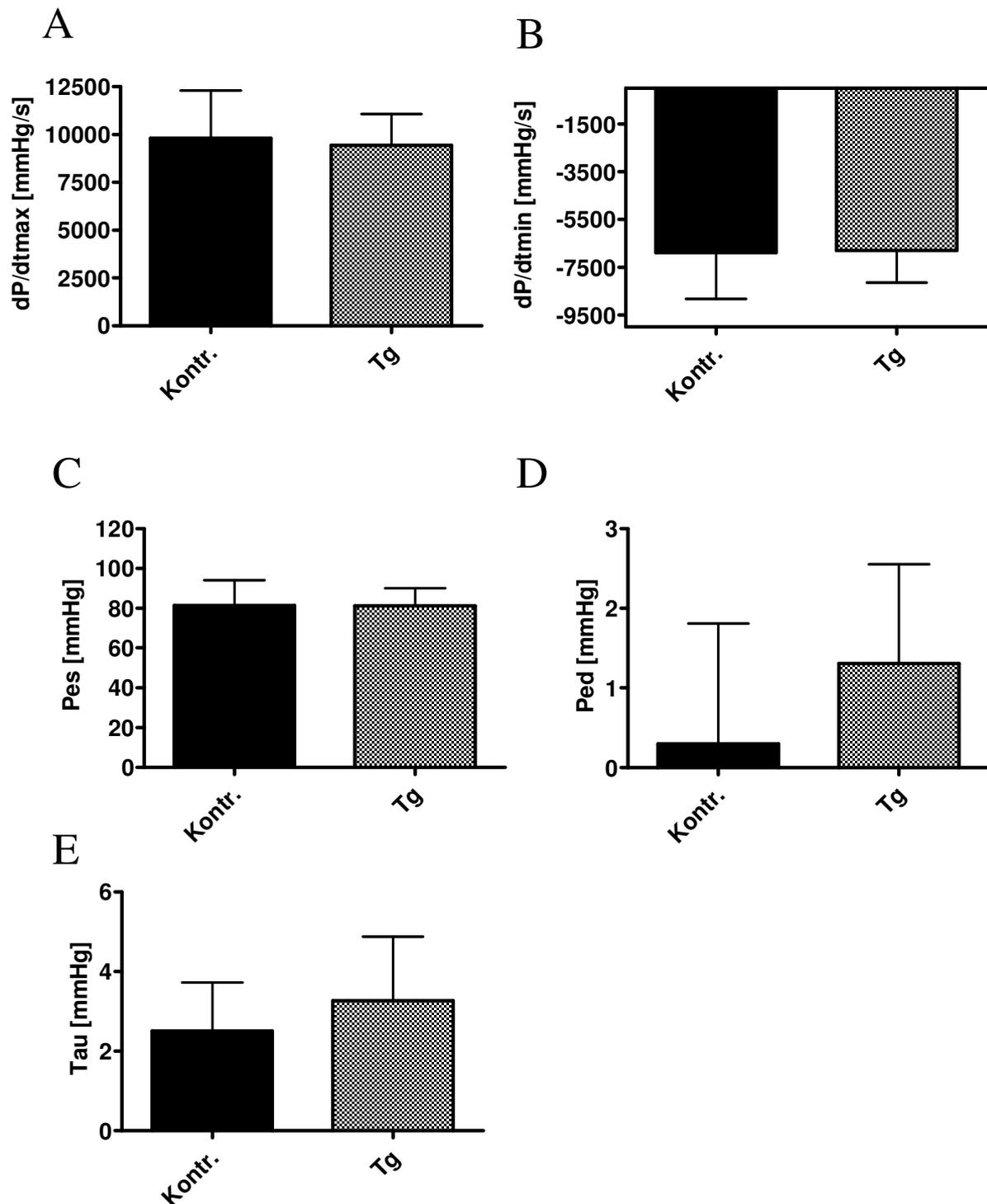


**Abbildung 21:** Ergebnisse der MRT-Messung junger adulter Tiere 11 Wochen nach konditionellem IGF1R KO. (Kontrolle n=6, Tg n=9). Enddiastolisches Volumen (EDV), Endsystolisches Volumen (ESV), Ejektionsfraktion (EF), Schlagvolumen (SV).

### 3.3.1.3 Ergebnisse der intrakardialen Druck-Volumen-Messung

Die innerhalb der Verlaufsuntersuchungen angewendeten, bildgebenden Verfahren erlauben eine präzise Bestimmung der Volumina und der daraus abgeleiteten Größen. Sie sind allerdings dahingehend limitiert, dass sie keinen Aufschluss über die Druckentwicklung des Herzens geben und damit einen wichtigen Teil der Herzfunktion nicht berücksichtigen. Aus diesem Grund wurden zusätzlich Druck-/Volumenmessungen mittels Konduktanzmanometrie durchgeführt. Diese Endpunktmessung erfolgte ebenfalls ca. 11 Wochen nach Induktion der IGF1R-Deletion.

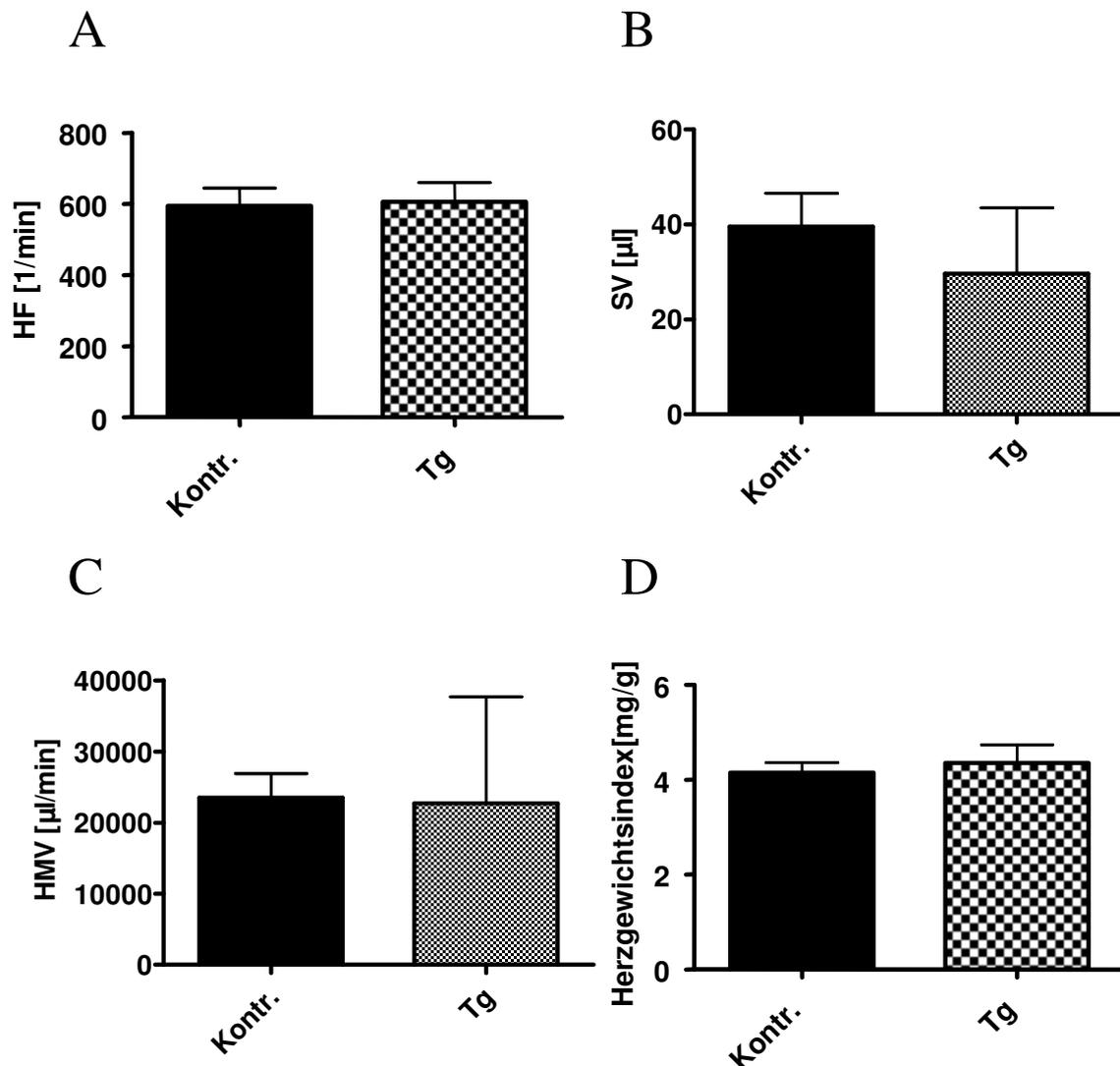
Abb. 22 fasst die Ergebnisse dieser Messung zusammen. Die systolischen Parameter endsystolischer Druck ( $P_{es}$ ) und Druckanstiegsgeschwindigkeit ( $dP/dt_{max}$ ) weisen keinen Unterschied zwischen den Kontroll- und den transgenen Tieren auf (Abb. 22 C und A). Ebenso zeigt die Druckabfallsgeschwindigkeit ( $dP/dt_{min}$ ) als diastolischer Parameter keinen Unterschied (Abb. 22 B). Lediglich könnten die leicht, allerdings nicht signifikant, erhöhten Werte der iCMIGF1RKO Tiere der isovolumetrischen Relaxationskonstante ( $\tau$ ) und des enddiastolischen Drucks ( $P_{ed}$ ) ( $\tau$  Tg vs.  $\tau$  Kontrolle  $3,27 \pm 1,61$  mmHg vs.  $2,50 \pm 1,26$  mmHg;  $P_{ed}$  Tg vs.  $P_{ed}$  Kontrolle  $1,31 \pm 1,25$  mmHg vs.  $0,30 \pm 1,51$  mmHg) ein Hinweis auf die Entwicklung einer diastolischen Funktionsstörung sein (siehe Abb. 22 D, E).



**Abbildung 22:** Linksventrikuläre Druckparameter, erhoben mittels intrakardialer Kathetermessung junger erwachsener Tiere (Kontrolle n=6, Tg n=9). Druckanstiegsgeschwindigkeit ( $dP/dt_{max}$ ), Druckabfallgeschwindigkeit ( $dP/dt_{min}$ ), endsystolischer Druck (Pes), enddiastolischer Druck (Ped), isovolumetrische Relaxationskonstante (Tau).

Die während der Kathetermessung bestimmte Herzfrequenz (siehe Abb. 23 A) war in beiden Tiergruppen regelmäßig und entsprach den für Mäuse zu erwartenden Werten. Gemeinsam mit dem Schlagvolumen (SV) (siehe Abb. 23 B), das für die iCMIGF1RKO Tiere eine nicht

signifikante Verminderung aufwies, ergab sich daraus das in Abb. 23 C graphisch dargestellte Herzminutenvolumen (HMV). Ebenso zeigte der Herzgewichtsindex (Herzgewicht/ Körpergewicht), dass die IGF1R-Deletion keinen Einfluss auf die kardiale Masse hatte (Kontrolle  $4,15 \pm 0,21$  mg/g vs. Tg  $4,35 \pm 0,39$  mg/g).

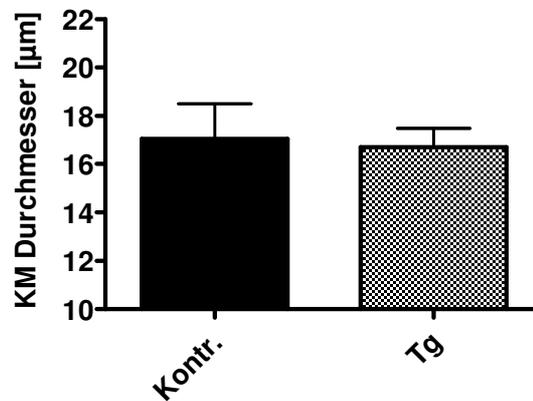


**Abbildung 23:** Darstellung des Herzminutenvolumens (HMV) junger, adulter Tiere, ermittelt durch Multiplikation von Herzfrequenz (HF) und Schlagvolumen (SV) sowie des Herzgewichtsindex im Gruppenvergleich Kontrolle und iCMIGF1RKO (Kontrolle n=6, Tg n=9).

### 3.3.1.4 Morphologie des Myokards

In weiteren Untersuchungen wurden die Herzen histologisch auf Größe des Kardiomyozytendurchmessers, auf interstitielle Fibrose und Apoptose untersucht. Die Vermessung des Herzmuskelquerschnitts erfolgte manuell unter Annahme des kürzesten Durchmessers mit Hilfe der Computersoftware Cell F. In einer 200-fachen Vergrößerung wurden an je zwei Schnitten jedes Tieres dieser Gruppe 50 angeschnittene Kardiomyozyten ausgezählt. Bei einer Tierzahl von 6 Kontroll- und 9 transgenen Tieren wurde der mittlere

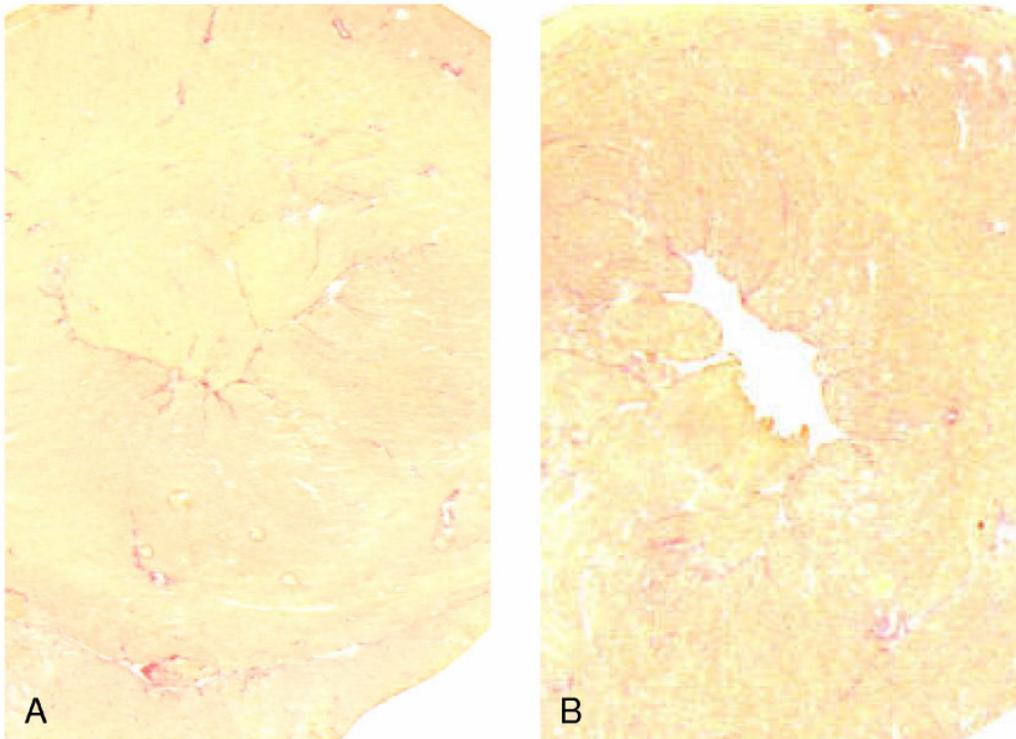
Durchmesser bestimmt. Bei der Kontrollgruppe konnte ein mittlerer Durchmesser von  $17,04 \pm 1,47 \mu\text{m}$  gemessen werden, für die iCMIGF1RKO Gruppe ergab sich ein Wert von  $16,69 \pm 0,79 \mu\text{m}$  (siehe Abb. 24). Die Mittelwerte beider Gruppen waren nicht unterschiedlich.



**Abbildung 24:** Kardiomyozytendurchmesser im Gruppenvergleich von Kontrolltieren und den iCMIGF1RKO Mäusen (Kontrolle n=6, Tg n=9).

Mittels Sirius Rot Färbung wurden die Herzen auf ihren Kollagengehalt untersucht, welches als Maß für die Entwicklung einer interstitiellen Fibrose gewertet werden kann. Es ist anzunehmen, dass der Kollagengehalt im Myokard alter Tiere gegenüber dem junger erhöht ist.

In Abb. 25 sind exemplarisch ein Schnitt eines Kontrolltieres (A) und eines iCMIGF1RKO Tieres (B) dargestellt. Es zeigte sich keine deutliche Kollageneinlagerung, sodass auf eine Quantifizierung verzichtet wurde.



**Abbildung 25:** Kollagenfärbung mittels Sirius Rot an 3 Monate alten Tieren. Kontrolle (A) und iCMIGF1RKO (B).

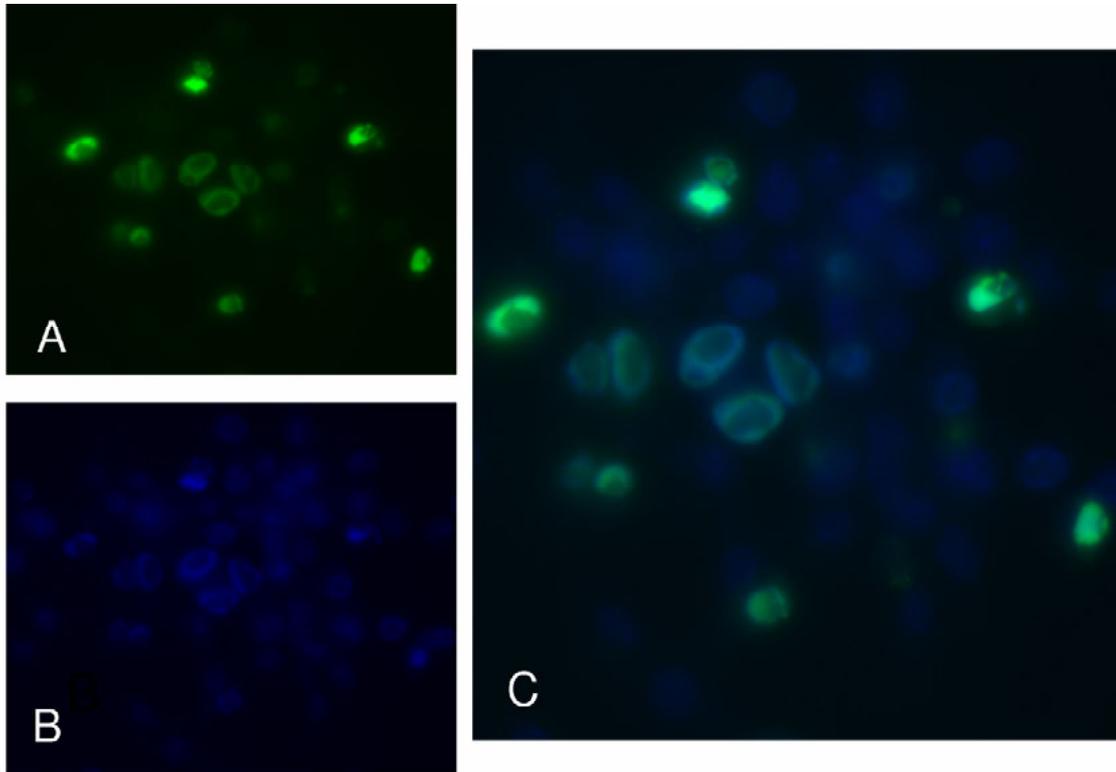
### 3.3.1.5 Detektion apoptotischer Zellen

Da für IGF1 eine antiapoptotische Wirkung am Herzen nachgewiesen wurde (15, 48), wurde untersucht, ob im iCMIGF1RKO Herzen ein erhöhter Grad an Apoptose im Myokard nachweisbar war.

Die Darstellung apoptotischer Zellen wurde mit der TUNEL Methode als häufig benutzte Technik zur Apoptoseerkennung vorgenommen. Aufgrund zahlreicher Limitierungen dieser Methode (49) wurde zusätzlich mittels Immunfluoreszenz die aktivierte Caspase-3 untersucht.

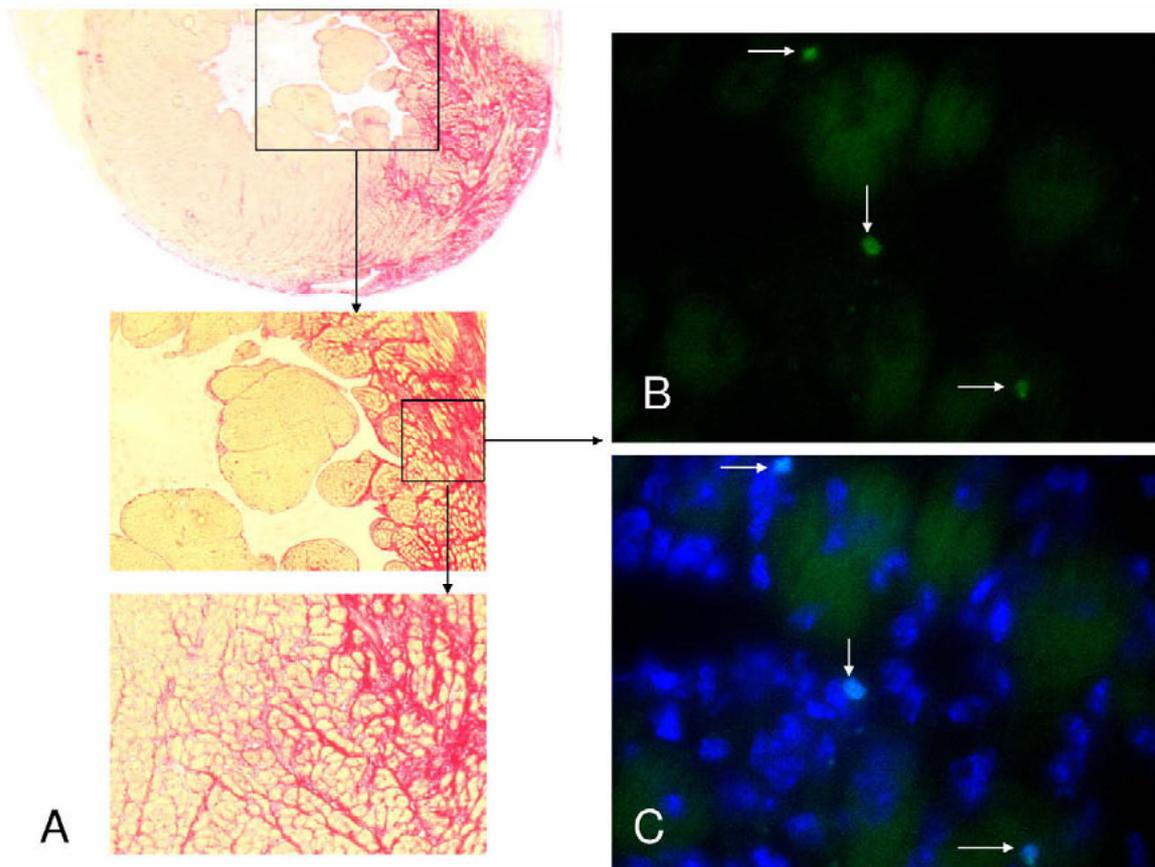
Da die Häufigkeit apoptotischer Zellen im gesamten Myokard sehr gering ist, war es erforderlich, beide Methoden in Vorversuchen zu validieren, um bei einem negativen Ergebnis, d.h. nicht nachweisbarer Apoptose, sicher zu sein, dass mit den gewählten Methoden eine Apoptose nachgewiesen worden wäre. Um geeignete Versuchsbedingungen für einen optimalen Nachweis zu ermitteln, wurde an murinen „*Heart Like-1*“ (HL-1) Zellen mittels Staurosporin (STS) Apoptose ausgelöst. Dabei stellte sich eine STS Konzentration zur Induktion der Apoptose von  $3,14\mu\text{M}$  mit einer Inkubationszeit von 4h, eine cleaved Caspase-3 Antikörperverdünnung von 1:200 und eine Sekundärantikörperverdünnung von 1:400 für die Immunhistologie als geeignet heraus. Parallel zur Immunhistologie mit Caspase-3-Antikörper wurden die HL-1 Zellen nach dem gleichen Schema für die TUNEL Methode mit STS inkubiert und das angewendete Kit (s.o.) nach Angaben des Herstellers verwendet.

Die Vorversuche zeigten, dass der cleaved Caspase-3 Antikörper zuverlässig apoptotische Zellen nachweist (siehe Abb. 26). Mit der TUNEL Methode wurden auch positive Zellen detektiert (siehe Material und Methoden Abb. 15). Allerdings zeigten auch die jeweiligen Kontrollen (ohne Enzym TdT) einige positive Zellen.



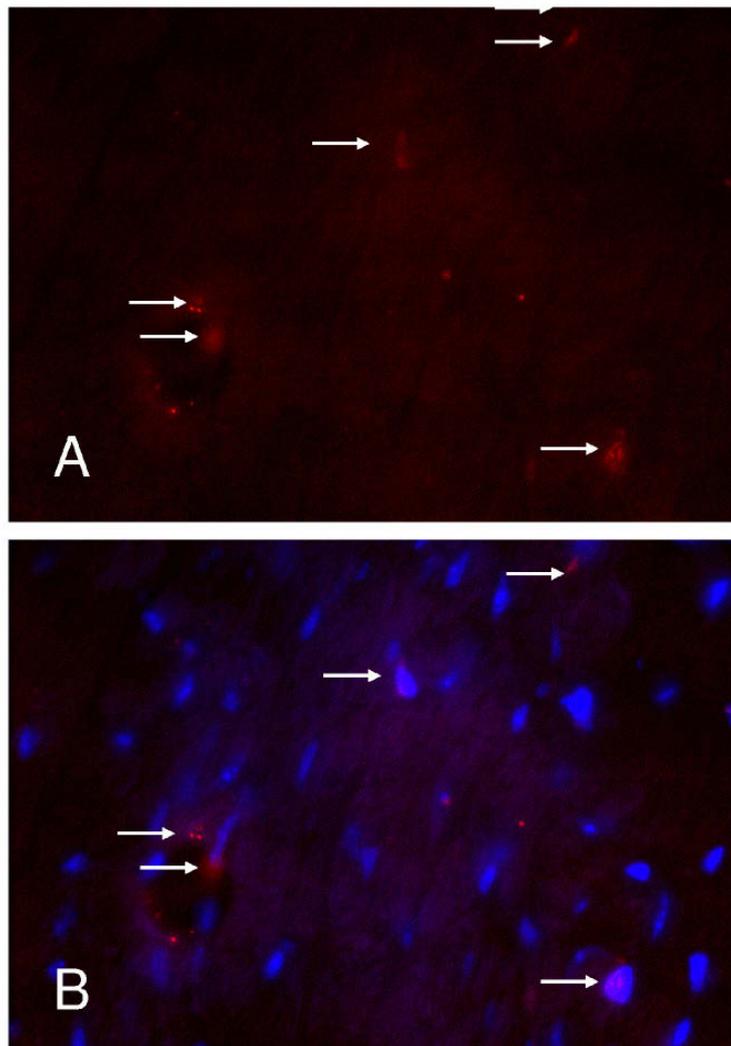
**Abbildung 26:** STS induzierte Apoptose an HL-1 Zellen und Detektion mittels Caspase-3-Immunhistologie. A zeigt die Kernfärbung mit DAPI an apoptotischen Zellen; In Abbildung B und C sind die Caspase-3 positiven Signale sichtbar, die deckungsgleich mit der Kernfärbung sind und als Nachweis des Schlüsselenzyms der Apoptosekaskade dienen.

Nach Etablierung der Inkubationsbedingungen für beide Methoden an HL1 Zellen wurden diese auch an Herzschnitten eines Troponin-I-induzierten Myokarditis-Maus-Modells (47) als Positivkontrolle getestet. Am Schnitt dieses Mausmodells konnte, wie in Abb. 27 A zu sehen ist, ein Linkswandinfarkt mit starker Kollagenansammlung nachgewiesen werden. Im Infarkt- als auch im gesamten Herzbereich wurden nach Anwendung der TUNEL Methode positive Signale gefunden (siehe Abb. 27 B), bei denen zum Teil die typischen morphologischen Merkmale der Apoptose wie Chromatinkondensation, Zellfragmentierung und Bildung „apoptotischer Körperchen“ als Abschnürung membranumgrenzender Vesikel mit enthaltenen Zellmembranbestandteilen und DNA-Fragmente aufzufinden waren (siehe Abb. 27 C).



**Abbildung 27:** A Sirius Rot Färbung eines Herzschnitts im Bereich eines Infarktes nach Troponin-I-induzierter Myokarditis: hier ist eine deutliche Zunahme an Kollagen im Infarktbereich zu sehen; B zeigt die positiven Signale, die mittels TUNEL Technik im Bereich des linksventrikulären Infarktes detektiert wurden. In Bild C sind die apoptotischen Kerne in der DAPI Färbung dargestellt

Bei der immunhistologischen Methode mit Anwendung des cleaved Caspase-3-Antikörpers am gleichen Modell konnten ebenfalls apoptotische Zellen detektiert werden, jedoch mussten diese von Verunreinigungen durch Überprüfung der Kerne mittels DAPI Färbung differenziert werden. Die dargestellten Pfeile in Abb. 28 A markieren die positiven Signale, welche mit den Kernen in Abb. B deckungsgleich sind; die anderen roten Punkte sind Hintergrund.



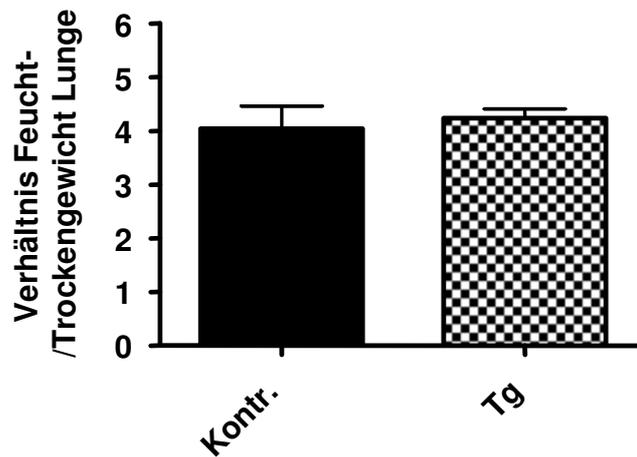
**Abbildung 28:** Anwendung der Caspase-3 Immunhistologie an einem Schnitt des Troponin-I-induzierten Myokarditis-Maus-Modells in 1000-facher Vergrößerung.

Nach Etablierung beider Methoden an Histologieschnitten wurde sowohl bei Tieren der Kontroll- als auch bei denen der iCMIGF1R KO -Gruppe (Kontrolle n=6, Tg n=9) das Myokard auf mögliche Apoptose überprüft. Pro Tier wurde je ein Schnitt mit einer Kontrolle [nur zweiter Antikörper (AK) bei der Caspase3 Methode bzw. ohne TdT Enzyme bei der TUNEL Technik] ausgewertet und jedes sichtbare Signal auf Apoptose mit Hilfe der Kernfärbung untersucht. Bei beiden Gruppen konnten mit beiden Methoden keine apoptotischen Zellen detektiert werden.

### 3.3.1.6 Beurteilung der Lunge

Zur Überprüfung kardialer Effekte nach induziertem, kardiomyozytenspezifischem IGF1RKO gehörte auch die Untersuchung auf das Vorhandensein eines möglichen Lungenödems, da es bei eingeschränkter Pumpfunktion des Herzens aufgrund des Blutrückstaus in die Lunge zur Steigerung des kapillären Drucks mit der Folge eines Flüssigkeitsaustritts ins Interstitium oder auch in die Alveolen kommen kann. Diese Ödembildung macht sich in einer Erhöhung des Lungenfeuchtgewichts bemerkbar. Aus diesem Grund wurde sowohl das Feucht- als

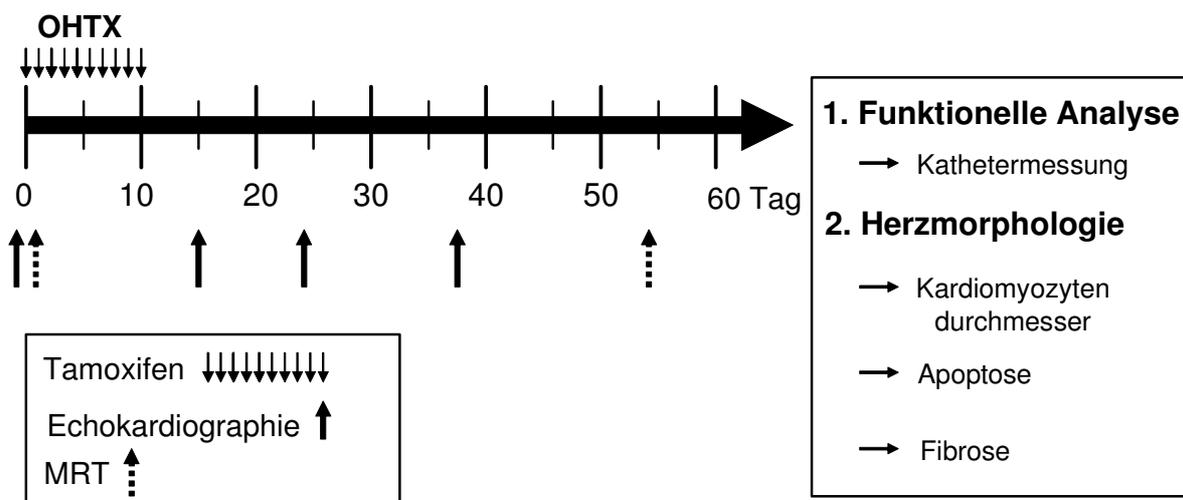
auch das Trockengewicht der Lunge bestimmt und daraus der Quotient gebildet. Wie aufgrund der zuvor vom Herzen erhobenen funktionellen Parameter zu erwarten war, zeigte sich auch hier im Gruppenvergleich kein Unterschied (Kontrolle  $4,0 \pm 0,42 \text{ mg/mg}$  vs. Tg  $4,24 \pm 0,17 \text{ mg/mg}$  - siehe Abb. 29).



**Abbildung 29:** Darstellung des Quotienten aus Feucht- und Trockengewicht der Lunge 3 Monate alter Tiere im Gruppenvergleich (Kontrolle n=6, Tg n=9).

### 3.3.2 Gruppe gealterter Tiere (10 Monate)

Um altersabhängige Effekte eines defekten IGF1R Signalwegs zu untersuchen, wurden neben den jungen adulten Tieren auch Tiere in höherem Lebensalter (ca. 10 Monate zu Versuchsbeginn) untersucht. Das Untersuchungsschema für diese Tiergruppe entsprach weitgehend dem der jungen Tiere. Allerdings wurden hier für eine größere Genauigkeit MRT Messungen an den Tagen 0 und 54 nach IGF1R KO Induktion durchgeführt. Eine schematische Darstellung des Versuchsplans ist in Abb. 30 dargestellt.

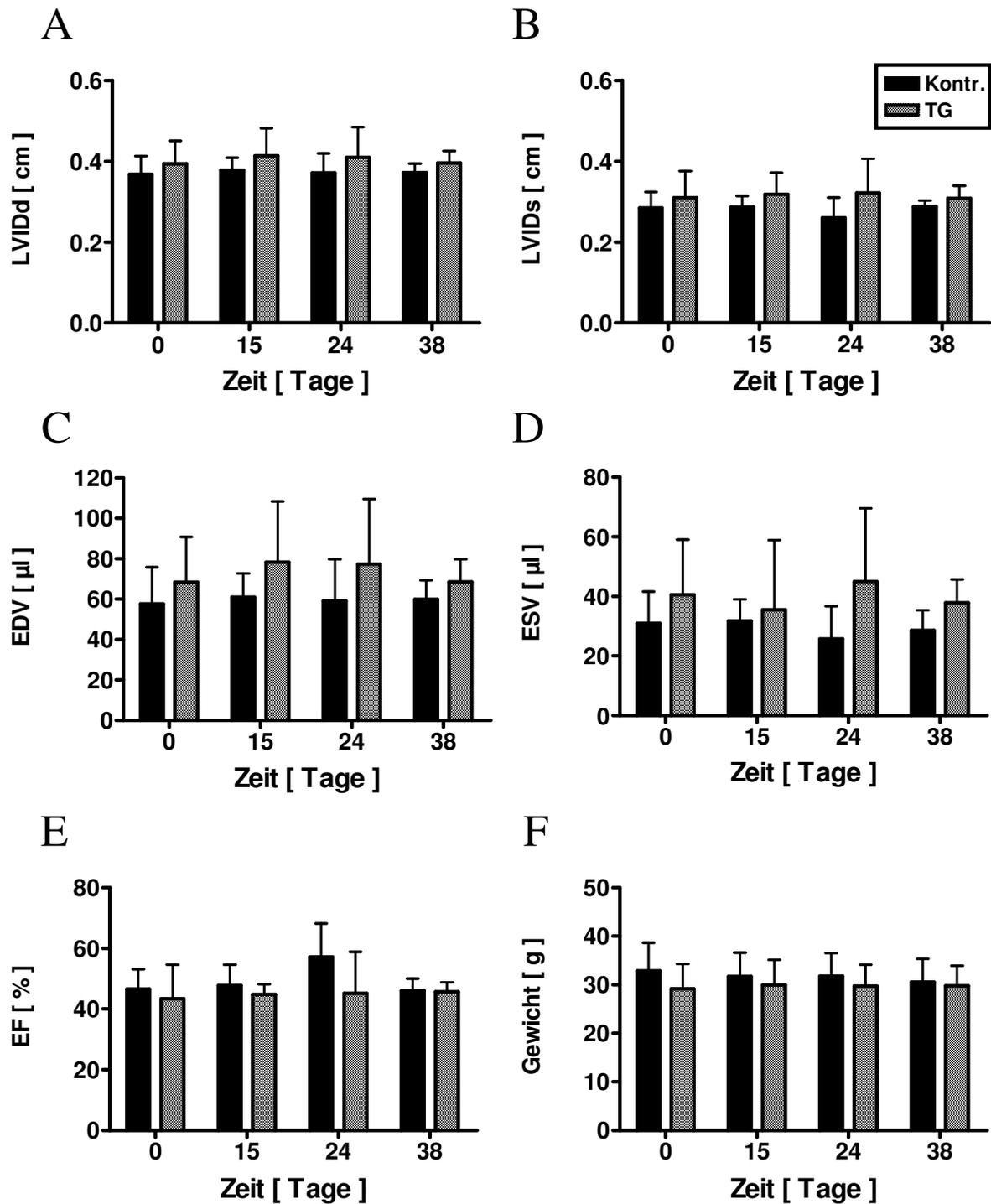


**Abbildung 30:** Schematische Darstellung des Behandlungsprotokolls gealterter Tiere.

#### 3.3.2.1 Ergebnisse transthorakaler Echokardiographie

Die Tiere dieser Gruppe wurden im Verlauf an vier definierten Messtagen mittels transthorakaler Echokardiographie untersucht. Die erste Messung erfolgte am Tag 0 vor Tamoxifenbehandlungsbeginn. Die weiteren Messungen erfolgten an den Tagen 15, 24 und 38. Nach dem oben beschriebenen Prinzip (siehe Kapitel 2.3.4.) wurden die linksventrikulären Durchmesser beider Herzphasen anhand des M-Modus ermittelt.

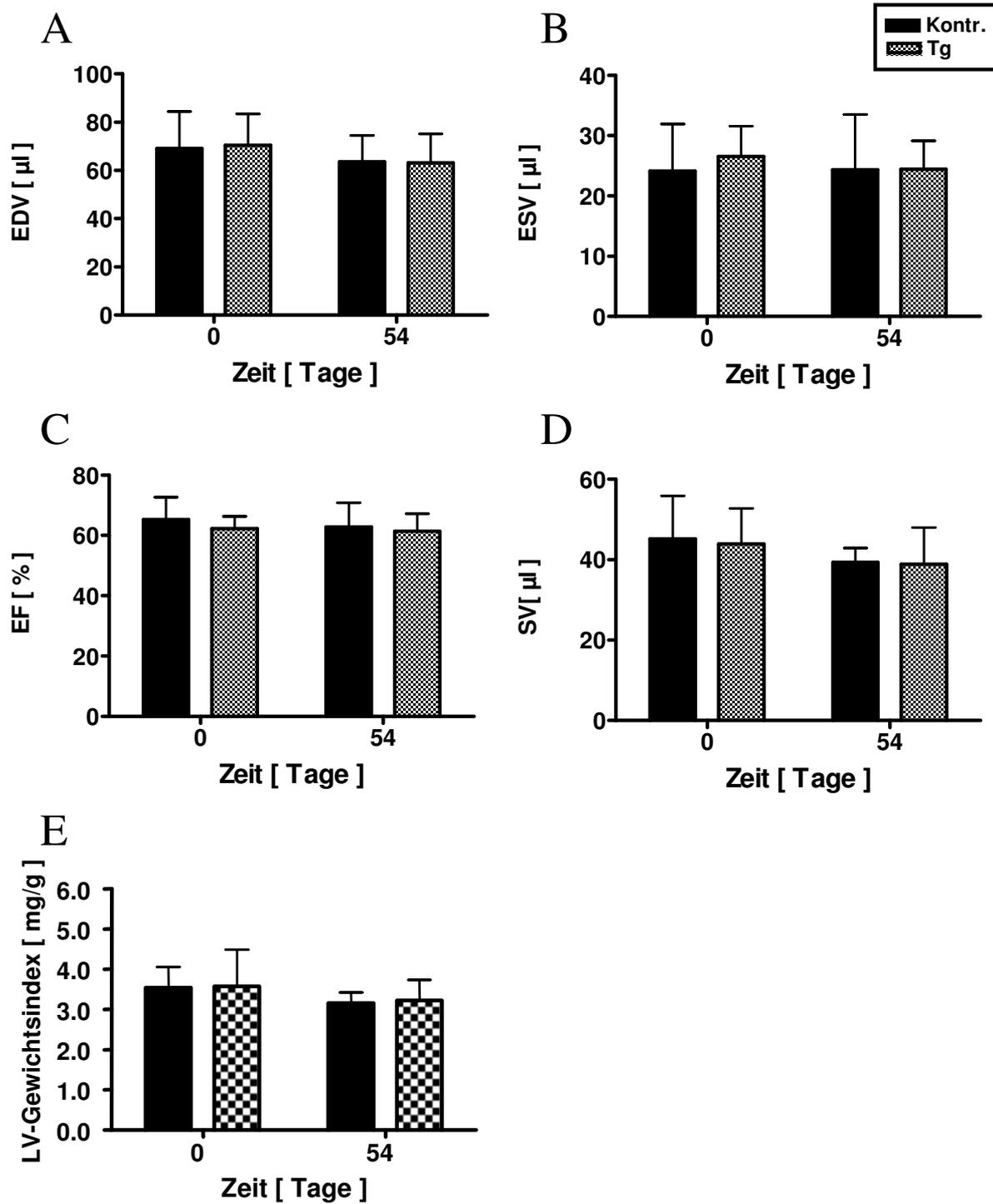
Insgesamt waren die Durchmesser der iCMIGF1RKO Gruppe sowohl in der Diastole (LVIDd) (siehe Abb. 31 A) als auch in der Systole (LVIDs) (siehe Abb. 31 B) an allen Messtagen geringfügig, jedoch nicht signifikant größer als die der Kontrollgruppe. Dieser Unterschied war nicht in einer größeren Körpergröße der iCMIGF1RKO Tiere begründet, da der Vergleich der Körpergewichte (siehe Abb. 31 F) keine signifikanten Unterschiede ergab. Aus den Durchmessern wurden mittels Teichholzformel das EDV, ESV und die EF berechnet. Sowohl das EDV als auch das ESV der IGF1R KO Gruppe (siehe Abb. 31 C, D) waren tendenziell erhöht, jedoch statistisch nicht signifikant. Die EF beider Gruppen lag zu Beginn der Messung dicht beieinander und blieb mit Ausnahme von Tag 25 in der Kontrollgruppe über den Verlauf weitgehend konstant (siehe Abb. 31 E). Insgesamt konnte für die EF an allen Messtagen kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen festgestellt werden.



**Abbildung 31:** Ergebnisse der Echokardiographie in der Gruppe der gealterten Tiere (Kontrolle n=9, Tg n=9). Linksventrikulärer Innendurchmesser in Diastole (LVIDd) und Systole (LVIDs), Enddiastolisches Volumen (EDV), Endsystolisches Volumen (ESV), Ejektionsfraktion (EF).

### **3.3.2.2 Ergebnisse der MRT-Messung**

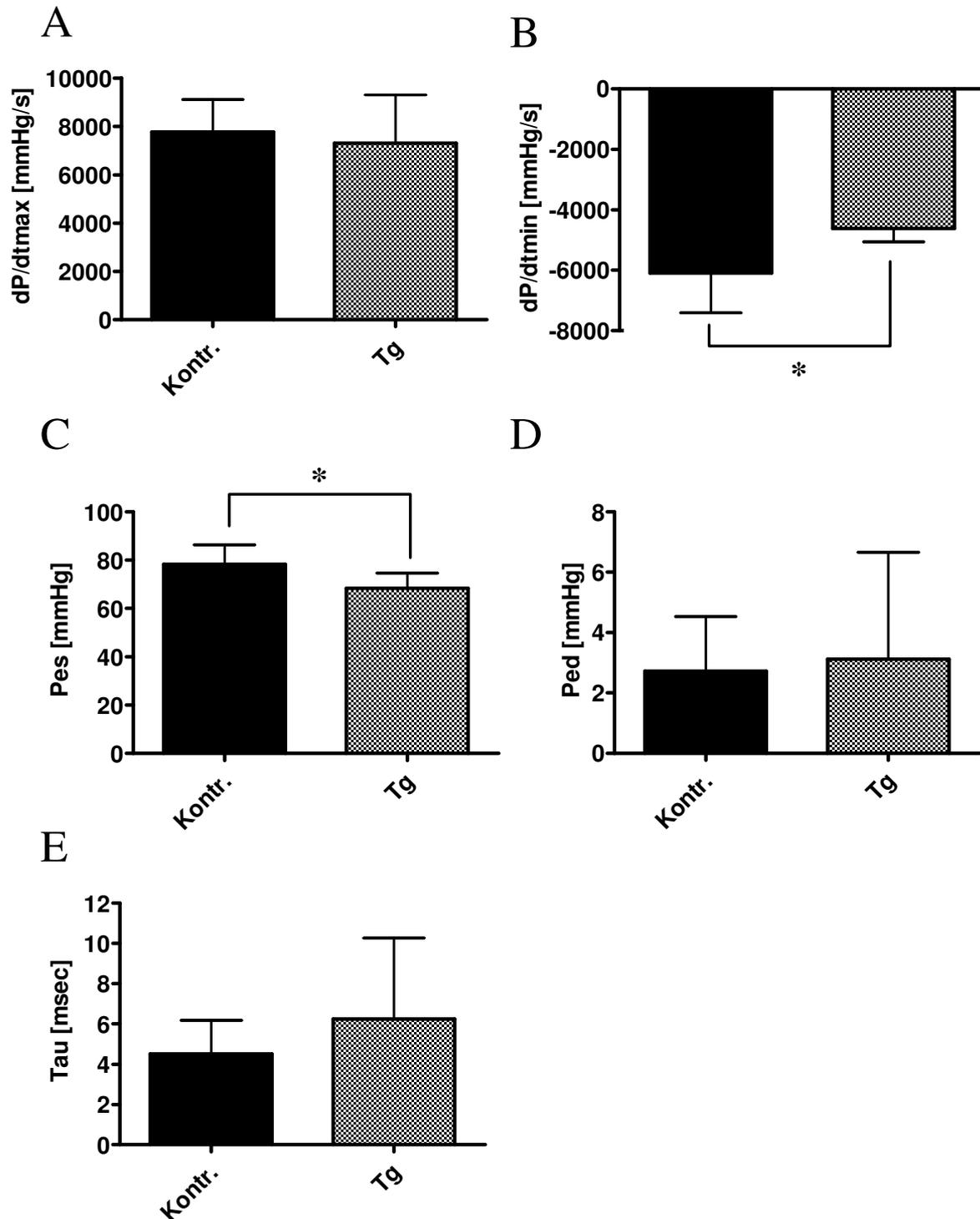
Zur Erzielung einer größeren Genauigkeit wurde bei den alten Tieren sowohl am Tag 0 vor Beginn der OHTX Behandlung als auch ca. fünf Wochen später am Tag 54 vor Messung der linksventrikulären Druckparameter mittels Katheter eine MRT-Messung durchgeführt. In Analogie zu den Echokardiographiedaten (siehe Abb. 31) konnte auch mit dieser genaueren Methode in allen dargestellten Parametern (siehe Abb. 32) keine Signifikanz zwischen der Kontroll- und der iCMIGF1RKO Gruppe festgestellt werden.



**Abbildung 32:** Erhobene MRT-Daten alternder Tiere (Kontrolle n=9, Tg n=9 Tg). Enddiastolisches Volumen (EDV), Endsystolisches Volumen (ESV), Ejektionsfraktion (EF), Schlagvolumen (SV), Linksventrikulärer Herzgewichtsindex (LV-Herzgewichtsindex).

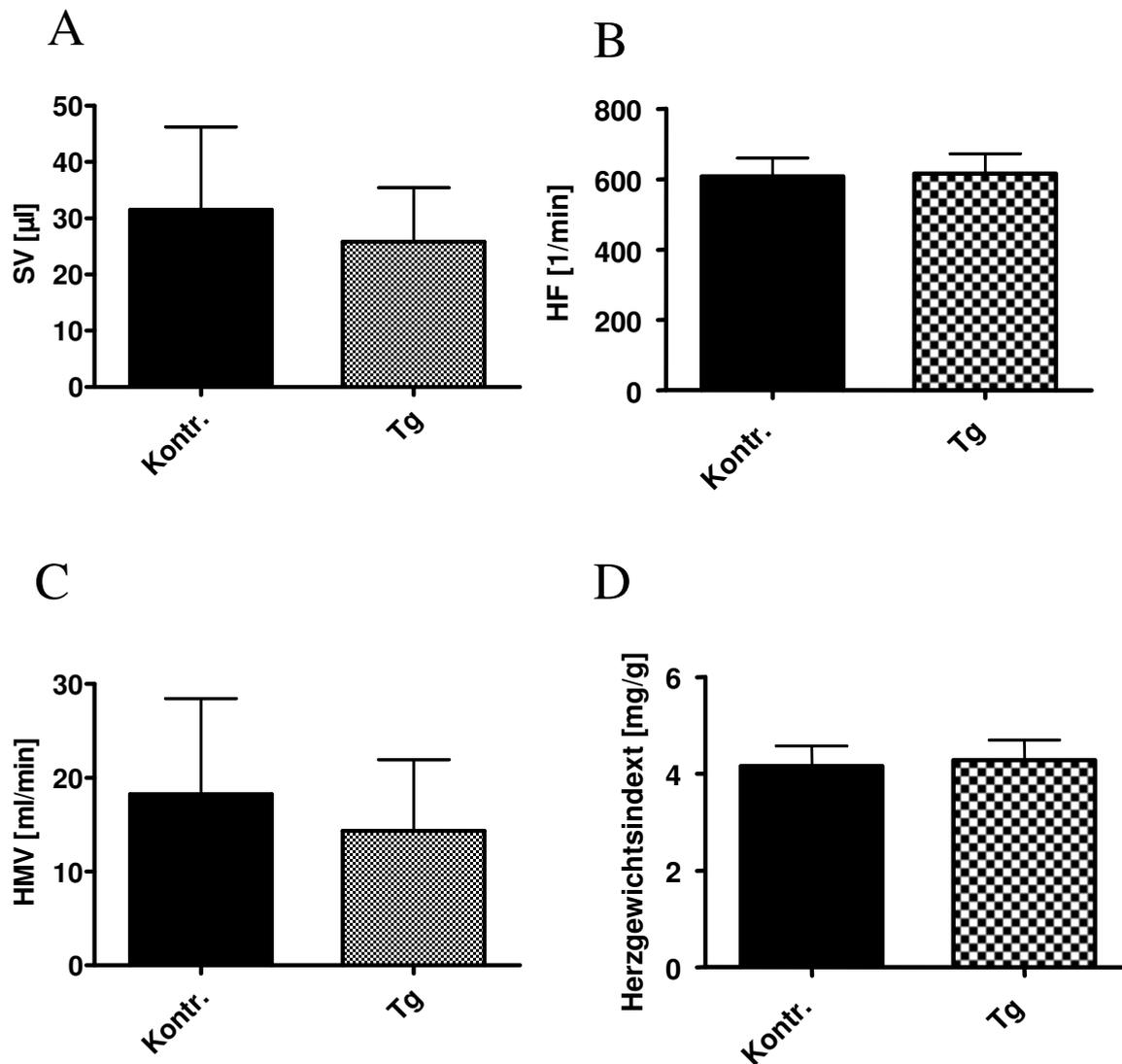
### 3.3.2.3 Ergebnisse der intrakardialen Druck-Volumen-Messung

Ungefähr acht Wochen nach Induktion des IGF1R KO wurde die Herzfunktion der alten Tiere mittels Herzkatheter untersucht. Anders als bei den jungen Tieren wurde hier eine Funktionseinschränkung deutlich. Die iCMiGF1R KO Tiere zeigten im Vergleich zu den Kontrolltieren eine signifikant verminderte Druckentwicklung (Pes Tg  $68,37 \pm 6,27$  mmHg vs. Pes Kontrolle  $78,29 \pm 8,01$  mmHg;  $p=0,008$ ; Abb. 33 C). Die Druckerhöhungsgeschwindigkeit  $dP/dt_{\max}$  beider Gruppen ergab jedoch keinen signifikanten Unterschied (Abb. 33 A). Eine gestörte Relaxation nach IGF1R KO spiegelt sich in einem signifikant verminderten  $dP/dt_{\min}$  Wert für die iCMiGF1RKO Tiere wieder (Tg  $-4618 \pm 438$  mmHg/s vs. Kontrolle  $-6090 \pm 1310$  mmHg/s;  $p=0,007$ , Abb. 33 B). Die weiteren diastolischen Parameter (Ped, Tau) wiesen nach IGF1R KO gegenüber den Kontrolltieren keinen signifikanten Unterschied auf (siehe Abb. 33 D, E).



**Abbildung 33:** Darstellung linksventrikulärer Druckparameter der Gruppe gealterter Tiere (Kontrolle n=9, Tg n=9), \* =  $p < 0,05$ . Druckanstiegsgeschwindigkeit ( $dP/dt_{max}$ ), Druckabfallgeschwindigkeit ( $dP/dt_{min}$ ), endsystolischer Druck (Pes), enddiastolischer Druck (Ped), isovolumetrische Relaxationskonstante (Tau).

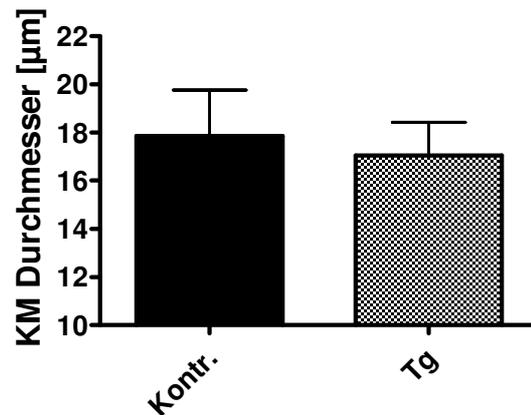
Des Weiteren wurden Schlagvolumen, Herzfrequenz und daraus das Herzminutenvolumen ermittelt (siehe Abb. 34 A, B, C). Die Unterschiede waren bei allen Parametern nicht signifikant verschieden. Auch der Herzgewichtsindex zeigte keine signifikanten Unterschiede (siehe Abb. 34 D).



**Abbildung 34:** SV, HF, HMV und Herzgewichtsindex gealterter Tiere im Gruppenvergleich (Kontrolle n=9, Tg n=9). Schlagvolumen (SV), Herzfrequenz (HF), Herzminutenvolumen (HMV).

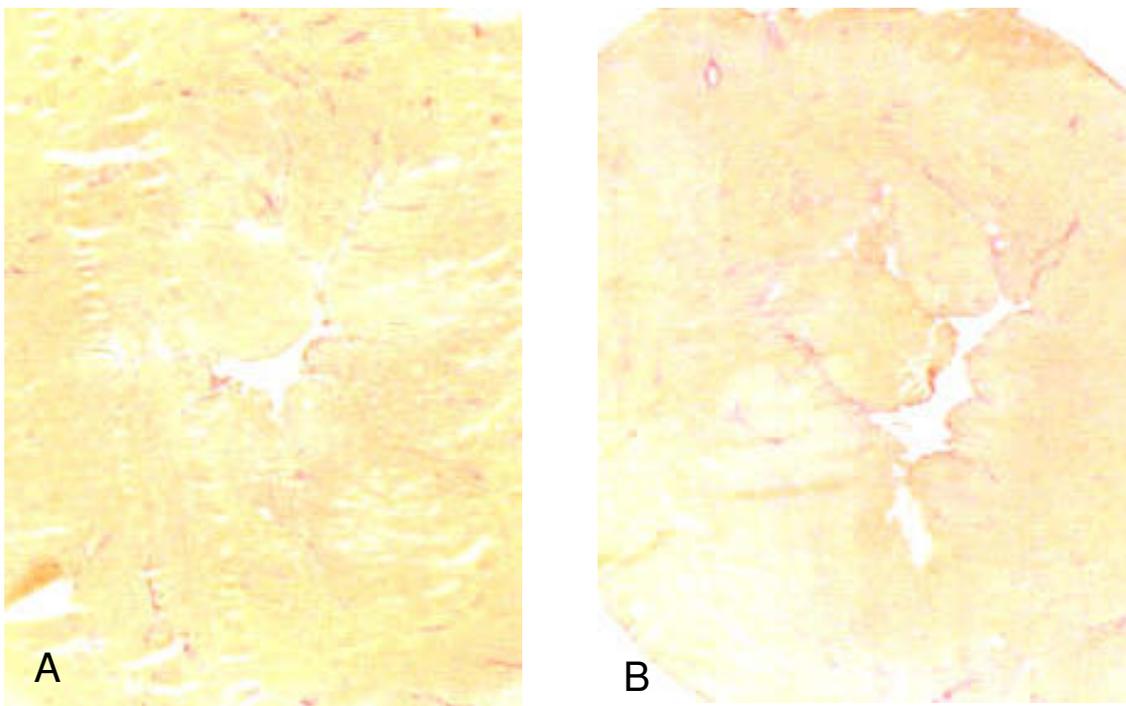
### 3.3.2.4 Morphologie des Myokards

Auch in dieser Gruppe wurde der mittlere Kardiomyozytendurchmesser nach der oben beschriebenen Methode (siehe Kapitel 2.3.9.4.) bestimmt. Wie Abb. 35 zeigt, konnte für die Gruppe der Kontrolltiere ein mittlerer Durchmesser von  $17,85 \pm 1,91 \mu\text{m}$  ermittelt werden, die iCMIGF1RKO Gruppe lag mit  $17,05 \pm 1,38 \mu\text{m}$  in der gleichen Größenordnung.



**Abbildung 35:** Kardiomyozytendurchmesser der gealterten Tiere im Gruppenvergleich Kontrolle und iCMIGF1RKO (Kontrolle n=9, Tg n=9).

Mittels Sirius Rot Färbung wurde auch hier die Morphologie des Myokards auf fibrotische Veränderungen überprüft. Erwartungsgemäß hätte man in den Herzen älterer Tiere im Vergleich zu den jüngeren mehr Kollageneinlagerung erwartet. Wie Abb. 36 exemplarisch zeigt, konnte zum einen kein sichtbarer Unterschied zwischen der Kontroll- (A) und der iCMIGF1RKO Gruppe (B) der älteren Tiere festgestellt und zum anderen auch kein Unterschied zu den jüngeren Tieren (siehe Abb. 25) beobachtet werden. Deshalb wurde auch hier auf eine Quantifizierung des Kollagengehalts verzichtet.



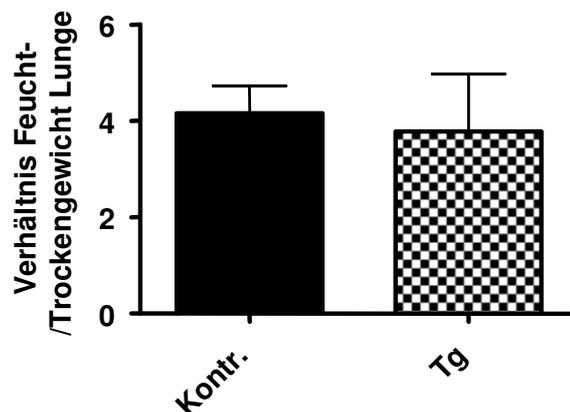
**Abbildung 36:** Kollagenfärbung mit Sirius Rot als Beispiel der gealterten Tiere der Kontroll- (A) und der iCMIGF1RKO Gruppe (B). Kollagen ist besonders im Bereich der angeschnittenen Blutgefäße sowie um das angedeutete Lumen des linken Ventrikels zu finden; geringgradig findet man auch diffus verteiltes Kollagen im gesamten Querschnitt.

### 3.3.2.5 Detektion apoptotischer Zellen

Die Anwendung der Immunfluoreszenzuntersuchung der aktivierten Caspase-3 ergab sowohl bei den gealterten wie auch bei der Gruppe der jungen adulten Tiere keinen Nachweis einer gesteigerten Apoptose. Mittels der TUNEL Methode wurden im Gegensatz zu den jungen Tieren positive Signale gefunden, die mit Zellkernen deckungsgleich waren und z.T. auch typische morphologische Merkmale der Apoptose zeigten. Jedoch wurden auch in den jeweiligen Kontrollschnitten, bei denen das Enzym TdT zum Einbau der fluorochrom konjugierten dUTPs fehlte, eine vergleichbare Anzahl an tunnelpositiven Zellen gefunden, so dass insgesamt die Aussagekraft bezüglich apoptotischer Zellen kritisch zu hinterfragen und die Kritik der Methode bezüglich falsch positiver Zellen zu Recht zulässig ist.

### 3.3.2.6 Beurteilung der Lunge

Die in Kapitel 3.3.2.3. dargestellten Druckparameter zeigten, dass die Gruppe der iCMIGF1RKO Tiere im Vergleich zur Kontrollgruppe eine kardiale Funktionseinschränkung aufwiesen. Aufgrund dessen war die Bestimmung des Quotienten aus Feucht- und Trockengewicht der Lunge im Hinblick auf ein mögliches, kardial bedingtes Lungenödem erforderlich. Wie Abb. 37 zeigt gab es keinen Hinweis auf ödematöse Veränderungen der Lunge (Kontrolle  $4,16 \pm 0,57 \text{mg}$  vs. Tg  $3,78 \pm 1,20 \text{mg}$ ), welche durch pathologisch veränderte Druckverhältnisse im Herzen bedingt sein können.



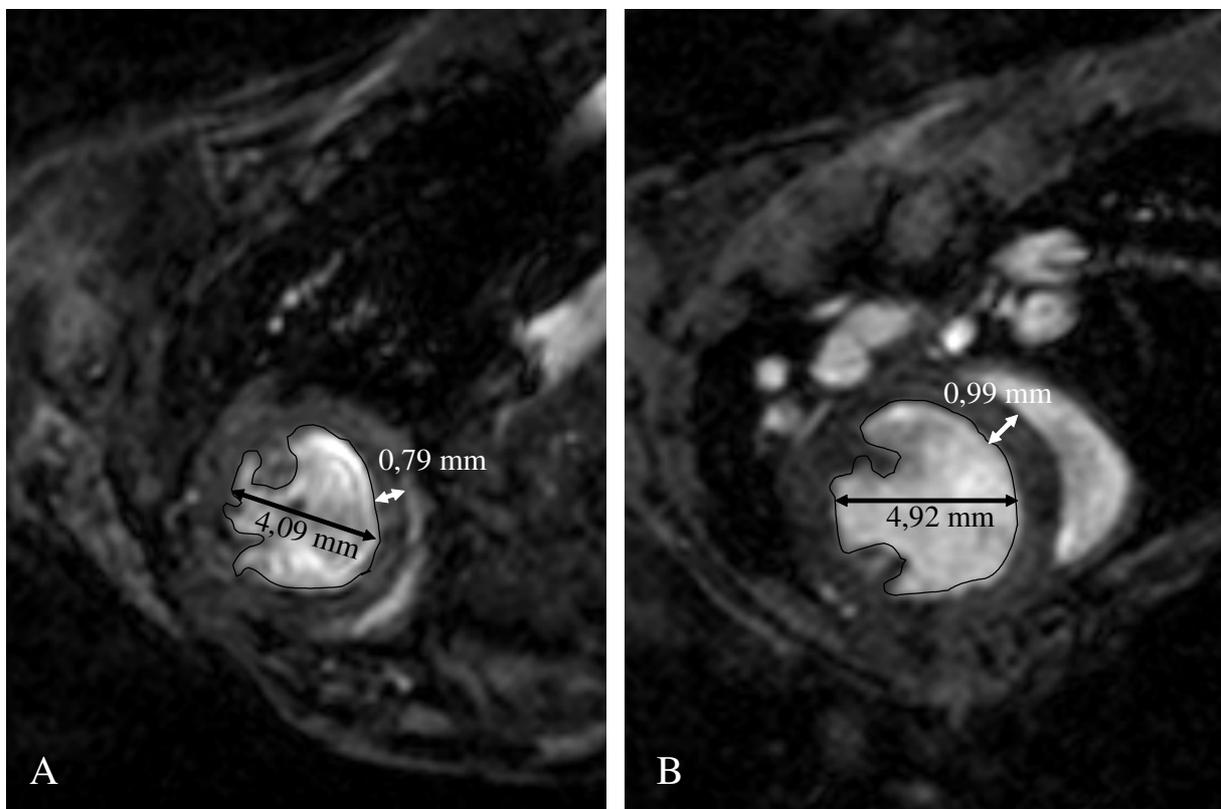
**Abbildung 37:** Quotient aus Feucht- und Trockengewicht der Lungen gealterter Tiere (Kontrolle n=9, Tg n=9).

### 3.3.3 Gruppe gealterter Tiere (10 Monate) unter Isoprotenerol

Die weitgehend konservierte Funktion und Struktur adulter Herzen nach IGF1R KO wirft die Frage auf, inwieweit dieser Signalweg eine Rolle bei der Entwicklung einer Hypertrophie infolge kardialen Stresses spielt. Daher wurde bei adulten, 10 Monate alten Mäusen mittels chronischer Infusion (14 d) von Isoproterenol (20mg/kg/d) eine kardiale Hypertrophie

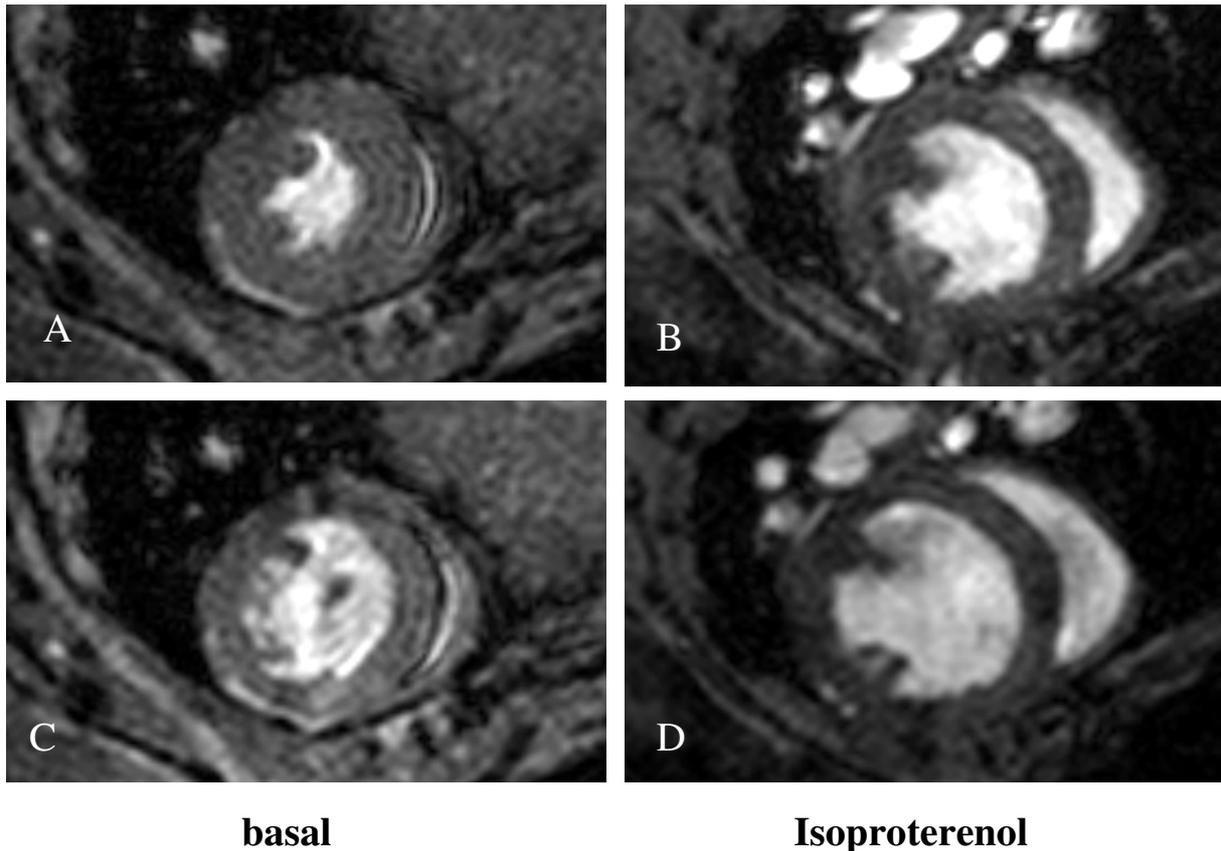
induziert. Zur morphologischen und funktionellen Analyse wurden MRT Messungen durchgeführt.

Betrachtet man die Morphologie des Myokards anhand eines mittventrikulären Transversalschnittes in der Diastole vor (siehe Abb. 38 A) und nach (siehe Abb. 38 B) Isoproterenolbehandlung im MRT, so zeichnet sich hier eine deutliche kardiale Funktionseinschränkung nach Isoproterenolbehandlung ab. Vergleicht man jeweils die enddiastolischen Durchmesser des linken Ventrikels auf mittventrikulärer Ebene miteinander, so lässt sich nach Behandlung ein deutlich erhöhtes linksventrikuläres Volumen feststellen (siehe Abb. 38 B). Außerdem fällt die Verdickung des Kammerseptums (siehe Abb. 38 B) nach Isoproterenolbehandlung als Ausdruck Isoproterenol induzierter kardialer Hypertrophie auf.



**Abbildung 38:** Darstellung mittventrikulärer Kurzachsenschnitte eines iCMIGF1RKO Tieres vor (A) und nach (B) Isoproterenolbehandlung.

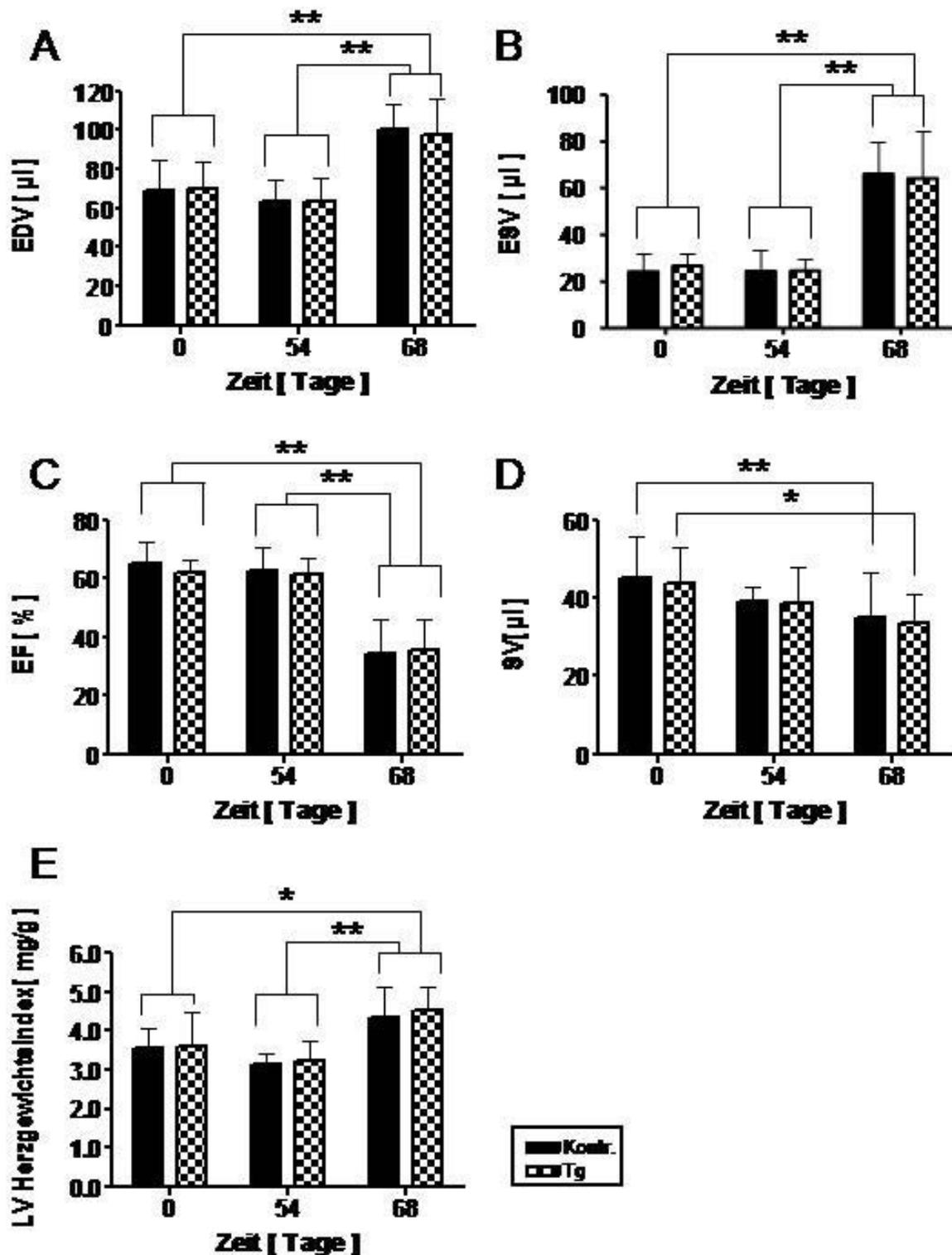
Der Vergleich der Herzen in der Endsystole und Enddiastole vor (siehe Abb. 39 A) und nach Isoproterenolbehandlung (siehe Abb. 39 B) lässt erkennen, dass nur eine geringe Verkleinerung des LV Kammerlumens in der Systole (siehe Abb. 39 B) im Vergleich zur Diastole (siehe Abb. 39 D) nach Behandlung vorhanden ist. Dieser Effekt wird besonders deutlich, wenn man den Vergleich zu den basalen Verhältnissen vor Isoproterenolbehandlung zieht (siehe Abb. 39 A, C).



**Abbildung 39:** Darstellung mittventrikulärer Transversalschnitte eines iCMIGF1RKO Tieres unter basalen Bedingungen in Systole (A) und Diastole (C) und 2 Wochen nach Isoproterenolbehandlung in Systole (B) und Diastole (D) mittels MRT.

Abbildung 40 zeigt eine Zusammenfassung aller quantitativ ermittelten Werte mittels MRT zum Zeitpunkt 0 (vor OHTX Behandlung), an Tag 54 (nach OHTX- und vor Isoproterenolbehandlung) und an Tag 68, zwei Wochen nach Isoproterenolbehandlung. Bei allen gemessenen Parametern ist nach iCMIGF1RKO kein signifikanter Unterschied zwischen der Kontroll- und der iCMIGF1RKO Gruppe festzustellen (siehe Abb. 40). Dies lässt vermuten, dass dem IGF1R-Signalweg unter kardialen Stress keine Bedeutung für die Herzfunktion und -Struktur beigemessen wird. Vergleicht man jedoch die ermittelten Parameter vor (Tag 0 und Tag 54) und nach (Tag 68) Isoproterenolbehandlung gruppenunabhängig, so ergibt sich für das EDV (A), das ESV (B) und auch für die EF (C) ein signifikanter Unterschied zwischen den Ergebnissen der Messung 1 (Tag 0) und 3 (Tag 68) bzw. 2 (Tag 54) und 3 (Tag 68). Beim Schlagvolumen konnte nur ein signifikanter Unterschied zwischen der Kontrollgruppe an Tag 0 und der Kontrollgruppe an Tag 68 festgestellt werden (siehe Abb. 39 D). Der LV-Herzgewichtsindex zeigte sowohl für die Kontroll- als auch für die iCMIGF1RKO Gruppe zwischen der 2. (Tag 54) und der 3. Messung (Tag 68) einen signifikanten Unterschied (siehe Abb. 39 E). Das ermittelte signifikant erhöhte ESV und EDV und, dadurch bedingt, eine signifikant verminderte EF nach Isoproterenolbehandlung im Vergleich zu den basalen Werten lässt sich auch morphologisch durch die bereits erwähnte deutliche Volumenzunahme sowohl in der Endsystole als auch –

Enddiastole (siehe Abb. 39 B,D) bestätigen. Der signifikant erhöhte LV Herzgewichtsindex (siehe Abb. 40 E) nach Isoproterenolgabe lässt auf eine Hypertrophie schließen.



**Abbildung 40:** Darstellung der mittels MRT erhobenen Parametern gealterter, 10 Monate alter Tiere vor und nach Isoproterenolbehandlung. Kontrolle n=9, Tg n=9. \*\* = p < 0,01, \* = p < 0,05. Enddiastolisches Volumen (EDV), Endsystolisches Volumen (ESV), Ejektionsfraktion (EF), Schlagvolumen (SV), Linksventrikulärer Herzgewichtsindex (LV-Herzgewichtsindex).

## 4 Diskussion

### 4.1 Beeinflussung der kardialen Funktion nach induziertem, herzspezifischem IGF1R KO (iCMIGF1RKO)

Eine Vielzahl experimenteller und klinischer Untersuchungen lässt darauf schließen, dass IGF1 im Herzen eine wesentliche Rolle bei der Regulation von Wachstumsprozessen, der Kontraktionskraft und dem Metabolismus spielt. Darüber hinaus scheint IGF1 Alterungsabhängige Funktionseinschränkung des Herzens zu modulieren. Viele dieser Daten wurden an transgenen Mausmodellen erhoben, die entweder das IGF1 spezifisch in Kardiomyozyten überexprimieren oder in denen der IGF1 Rezeptor konstitutiv in der Herz- und Skelettmuskulatur deletiert wurde. Die Überexpressionsmodelle erlauben nur Aussagen über die funktionelle Bedeutung gesteigerter IGF1 Spiegel im Herzen zu treffen. Eine Extrapolation auf basale IGF1 Signaltransduktion erscheint eher problematisch. Ähnliche Aussagen gelten für die akute Gabe von IGF1 zur Untersuchung der IGF1 Wirkung auf die kontraktile Funktion des Herzens. Auch hier werden hohe IGF1 Spiegel erreicht, die nicht notwendigerweise die physiologischen Spiegel simulieren. Die konstitutiven KO Modelle hingegen lassen Aussagen über die Funktion des IGF1 Rezeptors im Herzen zu. Allerdings muss einschränkend betont werden, dass konstitutive KOs häufig zur Aktivierung von Adaptationsmechanismen führen, die insbesondere bei einem Gendefekt, der bereits während der Embryonalentwicklung vorhanden ist, zu einer weit reichenden Veränderung funktioneller und struktureller Eigenschaften der betroffenen Organe führen können, die in ihrer Gesamtheit den Gendefekt kompensieren. Um die Rolle der IGF1-Signaltransduktion im adulten Herzen zu untersuchen, wurde im Rahmen dieser Arbeit erstmalig eine transgene Maus etabliert und verwendet, die eine zeitlich regulierbare und Zelltyp-spezifische Deletion des IGF1-Rezeptors (iCMIGF1RKO) in Kardiomyozyten ermöglicht. Dieses Modell umgeht mögliche Adaptationen, die während der Embryonalentwicklung infolge einer Rezeptordeletion eintreten könnten. Die wesentlichen Ergebnisse zur Analyse der Herzfunktion, die an diesem Modell erhalten wurden, lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- In jungen adulten Tieren hatte iCMIGF1RKO keinen Einfluss auf die Funktion, Morphologie und zelluläre Struktur der Herzen.
- Bei induzierter Deletion des IGF1-Rezeptors in alten Tieren zeigte sich im Vergleich zu den Kontrollen eine signifikante Funktionseinschränkung, gekennzeichnet durch eine Reduktion im endsystolischen Druck (Pes) sowie eine Abnahme der maximalen Druckabfallgeschwindigkeit ( $dP/dt_{min}$ ).
- Bei der Induktion einer pathologischen Hypertrophie ließ sich kein Unterschied zwischen iCMIGF1RKO und Kontrolltieren nachweisen.

Insulin und IGF1 vermitteln ihre Signaltransduktion über strukturell nah verwandte Rezeptoren, die als transmembranale Rezeptor-Tyrosinkinase, bestehend aus je zwei  $\alpha$ - und zwei  $\beta$ -Untereinheiten, nach Ligandenbindung ihre intrazelluläre Wirkung vor allem über eine Aktivierung des PI3-Kinase-AKT Weges entfalten. Außerdem findet eine Aktivierung des MAPKinase Weges statt. Über diese intrazellulären Signaltransduktionswege stimulieren Insulin und IGF1 im Herzen die Verstoffwechslung von Glukose, steigern die Proteinsynthese und hemmen Apoptose. Es ist daher auch nicht verwunderlich, dass transgene Mäuse mit kardiomyozytenspezifischer Überexpression von IGF1 eine kardiale Hypertrophie entwickeln (50). Interessanterweise wurde auch gezeigt, dass die IGF1 Überexpression im Herzen protektive Wirkung entfaltet, denn bei Induktion eines Myokardschadens durch lokale Applikation von Cardiotoxin, einer Komponente des Kobragiftes, zeigten IGF1-überexprimierende Herzen eine deutlich verbesserte Regeneration. Ähnliche Ergebnisse wurden im Herzinfarktmodell nach Ligation der linken Koronararterie (LCA) erhalten (48).

Ausgehend von diesen Beobachtungen stellt sich die Frage, inwieweit die endogene IGF-abhängige Signaltransduktion zur Integrität von Struktur und Funktion des adulten Herzens beiträgt. Führt die Ausschaltung des IGF1 Rezeptors zu einer Einschränkung des Kardiomyozytenwachstums im Sinne einer Atrophie? Kommt es zu gesteigerter Apoptose oder einer Einschränkung der kontraktile Funktion?

Um diese Fragen zu beantworten wurde im Rahmen dieser Arbeit der IGF1-Rezeptor in adulten Herzen der Maus mit Hilfe einer Tamoxifen-regulierbaren Cre Rekombinase inaktiviert. Dieses Tiermodell unterscheidet sich von den bisher eingesetzten Modellen dadurch, dass die IGF1-vermittelte Signaltransduktion selektiv in Kardiomyozyten unterbunden wird. Ferner erlaubt die zeitlich kontrollierbare Deletion des IGF1 Rezeptors in adulten Tieren die Aktivierung von Kompensationsmechanismen während der Embryonalentwicklung und frühen postnatalen Phase zu umgehen. Auf diesem Wege werden mögliche Wachstumsdefekte während der frühen Entwicklungsphase ausgeschlossen, so dass hier erstmalig die Auswirkungen der reduzierten IGF1 Signaltransduktion im adulten Herzen untersucht werden konnten.

Erfassung kardialer Funktionsparameter mit Hilfe der Echokardiographie und der Konduktanzmanometrie zeigten, dass in jungen adulten Mäusen die induzierte IGF-Rezeptordeletion zu keiner Veränderung der LV Funktion führte. So war Druckentwicklung,  $dP/dt_{max}$  und  $dP/dt_{min}$  unverändert. Systolische und diastolische linksventrikuläre Volumina waren von den Volumina der Kontrollen nicht verschieden. Ferner waren keine Unterschiede hinsichtlich der Geometrie von Ventrikeln und Kardiomyozyten im Sinne einer Atrophie oder Hypertrophie erkennbar. Auch wies das Myokard keine Zunahme interstitiellen Bindegewebes auf, und es konnte auch kein Hinweis auf eine gesteigerte Apoptose

gefunden werden. Dies legt den Schluss nahe, dass die IGF1-Rezeptorinaktivierung in Kardiomyozyten junger adulter Tiere zumindest im Untersuchungszeitraum keine Auswirkungen auf das Herz hatte.

Laustsen et al. (51) gingen ebenfalls der Frage nach, inwieweit eine Signaltransduktion über den IGF1 Rezeptor die Herzfunktion beeinflusst. Zu diesem Zweck verwendeten sie eine Kreuzung aus einer MCK-cre Maus mit einem geflochtenen IGF1 Rezeptor. Der MCK Promotor, der hier für die Expression der cre-Rekombinase genutzt wurde, vermittelt normalerweise die Expression der muskelspezifischen Kreatinkinase. In dem verwendeten Modell kam es also bereits während der Embryonalentwicklung zur Deletion des IGF1 Rezeptors in der Muskulatur einschließlich des Herzens. Der auffällige Befund dieser Untersuchung war, dass an jungen Tieren (echokardiographisch) keine veränderten linksventrikulären Durchmesser, keine veränderte Hinterwandstärke und keine Beeinträchtigung der Verkürzungsfraction nachweisbar waren. Diese Befunde wurden an jugendlichen (17 d) und adulten (6 Monate) Mäusen erhoben.

Kim et al. (7) untersuchten die Rolle der IGF1R-spezifischen Signaltransduktion bei der Entwicklung einer physiologischen Hypertrophie des Herzens. Dazu induzierten sie eine kardiomyozytenspezifische Deletion des IGF1R-Gens durch Kreuzung einer Maus mit geflochtenem IGF1R- Gen und einer  $\alpha$ -MHC-Cre Maus. Der  $\alpha$ MHC-Promotor vermittelt eine kardiomyozytenspezifische Expression des Transgens, so dass es in diesem Modell zu einer kardiomyozytenspezifischen Deletion des Transgens bereits während der Embryonalentwicklung kam. Auch diese Gruppe konnte keine Unterschiede hinsichtlich Herzgewichtsindex und Kardiomyozytendurchmesser an 8-10 Wochen alten Tieren ausmachen. Die Daten beider Gruppen sind damit in Übereinstimmung mit den Befunden, die in dieser Arbeit an den jungen iCM-IGF1RKO Mäusen erhoben wurden, und legen somit den Schluss nahe, dass die IGF1R-abhängige Signaltransduktion keine wesentliche Rolle für die Aufrechterhaltung der normalen Struktur und Funktion des jungen Herzens zu spielen scheint, oder dass die Funktion dieses Rezeptors auch in jungen adulten Tieren durch andere Mechanismen kompensiert werden kann.

Die Wirkung von IGF1 scheint in erheblichem Maße mit Alterungsprozessen assoziiert zu sein. Bei wirbellosen Tieren wie *C. elegans* und *D. melanogaster* wurde gezeigt, dass bei Tieren mit einer Mutation der IGF1-Rezeptor Homologen *daf-2* bzw. *InR* eine 3-fach höhere Lebenserwartung zu verzeichnen war als bei ihren entsprechenden Wildtypen. Auch bei heterozygoten IGF1R KO Mäusen konnte Holzenberger (52) im Durchschnitt eine 26%ig höhere Lebenserwartung beobachten als bei den Wildtyp-Kontrollen. Allerdings war dieser Phänotyp stark geschlechtsabhängig und bei weiblichen Mäusen stärker ausgeprägt (+ 33%) als bei männlichen (+15%). Ein ähnlicher Effekt einer IGF1 Rezeptordeletion wird auch in

Gehirn-spezifischen, heterozygoten IGF1R KO Mäusen gefunden, so dass die zentrale Regulation der somatotropen Achse über GH und IGF1 die Lebenserwartung zu regulieren scheint.

Im Gegensatz zu den Befunden auf der Ebene des gesamten Organismus scheint IGF1 auf der Ebene des Herzens entgegengesetzte Effekte hinsichtlich der Erhaltung der Integrität von Struktur und Funktion zu bewirken. Klinische Studien belegen, dass mit der Zunahme des Lebensalters reduzierte IGF1 Spiegel (35) (36) beim Menschen beobachtet werden. Interessanterweise wurde im Rahmen der Framingham Heart Study, einer prospektiven, epidemiologischen Studie an einem 717 Patienten umfassenden Subkollektiv mit einem durchschnittlichen Lebensalter von 78,5 Jahren eine positive Korrelation zwischen einem niedrigen IGF1 Spiegel im Serum und einem erhöhten Risiko, an kongestivem Herzversagen zu erkranken, nachgewiesen. Die Rotterdam-Studie, ebenfalls eine große epidemiologische Untersuchung an älteren Menschen, konnte zeigen, dass ein spezifischer Polymorphismus des IGF1 Gens, der zu höheren IGF1 Spiegeln führt, mit einem geringeren Risiko an Herzinsuffizienz zu erkranken assoziiert war. Diese Beobachtungen legen die Vermutung nahe, dass niedrige IGF1 Spiegel eine altersabhängige Funktionseinschränkung des Herzens begünstigen.

Angesichts der altersabhängigen Effekte von IGF1 wurde in einer weiteren experimentellen Serie untersucht, inwieweit nach Induktion einer IGF1R Deletion in Herzen gealterter Tiere Struktur- und Funktionsveränderungen nachweisbar waren. Die erhobenen Druckparameter mittels intrakardialer Kathetermessung zeigten in der iCMIGF1RKO Gruppe eine signifikant verminderte endsystolische Druckentwicklung  $P_{es}$  sowie eine Verlangsamung der frühen diastolischen Entspannung, erkennbar an einer gegenüber den Kontrolltieren um ca. 24% erniedrigten Druckabfallgeschwindigkeit  $dP/dt_{min}$ . Im Gegensatz zu den jungen Tieren zeigt sich also, dass es zu einer Verschlechterung der Herzfunktion bei IGF1-Rezeptorinaktivierung in den gealterten Tieren kommt.

Detaillierte histologische und immunhistochemische Untersuchungen zeigten aber, dass die beobachtete Funktionseinschränkung nicht mit strukturellen Veränderungen einherging. Sowohl der Kardiomyozytendurchmesser als auch der Herzgewichtsindex gaben keinen Hinweis auf eine Atrophie der Kardiomyozyten. Auch ließ sich kein gesteigerter Zelluntergang nachweisen, da sowohl Färbungen mittels Antikörpern gegen aktivierte Caspase3 bzw. Detektion von DNA-Strangbrüchen mittels TUNEL – Analyse keine Unterschiede zwischen Kontrollen und iCMIGF1RKO ergaben. Das Ausmaß interstitieller Fibrose war ebenfalls unverändert.

Diese Ergebnisse lassen nun folgende Schlussfolgerungen zu:

Im alternden Herzen trägt der IGF1 Rezeptor zum Erhalt der kontraktilen Funktion bei. Dabei wird sowohl die systolische als auch die diastolische Funktion unterstützt. Die molekularen Mechanismen, über die IGF1 diese kardiale Druckentwicklung und die Relaxation moduliert, waren nicht Gegenstand dieser Arbeit. Doch finden sich in der Literatur zahlreiche Hinweise über eine mögliche IGF1-(Rezeptor) Wirkung:

Am isoliert perfundierten Rattenherz konnten Cittadini et al. (11) eine positiv inotrope Wirkung von IGF1 nachweisen, die sich nach akuter IGF1 Gabe als eine signifikante Steigerung von  $P_{es}$  und  $dP/dt_{max}$  gegenüber dem Basalwert bemerkbar machte. Als Grund dieses akuten positiv inotropen Effekts wurde eine Erhöhung der  $Ca^{2+}$  Sensitivität des Troponin C, weniger eine erhöhte intrazelluläre  $Ca^{2+}$  -Konzentration durch Erhöhung des  $Ca^{2+}$  Transienten genannt. Auch konnte dieser Effekt durch Wortmannin aufgehoben werden, welches für eine Beteiligung der, dem IGF1-Rezeptor nachgeschalteten, von PI3-kinase-abhängigen Signalwege spricht. In Untersuchungen an isolierten Papillarmuskeln und Kardiomyozyten der Ratte wurde allerdings beschrieben, dass die durch IGF1 vermittelte Zunahme der Kontraktionskraft durch eine erhöhte Amplitude der  $Ca^{2+}$  Transienten ausgelöst wurde (12). An isolierten Kardiomyozyten wurde gezeigt, dass IGF1 eine Steigerung der  $Ca^{2+}$  Freisetzung aus intrazellulären Speichern bewirkt (53). Ähnliche Mechanismen könnten auch in den Herzen unserer iCMIGF1RKO-Mäuse zu dem verminderten  $P_{es}$  in vivo geführt haben.

Neben einem verminderten  $P_{es}$  als Hinweis einer verminderten systolischen Funktion wurde in der Gruppe der gealterten iCMIGF1RKO Tiere dieser Arbeit auch ein signifikant verminderter  $dP/dt_{min}$  als Zeichen einer verlangsamten Relaxation beobachtet. Tendenziell kam es auch zu einer Zunahme der Relaxationskonstante  $\tau$ . Beide Parameter signalisieren eine Verlangsamung der isovolumetrischen Relaxation und damit eine diastolische Dysfunktion. Die Relaxationsstörung könnte beispielsweise durch eine verlangsamte  $Ca^{2+}$ -Wiederaufnahme ins Sarkoplasmatische Retikulum oder eine erhöhte Aktivität des Ryanodin-Rezeptors bedingt sein. Die Folge dieser verlangsamten Ventrikelerschließung ist eine verspätete Ventrikelfüllung bei erhöhten Drücken. Cittadini et al. (11) konnten nach IGF1 Gabe am isolierten Rattenherz eine signifikant erhöhte Relaxationsgeschwindigkeit im Sinne einer verbesserten diastolischen Funktion beobachten, ein Effekt, der im Einklang mit den im Rahmen dieser Arbeit in vivo erhobenen Befunden an iCMIGF1RKO Mäusen steht.

Neben den funktionellen Veränderungen ergaben sich aber keine Unterschiede zwischen den Kontrolltieren und den iCMIGF1RKO Mäusen. Dies betraf die Ventrikelgeometrie, die Wandstärken und die Kardiomyozytendurchmesser ebenso wie das Ausmaß von Apoptose und interstitieller Fibrosierung. Es scheint, dass im Rahmen des Untersuchungszeitraums von ca. 8,5 Wochen zwar eine Funktionseinschränkung, noch nicht aber strukturelle

Veränderungen des Myokards der iCMIGF1RKO Mäuse eingetreten waren. Damit ähneln diese Befunde an den alten Tieren denen, die auch an jungen Tieren erhoben wurden.

Die fehlenden Veränderungen auf struktureller Ebene sind erstaunlich angesichts der wiederholt nachgewiesenen Wachstums-stimulierenden Eigenschaften von IGF1 an Kardiomyozyten. Sowohl chronische Applikation als auch transgene Überexpression von IGF1 im Herzen führt zu einer Zunahme des Kardiomyozytendurchmessers im Sinne einer Hypertrophie. Diese Hypertrophie wird auch durch körperliche Aktivität (Ausdauerleistung/Sport) ausgelöst und es wurde beobachtet, dass diese Form der adaptiven Hypertrophie zu einem großen Teil durch IGF1 induziert wird. So wurde in Mäusen mit konstitutiver, kardiomyozytenspezifischer Inaktivierung des IGF1 Rezeptors gezeigt, dass nach Schwimmtraining keine kardiale Hypertrophie ausgelöst wurde, während in Kontrollen eine deutliche Massenzunahme des Myokards induziert wurde. Ebenso führte eine chronische Gabe von IGF1 zu einer Hypertrophie, die ebenso wie eine durch Laufen ausgelöste Hypertrophie durch Atrogin, eine Ubiquitin-Ligase, gehemmt wurde. Man vermutet, dass IGF1 über seinen Rezeptor PI3-Kinase abhängig die Proteinkinase B (AKT) stimuliert. AKT kann nun eine Hypertrophie induzieren, indem es verschiedene Zielproteine phosphoryliert und somit deren Aktivität moduliert. In diesem Zusammenhang sind Transkriptionsfaktoren der Forkhead-Familie (Foxo1/Foxo3) von besonderer Bedeutung. Akt-abhängige Phosphorylierung führt nämlich zu deren Translokation aus dem Kern in das Zytosol und damit zu ihrer Inaktivierung. Eines der Zielgene der Foxo-Proteine ist das Atrogin-Gen, dessen Expression nun inhibiert wird. Atrogin wirkt im Zusammenspiel mit anderen Proteinen als Ubiquitin-Ligase und steigert so den Proteinabbau über das Proteasom. Damit ist eine pro-hypertrophe Wirkung von IGF-1 eine Reduktion des Proteinabbaus auch in Kardiomyozyten.

Angesichts dieser gut belegten Wirkung gesteigerter IGF1 Signaltransduktion im Zusammenhang mit physiologischer Hypertrophie bleibt die Frage offen, warum die Inaktivierung des IGF1 Rezeptors in den hier untersuchten iCMIGF1RKO Mäusen nicht zu einer Veränderung der basalen Kardiomyozytendurchmesser führte. Zusammen mit den entsprechenden Ergebnissen von Laustsen et al. (51) und Kim et al. (7) zeigen unsere Daten, dass für die strukturelle Integrität des Herzens unter sedentären Bedingungen die IGF1 Rezeptor-abhängige Signaltransduktion entbehrlich ist.

Wie bereits in der Einleitung zu dieser Arbeit ausgeführt, stellt die Entwicklung einer kardialen Hypertrophie eine Adaptation an veränderte mechanische Belastung des Herzens dar. Man weiß heute, dass sich eine kardiale Hypertrophie in unterschiedlicher Ausprägung entwickeln kann. Die physiologische oder adaptive Hypertrophie geht einher mit einer unveränderten oder verbesserten kontraktile Funktion und ist in der Regel reversibel. Im Gegensatz dazu ist die pathologische oder maladaptive Hypertrophie gekennzeichnet durch eine verminderte Kontraktionsleistung und häufig mit einer Progression zu linksventrikulärer

Dilatation und Pumpversagen assoziiert. Für die Entstehung der einen oder anderen Form scheint weniger der auslösende mechanische Stimulus entscheidend zu sein, als vielmehr die Art der aktivierten Signalwege, die das hypertrophe Wachstum der Kardiomyozyten stimulieren. Aktivierung der PI3Kinase  $\alpha$  führt eher zu einer physiologischen Hypertrophie, während insbesondere Gq-gekoppelte Signalwege die Entwicklung einer pathologischen Hypertrophie vermitteln. Sowohl chronische IGF1 Gaben als auch Ausdauerbelastung induzieren eine physiologische Hypertrophie, wie Untersuchungen an konstitutiven, kardiomyozytenspezifischen IGF1R-KO Mäusen belegen (7). Unklar ist jedoch, inwieweit IGF1 abhängige Prozesse die Entwicklung einer pathologischen Hypertrophie modulieren. Kommt es bei verminderter IGF1 – abhängiger Signaltransduktion zu einer Steigerung der pathologischen Hypertrophie, da eine möglicherweise durch IGF1 einfließende kompensatorische Komponente fehlt, oder sind beiden Formen der Hypertrophie strikt voneinander getrennt?

Um diesen Fragen nachzugehen, wurde eine pathologische Hypertrophie in Kontrollen und in iCMIGF1RKO Mäusen ausgelöst, indem eine chronische Infusion von Isoproterenol über osmotische Minipumpen durchgeführt wurde. Die chronische  $\beta$ -adrenerge Stimulation stellt ein häufig in der Literatur verwendetes kardiales Stressmodell dar, das in kurzer Zeit (14 d) eine Hypertrophie häufig mit Übergang zu LV-Dilatation auslöst. Dabei wird nicht nur Zellwachstum induziert sondern es können auch vermehrt Apoptose, Fibrose und Mikroinfarkte induziert werden, die die pathologische Ausprägung der Hypertrophie unterstützen.

Die Analyse der Herzfunktion mittels hochauflösendem Magnetic Resonance Imaging (MRI) ergab, dass eine ausgeprägte kardiale Hypertrophie bei Kontrollen und iCMIGF1RKO Mäusen nach zwei Wochen Isoproterenolstimulation eintrat. Die Vermessung der linksventrikulären systolischen und diastolischen Volumina zeigte, dass neben der Hypertrophie als Zeichen der Progression zur Herzinsuffizienz auch eine linksventrikuläre Dilatation eingetreten war. Allerdings ergaben sich für Kontrollen und iCMIGF1RKO Mäuse gleiche Werte, so dass auch die Ejektionsfraktion in gleichem Maße eingeschränkt war. Die Deletion des IGF1R-Gens hatte demnach keinen Einfluss auf die Ausprägung des kardialen Phänotyps im Isoproterenol-Stressmodell. Damit lässt sich vermuten, dass IGF1R-abhängige Signaltransduktion in Kardiomyozyten mit der über diesen Weg normalerweise ausgelösten physiologischen Hypertrophie die Entwicklung einer pathologischen Hypertrophie im Sinne einer Kompensation nicht modulieren kann.

Diese Befunde erscheinen zunächst überraschend, da eindrucksvoll gezeigt wurde, dass IGF1 sowohl bei Myokardinfarkt als auch bei Cardiotoxin-Gabe eine erhebliche kardioprotektive Wirkung entfalten kann (48). In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass IGF1

inflammatorische Prozesse hemmte, antioxidative Proteine induzierte, die Narbenbildung reduzierte und die Reparatur des Gewebes steigerte. Allerdings muss in diesem Zusammenhang betont werden, dass diese Effekte in transgenen Mäusen auftraten, die eine 35-fache Überexpression von muskelspezifischem IGF1 (mIGF1) im Herzen aufwiesen. Damit lässt sich in Verbindung mit unseren Daten zur Isoproterenol-induzierten Herzinsuffizienz vermuten, dass die endogenen IGF1 Spiegel nicht ausreichen, um eine wirkungsvolle Stimulation der kardialen IGF1 Rezeptoren auszulösen. Ein weiterer wesentlicher Punkt ist die spezifische IGF1 Isoform, die in der Arbeit von Santini et al.(48) exprimiert wurde. Die mIGF-1 Isoform ist nur eine von mehreren IGF1 Isoformen, die nach alternativem Splicing exprimiert werden können. Interessanterweise scheinen die einzelnen Isoformen trotz ihrer Bindung an denselben Rezeptor unterschiedliche Signalwege aktivieren zu können. So zeigten Santini et al. (48), dass in mIGF-1 exprimierenden Mausherzen keine Aktivierung der Proteinkinase AKT erfolgte, die eigentlich als entscheidender nachgeschalteter Mediator bei IGF-Rezeptoraktivierung gilt. Vielmehr wurde eine direkte PDK1 abhängige Aktivierung der ribosomalen S6-Kinase gefunden. Ohne weiter ins Detail gehen zu wollen, soll dieser exemplarische Befund nur zeigen, dass eine Extrapolation der in Überexpressionsmodellen (und auch durch chronische Applikation von IGF-1) erhobenen Daten auf die endogenen IGF1 Wirkungen nicht ohne Weiteres erfolgen kann.

Während die hier erhobenen Daten nahe legen, dass die endogene IGF1/IGF1-Rezeptor abhängige Signaltransduktion im Herzen eine unerwartet geringe Bedeutung zu spielen scheint, müssen alternative Interpretationen der Daten berücksichtigt werden.

So lässt sich nicht ausschließen, dass eine Verlängerung des Beobachtungszeitraums nach IGF1 Rezeptorinaktivierung sowohl in den jungen als auch in den alten Tieren zu einem deutlicher ausgeprägten kardialen Phänotyp führen würde. Weiterführende Untersuchungen sollten sich daher über Beobachtungszeiträume über das gesamte Lebensalter der Tiere erstrecken. Nichtinvasive, bildgebende Verfahren wie Echokardiographie und MRI, wie sie auch in dieser Arbeit verwendet wurden, stellen dazu ideale analytische Werkzeuge dar, um die Progression einer Funktionsveränderung über lange Zeit zu verfolgen.

Eine weitere Unklarheit besteht hinsichtlich einer möglichen Kompensation der fehlenden IGF1 Rezeptorfunktion in iCMIGF1RKO Mäusen. Obwohl die Inaktivierung des Rezeptors erst in adulten Tieren vorgenommen wurde, um eine entwicklungsbegleitende Adaptation, wie sie bei konstitutiven KO Mäusen häufig gefunden wird, zu umgehen, kann man nicht ausschließen, dass Kompensationsmechanismen auch im adulten Tier aktiviert werden können. Ein nahe liegender Mechanismus könnte im hohen Grad an Homologie zwischen Insulin- und IGF1 Rezeptor liegen. Auch nutzt die beiden Rezeptoren nachgeschaltete Signaltransduktion weitgehend ähnliche Elemente. So ist aus der Literatur bekannt, dass es

zu Kreuzreaktionen von Insulin, IGF1 und ihren Rezeptoren kommen kann. Es ist also nicht von vornherein auszuschließen, dass IGF1 über den Insulinrezeptor wirkt oder dass die Insulin-abhängige Signaltransduktion weitgehend die Funktion des ausgeschalteten IGF1 Rezeptors übernommen hat. Laustsen et al. (51) haben in ihrer Arbeit zum Vergleich der kardialen Funktion der Insulin- bzw. IGF-1 Rezeptoren an KO Mäusen mit muskelspezifischer Inaktivierung des IGF1- oder Insulin-Rezeptors gefunden, dass es nach intravenöser Applikation von IGF1 bzw. Insulin trotzdem zu einer Aktivierung von AKT und damit zu einem IGF1-Signaling gekommen ist, obwohl der IGF1 Rezeptor inaktiviert worden war. Ein möglicher Grund dieser Kreuzreaktion ist eine hohe Strukturhomologie zwischen beiden Rezeptoren, die für die  $\beta$ -Untereinheit 85%, und für die  $\alpha$ -Untereinheit 64-67% Übereinstimmung aufweisen. Aufgrund dieser Strukturhomologie sind IGF1 und Insulin in der Lage, an den jeweils anderen Rezeptor zu binden. Einschränkend muss jedoch betont werden, dass die Affinitäten für die Bindung an den heterologen Rezeptor deutlich niedriger liegen als für den homologen Rezeptor. So wurde für die Interaktion von IGF1 und IGF1R eine Affinität von  $10^{-10}$  M, für Insulin und IGF1 Rezeptor jedoch von  $10^{-8}$  M beschrieben. Ebenso hat IGF1 zum Insulinrezeptor eine 100-500fache niedrigere Affinität als Insulin selbst. Durch die deutlich stärkere Affinität zu ihren jeweiligen artverwandten Rezeptoren ist nach IGF1R KO eine schwächere IGF1 Wirkung über den Insulinrezeptor zu erwarten. Dennoch wäre es interessant zu überprüfen, inwieweit Insulin den IGF-Rezeptordefekt kompensieren kann. Experimentell bietet sich dazu beispielsweise das Streptozotozin-Modell an, bei dem auf pharmakologischem Wege die  $\beta$ -Zellen des Pankreas inaktiviert werden, somit in der Folge die Insulin Spiegel sinken und ein Diabetes mellitus Typ I entsteht. Auch lässt sich die mögliche Bedeutung der kardialen IGF1R-Signaltransduktion im Zusammenhang mit einem Typ II Diabetes mellitus analysieren, denn durch langfristige Fütterung einer Diät mit hohen Fruktosekonzentrationen lässt sich in der Maus die Insulinsensitivität im Sinne dieses Krankheitsbildes reduzieren.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass das in dieser Arbeit etablierte Tiermodell zur selektiven Inaktivierung des IGF1 Rezeptors in Kardiomyozyten des adulten Herzens bereits wichtige Einblicke in die Funktion des IGF1R in Kardiomyozyten gegeben hat. Ferner lässt sich schlussfolgern, dass am jungen adulten Herzen die Funktion des IGF1 Rezeptors entbehrlich zu sein scheint, während am alternden Herzen IGF1R Defizienz die Entwicklung einer diastolischen Dysfunktion begünstigt. Außerdem konnte gezeigt werden, dass IGF1 Signaltransduktion in einem Modell der pathologischen Hypertrophie keine Kompensation der maladaptiven Hypertrophie und ventrikulären Dilatation ermöglicht. Damit legt diese Arbeit wesentliche Grundsteine für eine weiterführende Analyse der IGF1 Signaltransduktion, z.B. im Rahmen der Diabetesentstehung.

## 4.2 Weiterführende Arbeiten

Im Hinblick auf die nur gering erzielten kardialen Effekte nach herzspezifischem, induziertem IGF1RKO (iCMIGF1RKO) unter basalen Bedingungen an jungen (3 Monate) und adulten Mäusen (10 Monate) in einem Untersuchungszeitraum von 80 bzw. 60 Tagen lässt sich nicht ausschließen, dass eine Verlängerung des Beobachtungszeitraums nach IGF1 Rezeptorinaktivierung zu einem deutlicher ausgeprägten kardialen Phänotyp führen würde. Weiterführende Untersuchungen sollten sich daher über Beobachtungszeiträume erstrecken, welche das gesamte Lebensalter der Tiere berücksichtigen. Hierbei kann man sich nichtinvasive, bildgebende Verfahren wie Echokardiographie und MRT zu Nutze machen, die als geeignete Mittel zur Analyse von Funktionsveränderung über längere Zeit angesehen werden.

Ein weiterer interessanter Zusammenhang scheint in den wenig stark ausgeprägten kardialen phänotypischen Veränderungen beider Altersgruppen und den möglicherweise damit verbundenen Kompensationsmechanismen zu bestehen. Hier wäre interessant zu überprüfen, inwieweit Insulin den IGF-Rezeptordefekt aufgrund der bereits beschriebenen Strukturhomologie zwischen IGF1 und Insulin und der Interaktion mit dem jeweils heterologen Rezeptor kompensieren kann. Dazu könnte auf ein Modell zurückgegriffen werden, bei dem durch Streptozotocininjektion die  $\beta$ -Zellen des Pankreas inaktiviert werden und somit ein Diabetes Typ I mit sinkendem Insulinspiegel induziert wird. Des Weiteren könnte die mögliche Bedeutung der kardialen IGF1R-Signaltransduktion im Zusammenhang mit einem Typ II Diabetes mellitus in Form einer reduzierten Insulinsensitivität analysiert werden, indem eine langfristige Fütterung einer Diät mit hohen Fruktosekonzentrationen in der Maus erfolgt.

## 5 Zusammenfassung

Eine Vielzahl experimenteller und klinischer Untersuchungen lassen darauf schließen, dass IGF1 im Herzen eine wesentliche Rolle bei der Regulation von Wachstumsprozessen, der Kontraktionskraft und des Metabolismus spielt. Darüber hinaus scheint IGF1 alterungsabhängige Funktionseinschränkungen des Herzens zu modulieren. Um die Bedeutung der IGF1-Signaltransduktion im adulten Herzen zu untersuchen, wurde im Rahmen dieser Arbeit erstmalig eine transgene Maus etabliert und verwendet, die eine zeitlich regulierbare und zelltypspezifische Deletion des IGF1-Rezeptors (iCMIGF1RKO) in Kardiomyozyten ermöglicht. Die Erfassung kardialer Funktionsparameter an Kontroll- und IGF1RKO Tieren mit Hilfe der Echokardiographie und der Konduktanzmanometrie zeigten, dass in jungen adulten Mäusen (3 Monaten) die induzierte IGF1-Rezeptordeletion zu keiner Veränderung der linksventrikulären Funktion führte. Dies konnte zum einen durch unveränderte Druckentwicklungen  $dP/dt_{max}$  und  $dP/dt_{min}$ , zum anderen durch systolische und diastolische linksventrikuläre Volumina, die sich von denen der Kontrollen nicht unterschieden, dargestellt werden. Darüber hinaus lieferten auch histologische und immunhistochemische Untersuchungen keine Unterschiede hinsichtlich der Geometrie von Ventrikeln und Kardiomyozyten im Sinne einer Atrophie oder Hypertrophie, das Myokard wies keine Zunahme an interstitiellen Bindegewebes auf und es konnte auch kein Hinweis auf eine gesteigerte Apoptose gefunden werden. Dies legt den Schluss nahe, dass die IGF-Rezeptorinaktivierung in Kardiomyozyten junger adulter Tiere im Untersuchungszeitraum von ca. 10 Wochen keine Auswirkungen auf das Herz hat. Aufgrund der bereits beschriebenen altersabhängigen Effekte von IGF1 wurde in einer weiteren experimentellen Serie untersucht, inwieweit nach Induktion einer IGF1R Deletion in Herzen gealterter Tiere (10 Monate) Struktur- und Funktionsveränderungen nachweisbar waren. Die erhobenen Druckparameter mittels intrakardialer Kathetermessung zeigten in der iCMIGF1RKO Gruppe eine signifikant verminderte endsystolische Druckentwicklung  $Pes$  sowie eine Verlangsamung der frühen diastolischen Entspannung, erkennbar an einer gegenüber den Kontrolltieren um ca. 24% erniedrigten Druckabfallgeschwindigkeit  $dP/dt_{min}$ . Im Gegensatz zu den jungen Tieren zeigte sich also, dass es in einem Untersuchungszeitraum von ca. 8,5 Wochen bereits zu einer Verschlechterung der Herzfunktion bei IGF1-Rezeptorinaktivierung in den gealterten Tieren gekommen ist. Detaillierte histologische und immunhistochemische Untersuchungen zeigten jedoch, dass die beobachtete Funktionseinschränkung nicht mit strukturellen Veränderungen einherging. Sowohl der Kardiomyozytendurchmesser als auch der Herzgewichtsindex gaben keinen Hinweis auf eine Atrophie der Kardiomyozyten. Auch ließ sich kein gesteigerter Zelluntergang nachweisen, da sowohl Färbungen mittels Antikörpern gegen aktivierte Caspase3 bzw. Detektion von DNA-Strangbrüchen mittels TUNEL – Analyse keine Unterschiede zwischen Kontrollen und iCMIGF1RKO ergaben. Das Ausmaß interstitieller Fibrose war ebenfalls unverändert. Im Gegensatz zu den jungen Tieren scheint demnach eine IGF1R-Deletion die Entwicklung einer diastolischen Dysfunktion zu

begünstigen, jedoch ohne Anzeichen begleitender struktureller und morphologischer Veränderungen des Herzens. Des Weiteren stellte sich die Frage, inwieweit IGF1 abhängige Prozesse die Entwicklung einer pathologischen Hypertrophie modulieren und ob es bei verminderter IGF1 abhängiger Signaltransduktion zu einer Begünstigung der pathologischen Hypertrophie kommt! Um diesen Fragen nachzugehen, wurde mittels chronischer Infusion über implantierte osmotische Minipumpen eine pathologische Hypertrophie in Kontrollen und in iCMIGF1RKO Mäusen ausgelöst. Die Analyse der Herzfunktion mittels hochauflösendem Magnetic Resonance Imaging (MRI) ergab, dass sowohl in den Kontrollen, als auch in den iCMIGF1RKO Mäusen eine ausgeprägte kardiale Hypertrophie zwei Wochen nach Isoproterenolstimulation zu beobachten war. Die Vermessung linksventrikulärer systolischer und diastolischer Volumina zeigte, dass neben der Hypertrophie als Zeichen der Progression zur Herzinsuffizienz auch eine linksventrikuläre Dilatation eingetreten war. Allerdings ergaben sich für Kontrollen und iCMIGF1RKO Mäuse gleiche Werte, so dass auch die Ejektionsfraktion in gleichem Maße eingeschränkt war. Die Deletion des IGF1R-Gens scheint demnach keinen Einfluss auf die Ausprägung des kardialen Phänotyps im Isoproterenol-Stressmodell zu haben. Damit lässt sich die Vermutung aufstellen, dass die IGF1R-abhängige Signaltransduktion in Kardiomyozyten mit der über diesen Weg normalerweise ausgelösten physiologischen Hypertrophie die Entwicklung einer pathologischen Hypertrophie im Sinne einer Kompensation nicht modulieren kann.

Zusammenfassend lässt sich sowohl aus den funktionellen Analysen, als auch aus den morphologisch und strukturellen Ergebnissen der untersuchten Tiere dieser Arbeit festhalten, dass das in dieser Arbeit etablierte Tiermodell zur selektiven Inaktivierung des IGF1 Rezeptors in Kardiomyozyten des adulten Herzens bereits wichtige Einblicke in die Funktion des IGF1R in Kardiomyozyten gegeben hat. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass am jungen adulten Herzen die Funktion des IGF1 Rezeptors entbehrlich zu sein scheint, während am alternden Herzen eine IGF1R Defizienz die Entwicklung einer diastolischen Dysfunktion begünstigt. Außerdem wurde deutlich, dass die IGF1 Signaltransduktion in einem Modell der pathologischen Hypertrophie keine Kompensation der maladaptiven Hypertrophie und ventrikulären Dilatation ermöglicht. Damit legt diese Arbeit wesentliche Grundsteine für eine weiterführende Analyse der IGF1 Signaltransduktion.

## 6 Summary

### **The importance of IGF1 signaling for the cardiac structure and function of the adult mouse**

From a great number of experimental and clinical investigations it can be concluded that IGF 1 plays an important part concerning the regulation of processes of growth, of myocardial contractility and of metabolism. Furthermore IGF1 seems to influence reductions of the function of the heart depending on age. In order to investigate the importance of the IGF1-signaling in the adult heart, in this paper for the first time a transgene mouse was established and used, which made a deletion of the IGF 1 receptor (iCMIGF1RKO) within the cardiomyocytes possible, being able to be regulated according to time and being specific in cell type.

The recordings of cardiac parameters concerning their function applied to control animals and iCMIGF1RKO animals with the help of echocardiography and catheter measurement showed that for young adult mice (three months old) the induced IGF1 receptor deletion did not cause any change of the left ventricular function of the heart. This fact could be shown on the one hand by consistent pressure developments  $dP/dt_{max}$  and  $dP/dt_{min}$  and on the other hand by systole and diastole left ventricular volumes, which did not differ from the ones of the control mice group. Additionally histological and immunohistochemical investigations did not deliver any differences concerning the geometry of the ventricle and the cardiomyocytes on behalf of atrophy or a hypertrophy. The myocardium did not show any increase of the interstitial connective tissue. Also no indication of an increased apoptosis could be found. This enables you to conclude that the IGF-receptor inactivation in the cardiomyocytes of young adult animals did not have any effect on the heart having undergone an investigation period of about ten weeks. Based on the effect of IGF1 having already been described and being dependent on age a further series of experiments was made trying to find out in how far changes in structure and function of the hearts of older animals (ten months old) could be proved after inducing an IGF1 receptor deletion. The pressure parameters carried out by intracardial catheter measurement showed a significantly decreased endsystole development of pressure.  $P_{es}$  as well as a slowing down of the early diastole relaxation, to be seen at the speed of loss of pressure ( $dP/dt_{min}$ ) by 24% less in contrast to the animals of the control group. As a contrast to the young animals it was shown that within the time of investigation of about 8.5 weeks already a worsening of the functioning of the heart concerning the IGF1 receptor inactivation could be seen in the older animals. Histological and immunohistochemical investigations carried out in detail, showed that the reduction of the functioning of the heart did not come along with changes in structure. No indication of an atrophy of the cardiomyocytes was given, neither within the cardiomyocyte diameter nor within the index of the weight of the heart. Additionally no increased apoptosis could be

found, because there were no differences existing between mice of the control group and mice of iCMIGF1RKO, neither due to execute Caspase-3 immunohistology nor due to the detection of DNA –frags by the help of TUNEL assay. The extent of interstitial fibrosis remained unchanged as well. In contrast to the young animals an IGF1R deletion seems to favour the development of a diastole dysfunction, however without any indications of accompanying structural and morphological changes of the heart. Furthermore the question must be asked, in how far processes which are dependent on IGF1 modify the development of a pathological hypertrophy and, if a signaling with a reduced IGF1 favours a pathological hypertrophy. In order to investigate into these questions more detailedly, a pathological hypertrophy was initiated in the mice of the control group and the mice of the iCMIGF1RKO group by a chronical infusion through implanted osmotic minipumps. The result of the analysis of the function of the heart made by high-resolution “Magnetic Resonance Imaging (MRI)” was the following one: two weeks after the stimulation of Isoproterenol a distinctive cardiac hypertrophy could be observed in the control group of mice as well as in the iCMIGF1RKO group. The measurement of the left ventricular systole and diastole volumes showed that next to the hypertrophy as a sign of the progression towards heart insufficiency also a left ventricular dilatation had occurred. However there were the same results found for the control group as well as for the iCMIGF1RKO group, so that the ejection fraction was limited to the same extent. The deletion of the IGF1R gene does not seem to have any influence on the parameter values of the cardiac phenotype within the Isoproterenol stress model. As a consequence you can assume that the signaling in cardiomyocytes depending on IGF1R, with the, in this way normally induced, physiological hypertrophy cannot modify the development of a pathological hypertrophy in the sense of a compensation.

Summarizingly you can state, derived as well from the functional analyses carried out as well as from the results on the morphological and the structural data of the examined animals that this animal model used for this paper has given an important insight into the function of the IGF1 receptor in the cardiomyocytes for the selective inactivation of the IGF1 receptor in the cardiomyocytes of the adult heart. Furthermore it could be shown that for the young adult heart the function of the IGF1 receptor seems to be dispensable. This, however, is not the case for the aging heart because the IGF1R deficiency favours the development of diastole dysfunction. In this paper it also became clear that the IGF1 signaling in a model of a pathological hypertrophy does not enable any compensation of the maladaptive hypertrophy and of the ventricular dilatation. Due to this fact this paper established an important foundation for a further analysis of the IGF1 signaling.

## 7 Tabellenanhang

Gruppe	Parameter	Einheit	n	Zeit nach OHTX (Wochen)				p-Wert
				0	5	9 (2 Wo nach ISO)	11	
Kontr. 3 Mo	EDV	μl	6	-	-	-	41,0±8,49	n.s.
	ESV	μl	6	-	-	-	11,5±0,71	n.s.
	EF	%	6	-	-	-	72±7,07	n.s.
	SV	μl	6	-	-	-	30±8,49	n.s.
	LV Gewichsindex	mg/g	6	-	-	-	3,1±0,42	n.s.
Tg 3 Mo	EDV	μl	9	-	-	-	44,75±9,36	n.s.
	ESV	μl	9	-	-	-	14±4,24	n.s.
	EF	%	9	-	-	-	68,75±2,75	n.s.
	SV	μl	9	-	-	-	30,5±5,51	n.s.
	LV Gewichsindex	mg/g	9	-	-	-	3,38±0,35	n.s.
Kontr. 10 Mo	EDV	μl	9	69,13±15,38 (1)	63,56±10,85 (2)	100,58±12,70 (3)	-	** 1-3, 2-3
	ESV	μl	9	24,14±7,88 (1)	24,33±9,19 (2)	65,85±13,65(3)	-	** 1-3, 2-3
	EF	%	9	65,26±7,37 (1)	62,78±8,04 (2)	34,49±11,41(3)	-	** 1-3, 2-3
	SV	μl	9	44,99±10,78 (1)	39,33±3,61 (2)	34,73±11,79(3)	-	** 1-3
	LV Gewichsindex	mg/g	9	3,54±0,52 (1)	3,16±0,27 (2)	4,32±0,80(3)	-	*1-3, ** 2-3
Tg 10 Mo	EDV	μl	9	70,41±13,10 (1)	63,11±11,98 (2)	97,67±18,18(3)	-	**1-3, 2-3
	ESV	μl	9	26,53±5,18 (1)	24,44±4,69 (2)	63,94±19,97(3)	-	**1-3, 2-3
	EF	%	9	62,22±3,93 (1)	61,44±5,81(2)	35,69±10,44(3)	-	**1-3, 2-3
	SV	μl	9	43,89±8,83 (1)	38,89±9,09 (2)	33,73±7,13(3)	-	* 1-3
	LV Gewichsindex	mg/g	9	3,58±0,90 (1)	3,22±0,51(2)	4,50±0,63(3)	-	*1-3, ** 2-3

**Tabelle 3:** Ermittelte MRT Daten; Werte sind als MW ± SE angegeben; Tg = iCMIGF1RKO, Kontr. = Kontrolle; \*\* = p < 0,01, \* = p < 0,05; n.s. = nicht signifikant;

Gruppe		junge erwachsene Tiere		p-Wert	alternde Tiere		p-Wert
		Kontr. 3 Mo	Tg 3 Mo		Kontr. 10 Mo	Tg 10 Mo	
<b>n</b>		6	9		9	9	
<b>dP/dtmin</b>	mmHg/s	7017±1788	6798±1348	n.s.	6090±1312	4618±438	*
<b>dP/dtmax</b>	mmHg/s	9653±2320	9437±1646	n.s.	7759±1352	7301±1994	n.s.
<b>Pes</b>	mmHg	84±14	81±9	n.s.	78±8	68±6	*
<b>Ped</b>	mmHg	3±6	1±1	n.s.	3±2	3±4	n.s.
<b>Tau</b>	mmHg	4±5	3±2	n.s.	5±2	6±4	n.s.
<b>SV</b>	μl	40±7	30±14	n.s.	31±15	26±10	n.s.
<b>HF</b>	1/min	595±50	606±54	n.s.	607±53	601±57	n.s.
<b>HMV</b>	μl/min	23459±3120	22683±14998	n.s.	18245±10211	14344±7580	n.s.

**Tabelle 4:** Intrakardial ermittelte Katheterdaten; Werte sind als MW ± SE angegeben; \* = p < 0,05; n.s. = nicht signifikant;

Gruppe	Parameter	Einheit	n	Zeitverlauf nach OHTX (Tage)				p-Wert
				0	13-15	24-25	38	
<b>Kontr. 3 Mo</b>	LVIDd	cm	6	0,39±0,06	0,38±0,06	0,39±0,06	-	n.s.
	LVIDs	cm	6	0,25±0,05	0,24±0,07	0,26±0,07	-	n.s.
	IVSd	cm	6	0,05±0,01	0,06±0,02	0,06±0,02	-	n.s.
	IVSs	cm	6	0,12±0,02	0,11±0,01	0,1±0,02	-	n.s.
	LVPWd	cm	6	0,06±0,03	0,05±0,01	0,05±0,01	-	n.s.
	LVPWs	cm	6	0,10±0,01	0,10±0,02	0,09±0,02	-	n.s.
	EDV	μl	6	66,07±21,32	64,87±26,72	67,26±35,37	-	n.s.
	ESV	μl	6	22,60±9,42	23,23±17,38	27,34±20,72	-	n.s.
	EF	%	6	66,72±6,29	67,16±10,08	62,75±12,42	-	n.s.
	Gewicht	g	6	25,82±5,57	28,54±4,41	27,97±4,23	-	n.s.
<b>Tg 3 Mo</b>	LVIDd	cm	9	0,39±0,05	0,40±0,02	0,41±0,05	-	n.s.
	LVIDs	cm	9	0,24±0,04	0,26±0,03	0,27±0,05	-	n.s.
	IVSd	cm	9	0,06±0,01	0,05±0,01	0,06±0,02	-	n.s.
	IVSs	cm	9	0,11±0,01	0,11±0,01	0,11±0,02	-	n.s.
	LVPWd	cm	9	0,05±0,01	0,05±0,01	0,07±0,02	-	n.s.
	LVPWs	cm	9	0,1±0,01	0,10±0,02	0,11±0,01	-	n.s.
	EDV	μl	9	68,4±21,55	70,85±10,08	74,13±20,97	-	n.s.
	ESV	μl	9	19,97±6,87	24,67±7,38	27,38±12,14	-	n.s.
	EF	%	9	70,95±6,85	65,54±7,99	64,2±9,09	-	n.s.
	Gewicht	g	9	24,01±4,78	26,48±4,05	26,01±3,15	-	n.s.
<b>Kontr. 10 Mo</b>	LVIDd	cm	9	0,37±0,05	0,38±0,03	0,37±0,05	0,37±0,02	n.s.
	LVIDs	cm	9	0,28±0,04	0,29±0,03	0,26±0,05	0,29±0,02	n.s.
	IVSd	cm	9	0,09±0,01	0,1±0,02	0,1±0,02	0,1±0,01	n.s.
	IVSs	cm	9	0,12±0,02	0,14±0,02	0,14±0,02	0,13±0,01	n.s.
	LVPWd	cm	9	0,09±0,01	0,1±0,01	0,09±0,01	0,1±0,01	n.s.
	LVPWs	cm	9	0,11±0,02	0,13±0,01	0,12±0,01	0,12±0,01	n.s.
	EDV	μl	9	57,68±18,09	60,95±11,79	59,16±20,73	59,89±9,40	n.s.
	ESV	μl	9	31±10,60	31,68±7,34	25,68±11,03	28,63±6,64	n.s.
	EF	%	9	46,64±6,49	47,72±6,93	57,15±11,01	46,04±3,98	n.s.
	Gewicht	g	9	32,87±5,78	31,70±4,86	31,78±4,70	30,57±4,80	n.s.
<b>Tg 10 Mo</b>	LVIDd	cm	9	0,39±0,06	0,41±0,07	0,41±0,07	0,4±0,03	n.s.
	LVIDs	cm	9	0,31±0,07	0,32±0,05	0,32±0,08	0,31±0,03	n.s.
	IVSd	cm	9	0,09±0,02	0,1±0,01	0,1±0,01	0,09±0,01	n.s.
	IVSs	cm	9	0,13±0,01	0,13±0,01	0,14±0,01	0,13±0,01	n.s.
	LVPWd	cm	9	0,1±0,01	0,1±0,01	0,1±0,02	0,1±0,01	n.s.
	LVPWs	cm	9	0,12±0,03	0,13±0,02	0,13±0,01	0,12±0,02	n.s.
	EDV	μl	9	68,35±22,30	78,25±30,09	77,21±32,24	68,42±11,27	n.s.
	ESV	μl	9	40,51±18,52	35,53±23,27	44,88±24,71	37,81±7,80	n.s.
	EF	%	9	43,44±11,19	44,84±3,34	45,19±13,64	45,7±3,08	n.s.
	Gewicht	g	9	29,18±5,10	29,99±5,11	29,73±4,39	29,79±4,11	n.s.

**Tabelle 5:** Transthorakale Echokardiographiedaten; Werte sind als MW ± SE angegeben; n.s. = nicht signifikant;

## 8 Abkürzungsverzeichnis

μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
μM	Mikromolar
A.	Arteria
Abb.	Abbildung
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
AP	Aktionspotential
AK	Antikörper
AKT	= Proteinkinase B (PKB)
ALS	Acid-labile subunit = säurelabile Untereinheit
AMPK	Adenosinmonophosphat aktivierte Proteinkinase
B-Mode	Brightness-Mode
bp	Basenpaar
Cm	Zentimeter
com.	Communis
°C	Grad Celsius
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
Cre	Cremer
Crk	Adapterprotein
C.elegans	Caenorhabditis elegans
DAPI	4',6-Diamidino-2'-phenylindol
DMSO	Di-Methyl-Sulf-Oxid
DNA	Desoxyribonucleinacid

dUTP	2`-desoxyuridine-5`-triphoshat
EDTA	Ethlylen-Diamin-Tetra-Acetat
EDV	Enddiastolisches Volumen
EF	Ejektionsfraktion
ESV	Endsystolisches Volumen
Fa.	Firma
FITC	Fluorescein isothiocyanate
F	French
FS	Fractional shortening
g	Gramm
G	Gauche
GDP	Guanosindiphosphat
GH	Growth Hormon
GLUT 4	Glukosetransporter 4
GSK3beta	Glykogen Synthase Kinase 3 beta
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HL-1	Heart Like-1
HCL	Salzsäure
IgG	ImmunglobulinG
IGF	Insulin-like Growth Factor
IGFBP	Insulin-like Growth Factor Binding Protein
IGFR	Insulin-like Growth Factor Receptor
IP <sub>3</sub>	Inositol 1,4,5-trisphosphat
IRS-1	Insulin-Rezeptor-Substrat 1

IVSd	Interventrikuläres Septum diastole
IVSs	Interventrikuläres Septum systole
kDa	Kilo-Dalton
kg	Kilogramm
KO	Knock Out
LBD	Liganden-Bindungs-Domäne
LVIDd	Left Ventricle Inner Diameter diastole
LVIDs	Left Ventricle Inner Diameter systole
LVPWd	Left Ventricle Post Wall diastole
LVPWs	Left Ventricle Post Wall systole
MAPK	Mitogen-Activated-Protein-Kinase
mg	Milligramm
MHz	Megahertz
min	Minuten
ml	Milliliter
M-Mode	Motion-Mode
Na	Natrium
NaOH	Natronlauge
NGS	Normal Goat Serum
nm	Nanometer
OHTX	4-Hydro-Tamoxifen
PCR	Polymerase-Chain-Reaction
PBS	Phosphate Buffered Saline
PDK1	3-Phosphoinositide-Dependent Protein Kinase-1
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase

PIP2	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat
PIP3	Phosphatidylinositol-trisphosphat
PTEN	Phosphatase and Tensin homolog
Raf-Protein	Rapidly growing fibrosarcoma protein
Ras	Rate sarcoma
ROS	Reactive Oxygen Species
rpm	revolutions per minute
SDS	Natriumdodecylsulfat
SH-Domäne	Src Homology-Domäne
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
SSC	Sodium chloride-sodium acetate- sodium citrate
STS	Staurosporin
Tab.	Tabelle
TdT	Terminal-Desoxynucleotidyl-Transferase
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TRITC	Tetramethylrhodamin isothiocyanate
V.	Vena
WGA	Wheat Germ Agglutinin

## 9 Literaturverzeichnis

1. McMurray, JJ; Stewart, S. Epidemiology, aetiology, and prognosis of heart failure 83, 596 (2000)
2. Stewart, S; MacIntyre, K; Hole, DJ; Capewell, S; McMurray, JJ. More 'malignant' than cancer? Five-year survival following a first admission for heart failure 3, 315 (2001)
3. Cohn, JN; Ferrari, R; Sharpe, N. Cardiac remodeling--concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. Behalf of an International Forum on Cardiac Remodeling 35, 569 (2000)
4. McMullen, JR; Shioi, T; Zhang, L; Tarnavski, O; Sherwood, MC; Kang, PM; Izumo, S. Phosphoinositide 3-kinase(p110alpha) plays a critical role for the induction of physiological, but not pathological, cardiac hypertrophy 100, 12355 (2003)
5. Dorn, GW. The fuzzy logic of physiological cardiac hypertrophy 49, 962 (2007)
6. Ren, J; Samson, WK; Sowers, JR. Insulin-like growth factor I as a cardiac hormone: physiological and pathophysiological implications in heart disease 31, 2049 (1999)
7. Kim, J; Wende, AR; Sena, S; Theobald, HA; Soto, J; Sloan, C; Wayment, BE; Litwin, SE; Holzenberger, M; LeRoith, D; Abel, ED. Insulin-like growth factor I receptor signaling is required for exercise-induced cardiac hypertrophy 22, 2531 (2008)
8. Duerr, RL; Huang, S; Miraliakbar, HR; Clark, R; Chien, KR; Ross, J, Jr. Insulin-like growth factor-1 enhances ventricular hypertrophy and function during the onset of experimental cardiac failure 95, 619 (1995)
9. Grimm, D; Cameron, D; Griese, DP; Riegger, GA; Kromer, EP. Differential effects of growth hormone on cardiomyocyte and extracellular matrix protein remodeling following experimental myocardial infarction 40, 297 (1998)
10. Dorn, GW; Force, T. Protein kinase cascades in the regulation of cardiac hypertrophy 115, 527 (2005)
11. Cittadini, A; Ishiguro, Y; Stromer, H; Spindler, M; Moses, AC; Clark, R; Douglas, PS; Ingwall, JS; Morgan, JP. Insulin-like growth factor-1 but not growth hormone augments mammalian myocardial contractility by sensitizing the myofilament to Ca<sup>2+</sup> through a wortmannin-sensitive pathway: studies in rat and ferret isolated muscles 83, 50 (1998)
12. Freestone, NS; Ribaric, S; Mason, WT. The effect of insulin-like growth factor-1 on adult rat cardiac contractility 163-164, 223 (1996)
13. Florini, JR; Ewton, DZ; Coolican, SA. Growth hormone and the insulin-like growth factor system in myogenesis 17, 481 (1996)
14. Palmen, M; Daemen, MJ; Bronsaer, R; Dassen, WR; Zandbergen, HR; Kockx, M; Smits, JF; van der, ZR; Doevendans, PA. Cardiac remodeling after myocardial infarction is impaired in IGF-1 deficient mice 50, 516 (2001)
15. Kajstura, J; Fiordaliso, F; Andreoli, AM; Li, B; Chimenti, S; Medow, MS; Limana, F; Nadal-Ginard, B; Leri, A; Anversa, P. IGF-1 overexpression inhibits the development of diabetic cardiomyopathy and angiotensin II-mediated oxidative stress 50, 1414 (2001)

16. Suleiman, MS; Singh, RJ; Stewart, CE. Apoptosis and the cardiac action of insulin-like growth factor I 114, 278 (2007)
17. Kaplan, RC; Strickler, HD; Rohan, TE; Muzumdar, R; Brown, DL. Insulin-like growth factors and coronary heart disease 13, 35 (2005)
18. Kato, H; Faria, TN; Stannard, B; Roberts, CT, Jr.; LeRoith, D. Essential role of tyrosine residues 1131, 1135, and 1136 of the insulin-like growth factor-I (IGF-I) receptor in IGF-I action 8, 40 (1994)
19. Abbott, AM; Bueno, R; Pedrini, MT; Murray, JM; Smith, RJ. Insulin-like growth factor I receptor gene structure 267, 10759 (1992)
20. Steele-Perkins, G; Turner, J; Edman, JC; Hari, J; Pierce, SB; Stover, C; Rutter, WJ; Roth, RA. Expression and characterization of a functional human insulin-like growth factor I receptor 263, 11486 (1988)
21. Werner, H; Weinstein, D; Bentov, I. Similarities and differences between insulin and IGF-I: structures, receptors, and signalling pathways 114, 17 (2008)
22. DeBosch, BJ; Muslin, AJ. Insulin signaling pathways and cardiac growth 44, 855 (2008)
23. Dupont, J; LeRoith, D. Insulin and insulin-like growth factor I receptors: similarities and differences in signal transduction 55 Suppl 2, 22 (2001)
24. Baxter, RC. Insulin-like growth factor (IGF)-binding proteins: interactions with IGFs and intrinsic bioactivities 278, E967 (2000)
25. Mohan, S; Baylink, DJ. IGF-binding proteins are multifunctional and act via IGF-dependent and -independent mechanisms 175, 19 (2002)
26. Mazerbourg, S; Klein, C; Roh, J; Kaivo-Oja, N; Mottershead, DG; Korchynskyi, O; Ritvos, O; Hsueh, AJ. Growth differentiation factor-9 signaling is mediated by the type I receptor, activin receptor-like kinase 5 18, 653 (2004)
27. Werner, H; Weinstein, D; Bentov, I. Similarities and differences between insulin and IGF-I: structures, receptors, and signalling pathways 114, 17 (2008)
28. Clemmons, DR. Modifying IGF1 activity: an approach to treat endocrine disorders, atherosclerosis and cancer 6, 821 (2007)
29. O'Connor, R; Kauffmann-Zeh, A; Liu, Y; Lehar, S; Evan, GI; Baserga, R; Blattler, WA. Identification of domains of the insulin-like growth factor I receptor that are required for protection from apoptosis 17, 427 (1997)
30. Taguchi, A; White, MF. Insulin-like signaling, nutrient homeostasis, and life span 70, 191 (2008)
31. Leri, A; Liu, Y; Wang, X; Kajstura, J; Malhotra, A; Meggs, LG; Anversa, P. Overexpression of insulin-like growth factor-1 attenuates the myocyte renin-angiotensin system in transgenic mice 84, 752 (1999)
32. Kulik, G; Klippel, A; Weber, MJ. Antiapoptotic signalling by the insulin-like growth factor I receptor, phosphatidylinositol 3-kinase, and Akt 17, 1595 (1997)
33. Chen, F; Chang, D; Goh, M; Klibanov, SA; Ljungman, M. Role of p53 in cell cycle regulation and apoptosis following exposure to proteasome inhibitors 11, 239 (2000)

34. Cittadini, A; Stromer, H; Katz, SE; Clark, R; Moses, AC; Morgan, JP; Douglas, PS. Differential cardiac effects of growth hormone and insulin-like growth factor-1 in the rat. A combined in vivo and in vitro evaluation 93, 800 (1996)
35. Bleumink, GS; Rietveld, I; Janssen, JA; van Rossum, EF; Deckers, JW; Hofman, A; Witteman, JC; van Duijn, CM; Stricker, BH. Insulin-like growth factor-I gene polymorphism and risk of heart failure (the Rotterdam Study) 94, 384 (2004)
36. Vasan, RS; Sullivan, LM; D'Agostino, RB; Roubenoff, R; Harris, T; Sawyer, DB; Levy, D; Wilson, PW. Serum insulin-like growth factor I and risk for heart failure in elderly individuals without a previous myocardial infarction: the Framingham Heart Study 139, 642 (2003)
37. Lieberman, SA; Hoffman, AR. The somatopause: should growth hormone deficiency in older people Be treated? 13, 671 (1997)
38. Laron, Z. The GH-IGF1 axis and longevity. The paradigm of IGF1 deficiency 7, 24 (2008)
39. Sohal, DS; Nghiem, M; Crackower, MA; Witt, SA; Kimball, TR; Tymitz, KM; Penninger, JM; Molkentin, JD. Temporally regulated and tissue-specific gene manipulations in the adult and embryonic heart using a tamoxifen-inducible Cre protein 89, 20 (2001)
40. Schipani, E. Conditional gene inactivation using cre recombinase 71, 100 (2002)
41. Metzger, D; Feil, R. Engineering the mouse genome by site-specific recombination 10, 470 (1999)
42. Muller, U. Ten years of gene targeting: targeted mouse mutants, from vector design to phenotype analysis 82, 3 (1999)
43. Kloting, N; Koch, L; Wunderlich, T; Kern, M; Ruschke, K; Krone, W; Bruning, JC; Bluher, M. Autocrine IGF-1 action in adipocytes controls systemic IGF-1 concentrations and growth 57, 2074 (2008)
44. Cerqueira, MD; Weissman, NJ; Dilsizian, V; Jacobs, AK; Kaul, S; Laskey, WK; Pennell, DJ; Rumberger, JA; Ryan, T; Verani, MS. Standardized myocardial segmentation and nomenclature for tomographic imaging of the heart. A statement for healthcare professionals from the Cardiac Imaging Committee of the Council on Clinical Cardiology of the American Heart Association 18, 539 (2002)
45. Weiss, JL; Frederiksen, JW; Weisfeldt, ML. Hemodynamic determinants of the time-course of fall in canine left ventricular pressure 58, 751 (1976)
46. Claycomb, WC; Lanson, NA, Jr.; Stallworth, BS; Egeland, DB; Delcarpio, JB; Bahinski, A; Izzo, NJ, Jr. HL-1 cells: a cardiac muscle cell line that contracts and retains phenotypic characteristics of the adult cardiomyocyte 95, 2979 (1998)
47. Goser, S; Andrassy, M; Buss, SJ; Leuschner, F; Volz, CH; Ottl, R; Zittrich, S; Blaudeck, N; Hardt, SE; Pfitzer, G; Rose, NR; Katus, HA; Kaya, Z. Cardiac troponin I but not cardiac troponin T induces severe autoimmune inflammation in the myocardium 114, 1693 (2006)
48. Santini, MP; Tsao, L; Monassier, L; Theodoropoulos, C; Carter, J; Lara-Pezzi, E; Slonimsky, E; Salimova, E; Delafontaine, P; Song, YH; Bergmann, M; Freund, C; Suzuki, K; Rosenthal, N. Enhancing repair of the mammalian heart 100, 1732 (2007)

49. Schaper, J; Elsasser, A; Kostin, S. The role of cell death in heart failure 85, 867 (1999)
50. Delaughter, MC; Taffet, GE; Fiorotto, ML; Entman, ML; Schwartz, RJ. Local insulin-like growth factor I expression induces physiologic, then pathologic, cardiac hypertrophy in transgenic mice 13, 1923 (1999)
51. Laustsen, PG; Russell, SJ; Cui, L; Entingh-Pearsall, A; Holzenberger, M; Liao, R; Kahn, CR. Essential role of insulin and insulin-like growth factor 1 receptor signaling in cardiac development and function 27, 1649 (2007)
52. Holzenberger, M; Dupont, J; Ducos, B; Leneuve, P; Geloën, A; Even, PC; Cervera, P; Le Bouc, Y. IGF-1 receptor regulates lifespan and resistance to oxidative stress in mice 421, 182 (2003)
53. Ibarra, C; Estrada, M; Carrasco, L; Chiong, M; Liberona, JL; Cardenas, C; Diaz-Araya, G; Jaimovich, E; Lavandero, S. Insulin-like growth factor-1 induces an inositol 1,4,5-trisphosphate-dependent increase in nuclear and cytosolic calcium in cultured rat cardiac myocytes 279, 7554 (2004)
54. Fischer M, Baessler A, Holmer SR, Muscholl M, Bröckel U, Luchner A, Hense HW, Döring A, Riegger G, Schunkert H: Epidemiologie der linksventrikulären systolischen Dysfunktion in der Allgemeinbevölkerung Deutschlands. Ergebnisse echokardiographischer Untersuchungen einer großen Bevölkerungsstichprobe. Z Kardiol 92 (2003) 294-302
55. Hoppe UC, Erdmann E: Herausgegeben vom Vorstand der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie - Herz- und Kreislaufforschung. Bearbeitet im Auftrag der Kommission für Klinische Kardiologie in Zusammenarbeit mit der Arzneimittelkommission der Deutschen Ärzteschaft: Leitlinien zur Therapie der chronischen Herzinsuffizienz. Z-Kardiol 90 (2001) 218-237
56. Statistisches Bundesamt: Häufige Todesursachen, Kapitel 1.4.2 (Gesundheit in Deutschland, 2006). <http://www.gbe-bund.de>. Statistisches Bundesamt: Diagnosedaten der Krankenhäuser ab 2000. <http://www.gbe-bund.de> Statistisches Bundesamt: Krankheitskosten in Mio. EURO für Deutschland (2004) I50 Herzinsuffizienz. <http://www.gbe-bund.de>
57. Silbernagl S, Despopoulos A - Taschenbuch der Physiologie; Thieme, Stuttgart; Auflage 6., korrig. A. (2003)
58. Engelhardt v W, Breves G – Physiologie der Haustiere; Enke; Auflage 2; völlig Neubearb. A. (26. Januar 2005)
59. Westermann D, Kasner M, Schultheiss HP, Tschöpe C: Die diastolische Herzinsuffizienz – No Time to Relax. Journal für Kardiologie 2006; 13 (7-8)

## 10 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Axel Gödecke für die Ermöglichung dieser Arbeit sowie für die überaus freundliche und engagierte Betreuung und Unterstützung während der gesamten Zeit am Institut.

Herzlicher Dank gilt auch Prof. Dr. Heike Tönhardt für die Vertretung dieser Arbeit am Fachbereich der Veterinärmedizin und für die Begutachtung dieser Dissertation.

Meiner gesamten Arbeitsgruppe danke ich für die schöne Zeit in Düsseldorf, besonders dir, Annika, für die netten Treffen außerhalb des Instituts, für viele Freundschaftsdienste und für viel Gesprächsstoff mit der Erkenntnis: „Das Leben ist manchmal kein Ponyhof“. Auch dir, Sarah, möchte ich für die Betreuung und Unterstützung meiner Arbeit danken und nicht zu vergessen Susanne, Sabine, Marian, Katharina und Claudia (kleines Feeble) für die netten Gespräche und die Hilfsbereitschaft. Dir, Christoph, danke ich besonders für deine geduldige und selbstverständliche Hilfe in allen technischen Bereichen, für Marmorkuchen & Co sowie für die Überreichung meiner persönlichen „Liste“ zur Bekämpfung diverser Lebenskrisen.

Danken möchte ich außerdem allen anderen Mitarbeitern des Instituts, die zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen und mir zwei schöne Jahre am Institut beschert haben.

Besonders danke ich meinen Eltern, die mir durch ihre Unterstützung und Zureden den erfolgreichen Abschluss meines Studiums und der Promotion ermöglicht haben.

Dir, Dirk, danke ich besonders für die ehrenwerte Betitelung „Computerfachfrau und Microsoft-Testerin“, für viele Stunden quälender Formatierungsarbeit sowie für viel Abwechslung während des Schreibens meiner Arbeit.

Ein großer Dank gilt außerdem Dorothea Hoelper und für die Korrektur dieser Arbeit.

Zuletzt gilt meine große Dankbarkeit Christel Scholl, die nicht nur einen Beitrag zu dieser Arbeit geleistet hat und mir immer in Erinnerung bleiben wird.

## **11 Selbständigkeitserklärung**

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Schwalmtal, den 26.11.2010

Claudia Kessels