

Medizinische Hochschule Hannover

Klinik für Kardiologie und Angiologie

**Skelettmuskuläres Myosin als endokriner Regulator
der Herzfunktion**

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

- Doctor rerum naturalium -

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von

Małgorzata Szaroszyk

aus Śrem, Polen

Hannover 2019

Angenommen durch den Senat: 29.11.2019

Präsident: Prof. Dr. med. Michael P. Manns

Wissenschaftliche Betreuung: Prof. Dr. med. Jörg Heineke

Wissenschaftliche Zweitbetreuung: Prof. Dr. rer. nat. Nils von Neuhoff

1. Referent/in: Prof. Dr. med. Jörg Heineke

2. Referent/in: Prof. Dr. rer. nat. Nils von Neuhoff

3. Referent/in: Prof. 'in Dr. rer. nat. Theresia Kraft

Prüfungsausschuss

Vorsitz: Prof. 'in Dr. rer. nat. Theresia Kraft

1. Prüfer/in: Prof. Dr. med. Jörg Heineke

2. Prüfer/in: Prof. Dr. rer. nat. Nils von Neuhoff

3. Prüfer/in: Prof. 'in Dr. rer. nat. Theresia Kraft

Tag der mündlichen Prüfung: 29.11.2019

“Experience is the teacher of all things”

- Gaius Julius Caesar -

Inhalt

Zusammenfassung	I
Summary	II
Grafische Zusammenfassung	III
1 Einleitung	1
1.1 Chronische Herzinsuffizienz	1
1.1.1 Formen der Herzinsuffizienz.....	2
1.1.2 Entwicklung und Mechanismen der Herzinsuffizienz	3
1.1.3 Kardiales <i>Remodeling</i>	4
1.1.4 Natriuretische Peptide	9
1.1.5 Fibroblasten und Fibrose	12
1.1.6 Kardiale Kontraktilität und Calciumhomöostase	15
1.2 Kardiale Kachexie	20
1.3 Musclin.....	22
2 Zielsetzung der Arbeit	26
3 Materialien und Methoden	27
3.1 Materialien.....	27
3.1.2 Geräte	27
3.1.2 Verbrauchsmaterialien und Chemikalien	29
3.1.3 Kits	32
3.1.4 Lösungen und Puffer	33
3.1.5 Plasmide	38

3.1.6	Oligonukleotide	39
3.1.7	Antikörper	40
3.1.8	Rekombinante Proteine	41
3.1.9	Bakterienstämme	42
3.1.10	Mausstämme.....	42
3.2	Methoden.....	44
3.2.1	Zellkultur.....	44
3.2.2	Molekularbiologie	49
3.2.3	Proteinbiochemie.....	54
3.2.4	Immunhistochemie	55
3.2.5	Tierexperimentelle Methoden	57
4	Ergebnisse.....	63
4.1	Kardiale Kachexie verursacht ein Musclindexit im atrophierten Skelettmuskel	63
4.2	Die skelettmuskelspezifische Überexpression von Musclin mittels AAV6 mindert die pathologische kardiale Fibrose und verbessert die Herzfunktion nach chronischer Druckbelastung.....	70
4.3	Die skelettmuskelspezifische Deletion von Musclin nach kurzfristiger TAC fördert die linksventrikuläre Dysfunktion und Fibrose	80
4.4	Musclin erhöht die Kardiomyozytenkontraktilität über CNP/NPR-B-vermittelten Signalweg	90
4.5	Musclin beeinflusst die Generierung von cAMP durch cGMP-vermittelte PDE3-Inhibierung in Kardiomyozyten	96
4.6	Deletion von skelettmuskulärem Musclin verursacht verminderte cGMP- und cAMP-Konzentration sowie eine reduzierte Aktivierung von Phospholamban in Kardiomyozyten	101
4.7	Musclin beeinflusst Proliferation und Migration der kardialen Fibroblasten	103

5	Diskussion	107
5.1	Musclin-Expression bei chronischer Herzinsuffizienz.....	107
5.2	Einfluss von Musclin auf die Kardiomyozytenkontraktilität	108
5.3	Zusammenhang von Musclin mit dem natriuretischen Peptidsystem	110
5.4	PDE 3-Hemmung als therapeutischer Ansatz.....	111
5.5	Musclin und Fibrose	113
5.6	Klinische Bedeutung	115
5.7	Fazit	115
5.8	Ausblick und Limitationen der Studie.....	116
6	Literaturverzeichnis	119
7	Anhang	137
8	Abkürzungsverzeichnis	138
9	Abbildungsverzeichnis	144
10	Tabellenverzeichnis	147
11	Publikationen und Konferenzbeiträge	149
12	Lebenslauf	150
13	Danksagung	152
14	Selbständigkeitserklärung.....	153

Zusammenfassung

Die Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems sind in der westlichen Welt eine der häufigsten Todesursachen. Etwa 20 % der Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz verlieren ungewollt stark an Skelettmuskelmasse und Gesamt-Körpergewicht. Dieses Krankheitsbild wird „kardiale Kachexie“ genannt. Die Letalität in dieser Hochrisiko-Patientengruppe ist etwa zwei- bis dreimal höher als bei herzinsuffizienten Patienten ohne Gewichtsverlust. Der Mechanismus, wie Skelettmuskelatrophie das Voranschreiten der Herzinsuffizienz fördert, ist bisher unzureichend erforscht. Hier wird die Hypothese aufgestellt und untersucht, dass die Freisetzung von kardio-protectiven Proteinen aus dem atrophierten Skelettmuskel bei herzinsuffizienten, kachektischen Patienten beeinträchtigt sein könnte.

Eine RNA-Sequenzierungsanalyse aus atrophierten Skelettmuskeln von herzinsuffizienten, kachektischen Mäusen zeigte eine deutlich verringerte Expression von Musclin (in der Literatur auch als Osteocrin bekannt) im Vergleich zu gesunden, scheinoperierten Mäusen. Musclin wird überwiegend in der Skelettmuskulatur und nicht im Herzen exprimiert und ist an der Verstärkung der Signaltransduktion natriuretischer Peptide beteiligt. In dieser Arbeit wurden die Auswirkungen einer skelettmuskelspezifischen Deletion von Musclin in induzierbaren *knock-out* Mäusen bei pathologischer Druckbelastung untersucht und ergaben als Folge der Musclin-Deletion im Skelettmuskel eine linksventrikuläre Dysfunktion sowie eine verstärkte Myokardfibrose. Eine gezielte, durch AAV6-vermittelte, skelettmuskelspezifische Musclin-Überexpression führte im Gegenzug zu einer verbesserten Herzfunktion und Minderung der Fibrose nach langfristiger chronischer Druckbelastung. Mechanistisch wurde in der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass Musclin die myokardiale CNP-Konzentration erhöht, dadurch eine positive cGMP/cAMP-Interaktion stimuliert und somit zur erhöhten Kardiomyozytenkontraktilität durch verstärkte Proteinkinase-A-Signaltransduktion führt. Zusätzlich vermindert Musclin die Aktivierung kardialer Fibroblasten durch Verstärkung des Proteinkinase-G-Signalwegs in diesen Zellen.

Zusammenfassend wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass die skelettmuskelspezifische Musclin-Überexpression ein vielversprechender therapeutischer Ansatz zur Behandlung einer Herzinsuffizienz mit begleitender kardialer Kachexie sein könnte.

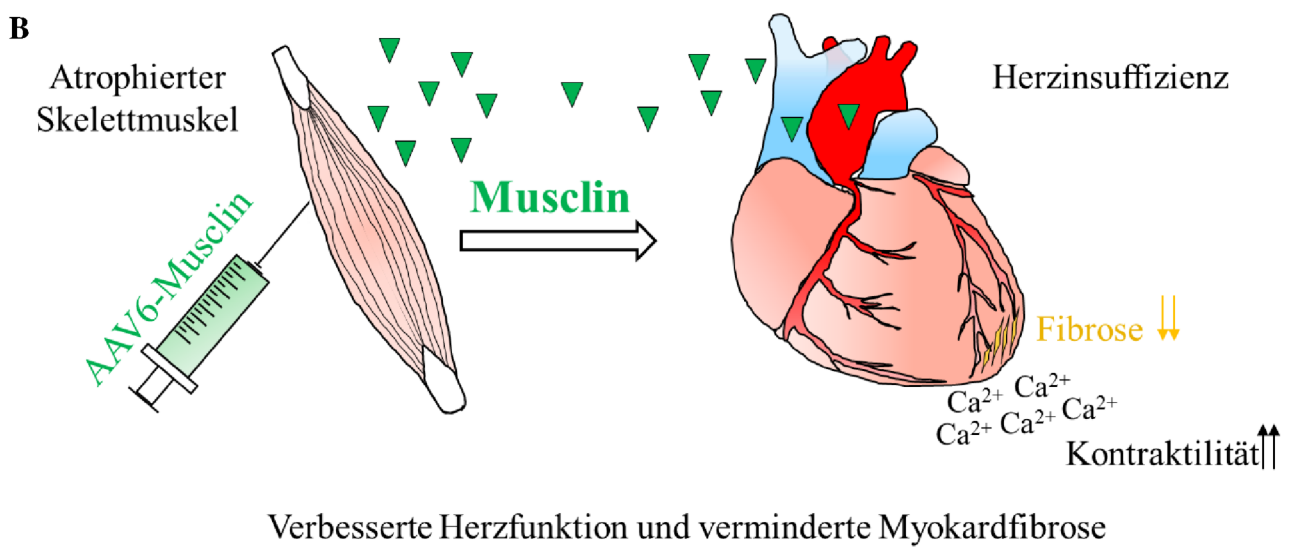
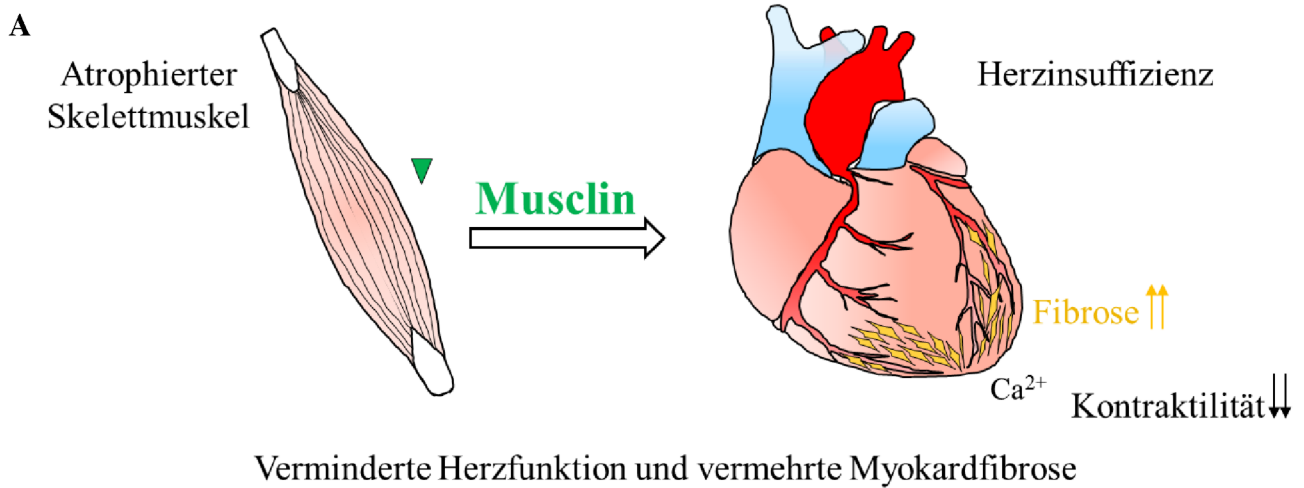
Summary

Diseases of the cardiovascular system are one of the leading causes of death in the Western world. About 20% of patients with chronic heart failure lose skeletal muscle and whole body mass. This heart failure associated co-morbidity is termed “cardiac cachexia”. The mortality in this high-risk patient group is about two to three times higher than in heart failure patients without weight loss. The mechanism, how skeletal muscle atrophy adversely affects the progression of heart failure during cardiac cachexia remains unclear. Here, it is hypothesized that the release of cardio-protective proteins from atrophic skeletal muscle could be compromised in patients with cardiac cachexia. In this study, we investigate this hypothesis.

A RNA sequencing analysis from tissues of atrophied skeletal muscle of mice with cardiac cachexia during long-term pressure overload showed significantly reduced expression of Musclin (known in the literature also as Osteocrin) compared to healthy mice. Musclin is expressed predominantly in skeletal muscle and not in the heart, and is involved in enhancing natriuretic peptide signaling. In this work, the effect of a skeletal muscle-specific deletion of Musclin in inducible knock-out mice during pressure overload revealed left ventricular dysfunction and increased myocardial fibrosis. Targeted AAV6-mediated, skeletal muscle-specific Musclin overexpression, in turn, led to improved cardiac function and reduced fibrosis after long-term chronic pressure overload. Mechanistically, this work shows that Musclin increases the myocardial CNP concentration, thereby stimulating a positive cGMP/cAMP interaction and thus leading to increased cardiomyocyte contractility through enhanced protein kinase A signaling. In addition, Musclin reduces fibroblast activation by enhancing the protein kinase G signaling pathway in these cells.

In summary, the relationship between skeletal muscle and heart through overexpression of Musclin may be a promising therapeutic strategy for the treatment of heart failure during cardiac cachexia.

Grafische Zusammenfassung



Das Musclindefizit im Skelettmuskel beschleunigt eine linksventrikuläre Herzdysfunktion und verstärkt die Bildung der Myokardfibrose (A), während die gezielte AAV6-vermittelte Musclin-Überexpression im Skelettmuskel die Herzfunktion deutlich verbessert und die Bildung der Myokardfibrose stark mindert (B).

1 Einleitung

Die chronische Herzinsuffizienz ist neben dem Myokardinfarkt eine der häufigsten Todesursachen in der westlichen Welt. Im fortgeschrittenen Stadium können Patienten eine kardiale Kachexie entwickeln, eine schwerwiegende Komplikation, die durch signifikanten Gewichtsverlust gekennzeichnet ist (Anker *et al.* 1997). In der Vergangenheit konnte demonstriert werden, dass auch sezernierte Faktoren aus dem Myokard (z.B. Myostatin) einen Skelettmuskelschwund induzieren können (Breitbart *et al.* 2011). Der Einfluss von sezernierten Faktoren aus dem Skelettmuskel auf das kranke Herz im Zusammenhang mit der kardialen Kachexie wurde bislang jedoch nicht untersucht.

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Rolle des sezernierten Proteins Musclin (auch bekannt als Osteocrin) in der Entwicklung einer chronischen Herzinsuffizienz mit begleitender kardialer Kachexie. Durch eine gezielte Überexpression bzw. eines Verlustes von Musclin wurden die Auswirkungen auf die Entwicklung einer Herzinsuffizienz *in vivo* als auch *in vitro* analysiert und die molekularen Mechanismen aufgeklärt.

1.1 Chronische Herzinsuffizienz

Das Herz ist der Motor des Lebens. Wenn das Herz seine Fähigkeit zu kontrahieren verliert, kommt es zu einer sogenannten Herzinsuffizienz. Dabei handelt es sich um eine fortschreitende Herzerkrankung, bei dem das Herz trotz genügend venösem Blutangebot nicht mehr in der Lage ist, die peripheren Organe in Ruhe und insbesondere bei Belastung ausreichend mit Blut und damit mit Sauerstoff zu versorgen (Swedberg *et al.* 2005). Grund dafür ist oft eine verschlechterte Kontraktilität des Herzens. Somit stellt die Herzinsuffizienz das Endstadium vieler Herzerkrankungen dar. Bedeutende Risikofaktoren für die Entstehung einer Herzinsuffizienz sind u.a. hohes Alter, Myokardinfarkte, Herzklappenfehler, Bluthochdruck, Myokarditis, angeborene Herzfehler, Erkrankungen der Lunge sowie Diabetes (Bui *et al.* 2011).

Erkrankungen des kardiovaskulären Systems gehören zu den häufigsten Todesursachen in der westlichen Welt, und die Herzinsuffizienz ist mit über vier Millionen Toten dabei die Hauptursache (Bui *et al.* 2011). Weltweit leiden schätzungsweise 40 Millionen Menschen an einer Herzinsuffizienz und es werden jährlich etwa 2 Millionen neue Fälle diagnostiziert.

Die Prävalenz nimmt mit dem Alter weiterhin zu und steigt alle drei Jahre um eine Million Erwachsene (Ziaecian and Fonarow 2016; Benjamin *et al.* 2018). Die Herzinsuffizienz ist mit einer erhöhten Morbidität und Mortalität verbunden und stellt eine erhebliche Belastung für das Gesundheitssystem dar. Bei Patienten mit Herzinsuffizienz treten häufig auch andere Krankheiten auf, die sogenannten Begleiterkrankungen oder Komorbiditäten (van der Wal *et al.* 2017). Zu den häufigsten Komorbiditäten einer Herzinsuffizienz, die ebenso zu erhöhter Morbidität und Mortalität sowie zu einer Beeinträchtigung der Lebensqualität beitragen, gehören: Niereninsuffizienz, Diabetes mellitus, Hypertonie, Lungenerkrankung, Anämie und Skelettmuskelschwund (van der Wal *et al.* 2017).

Die Aufklärung der molekularen Mechanismen, die insbesondere der Herzinsuffizienz zugrunde liegen, ist daher von großer Bedeutung. Dies würde nicht nur der Optimierung bereits bestehender Therapiemöglichkeiten dienen, sondern auch die Möglichkeit bieten, frühzeitig in den Krankheitsverlauf einzugreifen.

1.1.1 Formen der Herzinsuffizienz

Die Herzinsuffizienz stellt in der Regel eine myokardiale Anomalie dar, die eine systolische und diastolische ventrikuläre Dysfunktion verursacht. Die systolische Dysfunktion zeichnet sich vor allem durch einen reduzierten Auswurfanteil des sich am Ende der Diastole im Ventrikel befindlichen Blutes aus. Die diastolische Dysfunktion dagegen tritt auf, wenn sich die Herzkammer nicht ausreichend entspannt und steif wird. Dadurch wird die Herzkammer nicht optimal mit Blut gefüllt und das Blut staut sich in die Lungenstrombahn zurück. Der steife Ventrikel erhöht den Druck und hat ähnliche Folgen wie die systolische Dysfunktion (Federmann and Hess 1994).

Die Hauptbegriffe zur Beschreibung einer Herzinsuffizienz basieren auf der Messung der Linksventrikulären Ejektionsfraktion (LVEF). Diese umfasst ein breites Spektrum von Patienten mit erhaltener linksventrikulärer Ejektionsfraktion ($LVEF \geq 50\%$) (*Heart Failure with preserved Ejection Fraction*, HFpEF) bis hin zu Patienten mit reduzierter linksventrikulärer Ejektionsfraktion ($LVEF < 40\%$) (*Heart Failure with reduced Ejection Fraction*, HFrEF). Patienten mit einer LVEF im Bereich von 40-49 % stellen eine "Grauzone" dar, die als Herzinsuffizienz mit geringgradig eingeschränkter linksventrikulärer Ejektionsfraktion

(*Heart Failure with midrange Ejection Fraction*, HFmrEF) definiert wird (Ponikowski *et al.* 2016; Nadar 2017).

1.1.2 Entwicklung und Mechanismen der Herzinsuffizienz

Die häufigsten Ursachen für die Entstehung einer Herzinsuffizienz sind der Myokardinfarkt und eine chronisch bestehende arterielle Hypertonie. Letztere führt durch die oft langjährige Druckbelastung der linken Herzkammer zur Entwicklung einer myokardialen Hypertrophie und somit zu einer eingeschränkten Pumpleistung des Herzens. Als Reaktion darauf werden Kompensationsmechanismen aktiviert, die zur Verbesserung der Perfusion der peripheren Organe führen, langfristig aber maladaptiv wirken und einen wichtigen Risikofaktor für die Entwicklung einer chronischen Herzinsuffizienz darstellen (Jessup and Brozena 2003; Mann and Bristow 2005). Es werden insbesondere das sympathische Nervensystem aktiviert und die Stresshormone Adrenalin und Noradrenalin freigesetzt, die einen schnelleren und kräftigeren Herzschlag bewirken. Außerdem kommt es zur Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS), der vermehrten Ausschüttung natriuretischen Peptide und zur Freisetzung proinflammatorischer Zytokine. Die neuroendokrine Aktivierung führt zur arteriellen und venösen Vasokonstriktion, Flüssigkeitsretention, Vor- und Nachlasterrhöhung, sowie zu einer Steigerung der myokardialen Inotropie (Kontraktionsfähigkeit) und Chronotropie (Schlagfrequenz). Diese zunächst physiologisch sinnvollen Kompensationsmechanismen tragen jedoch langfristig zu einer Schädigung des Myokards und zur Progression der Erkrankung bei und es entsteht ein *circulus vitiosus* (Mann and Bristow 2005). Diese Prozesse führen schließlich zur funktionellen und strukturellen Veränderungen des Herzens und werden als kardiales *Remodeling* bezeichnet. Die Umgestaltung des Myokards beinhaltet Veränderungen auf Zell-, Molekular- und Expressionsebenen, die sich klinisch in Veränderungen der Größe, Form und Funktion der Herzventrikel widerspiegeln.

1.1.3 Kardiales *Remodeling*

Das Herz ist in der Lage, seine Form als Antwort auf physiologische oder pathologische Reize zu verändern. Wie jeder andere Muskel des Körpers kann es je nach Belastung in der Masse zu- oder abnehmen. Leistungssport oder eine Schwangerschaft fördern das physiologische Wachstum des Herzens (physiologisches *Remodeling*), während Bluthochdruck, Myokardinfarkt bzw. eine neurohumorale Aktivierung ein pathologisches Wachstum (pathologisches *Remodeling*) bewirken (Abbildung 1). Im Gegensatz zum physiologischen Wachstum kann pathologisches Wachstum das Risiko für die Entstehung einer Herzinsuffizienz und Arrhythmien erhöhen. Das Schrumpfen der Herzmuskelmasse (Atrophie) ist eine Komplikation, die Folge z.B. von längerer Bettruhe oder Krebserkrankungen sein kann (Hill and Olson 2008).

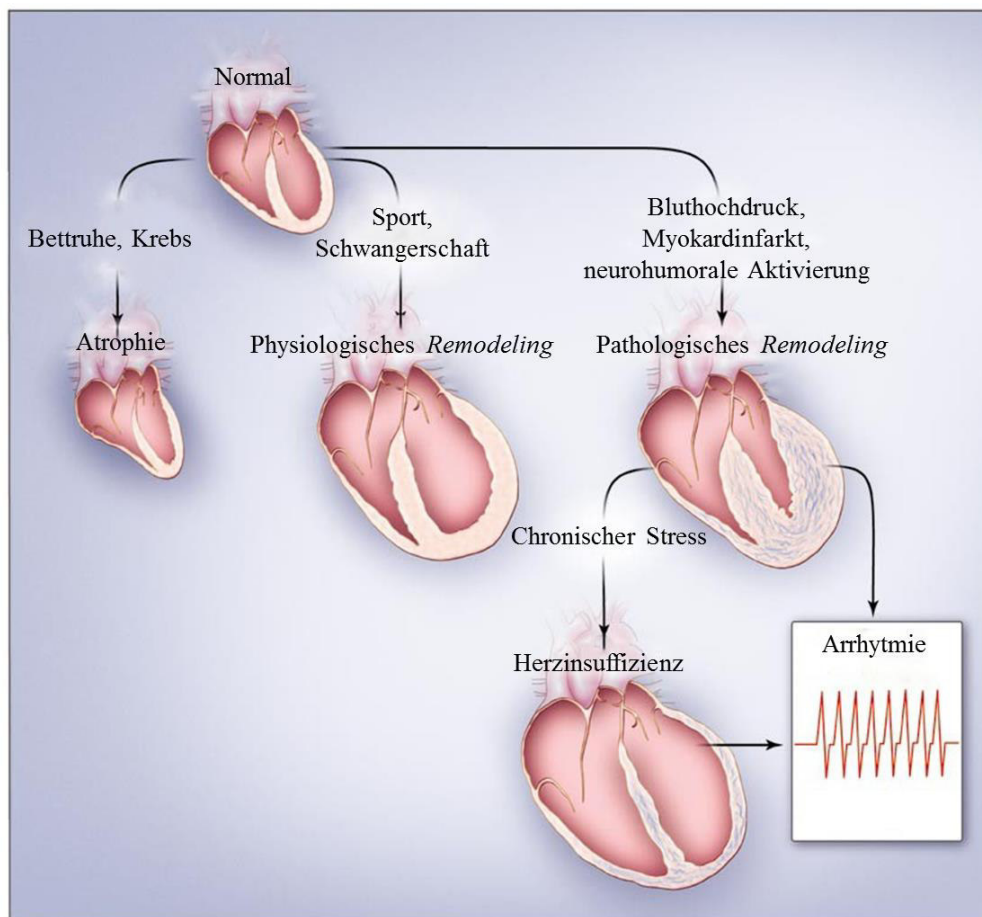


Abbildung 1 Das kardiale *Remodeling*.

Die Ursachen für das *Remodeling*, die zur Atrophie oder Hypertrophie bis hin zur Herzinsuffizienz führen, sind dargestellt. Im Gegensatz zum physiologischen *Remodeling* kommt es bei dem pathologischen *Remodeling* zur Fibrosebildung (in blau) (verändert nach Hill und Olson, 2008).

Das pathologische *Remodeling* beinhaltet eine komplexe Reihe von transkriptionellen, strukturellen, elektrophysiologischen und funktionellen Ereignissen, die innerhalb des Myokards auftreten (Burchfield *et al.* 2013). So kommt es z.B. zu zellulären Veränderungen wie Myozytenhypertrophie und deren Verlust durch Apoptose oder Nekrose bei gleichzeitiger Einlagerung von Kollagenen (Fibrose) innerhalb des Myokards (Drakos *et al.* 2010). Die zahlreichen Veränderungen im Herzen führen schließlich zu systolischer und diastolischer Dysfunktion (Hill and Olson 2008).

Beim Myokardinfarkt kommt es durch den Verschluss einer Koronararterie zum massiven Absterben von Herzmuskelgewebe und zur Ausbildung einer fibrotischen Narbe. Als Folge des Verlustes funktioneller Myozyten, hypertrophieren die Kardiomyozyten außerhalb des infarzierten Bereichs. Ultrastrukturell entspricht dies der Neubildung und Anlagerung von Sarkomeren mit Wachstumszunahme in der Längsachse (Verlängerung) sowie parallel zu den bestehenden Sarkomeren mit der Wachstumszunahme in der Querachse (Verdickung) (Abbildung 2) (Heineke and Molkentin 2006; Kehat and Molkentin 2010). Allgemein wird die Hypertrophie definiert als Zunahme der Muskelmasse des linken Ventrikels und es wird unterschieden in exzentrische und konzentrische Hypertrophie. Eine Druckbelastung führt in der Regel zu einer konzentrischen Hypertrophie und eine Volumenüberlastung typischerweise zu einer exzentrischen Hypertrophie. Mit Ausnahme der physiologischen Hypertrophie können alle anderen Arten des hypertrophen Umbaus zur Herzinsuffizienz führen (Abbildung 2) (Kehat and Molkentin 2010).

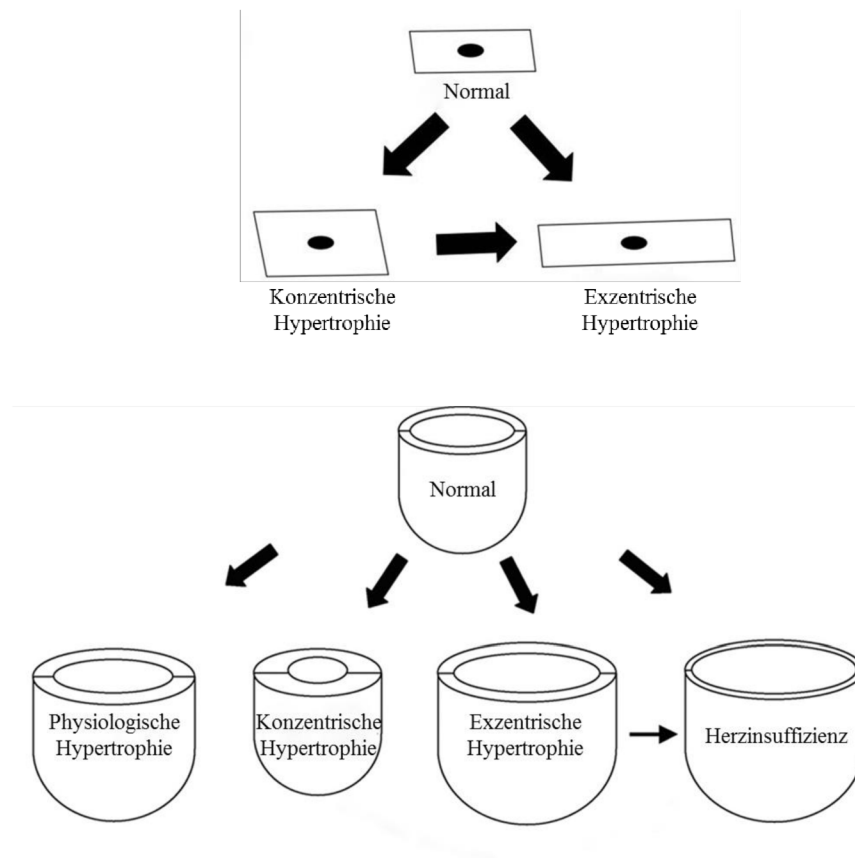


Abbildung 2 Arten des linksventrikulären Remodelings.

Geometrische Darstellung des konzentrischen (Verdickung) und exzentrischen (Verlängerung) Kardiomyozytenwachstums. Die konzentrische Hypertrophie entsteht durch dauerhaft erhöhte Druckbelastung. Dabei kommt es zu einer Zunahme des Herzmuskelgewebes, um den erhöhten Druck aufrechterhalten zu können. Der Durchmesser des linken Ventrikels wird geringer. Eine exzentrische Hypertrophie des Herzmuskelgewebes tritt dagegen vor allem bei einer erhöhten Volumenbelastung des Herzens auf und ist durch eine Dilatation der Herzinnerräume gekennzeichnet. Der Innenradius der Ventrikel nimmt stärker zu als die Wanddicke. Die konzentrische Hypertrophie kann in die exzentrische Form der Hypertrophie übergehen (verändert nach Kehat und Molckentin, 2010).

Die zahlreichen Veränderungen im Myokard während der pathologischen Hypertrophie haben ihren Ursprung auf der molekularen Ebene. Um dem mechanischen Stress entgegenzuwirken, werden Hormone, Zytokine und Wachstumsfaktoren ausgeschüttet, die verschiedenen Signalkaskaden im Myokard auslösen (Heineke and Molckentin 2006). Eine allgemeine Übersicht ist in Abbildung 3 dargestellt.

Die neurohumoralen Substanzen wie Katecholamine, Angiotensin II, Endothelin-1, und IGF-1 (*insulin growth factor 1*) binden als Liganden u.a. an membranständige G-Proteingekoppelte Rezeptoren, die zu einer Veränderung der Genexpression führen. Demzufolge kommt es zur Aktivierung mehrerer Signalwege im Myokard. Durch Aktivierung der Phos-

pholipase C (PLC) kommt es zu Calciumfreisetzung aus intrazellulären Speichern und somit zur Induktion der Calcineurin/NFAT-Signalkaskade. Die steigende Calciumkonzentration bewirkt die Aktivierung von Calcineurin und dessen Bindung an einem Transkriptionsfaktor der NFAT-Familie (*nuclear factor of activated T-cells*) (Feske *et al.* 2007). NFAT wird daraufhin dephosphoryliert und transloziert zum Zellkern, wo verschiedener pro-hypertroph wirkende Gene anschließend aktiviert werden (Wilkins and Molkenin 2004). Zusätzlich können weitere calciumabhängige pathologische Signalwege aktiviert werden. Durch die Bindung von Calcium-Ionen an Calmodulin entsteht ein Calcium/Calmodulin-Komplex, welches die Calcium/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaMKII) aktiviert. CaMKII beeinflusst die elektromechanische Kopplung in Kardiomyozyten, indem sie nicht nur die Calciumkanäle sondern auch die Aktivität von SERCA2a und Phospholamban (PLB) moduliert und die Kontraktilität beeinträchtigt.

Eine ebenso entscheidende Rolle bei der Entstehung der Hypertrophie spielt der mitogen-aktivierte Proteinkinase-Signalweg (MAPK), bei dem mehrere Kinasen nacheinander durch Phosphorylierung aktiviert werden. Hierbei kommt es zur Aktivierung der p38-mitogen-aktivierten Proteinkinase (p38), der Aktivierung von cJun N-terminalen Kinasen (JNKs) sowie von *extracellular-signal regulated* Kinasen (ERKs), welche schließlich über weitere Signalmoleküle und Transkriptionsfaktoren zu einer veränderten Genexpression in Myozyten führt (Garrington and Johnson 1999; Heineke and Molkenin 2006).

Eine weitere wichtige Signalkaskade wird durch den PI3K/AKT-Signalweg vermittelt. Die aktive Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) ist ein Schlüsselenzym der Wachstumsregulation der Myozyten und kann dann bestimmte Stellen von Membranlipiden phosphorylieren und diese eine Serin/Threonin-Kinase (AKT/PKB) binden und aktivieren. AKT aktiviert oder inhibiert verschiedene Substrate in der Zelle. So führt es zu Aktivierung der Proteintranslation über mTOR und durch die Hemmung der Glykogensynthasekinase (GSK3- β) und Aktivierung des *Forkhead-Box*-Proteins (FOXO) zu Induzierung der Proliferation. Folgende Transkriptionsfaktoren werden als Folge der hypertrophen Signaltransduktion aktiviert: GATA4, c-Myc und NFAT (Cantley 2002; Heineke and Molkenin 2006).

Das kardiale Genexpressionsmuster während der Entstehung der pathologischen Hypertrophie ähnelt teilweise dem während der Embryonalentwicklung (Dirkx *et al.* 2013). Die Veränderung des Myokards ausgelöst durch den Druck- bzw. Volumenbelastung bewirkt erneute Expression embryonaler Gene im linken Ventrikel. Als Biomarker der kardialen Hypertrophie gelten das atriale natriuretische Peptid (ANP) und das brain natriuretische Peptid

(BNP). Ebenso kommt es zu einer erhöhten Expression von α Aktin bzw. der embryonalen Isoform *alpha skeletal muscle Actin* (Acta1) (Suurmeijer *et al.* 2003) und einer veränderten Expression der Myosin-Isoformen (*Myh6 und Myh7*) im Ventrikel (Miyata *et al.* 2000). In herzinsuffizienten Patienten beobachtet man einen Anstieg der langsamen Isoform *Myh7*, die für das Protein β MHC kodiert bei gleichzeitiger stark verminderter Expression der schnellen *Myh6*-Isoform, die für das Protein α MHC kodiert (Miyata *et al.* 2000).

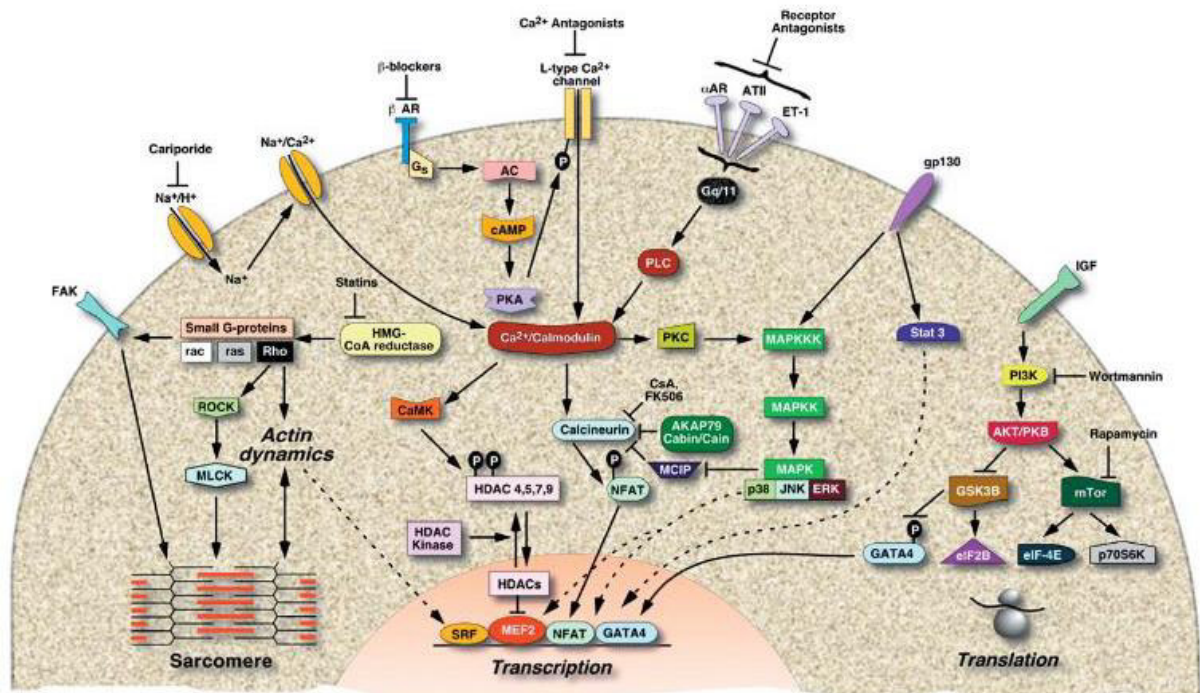


Abbildung 3 Signaltransduktion in der Hypertrophie

Während der pathologischen Hypertrophie in Kardiomyozyten werden intrazelluläre Signalkaskaden ausgelöst, welche schließlich über weitere Signalmoleküle und Transkriptionsfaktoren zu einer veränderten Genexpression in Myozyten führen (verändert nach Frey und Olson, 2003).

Das Ziel der aktuellen Therapie der chronischen Herzinsuffizienz ist insbesondere die Hemmung der neuroendokrinen Aktivierung. So konnte in randomisierten Studien für die Therapie mit β -Adrenozeptor-Antagonisten (β -Blockern), Angiotensin-Converting-Enzyme-Inhibitoren (ACE-Hemmern), sowie Aldosteron-Antagonisten eine signifikante Reduktion der Mortalität bei chronisch herzinsuffizienten Patienten nachgewiesen werden (Kuschyk *et al.* 2018). Für die Zukunft besteht die Hoffnung, dass durch gezielte Veränderungen insbesondere der kardiomyozytären Signaltransduktion das maladaptive kardiale *Remode-*

ling therapeutisch günstig beeinflusst werden kann (Jessup and Brozena 2003; Mann and Bristow 2005).

1.1.4 Natriuretische Peptide

Das hypertrophe Wachstum des Herzen wird stimuliert durch die Aktivierung zahlreicher Signalwege. Zudem existieren Signale, z.B. die vermehrte Freisetzung natriuretischer Peptide, die von essentieller Bedeutung für eine Adaptation des Herzens an pathologische Reize sind. Die natriuretischen Peptide senken den systemischen Blutdruck und zeigen am Myokard anti-hypertrophe, anti-proliferative und anti-fibrotische, aber auch positiv inotrope Effekte (Soeki *et al.* 2005; Frantz *et al.* 2013; Perera *et al.* 2015; Kuhn 2016).

Die Familie der natriuretischen Peptide besteht aus drei homologen Mitgliedern, den atrialen (ANP), den brain (BNP) und C-Typ natriuretischen Peptiden (CNP). ANP und BNP werden hauptsächlich im Herzgewebe synthetisiert: embryonal im gesamten Herz und adult nur in den Vorhöfen. Beide Peptide üben wichtige kardiovaskuläre Funktionen aus (Brenner *et al.* 1990; de Bold *et al.* 2001). CNP wird in unterschiedlichen Organen exprimiert, im Myokard hauptsächlich in vaskulären Endothelzellen (Suga *et al.* 1992b), Makrophagen (Ishizaka *et al.* 1992) und Fibroblasten (Horio *et al.* 2003) und übt verschiedene lokale, autokrine und parakrine Funktionen innerhalb und außerhalb des Herz-Kreislauf-Systems aus (Chen and Burnett 1998; Kuhn 2003). Darüber hinaus weist CNP anti-fibrotische und anti-hypertrophe Wirkungen beim pathologischen *Remodeling* nach Myokardinfarkt auf (Soeki *et al.* 2005). Alle drei natriuretischen Peptide werden bei einer Herzinsuffizienz verstärkt im Myokard produziert (Kalra *et al.* 2003; Kuhn 2016). ANP und BNP werden unter diesen Umständen im Ventrikel re-exprimiert.

Die biologische Funktion von natriuretischen Peptiden wird durch deren Rezeptoren vermittelt: Natriuretischer Peptidrezeptor A (NPR-A), Natriuretischer Peptidrezeptor B (NPR-B) und Natriuretischer Peptidrezeptor C (NPR-C). Die natriuretischen Peptide ANP und BNP binden mit sehr hoher Affinität an den NPR-A, während CNP an den Rezeptor NPR-B bindet (Abbildung 4) (Kuhn 2016). Auf Rezeptorebene scheint im insuffizienten Myokard der NPR-B höher als NPR-A Rezeptor exprimiert zu werden (Dickey *et al.* 2007). Intrazellulär führt sowohl die Aktivierung von NPR-A wie auch die von NPR-B wegen membranständigen Gu-

anylylcyclasen (GCs) zu einem Anstieg der zyklischen Guanosinmonophosphat (cGMP)-Konzentration, aber es werden auch Konzentrationsänderungen des zyklischen Adenosinmonophosphats (cAMP) beobachtet (Garbers 1991; Garbers and Lowe 1994). In der Signalkaskade aktiviert cGMP die cGMP abhängige Proteinkinase 1 (cGKI), die Phosphodiesterase 2 (PDE-2) und inhibiert die Phosphodiesterase 3 (PDE-3). Die PDE-3 fördert insbesondere den Abbau von cAMP, welches über die Aktivierung der Proteinkinase A (PKA) die Kontraktivität fördert. Insbesondere vermitteln PDE3 (cGMP-inhibierend) und PDE2 (cGMP-stimulierend) positive vs. negative cGMP/cAMP-Interaktionen (Fischmeister *et al.* 2006; Conti and Beavo 2007; Zaccolo and Movsesian 2007; Miller and Yan 2010). cGKI vermittelt anti-hypertrophe Effekte in isolierten Kardiomyozyten, führt aber auch überwiegend nach Stimulation mit CNP zu einer Phosphorylierung von Phospholamban am Serin 16, was die Phospholamban-vermittelte Inhibierung von SERCA2a hemmt und damit die kardiomyozytäre Kontraktivität fördert (Wollert *et al.* 2002; Frantz *et al.* 2013; Hofmann 2018) Interessanterweise zeigt an isolierten Kardiomyozyten CNP aber nicht ANP eine positiv inotrope Wirkung (Frantz *et al.* 2013).

Alle natriuretischen Peptide binden mit ähnlicher Affinität an den Rezeptor NPR-3, der als Clearance-Rezeptor wirkt (Abbildung 4) (Potter *et al.* 2006). NPR-3 wird hauptsächlich in den Nieren, Lunge und Gefäßen und in allen anderen Organen in geringer Menge exprimiert (Kuhn 2016) und kontrolliert die lokalen Konzentrationen von natriuretischen Peptiden durch deren konstitutive, rezeptorvermittelte Internalisierung und Degradation mit der folgenden Selektivität: ANP > CNP > BNP (Suga *et al.* 1992a; Kimura *et al.* 2007). Weitere Studien zeigen, dass NPR-C nicht nur die natriuretischen Peptide bindet und abbaut, sondern auch die biologischen Aktivitäten von natriuretischen Peptiden, insbesondere die vaskulären Wirkungen von endothelialelem CNP, vermittelt (Khambata *et al.* 2011; Conole *et al.* 2018). Wie derselbe Rezeptor entscheidet, die zirkulierenden natriuretischen Peptide zu degradieren oder ihre physiologischen Wirkungen umzuwandeln, ist immer noch ungeklärt.

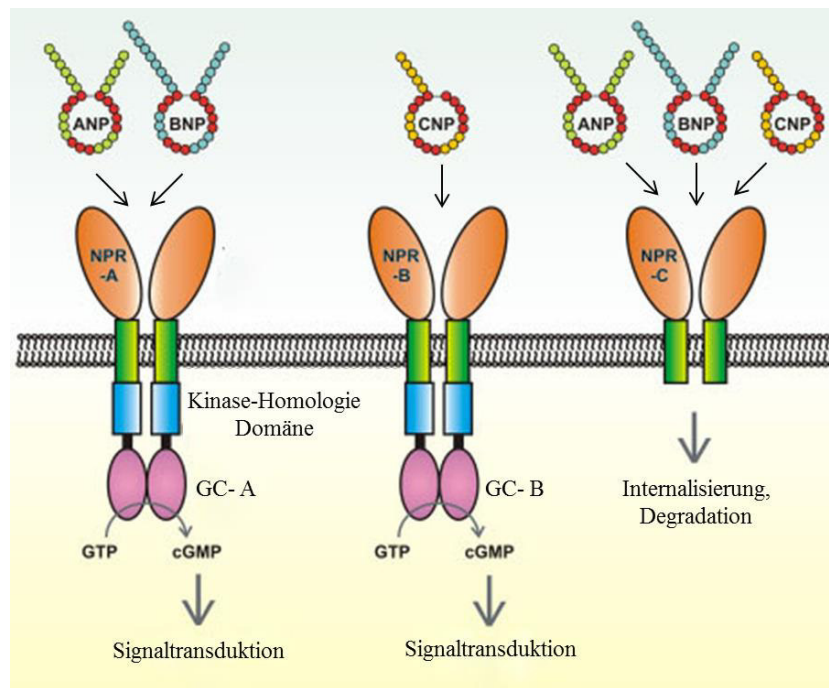


Abbildung 4 Bindungsspezifität der natriuretischen Peptide an Rezeptoren.

Die Ligandenbindung an den Rezeptor induziert die intrazelluläre Guanylylcyclase-Aktivität (GC-A und GC-B) und führt zur Umwandlung von Guanosintriphosphat (GTP) in zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) im Zytoplasma, welches dann die cGMP-abhängige Proteinkinase stimuliert. Sowohl die Bindung von ANP und BNP an den NPR-A Rezeptor, als auch die CNP-Bindung an den NPR-B Rezeptor führt zur erhöhten intrazellulären Konzentration von cGMP. Im Gegensatz dazu führt die Bindung aller drei natriuretischen Peptide an NPR-C zu ihrer Internalisierung und biologischen Inaktivität (verändert nach Meyer und Herrmann-Lingen, 2017).

Die Hauptfunktion der natriuretischen Peptide besteht in der Reduktion des Plasmavolumens und der Senkung des Blutdrucks, um das Herz vor einer übermäßigen Volumen- und Druckbelastung zu schützen. Bei der Herzinsuffizienz ist bekannt, dass die Plasmaspiegel von ANP und BNP erhöht sind. Dies wird als Kompensation der Herzinsuffizienz angesehen (Burnett *et al.*, 1986; Mukoyama *et al.*, 1990). Über die Bestimmung der Plasmakonzentration der Peptide kann eine Aussage über den klinischen Verlauf von Patienten mit Herzinsuffizienz getroffen werden (Maisel *et al.* 2010).

Experimentelle Studien zeigten insbesondere, dass exogenes, synthetisches CNP die Proliferation von Fibroblasten und die Transformation von Myofibroblasten hemmt, wodurch eine anti-fibrogene Schutzwirkung bei Herz-, Lungen- und Nierenerkrankungen ausgeübt wird, während unter normalen Bedingungen CNP im Plasma kaum nachweisbar ist (Li *et al.* 2015; Kuhn 2016). Darüber hinaus ist CNP ein regulatorisches Peptid im Knochen. Die Überexpression von CNP und Mutationen der Kinase-Homologie Domäne des Peptids führen zu

einem starken Skelettwachstum (Hannema *et al.* 2013; Kuhn 2016). Andere klinische Studien zeigten, dass der CNP-Spiegel im Plasma mit dem Alter oder bei der Hypertonie, Herzhypertrophie und Herzinsuffizienz ansteigt (Sangaralingham *et al.* 2015). Auf der zellulären Ebene wird CNP hauptsächlich im Endothel und in niedrigeren Mengen auch in aktivierten Fibroblasten, Makrophagen und Leukozyten exprimiert (Cabiati *et al.* 2013). Im Herzen wird die GC-B, die durch CNP aktiviert wird, in Fibroblasten und Kardiomyozyten exprimiert, was die parakrine Rolle von CNP unterstützt (Kuhn 2016). Dabei sind die kardialen auto/parakrinen und anti-fibrotischen Effekte, Signalwege und krankheitsabhängigen Veränderungen des endogenen CNPs und seines Rezeptors weitgehend unbekannt.

Die Wirksamkeit der natriuretischen Peptide bei der Herzinsuffizienz ist trotz stark erhöhter Konzentration allerdings durch Desensibilisierung des NPR-A Rezeptors, durch ihre verstärkte Internalisierung über den NPR-C Rezeptor und auch durch Phosphodiesterasen deutlich eingeschränkt. Es besteht während der Herzinsuffizienz somit eine Resistenz gegenüber den natriuretischen Peptiden. Therapeutisch versucht man seit Jahren mit Hilfe des Medikaments LCZ696, einer Kombination aus Angiotensin Rezeptor und Nephilysin-Inhibierung (eine Peptidase, welche natriuretische Peptide abbaut), die Wirkung der natriuretischen Peptide zu verstärken, eine Strategie, die zu einer Senkung der Mortalität und Morbidität von Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz führt (McMurray *et al.* 2014).

1.1.5 Fibroblasten und Fibrose

Kardiale Fibroblasten stellen zahlenmäßig eine der größten Zellpopulation im Myokard dar (Banerjee *et al.* 2007). Sie tragen zu den strukturellen, biochemischen und mechanischen Veränderungen des Myokards bei und sind für das pathologische *Remodeling* und die Fibrose mitverantwortlich (Camelliti *et al.* 2005; Porter and Turner 2009). Aufgrund dessen beinhaltet das kardiale *Remodeling* nicht nur Veränderungen der Kardiomyozyten, sondern auch die Aktivierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten und eine übermäßige Kollagenansammlung, die zu einer Beeinträchtigung der Herzfunktion beitragen (Moore-Morris *et al.* 2014; Dostal *et al.* 2015). Kardiale Fibroblasten entstehen während der embryonalen Entwicklung sowohl aus dem Epikard als auch aus dem Endokard (Moore-Morris *et al.* 2014; Ali *et al.* 2014) und sind Zellen mesenchymaler Herkunft, die sich durch ihre Fähigkeit auszeichnen,

strukturelle Proteine wie Kollagen (Typ I und Typ III), Proteoglykane, Fibronectin, und Glykoproteine zu produzieren, die die extrazelluläre Matrix umfassen (Bowers *et al.* 2010). Aufgrund dessen spielen kardiale Fibroblasten eine entscheidende Rolle bei der Synthese der extrazellulären Matrix (ECM), die sich netzartig durch das Myokardgewebe zieht (Fan *et al.* 2012). Darüber hinaus kommunizieren Fibroblasten mit Kardiomyozyten mittels Freisetzung spezifischer Wachstumsfaktoren (Kakkar and Lee 2010).

Im gesunden Herzen eines Erwachsenen befinden sich Fibroblasten hauptsächlich im Ruhezustand. Tritt eine Schädigung des Myokards auf, gehen die Fibroblasten in einen aktiven Phänotyp über. Die Aktivierung führt zu einer dramatischen Zunahme der Fibroblastenproliferation und Fibroblastenmigration, der Sekretion verschiedener pro-inflammatorischer Zytokine (IL-1 β , IL-6 und TNF- α) und pro-fibrotischer Zytokine (*Transforming growth factor-beta*, TGF- β) und Wachstumsfaktoren, der Differenzierung zu Myofibroblasten sowie der Sekretion extrazellulärer Matrixproteine (Abbildung 5) (Segura *et al.* 2014; Travers *et al.* 2016). Als Antwort darauf kommt es zur extensiven Kollagensynthese und Degradation der extrazellulären Matrix durch Matrix-Metalloproteasen (MMPs) (Brown *et al.* 2005; Souders *et al.* 2009). Diese Effekte führen zur fortschreitenden Fibrose und somit zur verminderten Kontraktilität des Muskelgewebes und zur eingeschränkten Herzfunktion.

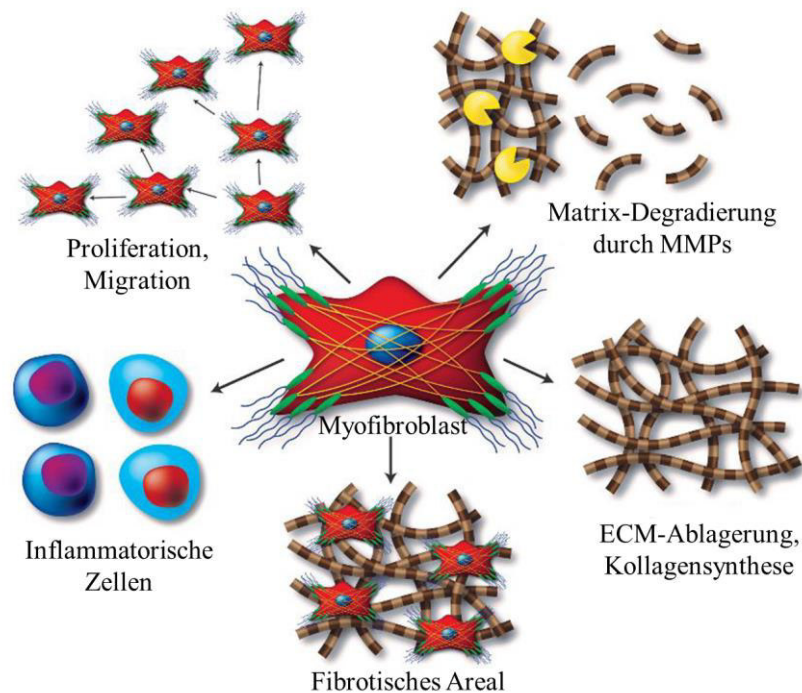


Abbildung 5 Aktivierung kardialer Fibroblasten.

Kardiale Fibroblasten werden durch pathologische Reize aktiviert und zu Myofibroblasten differenziert. Die Myofibroblasten exprimieren verschiedene pro-inflammatorische und pro-fibrotische Faktoren, die direkt die Proliferation und Migration begünstigen, sezernieren erhöhte Menge an Matrix-Metalloproteasen (MMPs) und anderen extrazellulären Matrix (ECM) -abbauenden Enzymen, die die Migration von Fibroblasten erleichtern, und tragen zur Ablagerung von Kollagen und anderen ECM-Proteinen bei, die anschließend zur Narbenbildung führen. (verändert nach Travers *et al.* 2016)

Die übermäßige Ausschüttung von TGF- β spielt eine Schlüsselrolle bei der Bildung der Fibrose. In der normalen Wundheilung wird TGF- β vorübergehend verstärkt ausgeschüttet, um die Reparatur eines Gewebeschadens anzuregen. Die andauernde Aktivierung von Erneuerungsprozessen verursacht jedoch eine Schädigung des Myokards (Weber *et al.* 2013; Rainer *et al.* 2014). Die Bindung von TGF- β -Liganden an deren Rezeptoren (Typ I und II) aktiviert eine Reihe von Signalwegen, insbesondere den Smad-Signalweg. Demzufolge werden Smad-abhängige Kaskaden durch die Bildung von Smad-Komplexen aktiviert und durch deren Kerntranslokation die Transkriptionsaktivierung beeinflusst (Shi and Massagué 2003). Darüber hinaus kann TGF- β 1 auch über die Aktivierung von Mitgliedern der Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK)-Familie wirken und die extrazelluläre signalregulierte Kinase (ERK) und die p38 Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK) aktivieren (Derynck and Zhang 2003; Biernacka *et al.* 2011).

Die Fibrosierung kann jedoch durch anti-fibrotische Effekte unterdrückt werden. Die Aktivierung von NPR-A-Rezeptoren durch ANP führt zu einer Erhöhung von cGMP und aktiviert die cGMP-abhängige Proteinkinase G (PKG), die eine Smad-Komplexbildung verhindert und unterbricht somit deren Kerntranslokation (Buxton and Duan 2008; Li *et al.* 2008a). Zusätzlich führt die verstärkte Aktivierung des cGMP/cGKI-Signalwegs in renalen Fibroblasten zu einer Verringerung der Myofibroblastenanzahl und somit zur Antagonisierung von TGF- β 1 und der Kollagenproduktion und somit zu Reduzierung der Fibrose (Masuyama *et al.* 2009; Sandner and Stasch 2017). Darüber hinaus wird die Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten durch Aktivierung von TRPC-6 initiiert (Davis *et al.* 2012), die ebenfalls durch die Aktivierung der cGMP abhängigen Proteinkinase 1 (cGKI) inhibiert werden kann.

Die Fibroblastenaktivierung kann auch durch einen erhöhten cAMP-Level inhibiert werden (Liu *et al.* 2006). Im Zusammenhang mit den natriuretischen Peptiden können ANP und BNP durch Aktivierung von cGKI auch anti-fibrotisch wirken (Kapoun *et al.* 2004; Li *et al.* 2008b; Eisner *et al.* 2013). Experimentelle Studien zeigen, dass synthetisches CNP die Proliferation von Fibroblasten und die Transformation zu Myofibroblasten hemmt und dadurch bei kardialen Erkrankungen protektiv wirkt (Li *et al.* 2015; Kuhn 2016).

1.1.6 Kardiale Kontraktilität und Calciumhomöostase

Die Kontraktilität beschreibt die Fähigkeit des Herzens, sich zusammen zu ziehen (Systole), um das Blut mit der nötigen Kraft in die peripheren Organe zu pumpen und sich danach wieder zu entspannen (Diastole). Diese Kreislaufpumpaktivität erfordert rhythmisch-cytosolische Calcium-Oszillationen in einzelnen Herzmuskeln, was die Wechselwirkungen zwischen Myofilamenten und Kontraktion der Zellen direkt fördert (Bers 2008). Die kardiale Kontraktilität wird überwiegend durch Änderungen der intrazellulären Calciumkonzentration reguliert. Ein Großteil des für die Kontraktion benötigten Calciums stammt aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR) und wird durch den sog. Calcium-induzierten Calciumfreisetzungsprozess reguliert. Die genaue Kontrolle des intrazellulären Calciumzyklus hängt von den Interaktionen zwischen den verschiedenen beteiligten Kanälen und Pumpen ab (Eisner *et al.* 2017).

Calcium-Ionen (Ca^{2+}) gehören zu den wichtigsten Ionen, die am Erhalt der Herzfunktion beteiligt sind und nehmen bei der elektromechanischen Kopplung eine Schlüsselposition

ein (Bers 2002a). Sie sind das Bindeglied zwischen dem elektrischen Prozess des Aktionspotentials (AP), das an der Plasmamembran einer Muskelzelle (Sarkolemma) generiert wird und dem mechanischen Prozess der Muskelkontraktion an den Aktin-Myosinfilamenten im Inneren der Zelle. Unter normalen Bedingungen ist die $[Ca^{2+}]$ -Konzentration in der Systole hoch (1 μ M) und in der Diastole ca. 10-fach gesenkt (100 nM) (Bers 2002a). Während der Systole führt ein Aktionspotential, ausgelöst durch den hohen Einstrom von Natrium-Ionen, zur Membrandepolarisation in Herzmuskelzellen, was die Öffnung des L-Typ-Calciumkanals (LTCC) auslöst. Dadurch kann eine geringe Menge des extrazellulären Calciums in das Cytosol gelangen (Bers 2002a; Bers 2008; Eisner *et al.* 2017). Dies führt wiederum zu einer massiven Calciumfreisetzung aus dem SR in das Cytosol durch die Ryanodin-Rezeptorkanäle (RyR) (Calcium-induzierter Calciumfreisetzungsprozess). Das freigesetzte Calcium bindet Troponin C an den Myofilamenten und leitet die Muskelkontraktion ein (Yano *et al.* 2005; Gorski *et al.* 2015).

Die Entspannungsphase (Diastole) wird durch Zurückpumpen von etwa 70 % des cytosolischen Calciums in das SR über die Sarkoplasmatische/Endoplasmatische Retikulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA2a) eingeleitet. Etwa 30 % werden außerhalb der Zelle durch die Plasmamembran transportiert, hauptsächlich durch den Natrium-Calcium-Austauscher (NCX) und die Plasmamembran-Calcium-ATPase (PMCA). Diese Abnahme des intrazellulären Calciums führt zur Dissoziation des Calciums an Troponin C und zur Muskelentspannung (Abbildung 6) (Bers 2002b; MacLennan and Kranias 2003; Yano *et al.* 2005; Gorski *et al.* 2015).

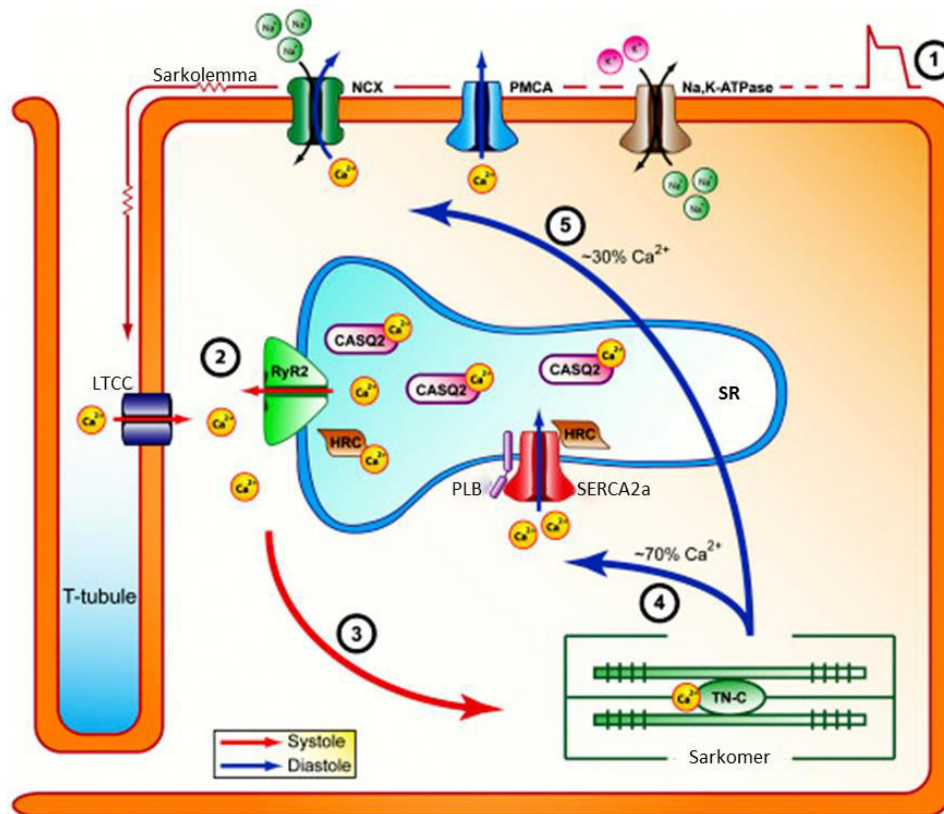


Abbildung 6 Elektromechanische Kopplung und Kontraktion in Kardiomyozyten.

Während der Systole (rote Pfeile) als Reaktion auf die Depolarisierung dringt Calcium durch Calcium-L-Typ-Kanäle (LTCC) in das Cytosol ein (1) und stimuliert die Calciumfreisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR) durch Ryanodin-Rezeptor-Kanäle (RyR2) in das Cytosol (2). Die hohe cytosolische Calciumkonzentration führt zur Bindung von Calcium an Troponin C (TN-C) und zum Beginn der Muskelkontraktion (3). Die schnelle Entfernung von cytosolischem Calcium während der Diastole wird hauptsächlich durch SERCA2a gesteuert, die das Calcium in das SR zurückpumpt (4). Etwas Calcium verlässt die Zelle durch kombinierte Aktivität der Plasmamembran - Calcium - ATPase (PMCA) und des Natrium/Calcium - Austauschers (NCX) (5). Diese Abnahme des intrazellulären Calciums führt zur Dissoziation des Calciums von TN-C und letztendlich zur Muskelentspannung (verändert nach Gorski *et al.*, 2015).

Darüber hinaus wird die kontraktile Herzfunktion durch die positive inotrope Wirkung des Sympathikus reguliert. Bei Bedarf kann das Herz innerhalb von Sekunden auf Stress reagieren und den Blutfluss zu peripherem Gewebe erhöhen (MacLennan and Kranias 2003). Die Herzschlagrate und die Kontraktionsfähigkeit im Ruhezustand werden dabei nach der Freisetzung von Adrenalin in das Blut deutlich erhöht (Kass *et al.* 1998). Adrenalin und andere β -Agonisten initiieren einen wichtigen Signalübertragungsweg im Herzen, indem sie an β -adrenerge Rezeptoren in der Plasmamembran binden und diese aktivieren (Abbildung 7) (Sampson and Kass 2010). Das Signal verläuft über G-Proteine, um die Bildung von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) durch Adenylatcyclase zu stimulieren (Levitzi

1988). Eine Erhöhung der cAMP-Konzentration aktiviert die cAMP-abhängige Proteinkinase A (PKA), die dann u.a. das LTCC (zur Erhöhung des Calciumeinstroms) sowie das SERCA2a-inhibitorische Protein Phospholamban (PLB) phosphoryliert, was zu einer verminderen PLB-vermittelten Hemmung der SERCA2a-Pumpe führt. Beide Signalwege zusammen führen zu einem erhöhten SR-Calciumgehalt und daher zu einer erhöhten systolischen Calciumfreisetzung und zu einer erhöhten Kontraktilität (Abbildung 7) (MacLennan and Kranias 2003).

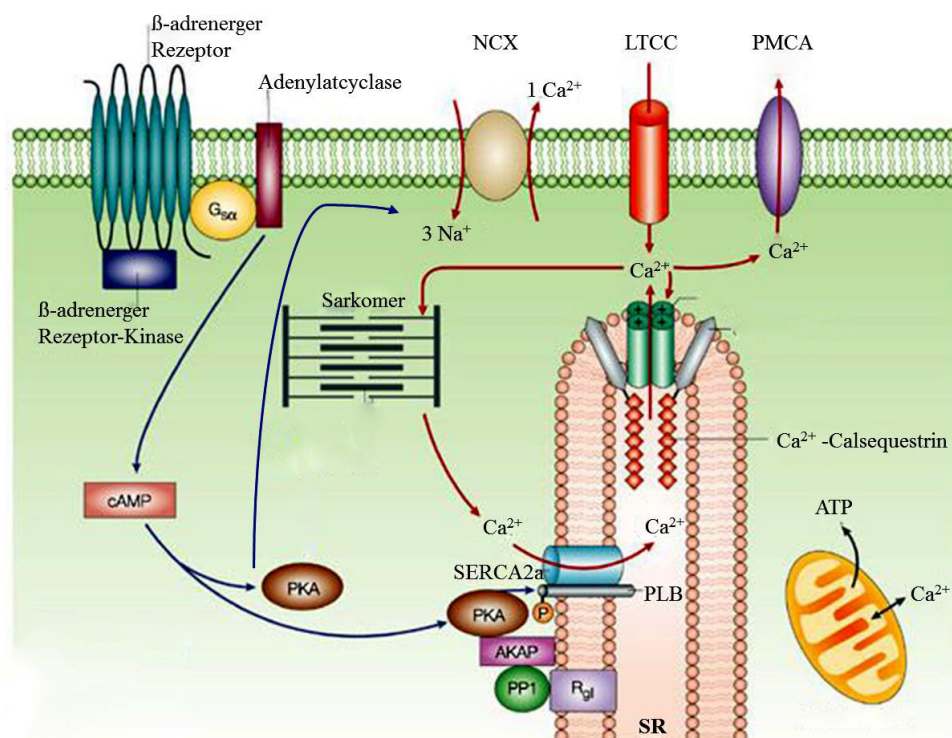


Abbildung 7 Interaktionen zwischen zwei Signalwegen während kardialer Kontraktilität.

Das Herz ist ein Beispiel dafür, wie zwei Signalwege daran beteiligt sind, die kardiale Kontraktilität physiologisch zu steuern. Zwei intrazellulären sekundären Botenstoffe sind daran beteiligt: das zyklische Adenosinmonophosphat (cAMP) (blaue Pfeile) und das Calcium (rote Pfeile) (verändert nach MacLennan und Kranias, 2003).

Im normalen Zustand befinden sich Calciumeinstrom und Calciumrückführung im Gleichgewicht. Bei einem pathologischen Stress (Hypertrophie, Myokardinfarkt, Herzinsuffizienz) werden Herzleistung und Blutdruck anfangs durch Aktivierung sympathischer Reflexreaktionen reguliert, die die Kontraktilität der Myozyten erhöhen, um den Blutfluss auf-

rechtzuerhalten. Langfristig jedoch kann die Calciumhomöostase nicht mehr aufrechterhalten werden (Zhang *et al.* 2010).

Bei der Herzinsuffizienz zeichnen sich die Kardiomyozyten durch eine verminderte Kontraktilität aus. Diese Veränderungen sind zum größten Teil die Folge einer defekten elektromechanischen Kopplung, wodurch eine konstante Calciumkonzentration in den Kardiomyozyten nicht aufrechterhalten werden kann (Yano *et al.* 2005; Gorski *et al.* 2015). Diese Beeinträchtigungen hängen von mehreren Faktoren ab: Anomalien und Anordnung von Calciumkanälen (LTCC, RyR und NCX) (Gómez *et al.* 1997; Barrère-Lemaire *et al.* 2000; Scriven *et al.* 2000), einer erhöhten cytosolischen Calciumkonzentration in der Diastole und einer Abnahme der Calciumkonzentration im SR (Hobai and O'Rourke 2001). Der verringerte Calciumgehalt im SR ist ein wichtiges Merkmal des insuffizienten Myokards, der durch eine verminderte SERCA2a-Aktivität bei unverändertem PLB-Gehalt verursacht wird (Yano *et al.* 2005). Des Weiteren kommt es zu einer reduzierten Phosphorylierung von PLB durch PKA bzw. durch die Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaMKII). Dies führt zu einer erhöhten inhibitorischen Wirkung von PLB gegenüber SERCA2a und ist zum Teil auf eine erhöhte Aktivität der Proteinphosphatase 1 (PP1) zurückzuführen, die PLB dephosphoryliert. Darüber hinaus ist die Expression und Phosphorylierung des Proteinphosphataseinhibitors 1 (I-1), eines PP-1-spezifischen Inhibitors, verringert.

Eine verminderte Aktivierung der SERCA2a bei insuffizientem Myokard bedingt somit eine verlangsamte Relaxation des Herzmuskels, was als „diastolische Dysfunktion“ bezeichnet wird. Eine verminderte diastolische Calciumrückführung in das SR führt aber auch durch einen geringeren Calciumgehalt des SRs zu einer geringeren systolischen Ausschüttung von Calcium aus dem SR, und somit zu einer schwächeren systolischen Kontraktilität. Während der systolische Calciumgehalt im pathologisch hypertrophierten Kardiomyozyten reduziert ist, ist der diastolische Calciumgehalt erhöht, was neben der gestörten Relaxation auch zu gehäuftem Auftreten von Arrhythmien führt. Darüber hinaus kann die Calciumabnahme im SR und die gleichzeitige Zunahme des cytosolischen Calciums in der Diastole durch ein Leck im RyR-Kanal verstärkt werden, was zu einer reduzierten Kontraktion des Myofilaments führt.

Die beschriebenen Veränderungen der kardiomyozytären Calciumkonzentration werden neben der verminderten SERCA-Aktivität auch durch eine veränderte Funktionsweise des sarkolemmalen Natrium/Calcium Austauschers bedingt. Bei insuffizientem Myokard kann NCX als Ausgleich zu einer verminderten SERCA-Aktivität verstärkt exprimiert werden.

Dieses wiederum führt zu einer gesteigerten transsarkolemmalen Elimination des Calciums und infolge dessen zu einem reduzierten SR Calciumgehalt (Yano *et al.* 2005). Außerdem kann es zu einem verlängerten AP kommen, wodurch sich die Richtung des Calciumtransport über NCX ändern kann und statt Calcium in der Diastole aus der Zelle zu pumpen, pumpt dieser mehr Calcium in den Kardiomyozyten, woraus eine gleichzeitige Hemmung der SERCA-Aktivität folgt, so dass die Zellen langsamer relaxieren (Birkeland *et al.* 2005).

Die Funktions- und Regulationsmechanismen des Herzens können medikamentös manipuliert werden. Soll die Herzfrequenz oder der Blutdruck gesenkt werden, kann bspw. die Wirkung des Sympathikus an den β -Rezeptoren des Herzens durch sog. Betablocker blockiert werden (Mudd and Kass 2008). Auch Calciumkanalblocker reduzieren den Calciumeinstrom über LTCC und verringern somit die Kontraktilität (Stokke *et al.* 2013). Ist dagegen eine Steigerung der Pumpkraft (im Rahmen einer Herzinsuffizienz) erwünscht, kann dies unter anderem durch Herzglykoside herbeigeführt werden. Durch Hemmung der Natrium/Kalium-ATPase sorgen sie indirekt für ein erhöhtes intrazelluläres Calciumangebot, wodurch der kontraktile Apparat eine größere Kontraktionskraft aufbauen kann. Auch übliche inotrope Wirkstoffe wie Noradrenalin und Dobutamin induzieren ebenfalls Inotropie, indem sie die Calciumkonzentration im Kardiomyozyten erhöhen (Aronsen *et al.* 2016). Darüber hinaus kann die Anwendung eines Nephilysin-Inhibitors, der an dem Abbau des NPs beteiligt ist, zu einer verbesserten Herzfunktion beitragen, wobei der genaue Wirkmechanismus nicht bekannt ist (McMurray *et al.* 2014).

1.2 Kardiale Kachexie

Kachexie ist ein komplexes Syndrom, das mit verschiedenen zugrunde liegenden Erkrankungen assoziiert sein kann und allgemein durch Muskelverlust mit oder ohne Fettmasseverlust gekennzeichnet ist (Evans *et al.* 2008). Während bei der Unterernährung (Anorexie) der Gewichtsverlust durch erhöhte Nahrungsaufnahme reversibel ist, ist die alleinige Ernährung bei der kardialen Kachexie keine zielführende Therapie (Anker and Morley 2015). Bei Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz ist der relativ häufig auftretende chronische Gewichtsverlust als komplexes Syndrom der kardialen Kachexie bekannt. Stefan Anker hat im Jahr 1997 Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz prospektiv identifiziert und ihr Überleben im Ver-

gleich zu nicht kachektischen Patienten mit Herzinsuffizienz unter Berücksichtigung bekannter Risikofaktoren analysiert und konnte dabei zeigen, dass der kachektische Zustand ein starker unabhängiger Risikofaktor für die Sterblichkeit bei Patienten mit einer chronischen Herzinsuffizienz ist (Anker *et al.* 1997). Kardiale Kachexie ist generell als Folgeerscheinung der chronischen Herzinsuffizienz ein multifaktorielles Syndrom und ist assoziiert mit hormonalen Veränderungen, gestörter Homöostase des katabolen und anabolen Stoffwechsels (Anker *et al.* 2004) und aktiven Inflammationsprozessen, gefolgt von einem enormen Verlust von Fett-, Körper- und Muskelmasse (Skelettmuskelatrophie) bis zu einer geringeren Knochendichte (Strassburg *et al.* 2005; Loncar *et al.* 2013; Fulster *et al.* 2013; Valentova *et al.* 2013; von Haehling 2015). Diese schwerwiegenden Komplikationen der Kachexie können außerdem bei vielen chronischen Erkrankungen im fortgeschrittenen Stadium auftreten wie bei Krebs, chronisch obstruktiver Lungenerkrankung, chronischer Nierenerkrankung, Immunschwäche-Syndrom, Infektionen oder auch bei Blutvergiftung (Evans *et al.* 2008; von Haehling *et al.* 2017).

Bis heute ist es schwierig eine allgemeine Definition der kardialen Kachexie zu nennen. Eine sehr nützliche Definition für die klinische Praxis wird von der Arbeitsgruppe von Stephan Anker vorgeschlagen. Die Schlüsselkomponente neben einem niedrigen Body-Mass-Index (BMI) von weniger als 20 kg/m² ist ein Verlust des ödemfreien Körpergewichts von mindestens 5 % während der letzten 12 Monate. Der Zeitrahmen kann jedoch je nach Erkrankung variieren (Evans *et al.* 2008). Die Prävalenz der Patienten mit kardialer Kachexie beträgt ca. 15 bis 20 % pro Jahr. Darüber hinaus zeichnet sich die kardiale Kachexie durch eine hohe Mortalität von 20 bis 40 % pro Jahr aus. Daraus lässt sich abschätzen, dass jährlich 1,5–2 Millionen Todesfälle bei Patienten mit Kachexie auftreten (von Haehling *et al.* 2016). Therapeutische Interventionen, welche die kardiale Kachexie vermindern, können bei Patienten auch zur einer Verbesserung der Herzfunktion führen (Nagaya *et al.* 2004; von Haehling *et al.* 2017). Angesichts der hohen Prävalenz und noch höheren Mortalität im Zusammenhang mit der kardialen Kachexie sind Fortschritte für Patienten weltweit dringend erforderlich.

Da eine verminderte Skelettmuskelmasse ein wichtiger Bestandteil der kardialen Kachexie ist und auch schon alleine mit einer verschlechterten Herzfunktion einhergeht, kann der atrophierte Skelettmuskel in dieser Situation zum Fortschreiten der Herzinsuffizienz kausal beitragen (Fulster *et al.* 2013). Der sog. Muskelhypothese zur Folge führt die Muskelatrophie über afferente neuronale Signale aus dem Muskel zu einem gesteigerten Sympathikotonus, wodurch die atrophierte Muskulatur selbst zur Verschlechterung der Herzinsuffizienz beiträgt

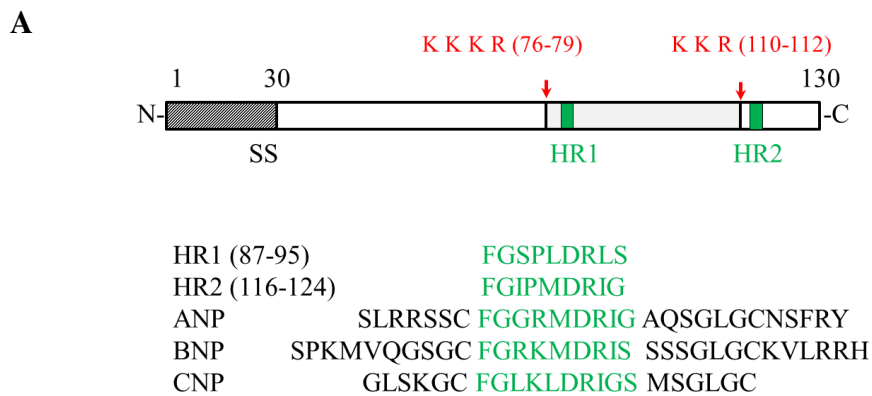
(Strassburg *et al.* 2005; Piepoli *et al.* 2006). Neben den durch Nervenfasern vermittelten Signalen der erkrankten Skelettmuskulatur können auch endokrine Signale aus der Skelettmuskulatur die Erkrankung ungünstig beeinflussen. So konnte in diesem Sinne bereits demonstriert werden, dass inflammatorische Zytokine wie TNF α und Interleukin 1 β im Muskel Quadrizeps von Ratten mit einer Herzinsuffizienz verstärkt exprimiert werden (Schulze *et al.* 2003), wobei TNF α bei herzinsuffizienten Patienten vermehrt im Plasma zu finden ist und zu ungünstigem myokardialen *Remodeling* führt (Levine *et al.* 1990). Neben der vermehrten Ausschüttung krankheitsfördernder Proteine aus der Skelettmuskulatur, könnte auch eine verminderte Ausschüttung protektiver Proteine aus den Skelettmuskeln sich ungünstig auf den Krankheitsverlauf der Herzinsuffizienz auswirken. So wird postuliert, dass die Skelettmuskulatur prinzipiell eine wichtige Quelle solcher systemisch protektiv wirkender endokriner Proteine (Myokine) ist (Walsh 2009; Pedersen 2011). In diesem Sinne konnte gezeigt werden, dass das protektive IGF-1 im Skelettmuskel herzinsuffizienter Ratten herunterreguliert wird (Schulze *et al.* 2003). In Bezug auf den Zusammenhang von Herz und Muskel bei einer Herzinsuffizienz wurde nachgewiesen, dass das Myokard bei pathologischer Belastung vermehrt Myostatin in den Blutstrom abgibt und dass dieses kardiale Myostatin im Skelettmuskel eine Atrophie induziert (Heineke *et al.* 2010; Breitbart *et al.* 2011). Auf welche Weise jedoch der atrophierte Skelettmuskel durch endokrin agierende sezernierte Myokine negativ auf das Herz einwirkt und so möglicherweise im Rahmen der kardialen Kachexie eine Herzinsuffizienz verschlimmert, bleibt weiterhin unklar.

1.3 Musclin

Der Skelettmuskel als ein endokrines Organ besitzt die Fähigkeit, Proteine (sog. Myokine) zu exprimieren und diese in die Blutbahn zu sezernieren. Diese üben dann spezifische parakrine Wirkungen im Muskel und endokrine Wirkungen auf andere Organe aus (Henningsen *et al.* 2010; Pedersen 2011).

Musclin, auch Osteocrin genannt, wird durch das Gen Osteocrin (*Ostn*) kodiert. Musclin ist ein 130 Aminosäure großes sezerniertes Protein, wobei die ersten 30 Aminosäuren das Signalpeptid darstellen (Thomas *et al.* 2003; Nishizawa *et al.* 2004). Das kleine Peptid enthält bei den Aminosäuren 76-79 eine KKKR-Sequenz und bei den Aminosäuren 110-112

eine KKR Serinprotease-Spaltungsstelle und zwei konservierte Regionen (HRs), bei den Aminosäuren 84-98 (HR1) und bei den Aminosäuren 113-128 (HR2), die eine starke Homologie zu den natriuretischen Peptiden (ANP, BNP, CNP) aufweisen (Abbildung 1 A) (Thomas *et al.* 2003; Moffatt *et al.* 2007). Darüber hinaus zeigt die kodierende Musclin-Sequenz (NM_198112.2) der Maus bis zu 95 % Homologie mit der humanen Musclin-Sequenz (NM_198184.2). Durch fehlende Cysteinreste kann Musclin aber im Gegensatz zu den natriuretischen Peptiden nicht an die Rezeptoren NPR-A und NPR-B binden, sondern bindet mit hoher Affinität durch homologe Regionen an deren Clearance-Rezeptor NPR-C (Moffatt and Thomas 2009; Kita *et al.* 2009).



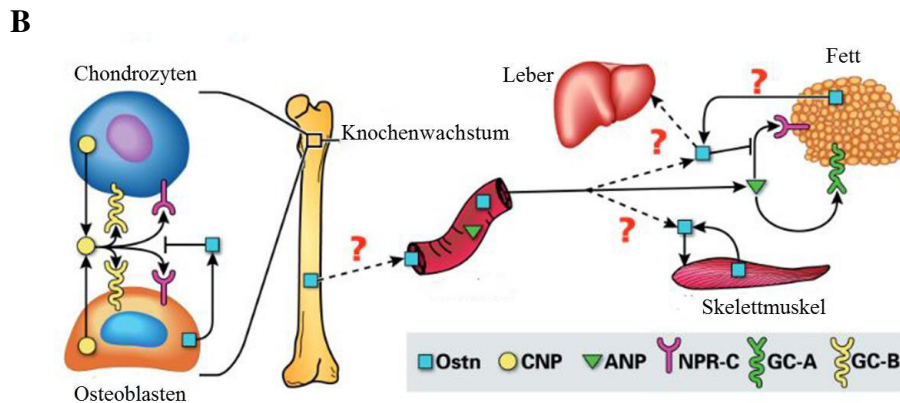


Abbildung 8 Schematische Darstellung des sezernierten Musclin (Ostn) mit Homologie zu den natriuretischen Peptiden.

(A) 130 Aminosäuren großes Musclin-Peptid enthält ein Signalpeptid am N-Terminus und zwei konservierte homologe Regionen (HR1 und HR2 in grün) zu den natriuretischen Peptiden (ANP, BNP, CNP) an C-Terminus. Musclin wird an zwei Stellen durch Serinproteasen gespalten (KKKR- und KKR-Spaltungsstelle in rot). (B) Musclin wird in Osteoblasten und Chondrozyten exprimiert und beeinflusst das Knochenwachstum. Musclin wird auch in der Skelettmuskulatur exprimiert und bindet an den natriuretischen Clearance-Rezeptor (NPR-C). Die Wirkung von zirkulierendem Musclin auf weitere Organe, besonders auf das Herz, wurde bis heute nicht untersucht (verändert nach Moffatt und Thomas, 2009).

NPR-C ist vorwiegend für den Abbau von ANP, BNP und CNP verantwortlich. Eine Bindung des NPR-C durch Musclin führt so zu erhöhtem ANP Plasmaspiegel, während im Gegenzug systemische Musclin *knock-out* Mäuse in der Tendenz geringere ANP-Konzentration im Plasma aufweisen (Moffatt *et al.* 2007; Kita *et al.* 2009; Subbotina *et al.* 2015; Miyazaki *et al.* 2018). Dies führt zu einer gesteigerten Signaltransduktion über den NPR-A Rezeptor und somit zu erhöhtem cGMP-Spiegel im Skelettmuskelgewebe. Darüber hinaus blockiert Musclin durch Bindung an NPR-C den Abbau von CNP und erhöht somit den CNP-Level und stimuliert dadurch die Proliferation und Differenzierung von Chondrozyten sog. Knorpelzellen und fördert das Knochenwachstum (Abbildung 8 B) (Thomas *et al.* 2003; Moffatt and Thomas 2009; Kanai *et al.* 2017).

Musclin wird vor allem in der Skelettmuskulatur und in deutlich geringeren Mengen im Knochen (Thomas *et al.* 2003; Bord *et al.* 2005) und im Gehirn (Ataman *et al.* 2016) exprimiert. Es wird durch Insulin sowie durch die Akt/Proteinkinase B hochreguliert und durch FOXO-Transkriptionsfaktoren herabreguliert (Yasui *et al.* 2007). Es konnte demonstriert werden, dass körperliches Training die Musclin-Expression erhöht, während sie beispielsweise in insulinresistenten Tieren herabreguliert ist (Nishizawa *et al.* 2004; Subbotina *et al.*

2015). Konstitutive, systemische Musclin *knock-out* Mäuse weisen eine reduzierte körperliche Trainingskapazität auf, welche mit reduzierten Level von cGMP und PGC1 α im Skelettmuskel einhergeht, was eine geringere Anzahl von Mitochondrien nach sich zieht (Subbotina *et al.* 2015). Im klaren Gegensatz zur Maus, wird Musclin im Zebrafisch in Kardiomyozyten produziert und kann von dort die Knochenentwicklung über eine Verstärkung von CNP-Effekten steuern. Hierbei wurde neben der Verstärkung der CNP-Wirkung über den NPR-B Rezeptor auch die Existenz eines unabhängigen Musclin-Rezeptors diskutiert (Chiba *et al.* 2017). Diese Untersuchungen deuten darauf hin, dass Musclin die Effekte der natriuretischen Peptide ANP, BNP und CNP verstärken kann.

In Bezug auf eine Wirkung von Musclin im Myokard bei pathologischer kardialer Belastung und bei der Entstehung einer Herzinsuffizienz ist bisher nicht viel bekannt. Die ersten experimentellen Studien in Ratten haben gezeigt, dass Musclin eine Vasokonstriktion in der Aorta induziert und an der Blutdruckregulierung beteiligt ist (Li *et al.* 2013; Lin *et al.* 2014). Einen ersten Hinweis auf die mögliche Funktion von Musclin im Herzen wurde erst vor Kurzem durch eine japanische Forschungsgruppe beschrieben. Diese Studien zeigen, dass Musclin die Herzfunktion nach Myokardinfarkt durch Hemmung des Clearance NPR-C Rezeptors verbessern kann. Durch eine Überexpression von Musclin in transgenem Mausmodell konnte eine erhöhte ANP- und CNP-Konzentration in Plasma nachgewiesen werden (Miyazaki *et al.* 2018).

Aufgrund der besonderen Interaktion von Musclin mit dem Clearance NPR-C Rezeptor und dem daraus resultierenden gehemmten Abbau der natriuretischen Peptide wird in der vorliegenden Arbeit postuliert, dass Musclin bei einer chronischen Herzinsuffizienz das pathologische *Remodeling* hemmen und damit die Herzfunktion verbessern kann.

2 Zielsetzung der Arbeit

Ein Teil der Patienten mit fortgeschrittener Herzinsuffizienz entwickelt eine Skelettmuskelschwäche und im fortgeschrittenem Stadium der Erkrankung eine kardiale Kachexie, welche mit einer sehr schlechten Prognose einhergeht. Das Verständnis der molekularen Mechanismen sowie die Suche nach neuen spezifischen Proteinen während der Entwicklung der kardialen Kachexie sind daher für den Einsatz neuer Therapien von großer Bedeutung. Das konkrete Ziel dieser Arbeit war es, die Auswirkungen von sezerniertem Musclin aus dem Skelettmuskel während der Ausbildung einer Herzinsuffizienz in Mäusen molekularbiologisch und histologisch zu untersuchen.

3 Materialien und Methoden

3.1 Materialien

3.1.2 Geräte

Tabelle 1 Geräte

Gerät	Typ	Firma
Agarosegel Imager	InGenius 3	Syngene, England
Agarosegelkammern	Eigenbau	Medizintechnik, MHH
Autoklav	Systec VX-150	Omnilab, Deutschland
Blutdruckmessgerät	BP-2000	Visitech Systems, USA
CO ₂ -Inkubator Zellkultur	CB 220	Binder, Deutschland
Cryostat	CM1900	Leica, Deutschland
Eismaschine	ZBE 30-10	Ziegra Eismaschinen, Deutschland
Elektrophorese-Kammer SDS-Page	Mini-PROTEAN	Bio-Rad, USA
Elektrophorese-Kammer Western Blot	Mini Trans-Blot	Bio-Rad, USA
Fluoreszenz-Mikroskop	Axio Observer.Z1	Zeiss, Deutschland
Gefrierschrank -20 °C	Premium NoFrost	Liebherr, Deutschland
Gefrierschrank -80 °C	VIP Freezer MDF-U73-V	Sanyo, England
Haarschneidemaschine	Wella Contura	Wella, Deutschland
Heizblock	Thermomixer Compact	Eppendorf, USA
Homogenisierer	PowerGen 125	Fisher Scientific, England
Inkubator Bakterien	MIR-153	Sanyo, England
Inkubator Bakterienschüttler	CERTOMAT BS-1	Sartorius, Deutschland
IonOptix		IonOptix, USA
Isofluranvapor	Dräger Vapor 19.3	Drägerwerk AG, Deutschland
Katheter	Modell SPR-839	Millar Instruments, USA
Kühlschrank 4 °C	Premium BioFresh	Liebherr, Deutschland
Langendorff-Anlage		Föhr Medical Instruments GmbH, Deutschland
Mausrespirator	MiniVent Type 845	Hugo Sachs Elektronik, Deutschland
Mikroskop Software	AxioVision 4.8	Zeiss, Deutschland
Mikrowelle	MW 13141E	Amica International GmbH
Mikrozentrifuge	HeraeusPico 17	Thermo Scientific, USA
Mikrozentrifuge	MiniStar	VWR, USA
Multi-Plate Reader	Synergy HT	BioTek Instruments, USA

Gerät	Typ	Firma
PCR Cycler	peqSTAR 2X	peqlab, Deutschland
pH-Meter	766 Calimatic	Knick, Deutschland
Pipetten	10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl	Gilson, Frankreich
Pipettierhilfe	Pipetus	Hirschmann, Deutschland
Power Supply	EV231	peqlab, Deutschland
Real Time-PCR Maschine	Mx3005P	Agilent Technologies, USA
Sicherheitswerkbank S1	Herasafe KS12	Thermo Scientific, USA
Sicherheitswerkbank S2	Herasafe KSP12	Thermo Scientific, USA
Sonifizierer	OmniRuptor 250	Omni International Inc., USA
Spektrophotometer	Nanodrop ND-1000	Thermo Scientific, USA
Stereomikroskop	Stemi 2000-C	Zeiss, Deutschland
Stickstofftank	CBS-V-5000AB	Ewald Innovationstechnik GmbH, Deutschland
Transfer System	Trans-Blot® Turbo™	Bio Rad, USA
Ultraschalldiagnostik-System (Echo)	Vevo 3100	VisualSonics, Kanada
Ultrazentrifuge	Avanti J-26 XP	BeckmanCoulter, USA
Vortexer	peqTWIST	peqlab, Deutschland
Waage (fein)	Atilon	Acculab GmbH, Deutschland
Waage (grob)	CP3202S	Sartorius, Deutschland
Wasserbad	1083	GFL, Deutschland
Western Blot-Imager	ImageQuant LAS4000	GE Healthcare, England
Wipptisch	WT16	Biometra, Deutschland
Zentrifuge	3-16K	Sigma Laborzentrifugen GmbH, Deutschland
Zentrifuge	Heraeus Multifuge 3SR+	Thermo Scientific, USA

3.1.2.1 Verwendete Softwares

Tabelle 2 Softwares

Software	Anwendung
AdobePhotoshop CS6	Grafik
GENTle (Klonierung)	Klonierung
GraphPad Prism 8	Statistik
LabChart 7	Katheter
Lavan	Tierzucht
pDRAW32	Klonierung

Software	Anwendung
Primer3Plus	Primerdesign
ApEA Plasmideditor	Klonierung
MxPro ET	Real-Time QPCR
ImageJ 1.49	Mikroskopbilder, Zellanalyse
GATCViewer 1.0	Sequenzierung
IonOptix Wizard 6.6	Kontraktilität
AxioVision Rel. 4.8	Mikroskopbilder
BP-2000 Blood Pressure Analysis System™	Blutdruckmessung
Vevo LAB	Echokardiographie

3.1.2 Verbrauchsmaterialien und Chemikalien

Tabelle 3 Materialien

Material	Firma
Cryotubes	Sarstedt, Deutschland
Eppendorfgefäße	Sarstedt, Deutschland
Faden Ethibond grün RB2 + RB2 5/0	ETHICON, Deutschland
Faden Ethilon, schwarz monofil BV1 7-0	ETHICON, Deutschland
Falcon tubes	Sarstedt, Deutschland
Filterpapier 1mm und 1,5 mm	Carl Roth GmbH, Deutschland
Glaswaren	DURAN Group GmbH, Deutschland
Handschuhe	Hartmann, Deutschland
Histoacryl-Gewebekleber	B. Braun Melsungen AG, Deutschland
Immobilon-PSQ Membran PVDF 0,2 µm	Merck Millipore, Deutschland
Immobilon-PSQ Membran PVDF 0,45 µm	Merck Millipore, Deutschland
Kanülen	B. Braun Melsungen AG, Deutschland
Objektträger und Deckgläser	Thermo Scientific, USA
Optical tubes Real-Time PCR	Agilent Technologies, USA
Parafilm	Bemis, USA
Pipettenspitzen	Sarstedt, Deutschland
Primer	Sigma Aldrich, Deutschland
Röhrchen Bakterienkultur	Greiner Bio-One GmbH, Deutschland
Sequenzierreaktionen	GATC, Deutschland
Serologische Pipetten	Sarstedt, Deutschland
Skalpells	B. Braun Melsungen AG, Deutschland

Material	Firma
Spritzen	B. Braun Melsungen AG, Deutschland
Zellkulturschalen und -flaschen	Sarstedt, Deutschland & Thermo Scientific, USA

Tabelle 4 Chemikalien

Chemikalie	Artikel-Nr.	Firma
16 % Formaldehydlösung	28908	Thermo Scientific, USA
2-Mercaptoethanol	4227.3	Roth, Deutschland
2-Methylbutan	3927.1	Roth, Deutschland
2-Propanol (Isopropanol)	9866.5	Roth, Deutschland
2-Propanon (Aceton)	CP40.3	Roth, Deutschland
Acrylamid/Rotiphorese 30	3029.1	Roth, Deutschland
Agar Agar	5210.2	Roth, Deutschland
Agarose	BIO-41025	Bioline, Deutschland
Ammoniumperoxysulfat	9592.3	Roth, Deutschland
Ampicilin	K029.1	Roth, Deutschland
BDM	B0753	Sigma-Aldrich
Blebbistatin	13013	Cayman Chemicals / biomol, USA
Borsäure	6943.1	Roth, Deutschland
Bovine Calf Serum	SH30073.03	Hyclone
Bovine Serum Albumin	P06-1391100	Pan-Biotech, Deutschland
Bromphenolblau	15090-046	Thermo Scientific, USA
Calciumchlorid CaCl ₂	C3881	Sigma Aldrich
CHAPS	1479.3	Roth, Deutschland
Coomassie Brilliant Blue G250	17524	Serva, Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat Na ₂ HPO ₄	S0876	Sigma Aldrich
Direct Red 80 (Sirius-Rot)	365548	Sigma Aldrich, USA
DMSO	A994.1	Roth, Deutschland
Doxycycline hyclate	D9891-25G	Sigma Aldrich, USA
DTT	15508-013	Thermo Scientific, USA
EDTA	8040.3	Roth, Deutschland
Ethanol	K928.4	Roth, Deutschland
Fura-2 AM	F1201	Thermo Fisher, USA
Glucose	HN06.1	Roth, Deutschland
Glycerol	7530.1	Roth, Deutschland
Glycin	3790.2	Roth, Deutschland
H ₂ O ₂	CP26.1	Roth, Deutschland
Harnstoff	3941.3	Roth, Deutschland
Hefeextrakt	24540	Serva, Deutschland
HEPES	9105.4	Roth, Deutschland
Isofluran	HDG9632	Baxter, USA
Isolectin B4	FL-1201	Vector Laboratories, USA

Chemikalie	Artikel-Nr.	Firma
Isoproterenol/Isoprenalin	I6504	Sigma Aldrich, USA
ITS Liquid Media Supplement	I3146-5ML	Sigma Aldrich, USA
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	P5379	Sigma Aldrich
Kaliumhydrogencarbonat (KHCO_3)	60339	Sigma Aldrich
Kanamycinsulfat	T832.1	Roth, Deutschland
KCl	6781.3	Roth, Deutschland
Laminin	354232	BD BioSciences
L-Glutamine	25030-024	Gibco, USA
Liberase DH Blendzyme	5401089001	Roche Applied Sciences
Liberase TH Research	5401151001	Roche Applied Sciences
Lipofectamine	11668-027	Thermo Scientific, USA
Luminata Crescendo Western HRP Substrate	WBLUR0500	Merck-Millipore, Deutschland
Magnesiumsulfat-Monohydrat ($\text{MgSO}_4\text{H}_2\text{O}$)	P027.1	Roth, Deutschland
Methanol	4627.3	Roth, Deutschland
NaCl	9265.2	Roth, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat NaHCO_3	S5761	Sigma Aldrich, USA
Natriumhydroxid (NaOH)	9356.1	Roth, Deutschland
Natriumlaurylsulfat (SDS)	2326.3	Roth, Deutschland
Penicillin	P3032-1Mu	Sigma Aldrich, USA
Penicillin/Streptomycin (Zellkultur)	P06-07100	Pan-Biotech, Deutschland
Pferdeserum	S9135	Merck Millipore, Deutschland
Phenol Red	P3532	Sigma Aldrich, USA
Pikrinsäure	P6744	Sigma Aldrich, USA
Roticlear	A538.5	Roth, Deutschland
RotiMount mit DAPI	HP20.1	Roth, Deutschland
Salzsäure	4625.1	Roth, Deutschland
Taurine	T0625	Sigma Aldrich, USA
TEMED	A1148	AppliChem, Deutschland
Trichlormethan/Chloroform	6340.1	Roth, Deutschland
TRIS	0188.4	Roth, Deutschland
Triton® X 100	3051.3	Roth, Deutschland
Trypsin	15090046	Gibco, USA
Trypton/Pepton	8952.3	Roth, Deutschland
Tween® 20	9127.1	Roth, Deutschland
WGA-TRITC-Konjugat	L5266	Sigma Aldrich, USA

Tabelle 5 Inhibitoren

Inhibitor	Artikel-Nr.	Firma
Cilostamid/PDE3-Inhibitor	BML-PD125-0005	Enzo Life Sciences
PKG I α Inhibitor, Cell-Permeable	370655	Merck
P19, NPR-B Receptor Antagonist	005-40	Phoenix Pharmaceuticals

3.1.3 Kits

Tabelle 6 Kits

Kit	Artikel-Nr.	Firma
ANP-Fluorescent EIA Kit	FEK-005-24	Phoenix Pharmaceuticals, Deutschland
Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric)	11647229001	Roche, Schweiz
cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail	11697498001	Roche, Schweiz
Cyclic AMP ELISA Kit	581001	Cayman Chemical, USA
Cyclic GMP ELISA Kit	581021	Cayman Chemical, USA
GeneJet Purificationkit	K0701	Thermo Scientific, USA
GeneRuler 100 bp DNA Ladder	SM0242	Thermo Scientific, USA
GoTaq® G2 Flexi DNA Polymerase	M7805	Promega, Deutschland
Maxima H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit	K1652	Thermo Scientific, USA
Maxima SYBR Green qPCRMastermix	K0253	Thermo Scientific, USA
Mouse Osteocrin (OSTN) ELISA kit	EKC37526	Biomatik, USA
NucleoBond® Xtra Midi / Maxi	740410100	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Deutschland
O'GeneRuler 1 kb DNA Ladder	SM1163	Thermo Scientific, USA
PageRuler Plus Prestained Protein Ladder	26620	Thermo Scientific, USA
peqGOLD TriFast	30-2020	peqlab, Deutschland
Phosphatase Inhibitor Cocktail Set V	524629	Merck Millipore, Deutschland
Phusion® High-Fidelity PCR Kit	E0553	New England Biolabs, USA
Pierce BCA Protein Assay Kit	23227	Thermo Scientific, USA
ProteoExtract® Albumin Removal Kit	122640	Merck Millipore, Deutschland
QIAquick Gel Extraction Kit	28706	Qiagen, Deutschland
Restriktionsenzyme		New England Biolabs, USA
T4 DNA Ligase	15224-017	Thermo Scientific, USA
Tissue-Tek® O.C.T™	4583	Sakura, Niederlande
VECTASHIELD HardSet Antifade Mounting Medium mit DAPI	H-1500	Vector Laboratories, USA
ZR Miniprep classic	D4054	Zymo Research, USA

3.1.4 Lösungen und Puffer

3.1.4.1 Zelllinien und Zellkulturmedien

Tabelle 7 Zelllinien

Zelllinie	Firma
HEK293	ATTC, England

Tabelle 8 Zellkulturmedien

Medium	Artikel-Nr.	Firma
DMEM, high glucose	P04-03500	Pan-Biotech, Deutschland
MEM	21575-097	Gibco, USA
Opti-MEM® I Reduced Serum Medium	31985-062	Thermo Scientific, USA

Tabelle 9 Digestion Buffer (Langendorff)

Komponente	Menge/300 ml
Perfusion Buffer 1X	285 ml
Liberase™ DH	75 mg
Trypsin 10X	1668 µl
CaCl ₂ 100 mM	37,5 µl

Tabelle 10 10x Perfusion Buffer (Langendorff)

Komponente	Konzentration
NaCl	1130 mM
KCl	47 mM
KH ₂ PO ₄	6 mM
Na ₂ HPO ₄	6 mM
MgSO ₄ ·7H ₂ O	12 mM
Phenol Red	0,32 mM
NaHCO ₃	120 mM
KHCO ₃	100 mM
HEPES 1 M	100 mM
Taurine	300 mM

Tabelle 11 1x Perfusion Buffer (Langendorff)

Komponente	Menge/800 ml
10x Perfusion Buffer	80 ml
Glucose	5,5 mM
BDM 0,5 M	16 ml

Tabelle 12 Stop Buffer 1 (Langendorff)

Komponente	Menge/50 ml
Perfusion Buffer 1X	45 ml
Kälberserum	5 ml
CaCl ₂ 10 mM	62,5 µl

Tabelle 13 Stop Buffer 2 (Langendorff)

Komponente	Menge/100 ml
Perfusion Buffer 1X	95 ml
Kälberserum	5 ml
CaCl ₂ 10 mM	208,33 µl

Tabelle 14 Plating Medium (AMCM)

Komponente	Menge/120 ml
MEM	109,2 ml
Kälberserum	6 ml
BDM 0,5 M	2,4 ml
Penicillin 10X	1,2 ml
L-Glutamin 10X	1,2 ml

Tabelle 15 Langzeitmedium (AMCM)

Komponente	Menge/100 ml
MEM	97,9 ml
BSA	200 mg
HEPES 1 M	1 ml
Penicillin 10X	1 ml
L-Glutamin 10X	1 ml
IST 1000x	100 µl

Tabelle 16 SADO-MIX Lösung (Fibroblasten)

Komponente	Volumen	Endkonz. (1X)
200 mM HEPES-NaOH (pH 7.6)	50 ml	20 mM
1,3 M NaCl	50 ml	130 mM
300 mM KCl	5 ml	3 mM
100 mM NaH ₂ PO ₄	5 ml	1 mM
2 M Glucose	1 ml	4 mM
1,5 mM MgSO ₄	185 mg	
dH ₂ O	390 ml	

Tabelle 17 Enzymlösung (Fibroblasten)

Komponente	Menge/20 ml SADO-MIX
Liberase TH	5 mg/ml

3.1.4.2 SDS-PAGE und Western Blot

Tabelle 18 Sammelgel für 1 Gel

Komponente	Volumen
dH ₂ O	1,4 ml
Rotiphorese Gel 30	0,33 ml
1,5 M Tris (pH 8,8)	0,25 ml
10 % (w/v) SDS	200 µl
10 % APS	20 µl
TEMED	2 µl

Tabelle 19 Trenngel für 1 Gel

Komponente	12 %	15 %
dH ₂ O	3,3 ml	2,3 ml
Rotiphorese Gel 30	4,0 ml	5,0 ml
1,5 M Tris (pH 8,8)	2,5 ml	2,5 ml
10 % (w/v) SDS	100 µl	100 µl
10 % APS	100 µl	100 µl
TEMED	4 µl	4 µl

Tabelle 20 Lysis-Puffer

Komponente	Volumen
Urea	8 M
Tris-HCl pH 7,5	30 mM
CHAPS	4 % (w/v)
Protease-Inhibitoren	1X

Tabelle 21 5X Ladepuffer

Komponente	Volumen
1M Tris (pH 7,0)	4,0 ml
Glycerol	6,4 ml
SDS	1,28 g
2-Mercaptoethanol	3,2 ml
Bromphenolblau	16 µl

mit dH₂O auf 16 ml auffüllen

Tabelle 22 10X SDS-Page Elektrophorese-Puffer

Komponente	Menge/L	Endkonz. (10X)	Endkonz. (1X)
Tris	30,3 g	250 mM	0,25 mM
Glycin	144,0 g	1,92 M	192 mM
SDS	10 g	1 % (w/v)	0,1 % (w/v)

mit dH₂O auf 1 L auffüllen

Tabelle 23 10X Western Blot Transfer-Puffer

Komponente	Menge/L	Endkonz. (10X)	Endkonz. (1X)
Tris	30,3 g	250 mM	0,25 mM
Glycin	144,0 g	1,92 M	192 mM
Methanol	200 ml		20 %

mit dH₂O auf 1 L auffüllen

Tabelle 24 10X TBS-T Western Blot Wasch-Puffer

Komponente	Menge/L	Endkonz. (10X)	Endkonz. (1X)
Tris	60,5 g	499 mM	0,25 mM
NaCl	87,6 g	1,5 M	192 mM

Komponente	Menge/L	Endkonz. (10X)	Endkonz. (1X)
Tween20	10 ml	1 %	0,1 %

mit dH₂O auf 1 L auffüllen; pH 8,0 mit HCl einstellen

3.1.4.3 Bakterienkulturen

Tabelle 25 LB-Medium

Komponente	Menge
Trypton/Pepton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	5 g

mit dH₂O auf 1 L auffüllen; autoklavieren

Tabelle 26 Agarplatten

Komponente	Menge
Trypton/Pepton	5 g
Hefeextrakt	2,5 g
NaCl	2,5 g
Agar Agar	7,5 g

mit dH₂O auf 500 ml auffüllen; autoklavieren, abkühlen

Add.:

Ampicillin / Kanamycin 100 µg/ml / 50 µg/ml

3.1.4.4 Genotypisierung

Tabelle 27 Lösung A für DNA Isolierung

Komponente	Volumen	Endkonz.
1 M NaOH	1,25 ml	25 mM
H ₂ O	48,75 ml	

Tabelle 28 Lösung B für DNA Isolierung

Komponente	Volumen	Endkonz.
1 M Tris pH5	2 ml	40 mM
0,5 M EDTA	20 µl	0,2 mM
H ₂ O	48 ml	

Tabelle 29 TBE Puffer

Komponente	Volumen
Tris	242 g
Borsäure	120,6 g
0,5 M EDTA	80 ml
mit dH ₂ O auf 2 L auffüllen	

Tabelle 30 TE Puffer

Komponente	Volumen
Tris	10 mM
EDTA	1 mM
Tris	10 mM
pH 7,4 mit HCl einstellen	

3.1.5 Plasmide

Tabelle 31 Vektoren

Plasmid	Herkunft	Anwendung
pShuttleCMV	Agilent Technologies, USA	Standard quantitative PCR
pds-MCK-hrluc	O.J. Müller, Universität Heidelberg	Herstellung AAV6-Musclin

Tabelle 32 cDNA-Klone

Gen	Plasmid	Spezies	Katalog-Nr.	NCBI Datenbank-Eintrag
Musclin	pCR4-TOPO	Maus	MM1013-211691361	BC117063.1

3.1.6 Oligonukleotide

Tabelle 33 Genotypisierungsprimer

Gen	Sequenz	Produktgröße
Musclin-fwd	ATGCAGTTGTTCTGGGGCTGAATC	WT 356 bp
Musclin-reverse	CACCAGATCATCAAGACGCAGGAG	KO 438 bp
Cre-forward	GGCGTTTTCTGAGCATACT	550 bp
Cre-reverse	CTACACCAGAGACGGAAATCC	

Tabelle 34 Real Time-PCR Primer

Gen	Sequenz 5' - 3'	Spezies
α MHC-fwd	ACTGTGGTGCCTCGTTCC	Maus
α MHC-rev	GCCTCTAGGCGTTCCTTCTC	
β MHC-fwd	AGGCAAGGCAAAGAAAGGCTCATC	Maus
β MHC-rev	GCGTGGAGCGCAAGTTTGTCTATAA	
Acta1-fwd	GCCAGAGTCAGAGCAGCAGAAACTA	Maus
Acta1-rev	CAGAGCCGTTGTACACACAAGA	
ANP-fwd	ATTGACAGGATTGGAGCCCAGAGT	Maus
ANP-rev	TGACACACCACAAGGGCTTAGGAT	
BNP-fwd	CTCAAGCTGCTTTGGGCACAAGAT	Maus
BNP-rev	AGCCAGGAGGTCTTCTACAACAA	
CNP-fwd	GCTGGTTCCTGACCAAAAAG	Maus
CNP-rev	CAGATGGCTTGTCCAGATCA	
Collagen 1-fwd	GACTGGCAACCTCAAGAAGG	Maus
Collagen 1-rev	GGCCAATGTCTAGTCCGAAT	
Collagen 3- fwd	ATAAGCCCTGATGGTTCTCG	Maus
Collagen 3-rev	ATGCATGTTTCCCCAGTTTC	
Fibronectin 1-fwd	TGACAACCTGCCGTAGACCTG	Maus
Fibronectin 1-rev	ATCTAGCGGCATGAAGCACT	
GAPDH-fwd	ACCCAGAAGACTGTGGATGG	Maus
GAPDH-rev	CACATTGGGGGTAGGAACAC	
Musclin-fwd	TGGACTGGAGATTGGCAAGT	Maus
Musclin-rev	CAGATCATCAAGACGCAGGA	
NPR-A-fwd	AAGAGACGATGGGCAGGATA	Maus
NPR-A-rev	CCATCCTCCATGGTGAAGTT	
NPR-B-fwd	ATACCGAGAACCCCCAAATC	Maus
NPR-B-rev	TCTTCGTCCCTGCATCTTCT	

Gen	Sequenz 5' - 3'	Spezies
NPR-C-fwd	ACACGGAATACTCGCACCTC	Maus
NPR-C-rev	TGATTCTCCGAATGGTGTCA	
Periostin-fwd	ACCAGCCAACAAAAGGGTTC	Maus
Periostin-rev	TGCTTGAAGATTGGCTTCTG	
SERCA2a-fwd	ACGTGCCTGGTGGAGAAGATGAAT	Maus
SERCA2a-rev	ATCTTGCTCATGGATGTCCGGCTT	

Tabelle 35 Klonierungsprimer (Restriktionsschnittstellen sind kursiv markiert)

Gen	Spezies	Zielvektor	Sequenz 5' - 3'	Anmerkung
Musclin-fwd	Maus	pShuttleCMV	ATATATATGGTACCATGCTGGACTGGAGATTGGCA	Musclin-Myc
Musclin-rev			TTGGTTGGCTCGAGCTACAGATCTTCTTCA-GAAATAAGTTTTTGTTCGCCTCTGGAAGTGGAGAGC	
Musclin-fwd	Maus	pds-MCK-hrluc	ATATATATGGATCCATGCTGGACTGGAGATTGGCA	AAV6 Musclin
Musclin-rev			TTGGTTGGTGTACATCACAGATCTTCTTCA-GAAATAAGTTTTTGTTCGCCTCTGGAAGTGGAGAGC	

3.1.7 Antikörper

Tabelle 36 Primäre Antikörper

Antikörper	Artikel-Nr.	Firma
Aktin	A2066	Sigma-Aldrich, USA
alpha Tubulin	ab40742	Abcam, USA
CNP	PA5-87696	Invitrogen, USA
CREB (48H2)	9197	Cell Signaling, USA
GAPDH	10R-G109a	Fitzgerald, USA
Musclin	RD181079100	BioVendor, Tschechien
p38 MAPK	9212	Cell Signaling, USA
p44/42 MAPK (Erk1/2)	9102	Cell Signaling, USA
Phospho-CREB (S133)	9198	Cell Signaling, USA

Antikörper	Artikel-Nr.	Firma
Phospholamban	A010-14	Badrilla, Großbritannien
Phospholamban (pSer16)	A010-12	Badrilla, Großbritannien
Phospho-p38 MAPK (T180/Y182)	9211	Cell Signaling, USA
Phospho-p44/42 MAPK (T202/Y204)	9101	Cell Signaling, USA
Phospho-Troponin I (Cardiac)(Ser23/24)	4004	Cell Signaling, USA
SERCA2a ATPase	ab2861	Abcam, USA
Troponin I	4002	Cell Signaling, USA

Tabelle 37 Sekundäre Antikörper (Western Blot)

Antikörper	Artikel-Nr.	Firma
Anti-Rabbit-IgG-HRP	NA934	GE Healthcare Life Science, Großbritannien
Anti-Mouse-IgG-HRP	NXA931	GE Healthcare Life Science, Großbritannien
Anti-Goat-IgG-HRP	HAF005	R&D Systems, USA

Tabelle 38 Sekundäre Antikörper für Immunhistochemie

Antikörper	Artikel-Nr.	Firma
Anti-Mouse IgG, Alexa Fluor 488	4408	Cell Signaling, USA
Anti-Rabbit IgG Alexa Fluor® 488	4412	New England Biolabs, USA

3.1.8 Rekombinante Proteine

Tabelle 39 Rekombinante Proteine

Rekombinantes Protein	Artikel-Nr.	Firma
Atrial Natriuretic Peptide (ANP)	Ab114317	Abcam, USA
Natriuretic Peptide, C-Type (CNP)	N8768-1MG	Sigma Aldrich, USA
Human Osteocrin	D172079100	BioVendor, Tschechien
Human Osteocrin	ab105614	Abcam, USA

3.1.9 Bakterienstämme

Tabelle 40 Bakterienstämme

<i>E-coli</i> - Stamm	Artikel-Nr.	Firma
DH5 α TM Competent Cells	18265-017	Thermo Scientific, USA
XL10-Gold Ultracompetent Cells	200315	Agilent Technologies, USA
BJ5183-AD-1 Electroporation Competent Cells	200157	Agilent Technologies, USA

3.1.10 Mausstämme

Tabelle 41 Mausstämme

Mausstamm	Linie	Herkunft
HSA-rtTRE-Cre	C57BL/6;C3-Tg(ACTA1-rtTA,tetO-cre)102Monk/J	The Jackson Laboratory, USA
C57Bl/6J	C57Bl/6JCr1	Charles River Laboratories, Deutschland
Ostn ^{flα/flα}	C57BL/6-Ostntm1(loxP)iTL	Ingenious Targeting Laboratory, USA
Ostn ^{flα/flα} x HSA-rtTRE-Cre	C57BL/6-Ostntm1(loxP)iTL x C57BL/6;C3-Tg(ACTA1-rtTA,tetO-cre)102Monk/J	Aus eigener Zuchtkreuzung

Die Mauslinie Musclin (Ostn^{fl/fl}) wurde zusammen mit der Firma *Ingenious Laboratory* hergestellt. Um die Funktion von endogenem Musclin zu untersuchen, wurde das Exon 3 des Musclingens (Ostn) gefloxed (Ostn^{fl/fl}). Die protein-kodierende Sequenz des Maus Musclin Gens verteilt sich auf die Exons 2, 3 und 4. Durch die Expression der Cre-Rekombinase kommt es in Ostn^{fl/fl} Mäusen somit zu einem Ausschneiden des Exons 3, was zur Eliminierung von >50 % der protein-kodierenden Sequenz und außerdem zu einem „frameshift“ der nachfolgenden kodierenden Sequenz (in Exon 4) führt, so dass kein funktionelles Protein entsteht (Abbildung 9).

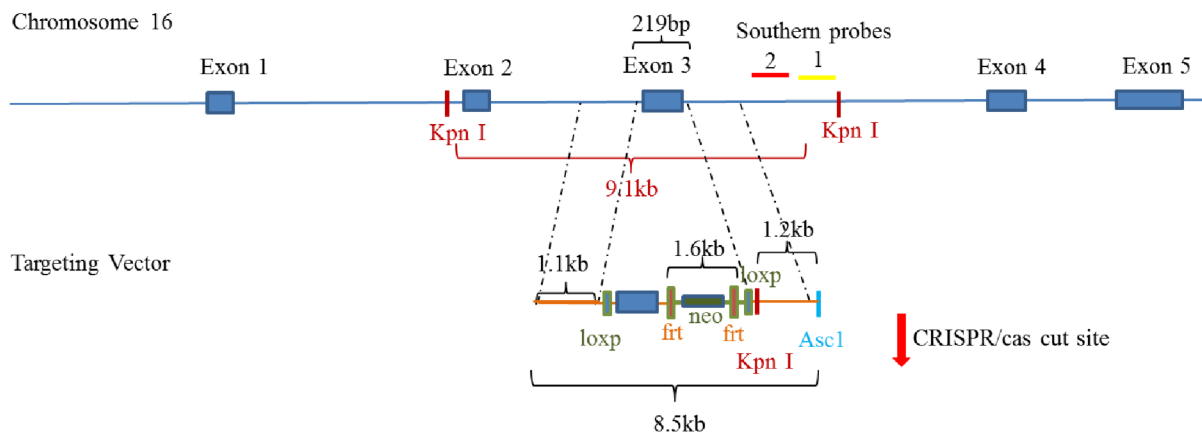


Abbildung 9 Musclin knock-out Targeting Strategie.

Durch die gezielte Targeting Strategie wird das Exon 3 des Musclingens mit LoxP Schnittstellen umgeben (zur Generierung der $Ostn^{fl/fl}$ Mäuse), welche bei zellulärer Expression der Cre-Rekombinase zur Eliminierung des Exons führt. Die Eliminierung des Exons 3 führt in den nachfolgenden, von den Exons 4 codierenden Sequenzen zu einem sog. „frameshift“.

Für die Generierung von induzierbaren skelettmuskelspezifischen Musclin *knock-out* Mäusen durch Doxycyclingabe ins Trinkwasser (Abbildung 10), wurden die $Ostn^{fl/fl}$ Mäuse (Musclin WT) mit dem skelettmuskelspezifischen aktivierbaren HSA-rtTRE-Cre Mäusen ($Ostn^{fl/fl} \times HSA-rtTRE-Cre$; Musclin KO) verpaart (Rao and Monks 2009). Die induzierbaren Musclin KO Mäuse ermöglichen gezielt eine zeitlich selektive Ausschaltung von skelettmuskulärem Musclin im Erwachsenenalter oder zu einem späteren Krankheitsstadium, um mögliche embryonale Kompensationsmöglichkeiten zu umgehen.

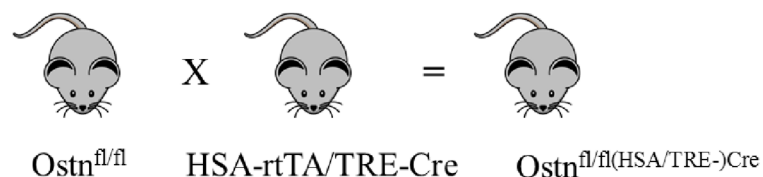


Abbildung 10 Schematische Darstellung der Generierung von induzierbaren skelettmuskelspezifischen Musclin knock-out Maus.

Eine $Ostn^{fl/fl}$ Maus (Musclin WT) wurde gekreuzt mit einer skelettmuskelspezifischen aktivierbaren HSA-rtTRE-Cre Maus zur Erzeugung der induzierbaren $Ostn^{fl/fl(HSA/TRE-Cre)}$ Maus (Musclin KO).

Für die Versuche wurden 8 Wochen alte männliche und weibliche Musclin KO ($Ostn^{fl/fl(HSA/TRE-Cre)}$) und Musclin WT ($Ostn^{fl/fl}$) Mäuse als Kontrolle verwendet. Eine Woche vor dem Beginn des Experiments wurden alle Mäuse mit Doxycyclin behandelt. Für die AAV6-Versuche wurden 8 Wochen alte, männliche C57BL/6J Wildtyp Mäuse verwendet. Alle Tierversuche wurden gemäß den gesetzlichen Bestimmungen für Tierversuche durchgeführt und durch die Behörden genehmigt (LAVES 33.14-42502-04-11/0335 und 33.12-42502-04-16/2356).

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkultur

Alle Primärzellen sowie Zelllinien wurden in einem befeuchteten Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert.

3.2.1.1 Kultivierung und Passagieren von Zelllinien

HEK293-Zellen wurden in DMEM mit 10 % (v/v) FBS, 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin und 1 % (v/v) L-Glutamin kultiviert. Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen passagiert oder für Versuche ausplattiert.

3.2.1.2 Isolierung und Kultivierung von adulten kardialen Fibroblasten aus der Maus

Die Fibroblasten wurden aus 3 bis 5 Wochen alten CD1 Mäusen isoliert. Die entnommenen Herzventrikel wurden in kaltem 1X PBS-Puffer gründlich gespült, fein geschnitten und in ein 50 ml Falcon-Röhrchen überführt und mit 3 ml SADO-Mix Lösung (Tabelle 16) versetzt. Nach dem Zentrifugationsschritt für 3 Min. bei 4 °C und 200xg wurde der Überstand

abgesaugt und durch 4 ml Enzymlösung (Tabelle 17) ersetzt. Nach Inkubation für 8 Min. bei 37 °C und 18 rpm wurde der Überstand in ein neues 50 ml Falcon-Röhrchen (I) mit 10 ml HS überführt und auf Eis gelagert. Der Verdauungsschritt wurde zweimal wiederholt und der Überstand gesammelt. Für den weiteren Verdau wurde Enzymlösung 1:2 mit SADO-Mix Lösung verdünnt. Das Herzgewebe wurde mit 5 ml verdünnter Enzymlösung für 25 Min. bei 37 °C und 18 rpm inkubiert. Der Überstand wurde in ein neues 50 ml Falcon-Röhrchen (II) mit 10 ml HS überführt. Der Verdauungsschritt wurde zweimal wiederholt und der Überstand gesammelt. Die Zellen aus Falcon-Röhrchen (I) wurden 3 Min. bei 400xg zentrifugiert und der Überstand in Falcon-Röhrchen (II) überführt. Nach dem Zentrifugationsschritt für 3 Min. bei 400xg wurde der Überstand abgesaugt und die beiden Pellets aus dem Falcon-Röhrchen (I) und (II) mit 10 ml DMEM mit 10 % FBS mit 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin und 1 % (v/v) L-Glutamin resuspendiert. Nach anschließender Zentrifugation für 2 Min. bei 400xg wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 20 ml DMEM mit 10 % FBS mit 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin und 1 % (v/v) L-Glutamin resuspendiert und die Zellen auf zwei 10 cm Zellkulturplatten verteilt. Nach 3 h Inkubation wurde das Medium gewechselt.

Das Kulturmedium wurde jeden Tag gewechselt und bei Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen anschließend passagiert. Die Zellpassage wurde mit einer Trypsin-basierten Lösung durchgeführt.

Da sich Fibroblasten in Kultur nicht unbegrenzt vermehren lassen, mussten sie in regelmäßigen Abständen frisch isoliert werden.

3.2.1.3 Isolierung und Kultivierung von adulten Kardiomyozyten aus der Maus (AMCM)

Adulte Kardiomyozyten (AMCM) aus Mäusen wurden nach der Langendorff-Methode isoliert (AfCS Procedure Protocol PP00000125). Die Langendorff-Methode wurde durch Andrea Grund und Anna Gigina durchgeführt (AG Heineke, Kardiologie, MHH). Hierfür wurde das Herz aus adulten Mäusen frei präpariert und die Aorta am Perfusorstutzen der Langendorff-Apparatur befestigt. Die Koronararterien wurden zunächst für 4 Min. mit Perfusionspuffer (Tabelle 11) und anschließend für 10 Min. mit Digestion-Puffer (Tabelle 9) mit der Durchflussgeschwindigkeit jeweils 3 ml/Min. durchspült. Ab der 9. Minute wurde der

Digestion-Puffer in einer Petrischale aufgefangen. Das Herz wurde abgenommen und im aufgefangenen Digestion-Puffer mit einer 1 ml-Spritze (ohne Kanüle) homogenisiert. Durch Zugabe des Stop-Buffer 1 (Tabelle 12) in gleichem Volumen wurde der enzymatische Verdau gestoppt. Es erfolgte ein weiterer Homogenisierungsschritt mit Hilfe einer 1 ml-Spritze (ohne Kanüle) sowie anschließend eine Zentrifugation für 3 Min. bei 30xg. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 10 ml Stop-Buffer 2 (Tabelle 13) resuspendiert und die Zellsuspension für die Calcium-Aufbau auf eine 6 cm-Platte pipettiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von Calcium in aufsteigender Konzentration mit jeweils Inkubation von 4 Min.: 50 μ l 10 mM CaCl_2 , 50 μ l 10 mM CaCl_2 , 100 μ l 10 mM CaCl_2 , 30 μ l 100 mM CaCl_2 , 50 μ l 100 mM CaCl_2 . Durch Zentrifugation für 3 Min. bei 30xg wurden die Myozyten gesammelt und das Pellet in 12 ml Plating Medium (Tabelle 14) resuspendiert. Je nach Bedarf wurden entweder 500 μ l Zellsuspension pro ein mit 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ Laminin beschichtetes Deckglas (24/24 mm) ausplattiert oder das gesamte Pellet abzentrifugiert und schockgefroren.

3.2.1.4 Kontraktilitätsmessung der adulten Kardiomyozyten (IonOptix)

Die adulten Kardiomyozyten wurden nach Langendorff-Methode aus C57Bl/6J Wildtypmäusen im Alter von 8-10 Wochen isoliert. Die Zellsuspension aus einem Herzen wurde dann auf 24 mit Laminin beschichteten Deckgläsern (24/24 mm) gleichmäßig verteilt. Nach 2 h, nachdem sich die Zellen abgesetzt hatten, erfolgte die Kontraktilitätsmessung im IonOptix Gerät. Dafür wurden die Zellen in Leingzeitmedium (Tabelle 15) versetzt und in einem befeuchteten Inkubator bei 37 °C und 2 % CO_2 während der Messung aufbewahrt. Für die Messung wurden die Deckglässchen mit den adhären Zellen in die Kammer gespannt und mit Titanelektroden verbunden. Die Kontraktionen von Zellen wurden elektrisch bei 1 Hz und der Spannung von 30 V induziert. Nur die morphologisch intakten Zellen, die bei Stimulation konstant kontrahiert haben, wurden ausgewählt. Als Kriterien galten auch erkennbare Querstreifung und glatte Randstruktur. Die Zellkontraktilität wurde zunächst basal ermittelt. Anschließend erfolgte die Stimulation der Zellen unter Zugabe verschiedener Kombinationen aus Isoproterenol (100 nM) und rekombinanten Proteinen wie Musclin (1,10 und 100 nM), ANP (100 nM) und CNP (100 nM). Mindestens 20 Messungen an verschiedenen

Zellen mit einer Dauer von jeweils 1 Minute wurden pro Bedingung durchgeführt und anschließend mit der IonWizard 6.6 Software ausgewertet.

In Kooperation mit Prof. Ali El-Armouche in Dresden am Institut für Pharmakologie wurden die kardiomyozytären Kontraktilitäts- und zusätzlich Calcium-Messungen durchgeführt. Die automatisierten Injektionssysteme ermöglichten dort die zeitgleiche Applikation mehrerer Substanzen (z.B. ansteigender Konzentrationen).

3.2.1.5 Messung der cGMP und cAMP-Dynamik mithilfe von Förster-Resonanzenergietransfer (FRET)

Die Messung der cGMP- und der cAMP-Dynamik wurde in Kooperation mit Prof. Viacheslav O. Nikolaev Universitätsklinikum Eppendorf in Hamburg am Institut für Experimentelle Herz-Kreislaufforschung durchgeführt. Hierfür wurden die adulten Kardiomyozyten entweder aus den cGES-DE5 transgenen Mäusen für die cGMP-Messung oder aus den Epac2-Camps transgenen Mäusen für die Analysen von cAMP frisch isoliert auf mit Laminin beschichteten Deckgläsern (Nikolaev *et al.* 2004). Nach dem Waschen der Zellen wurden diese in einem physiologischen FRET-Puffer inkubiert (144 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂ und 20 mM HEPES; pH 7.4). FRET-Messungen wurden mit einem inversen Fluoreszenzmikroskop (Leica DMI3000B) durchgeführt. Die Zellen wurden nacheinander mit den angegebenen Substanzen stimuliert und das CFP/YFP-Emissionsverhältnis (Donor/Akzeptor) für die Messung der cAMP-Dynamik und das GFP/RFP-Verhältnis (Donor/Akzeptor) für die Messung der cGMP-Dynamik bei Anregung der Lichtdiode ermittelt (Nikolaev *et al.* 2006; Nikolaev *et al.* 2010). Kardiomyozyten mit optimaler Sensorexpression wurden mit aktivem Fluoreszenzlicht ausgewählt, das sofort nach dem Auffinden einer geeigneten Zelle ausgeschaltet wurde, um ein Photobleichen des FRET-Sensors zu vermeiden. Die Belichtungszeit betrug üblicherweise 20 ms, was zu einem guten Signal-Rausch-Verhältnis führte. Alle fünf Sekunden wurden Bilder in den Emissionskanälen aufgenommen. Die FRET-Imaging-Daten wurden mit der Origin 8.5-Software analysiert.

3.2.1.6 Bestimmung der Fibroblastenproliferation nach Stimulation mit rekombinanten Proteinen

Die Zellproliferation wurde mit dem Cell Proliferation ELISA, BrdU (colrimetric) (Roche) bestimmt. Dafür wurden die frisch isolierten Fibroblasten in zwei Dichten ($0,6 \times 10^3$ Zellen/well und $1,2 \times 10^3$ Zellen/well) auf eine 96well Platte ausplattiert. Die Stimulation der Zellen erfolgte unter Zugabe verschiedener Kombinationen aus rekombinanten Proteinen wie Musclin (100 nM) und CNP (100 nM). Nach Markierung der Zellen mit 5-Brom-2'-Desoxyuridin (BrdU) wurden diese nach 24 h fixiert und mit Anti-BrdU Antikörper für 90 Min. inkubiert. Nach dem Waschschrift wurde die Substratlösung der BrdU verwendet, was zur Farbentwicklung geführt hat. Die Absorption wurde bei 370 nm alle 2 Min. gemessen. Die Höhe der Absorption ist proportional zur Menge des inkorporierten BrdU's in den Zellen, was ein direkter Hinweis auf die Zellproliferation ist.

3.2.1.7 Bestimmung der Fibroblastenmigration nach Stimulation mit rekombinanten Proteinen

Die Zellmigration wurde mittels *Scratch*-Assay durchgeführt, indem die konfluente Zellschicht durch eine Pipettenspitze aufgekratzt und verfolgt wurde. Dafür wurden 5×10^4 Zellen/well auf eine 24 well Platte ausplattiert. Nach 24 h wurden die Zellen mit 1X PBS Puffer gewaschen und mittels einer 200 μ l Pipettenspitze mittig angekratzt. Die Stimulation der Zellen für 16 h erfolgte unter Zugabe verschiedener Kombinationen aus rekombinanten Proteinen wie Musclin (100 nM) und CNP (100 nM) und Inhibitoren wie Cilostamid (1 μ M), P19 (500 μ M) und PKG (200 μ M). Vor (0 h) und nach (4-8 h) der Stimulation wurden die Phasenkontrastmikroskopbilder aufgenommen und mit der AxioVision Software analysiert. Die Migrationseffizienz (%) wurde berechnet als $[(\text{zellfreie Fläche bei 0 h} - \text{zellfreie Fläche bei 16 h}) / \text{zellfreie Fläche bei 0 h}] \times 100$.

3.2.2 Molekularbiologie

3.2.2.1 RNA Isolierung

Die Isolierung von RNA aus Zellen wurde mit NucleoSpin® RNA II Kit (Macherey Nagel) und aus dem Gewebe mit peqGOLD TriFast (Peqlab) gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt.

Das Gewebe wurde in je 1 ml TriFast-Lösung aufgenommen und homogenisiert. Nach einer Inkubation von 5 min bei RT wurde je 200 µl Chloroform zugegeben, 15 Sekunden kräftig geschüttelt und 10 Min. bei RT stehen gelassen. Nach der Zentrifugation für 5 Min. bei 13000 rpm wurde die wässrige RNA-haltige Phase abgenommen und mit je 600 µl Isopropanol versetzt. Nach Fällung über Nacht bei -20 °C und Zentrifugation der RNA wurde das Pellett zweimal mit 75 % Ethanol gewaschen und getrocknet. Zuletzt wurde das Pellet in 20 µl nukleasefreiem Wasser gelöst und die Konzentration mittels Nanodrop bestimmt.

3.2.2.2 cDNA Synthese

Für die mRNA-Expressionsanalysen wurde die cDNA mittels Maxima H-Minusfirst Strang-cDNA-Synthese Kit (Thermo Scientific) aus RNA-Proben gemäß den Angaben des Herstellers synthetisiert. Je 1 µg RNA-Probe wurde revers transkribiert. Die synthetisierten cDNA-Proben wurden mit nukleasefreiem Wasser 1:10 verdünnt und bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

3.2.2.3 Quantitative Real Time-PCR (qRT-PCR)

Um die Expression der Gene zu analysieren, wurde eine relative quantitative Real Time-PCR mit dem Stratagene Mx3005P (Agilent Technologies) und dem Maxima SYBR Green qPCR Mastermix (Thermo Scientific) durchgeführt.

Als *threshold fluorescence* wurde die Einstellung *amplification based* gewählt. Der Ct-Wert wurde mit Hilfe der MxPro Software berechnet. Normalisiert wurde mit Hilfe des Housekeepinggens GAPDH.

Für die Expressionsanalyse des Gens Musclin wurde eine absolute quantitative Real Time-PCR verwendet. Als Standard wurde ein Plasmid mit Musclin-Sequenz (pShuttleCMV-Musclin-Myc) in Picomol verwendet. Die Werte wurden der Einstellung *Initial template quantity* in Picomol entnommen.

3.2.2.4 DNA Isolierung

Die Isolierung von DNA aus Bakterien erfolgte mit den Kits ZR Miniprep classic (Zymo Research) sowie NucleoBond® Xtra Midi / Maxi (MACHERY-NAGEL GmbH & Co. KG) gemäß den Angaben des Herstellers. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mittels Nanodrop.

Für die Genotypisierung der Mausstämmen wurden die Mausbiopsien in je 150 µl Lösung A für 20 Min. bei 95 °C gekocht. Anschließend wurden die Proben mit je 150 µl Lösung B versetzt, gemischt und bei 4 °C für 15 Min. bei 13000 rpm zentrifugiert. Je 1 µl DNA wurde für den PCR-Ansatz eingesetzt.

3.2.2.5 Primerdesign

Klonierungsprimer sowie Primer für die quantitative Real Time-PCR wurden mit dem Programm „Primer3Plus“ generiert. Die Schmelztemperatur (T_M) sollte bei ca. 60 °C liegen. Klonierungsprimer wurden mit einer spezifische Bindungssequenz für Restriktionsenzyme am 5'-Ende generiert sowie *upstream* davon 4-6 zusätzliche unspezifische Nukleotide z.B. ATATAT.

3.2.2.6 PCR und Aufreinigung der PCR-Produkte

Die Amplifikation spezifischer großer DNA-Fragmente erfolgte durch PCRs mit einer Polymerase mit Korrekturlesefunktion (PhusionHigh-Fidelity PCR Kit, NEB) bzw. für die Genotypisierungs-PCRs die GoTaq G2 Flexi DNA Polymerase (Promega). Die Bedingungen der PCR für das Musclin-Gen waren folgende: 94 °C für 3 Min., 35 Zyklen von 94 °C für 30 Sec., 60 °C für 30 Sec., 72 °C für 1 Min, finale Elongation bei 72 °C für 10 Min.

Die Aufreinigung der PCR-Produkte erfolgte mit dem GeneJet Purification Kit (Promega) nach den Angaben des Herstellers.

3.2.2.7 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Bestimmung der Größe von PCR-Produkten wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. 1 %ige Agarosegele wurden mit einem DNA-Farbstoff MidoriGreen versetzt. DNA-Proben wurden beladen und bei 80 V für 40 Min. aufgetrennt. Die Visualisierung erfolgte unter UV-Licht im Agarosegel Imager. Nach Bedarf wurden einzelne Banden ausgeschnitten und die DNA mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) aufgereinigt.

3.2.2.8 Klonierung von PCR-Produkten

Die kodierende Sequenz von Musclin (Ostn) (Maus: NM_198112.2) wurde in den pShuttle-CMV Vektor mit einem Myc-Tag am C-Terminus unter anderem für die generierung adeno-assoziierten viraler Vektoren (AAV) kloniert.

Für die Klonierung von PCR-Fragmenten in die Zielvektoren wurden diese wie folgt enzymatisch verdaut:

aufgereinigtes PCR-Produkt/Zielvektor	30 µl/µg
10X CutSmart Buffer	5 µl
Enzym 1(KpnI HF)	1 µl (20 U)
Enzym 2 (HxoI-HF)	1 µl (20 U)
ddH ₂ O	add 50 µl

Der Verdau erfolgte für 3 h bei 37 °C. Die Aufreinigung erfolgte mit dem GeneJet Purification Kit (Promega) bzw. über ein Agarosegel mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen). Anschließend wurden PCR-Fragmente und Zielvektor ligiert:

Zielvektor	100 ng
PCR-Produkt	s. Formel
10X T4 Ligase Buffer	4 µl
T4 DNA Ligase	2 µl
dH ₂ O	add 20 µl

Die Berechnung für die eingesetzte Menge an PCR-Produkt:

$$x \text{ ng PCR - Produkt} = \frac{100 \text{ ng Zielvektor} * x \text{ bp Zielvektor}}{\text{bp PCR - Produkt}}$$

Die Inkubation erfolgte 5 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 16 °C. Die Transformation von *E.coli* DH5α erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Jeweils 50 µl-Aliquots von DH5α wurden auf Eis aufgetaut, mit je 2 µl Ligationsansatz versetzt und 30 Min. auf Eis inkubiert. Danach erfolgte der Hitzeschock für 20 Sec. im 42 °C Wasserbad und 2 Min. auf Eis. Die Bakterien wurden in 400 µl vorgewärmten LB-Medium aufgenommen und 1 h bei 37 °C geschüttelt. Anschließend wurde die Bakteriensuspension auf Agar-Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden Kolonien einzeln gepickt, in 3 ml LB-Medium mit Antibiotikum aufgenommen und schüttelnd über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Isolierung der DNA erfolgte mit dem Kit ZR Miniprep classic (Zymo Research) gemäß des Herstellers. Um positive Klone zu identifizieren, wurde ein Kontrollverdau mit anschließender Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Hier positive Klone wurden durch die Firma GATC (Deutschland) mit Standardprimern spezifisch für die Zielvektoren sequenziert. Die anschließende DNA-Isolierung aus Midi-Kulturen erfolgte mit dem Kit NucleoBond® Xtra Midi/Maxi (MACHEREY-NAGEL).

3.2.2.9 Generierung und Expression von AAV6-MCK-Musclin

Adeno-assoziierte virale (AAV) Vektoren wurden zur gezielten Überexpression von Musclin in Skelettmuskelzellen eingesetzt. AAV sind Parvoviren, die keine Erkrankung hervorrufen können, da sie nur zu einem geringen Anteil ins Genom integrieren und eine niedrige Immunogenität aufweisen. AAVs ermöglichen einen langanhaltenden Gentransfer. Durch die Verwendung des AAV6 Virus mit der muskelspezifischen Kreatinkinase (MCK) als Promotor sollte das Ablesen des eingebrachten Gens auf den Skelettmuskel beschränkt werden (Wang *et al.* 2008; Zincarelli *et al.* 2008).

Die kodierende Sequenz des Musclingens wurde in den AAV6-Vektor pds-MCK kloniert (AAV6-Musclin). Musclin wurde dadurch spezifisch unter der Kontrolle des MCK-Promotors im Skelettmuskel exprimiert. Die Produktion des Virus erfolgte durch die AG Müller in Kiel (Universitätsklinikum Schleswig-Holstein Campus Kiel, Deutschland). Der Kontrollvirus AAV6-Control, welcher die *Renilla* Luciferase exprimierte (pds-MCK-hrluc), wurde ebenfalls durch die AG Müller zur Verfügung gestellt.

3.2.2.10 Immunoassays

3.2.2.10.1 Bestimmung der kardialen cGMP- und cAMP-Konzentration

Der cGMP-Spiegel wurde unter Verwendung des CyclicGMP-Enzym-Immunoassays (EIA) (Cayman Chemical) gemessen. Die adulten murinen Kardiomyozyten wurden mittels Langendorff-Methode isoliert und das Pellet (1/4) in 100 µl 0,1 M HCl aufgenommen und homogenisiert. Danach erfolgte die schonende Zentrifugation der Proben für 10 Min. bei 1000xg. Die Überstände wurden mit Verdünnungspuffer im Verhältnis 1 zu 6 verdünnt und die cGMP-Konzentrationsmessung gemäß dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Für die Messung des cAMP-Gehaltes wurde das CyclicAMP-Enzym-Immunoassay (EIA)-Kit (Cayman Chemical) verwendet. Die Verarbeitung der Proben erfolgte wie oben schon beschrieben.

3.2.2.10.2 Bestimmung der Musclinkonzentration in Plasma

Die Musclinkonzentration in Plasma wurde mit dem Mouse Osteocrin (OSTN) ELISA Kit bestimmt. Hierfür wurden die Plasmaproben im Verhältnis 1 zu 3 mit dem ELISA-Puffer verdünnt und nach Angaben des Herstellers die Messung des Musclin-Spiegels durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit der GraphPad Prism-Software.

3.2.2.10.3 Bestimmung der ANP-Konzentration in Plasma

Die ANP-Konzentration in Plasma wurde mit dem ANP-Fluorescent EIA Kit bestimmt. Die Messung des ANP-Spiegels in Plasma wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit der GraphPad Prism-Software.

3.2.3 Proteinbiochemie

3.2.3.1 Protein Isolierung

Für die Isolation von Proteinlysaten wurden Zellen bzw. Herzgewebe in Lysis-Puffer mit Protease- sowie Phosphatase-Inhibitoren homogenisiert und mindestens 30 Min. auf Eis gestellt. Das Lysat wurde bei 13 000 rpm und 4 °C für 15 Min. zentrifugiert und der Überstand in ein neues 1,5 ml Eppi überführt. Die Lagerung der Proben erfolgte bei -20 °C. Der Proteingehalt wurde mittels Micro BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) nach den Angaben des Herstellers bestimmt.

3.2.3.2 SDS Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS Page)

Proteinlysate wurden mittels SDS Page elektrophoretisch aufgetrennt. Dafür wurden je 20 µg Gesamtprotein mit 5X Ladepuffer versetzt und für 30 Min. bei 37 °C inkubiert. Die

Prozentigkeit der Polyacrylamid-Gele lag zwischen 10 und 15 %. Die SDS Page wurde in einer Elektrophorese-Kammer bei 20 mA für 30 min und dann bei 40 mA pro Gel in 1X SDS-Page Elektrophorese-Puffer durchgeführt.

3.2.3.3 Western Blot

Die Proteine wurden nach der Gelelektrophorese aus dem Gel auf eine PVDF Transfermembran mit einer Porengröße von 0,45 µm übertragen. Hierfür erfolgte der Transfer des Proteins auf die Membran durch das Anlegen einer Spannung von 100 V für 1 h im Puffertank (*wet-blot*). Das Musclin-Protein jedoch wurde aus dem Gel auf eine PVDF Transmembran mit einer Porengröße von 0,2 µm übertragen und mit Hilfe eines halbtrockenen Blotverfahrens (*semi-dry blot*) bei 24 V für 30 Min. geblottet.

Um unspezifische Bindungen zu blockieren wurde die Membran bei Raumtemperatur für 1 h in 5 % BSA/TBS-T Lösung gewippt. Die anschließende Inkubation mit primärem Antikörper (in 5 % BSA/TBS-T) erfolgte über Nacht bei 4 °C. Die Membran wurde gründlich mit 1X TBS-T gewaschen und für 1 h bei Raumtemperatur mit dem spezifischen sekundären Antikörper (in 1X TBS-T), der mit dem Enzym Meerrettichperoxidase (*HRP*) konjugiert war, gewippt. Nach erneutem Waschen der Membran mit 1X TBS-T wurde diese mit der sensitiven Crescendo Western HRP Substratlösung inkubiert und das Signal mit dem ImageQuant LAS4000 (GE Healthcare) detektiert.

3.2.4 Immunhistochemie

3.2.4.1 Immunfärbung

Für den Nachweis von Musclin in Muskel Quadrizeps wurde das Muskelgewebe im gekühlten mit flüssigem Stickstoff Isopentan behandelt und anschließend bei -80 °C gelagert. Für die Färbung wurden Kryoschnitte von 7 µm angefertigt und mit 100 % eiskaltem Aceton fixiert, danach für 10 Min. getrocknet. Nach dreimaligem Waschen mit 1X PBS erfolgte das Permeabilisieren mit 0,3 % Triton X100 in PBS und anschließend das Blockieren unspezifischer Bin-

dungsstellen durch Inkubation mit 3 % BSA/PBS bei Raumtemperatur für 30 Min. Die Inkubation mit Musclin-Antikörper (RD181079100; BioVendor) 1:50 verdünnt in 3 % BSA/PBS wurde über Nacht bei 4 °C in einer feuchten Kammer durchgeführt. Darauf erfolgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper Anti-Rabbit IgG Alexa Fluor® 488 (grün) in einer Verdünnung von 1:250 in 3 % BSA/PBS und Weizenkeimagglutinin (WGA, *Wheat Germ Agglutinin*) (rot) verdünnt 1:50 bei Raumtemperatur für 4h in einer feuchten Kammer. Eine Kernfärbung wurde durch die Verwendung von VECTASHIELD Mounting Medium (Vector Laboratories) mit DAPI ermöglicht. Die Detektion erfolgte mittels Fluoreszenzmikroskopie.

3.2.4.2 Sirius-Rot-Färbung

Um mögliche Kollageneinlagerungen im Herzen nach experimenteller Druckbelastung durch transversale Aortenkonstriktion (TAC) zu detektieren, wurden von in O.C.T. eingebetteten Herzen 12 µM dicke Kryoschnitte angefertigt und mit einer Sirius-Rot-Färbung behandelt. Hierfür wurden die bei -80 °C gelagerten Gewebeschnitte in kaltem Aceton auf Raumtemperatur aufgetaut und anschließend für 10 Min. getrocknet. Die Färbung wurde nach dem Färbeprotokoll (Tabelle 42) durchgeführt.

Tabelle 42 Färbeprotokoll der Sirius-Rot-Färbung

Schritt	Färbung [min]	Reagenz
1	30	Pikrinsäure-Lösung mit Formaldehyd (150 ml Pikrinsäure + 50 ml 37 % Formaldehyd)
2	1	Ethanol 70 %
3	60	Sirius-Rot in Pikrinsäure (200 ml Pikrinsäure + 0,2 g Direct Red 80)
4	2	10 mM HCl
5	2	Ethanol 70 %
6	2	Ethanol absolut 99,6 %
7	2	Ethanol absolut 99,6 %
8	2	Isopropanol 100 %
9	5	Roticlear
10	5	Roticlear
11		Eindecken mit RotiMount
12		unter dem Abzug trocknen

Die Mikroskopbilder wurden mit der Software Adobe Photoshop CS3 ausgewertet. Dabei wurde die Anzahl der Pixel fibrotischer Areale (rot) mit der Gesamtpixelzahl abgeglichen und der prozentuale Anteil errechnet.

3.2.5 Tierexperimentelle Methoden

Alle *in vivo* Versuche erfolgten nach den gesetzlichen Bestimmungen für Tierversuche und wurden durch die Behörden genehmigt. Die Haltung der Mäuse erfolgte im Zentralen Tierlabor der MHH unter Standardbedingungen mit einem 12 h:12 h Hell-Dunkel-Zyklus sowie *Ad libitum*-Fütterung.

3.2.5.1 Genotypisierung und Zucht der Musclin *knock-out* Mäuse.

Der Genotyp der Musclin *knock-out* Mäuse (Musclin KO) wurde mittels PCR und anschließender Gel-elektrophorese bestimmt (Abbildung 11). Spezifische Primer für Musclin WT und Musclin KO DNA wurden dafür verwendet (Tabelle 33). Um den *Ostn*^{fl/fl(HSA/TRE-Cre)} Zuchtstamm zu erhalten wurden homozygote Mäuse *Ostn*^{fl/fl} mit HSA-rtTRE-Cre Mäusen verpaart.

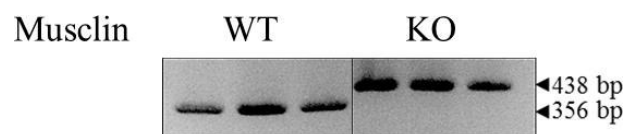


Abbildung 11 Agarose-Gelelektrophorese zur Bestimmung des Genotyps der Musclin WT und KO Mäuse.

Dargestellt sind die Ergebnisse von 3 Mäusen des jeweiligen Genotyps. Die *knock-out* Bande wurde bei 438 bp detektiert und die Wildtypbande bei 356 bp.

3.2.5.2 Transversale Aortenkonstriktion (TAC)

Um eine kardiale Hypertrophie im Mausmodell auszulösen, wurde eine transversale Aortenkonstriktion (TAC) durchgeführt. Die Aorta wurde in acht Wochen alten Mäusen um eine 26 G-Kanüle verengt, um eine kompensierte Hypertrophie des Herzens hervorzurufen. Für die Entwicklung einer chronischen Herzinsuffizienz mit anschließender Herzdilatation und Herzversagen wurde die Aorta um eine 27 G-Kanüle verengt.

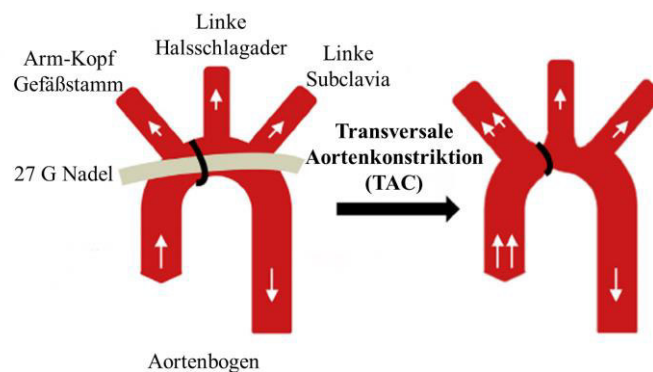


Abbildung 12 Transversale Aortenkonstriktion (TAC).

Schematische Darstellung des Aortenbogens mit Abgängen und der Durchführung transversaler Aortenkonstriktion (TAC) mittels 27 Gauge Nadel (verändert nach Luo *et al.* 2015).

Nach Narkoseeinleitung, Rasur, örtlicher Desinfektion und Applikation von Schmerzmitteln erfolgte eine linkssternale Thorakotomie. Unter vorsichtiger Separation des Thymus erfolgte die Freipräparation des Aortenbogens. Nachfolgend wurde der Aortenbogen zwischen den beiden Abgängen der Karotisarterien mittels eines chirurgischen Nahtmaterials (Ethicon, Ethilon 7-0) um eine 26 G- bzw. 27 G Nadel ligiert, welche unmittelbar nach der Ligation entfernt wurde (Abbildung 12). Nach Adaptation der Rippen und der Muskulatur wurde schließlich die Haut mittels Einzelknoten (Ethicon, Ethibond Excel 5-0) verschlossen und anschließend mit dem Gewebekleber Histoacryl behandelt. Nach Beenden der Narkose und Einsetzen der Spontanatmung wurde die Maus vom Beatmungsgerät getrennt und extubiert. Die gesamte Dauer der Operation betrug ca. 10 Minuten. Das Vorgehen bei scheinoperierten Mäusen ist vergleichbar, jedoch ohne Einsatz der Ligatur. Nach Ablauf von zwei Wochen wurden die Mäuse echokardiographisch und durch nicht-invasive oder invasive Blutdruckmessung analy-

siert. Für die länger andauernden Experimente wurden die Tiere alle 3 Wochen echokardiographisch analysiert. Anschließend erfolgten die Entnahme und molekularbiologische und histologische Analysen.

Das murine TAC-Modell wurde zuerst von (Rockman *et al.* 1991) etabliert und seitdem ausgiebig als wertvolles Werkzeug zur Nachahmung menschlicher kardiovaskulärer Erkrankungen und zur Aufklärung grundlegender Signalprozesse verwendet, die bei der Entwicklung von Herzinsuffizienz eine Rolle spielen. Alle Operationen wurden in der AG Heineke durch meine Person durchgeführt.

3.2.5.4 Injektion von adeno-assoziierten Viren (AAV6)

Um Musclin spezifisch im Skelettmuskel zu exprimieren, erfolgte zwei Tage nach TAC/Sham-Operation männlicher C57BL/6J Wildtyp Mäuse eine einmalige intramuskuläre Injektion in den Muskel Quadrizeps von AAV6-Musclin bzw. AAV6-Control mit jeweils 5×10^{11} Viruspartikeln in 50 μ l 0,9 % NaCl-Lösung. Alle drei Wochen wurden die Tiere echokardiographisch untersucht. Nach dem Versuchsende nach 9 Wochen erfolgten die Entnahme der Organe und molekularbiologische und histologische Analysen.

3.2.5.5 Echokardiographie

Die Echokardiographie wurde durch Badder Kattih (AG Heineke, Kardiologie, MHH) und Mortimer Korf-Klingebiel (AG Wollert, Kardiologie, MHH) durchgeführt.

Echokardiographisch wurde die linksventrikuläre Herzfunktion in Mäusen nach TAC und Scheinoperation bestimmt. Nach Narkoseeinleitung wurde der ventrale Thorax rasiert und mit Ultraschallgel versehen. Die Aufrechterhaltung der Anästhesie erfolgte durch eine Maske (Isofluran 2 %, Airflow 0,8 L/Min). Anschließend wurde mittels eines 30 MHz Schallkopfes (Vevo 770, Visualsonics) die linksventrikuläre Funktion, die Herzgröße und die Herzmasse im M-Mode bestimmt. Die linksventrikuläre end-diastolische Fläche (LVEDA) wurde über die parasternale kurze Achse abgebildet

3.2.5.6 Nicht-Invasive Blutdruckmessung (Schwanz-Manschette)

Die nicht-invasive Blutdruckmessung bei Mäusen wurde an dem Gerät BP-2000 mittels einer Transmissionsphotoplethysmographie durchgeführt. Hierzu wurden die Mäuse in eine Box auf eine beheizte Platte gelegt, der Schwanz durch die Messmanschette durchgezogen und mit einem Klebeband befestigt. Die Messung wurde zweimal mit je 20 Zyklen durchgeführt und die Daten in eine Excel-Tabelle überführt. Jedes Mal, wenn das Herz schlägt, durchläuft eine Druckwelle das Gefäßsystem. Wenn es den Schwanz erreicht, erweitern sich die Gefäße leicht und streuen somit mehr rotes Licht (dies entspricht der Systole). Wenn der Druck abnimmt, werden die Gefäße im Schwanz kleiner und weniger Licht wird gestreut (dies entspricht der Diastole.) Der diastolische und systolische Druck kann hier bestimmt werden, indem die Gefäßdilatation überwacht wird, wenn sich die Messmanschetten aufblasen.

3.2.5.7 Invasive Blutdruckmessung (Katheter)

Die invasive Blutdruckmessung in AAV6-Musclin und AAV6-Control Mäusen wurde durch Sandor Batkai (AG Thum, IMTTS, MHH) und die Messungen in Musclin KO und WT in der AG Heineke von mir durchgeführt.

Dafür wurden die Mäuse narkotisiert (2 % Isofluran) und künstlich beatmet (MiniVent Respirator, Harvard Apparatus). Die hämodynamische Daten wurden mit einem 1.4-F Micro-Tip-Katheter (Modell SPR-839, Millar Instruments, USA), der an ein Powerlab/4SP System (ADInstruments Ltd) gekoppelt war, ermittelt. Nach Haarentfernung von der Bauchpartie wurde der Brustkorb geöffnet. Die Herzspitze wurde linksventrikulär mit einer 25 Gauge Nadel punktiert und ein Druck-Volumenkatheter in den linken Ventrikel durch die Stichwunde vorgeschoben (Pacher *et al.* 2008). Nach korrekter Positionierung des Katheters wurden die Druckmessungen durchgeführt. Nach Beenden der Messungen wurde der Katheter entfernt, die narkotisierte Maus durch Überstrecken der Halswirbel getötet und Organe entnommen. Kardiale Parameter wurden mittels der Software LabChart 7 (ADInstrument Ltd.) aufgezeichnet und daraus die minimalen und maximalen Raten der Druckveränderungen im Ventrikel (dP/dt_{\min} und dP/dt_{\max}) sowie die Herzfrequenz abgeleitet.

3.2.5.8 Organentnahme und Plasmagewinnung

Für die Plasmagewinnung wurden die Tiere euthanasiert und das Herz freipräpariert. Das Blut wurde langsam aus dem rechten Ventrikel mit einer Spritze (25 G-Kanüle) entnommen und in ein Plasmaröhrchen mit Heparin (Sarstedt) überführt. Anschließend wurde das Blut für 10 Min. bei 1000xg und 4 °C abzentrifugiert und Plasma in neues Röhrchen überführt. Die Lagerung der Plasmaproben erfolgte bei -80 °C.

Um den Relaxationszustand der Ventrikel zu gewährleisten, wurden die entnommenen Herzen zuerst in kaltem 1xPBS und danach in 0,5 M KCl/PBS gewaschen.

Alle entnommenen Organe wurden gewogen und im Flüssigstickstoff schockgefroren. Für die Histologie wurde das die Herzbasis in Einbettmedium (O.C.T.) mit der Schnittstelle nach unten gerichtet und auf dem Trockeneis eingefroren. Das Muskelgewebe wurde auf ein mit einem Tropfen Einbettmedium beträufeltes Korkplättchen ausgerichtet. Das Einfrieren erfolgte in einem mit 2-Methylbutan (Isopentan) gefüllten Gefäß, der zur Kühlung in ein Flüssigstickstoff enthaltendes Thermogefäß gestellt wurde. Die Lagerung von eingebetteten Geweben erfolgte bei -80 °C.

3.2.5.9 Statistik

Die statistischen Analysen wurden mit Prism 8 (GraphPad Software) durchgeführt. Die Daten werden als Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM) dargestellt. Es wurde keine statistische Methode angewandt, um die benötigte Stichprobengröße zu ermitteln. Die Anzahl der biologischen Replikate ist in der Legende angegeben. Die Experimente waren nicht randomisiert. Die Forscher waren für die Maus-Genotypen bei den durchgeführten Operationen geblendet. Das gleiche galt bei der Durchführung der Echokardiographie, der invasiven und nicht invasiven Blutdruckmessung, der Gewichtsbestimmung der Organe sowie bei der Auswertung mikroskopischer Präparate.

Die Varianz war zwischen den Versuchsgruppen ähnlich und es wurde eine Normalverteilung der Werte angenommen. Um die statistische Signifikanz bei einer Gruppenanzahl größer als 2 zu bestimmen, wurde die Varianzanalyse (*One way ANOVA 1*) gefolgt vom Post-Hoc-Mehrfachvergleich nach Sidak angewandt. Zwei Versuchsgruppen wurden mit dem

Zweistichproben-t-Test für unabhängige Stichproben verglichen. Unterschiede mit einem Signifikanzwert von $p < 0,05$ wurden als signifikant betrachtet.

4 Ergebnisse

In dieser Studie wurde ein wichtiger Aspekt der Herz-Muskel-Interaktion während der Entwicklung der kardialen Kachexie genauer untersucht. Hierfür wurde zuerst ein experimentelles Mausmodell der kardialen Kachexie etabliert und das Expressionsmuster von sezernierten Proteinen aus dem atrophierten Skelettmuskel nach experimenteller Druckbelastung (TAC) analysiert. Mittelpunkt dieser Arbeit waren Analysen zur Bedeutung und Funktion von Musclin als sezerniertem Faktor, der im Skelettmuskel von herzinsuffizienten Mäusen herunterreguliert ist und nicht im Herzen exprimiert wird. Es erfolgten morphologische sowie funktionelle Analysen des Herzens sowohl von Mäusen mit muskelspezifischer Überexpression von Musclin als auch von skelettmuskelspezifischen Musclin *knock-out* Mäusen während einer chronischen Druckbelastung. Um die Wirkmechanismen von Musclin zu ermitteln, wurde dessen Einfluss auf die Kardiomyozytenkontraktilität untersucht. Darüber hinaus wurden die Effekte von Musclin auf die Entstehung der kardialen Fibrose ermittelt. Anhand der Ergebnisse konnte ein molekularer Mechanismus von Musclin an Herzmuskelzellen aufgedeckt werden.

4.1 Kardiale Kachexie verursacht ein Musclindefizit im atrophierten Skelettmuskel

Um zu bestimmen, ob der Skelettmuskel während der Herzinsuffizienz ein differenzielles Expressionsmuster von sezernierten Proteinen (sog. Myokinen) während des Skelettmuskelschwunds aufweist, wurde ein Mausmodell der kardialen Kachexie etabliert. Hierfür wurden C57B/6J Wildtypmäuse (WT) einer chronischen kardialen Druckbelastung durch transversale Aortenkonstriktion (TAC) unter Verwendung einer 27 Gauge Nadel für zwölf Wochen unterzogen (Abbildung 13).

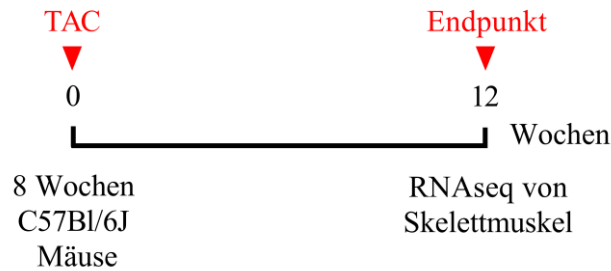


Abbildung 13 Experimenteller Zeitverlauf der Induktion kardialer Kachexie in der Maus.

C57Bl/6J Mäuse wurden einer transversalen Aortenkonstriktion (TAC) unter Verwendung einer 27 Gauge Nadel ausgesetzt oder einer Scheinoperation (Sham) unterzogen. Nach 12 Wochen wurden die Mausorgane molekularbiologisch und histologisch untersucht und eine RNA-Sequenzierungsanalyse (RNASeq) der Skelettmuskel durchgeführt.

WT-Mäuse, die zwölf Wochen lang einer chronischen Druckbelastung durch TAC ausgesetzt waren, entwickelten eine maladaptive Herzhypertrophie, worauf ein deutlich erhöhtes Verhältnis von Herzgewicht/Tibiallänge (HW/TL) im Vergleich zu den scheinoperierten Kontrolltieren (Sham) hindeutet (Abbildung 15 A). Als Zeichen für eine fortgeschrittene Herzinsuffizienz wurde eine schwere Lungenstauung in diesen Mäusen beobachtet, welche sich durch ein erhöhtes Verhältnis von Lungengewicht/Tibiallänge (LW/TL) zeigte (Abbildung 15 B). Zur Analyse der Skelettmuskulatur wurden die Muskeln Quadrizeps und Gastrocnemius beidseitig entnommen und gewogen (Abbildung 14). Das Gewicht bei den Skelettmuskeln war nach TAC um 20 % (Muskel Quadrizeps, Muskel Gastrocnemius) im Verhältnis zur Tibiallänge (Quadri/TL und Gastro/TL) reduziert. Dies deutet auf einen Skelettmuskelschwund und zusammen mit dem Verlust an Körpergewicht (BW) auf eine Kachexie im Vergleich zu scheinoperierten Mäusen (Sham) hin (Abbildung 15 C-E).

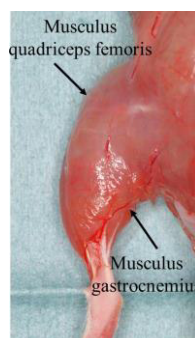


Abbildung 14 Darstellung der linken Beinmuskulatur der Maus.

Der *Musculus quadriceps femoris* (Muskel Quadrizeps) befindet sich auf der Ventralseite des Oberschenkels und der *Musculus gastrocnemius* (Muskel Gastrocnemius) ist ein Skelettmuskel, der zur Unterschenkelmuskulatur zählt (verändert nach Kochi *et al.* 2013).

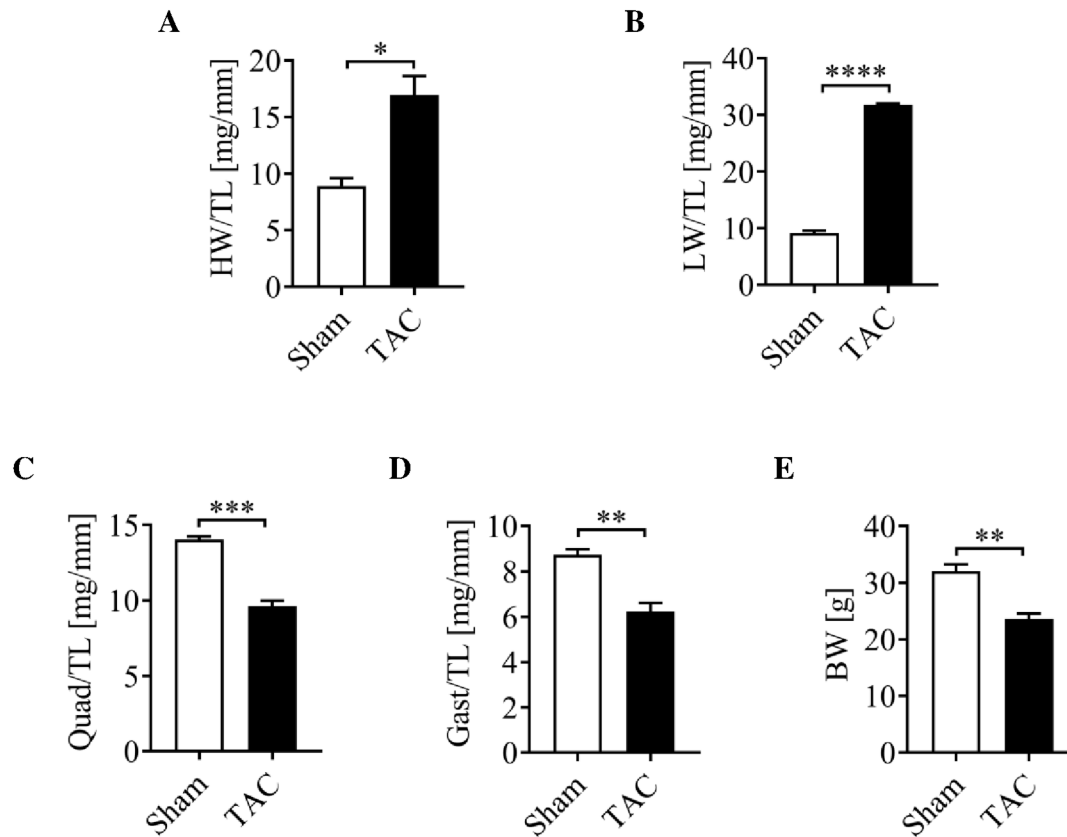


Abbildung 15 Analysen des experimentellen Mausmodells der kardialen Kachexie.

Die Analyse der Mäuse nach chronischer kardialer Druckbelastung durch transversale Aortenkonstriktion (TAC) im Vergleich zu den scheineroperierten Mäusen (Sham). (A) Quantifizierung des Herzgewichts/Tibiallänge-Verhältnisses (HW/TL), (B) des Lungengewicht/Tibiallänge-Verhältnisses (LW/TL), (C) des Skelettmuskel Quadrizeps/Tibiallänge-Verhältnisses (Quad/TL), (D) des Skelettmuskel Gastrocnemius/Tibiallänge-Verhältnisses (Gastro/TL), und (E) die Quantifizierung des Körpergewichts (BW). Die Anzahl der untersuchten Mäuse pro Gruppe beträgt $n = 3$. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$

Um unbekannte sezernierte Faktoren aus dem atrophierten Skelettmuskel zu identifizieren, wurde mRNA aus dem M. Quadrizeps (Abbildung 14) von Mäusen nach zwölfwöchiger, chronischer Druckbelastung durch TAC oder nach Scheinoperation (Sham) isoliert und das globale Expressionsmuster mittels RNA-Sequenzierungsanalyse (RNAseq) analysiert. Ziel dieser Analyse war die Identifizierung von Genen, die nach TAC im Skelettmuskel dysreguliert waren und die das Herz in endokriner Weise beeinflussen könnten. Hierfür wurden die primären RNAseq-Ergebnisse nach sezernierten Faktoren mit einer extrazellulären Region und einer signifikanten Dysregulation mittels PubMed-Recherche ausgesucht (Abbildung 16 A). Gene, die auch im Herzen exprimiert werden, wurden ausgeschlossen, da in diesem

Fall die lokalen parakrinen Effekte im Herzen vermutlich die endokrinen Effekte aus dem Skelettmuskel weit überwiegen würden. Laut dieser Kriterien konnten 48 mRNAs identifiziert werden (Abbildung 16 B). Eine dieser mRNAs kodierte für das *Insulin-like growth factor-binding protein 5* (IGFBP5), ein sezerniertes IGF-1-Bindungsprotein, von dem zuvor gezeigt wurde, dass es im Skelettmuskel von Patienten mit einer Herzinsuffizienz herunterreguliert ist (Godard *et al.* 2012).

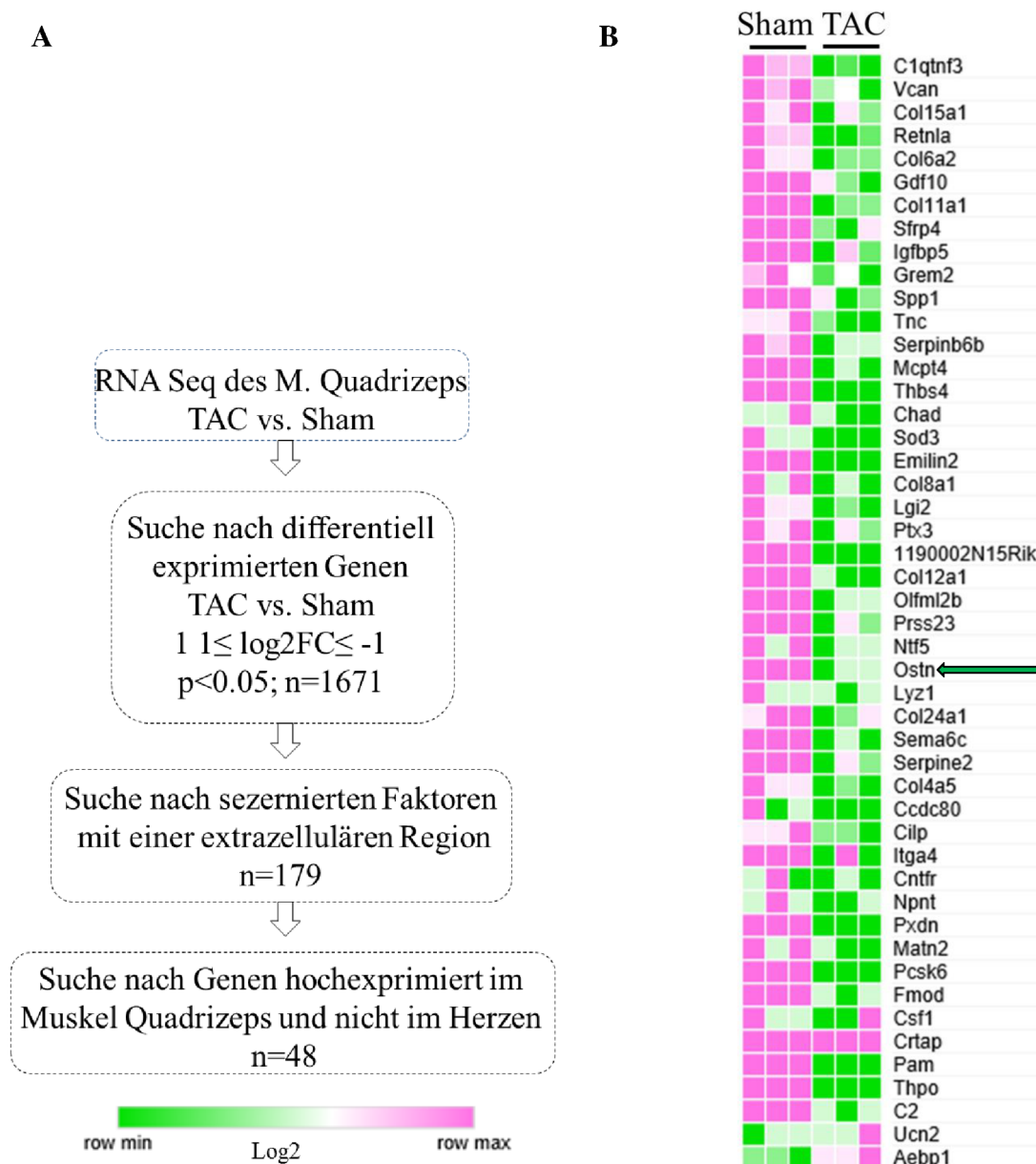


Abbildung 16 Visualisierung der RNA-Sequenzierungsanalyse der Genexpression des Muskel Quadrizeps nach chronischer Druckbelastung (TAC) und der Scheinoperation (Sham).

(A) Flussdiagramm des Experiments; (B) Die *Heatmap* zeigt die repräsentative Gruppe unterschiedlich regulierter Gene ($n = 48$) im M. Quadrizeps nach TAC im Vergleich zu Sham. Die Anzahl der sequenzierten Proben pro Gruppe beträgt $n = 3$.

Für weitere Analysen wurde das Gen Musclin (in der Literatur auch Osteocrin, Ostn genannt; NM_198112.2) ausgewählt, dessen Expression im Muskel Quadrizeps nach chronischer TAC um das 3,5-Fache herunterreguliert wurde (Sham Wert = 6,14632 vs. TAC Wert = 2,1638, Abbildung 16 B, grüner Pfeil). Da hier eine starke Dysregulation der endogenen Musclin-Expression im Skelettmuskel zwölf Wochen nach TAC im Vergleich zu Sham beobachtet wurde, wurde die Genexpression mittels qRT-PCR auch in anderen wichtigen Organen untersucht (Abbildung 17). Eine Musclin-Expression wurde weder im Herzen noch in Lunge, Niere, Fett und Leber detektiert. Die signifikante Verringerung der Musclin-Expression nach TAC konnte jedoch im M. Quadrizeps bestätigt werden.

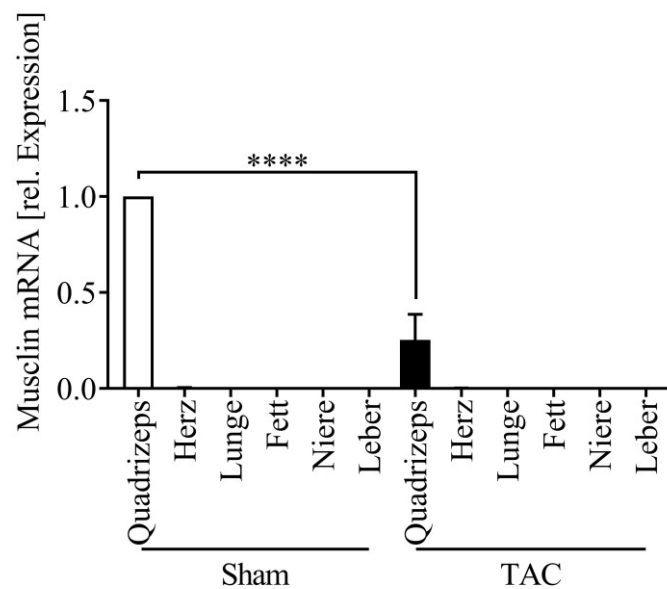


Abbildung 17 Analyse der Musclin mRNA-Expression in verschiedenen Organen.

Nach zwölfwöchiger chronischer Druckbelastung durch transversale Aortenkonstriktion (TAC) oder Scheinoperation (Sham) wurde die Analyse der Musclin-Expression in Mauserherzen, Lungen, Niere, Fett und Leber durchgeführt. Die Anzahl der Gewebeproben pro jeweilige Gruppe beträgt $n = 3$. **** $p < 0.0001$

Die Herunterregulierung der Musclin-Expression nach chronischer TAC im Muskel Quadrizeps konnte zusätzlich auf Ebene der Protein-Expression mittels Western Blot-Analyse bestätigt werden (Abbildung 18 A). Außerdem wurde die Expression des Musclin Proteins im M. Quadrizeps mittels Immunhistochemie untersucht (Abbildung 18 B). Bei den kachektischen Mäusen konnte eine deutlich verminderte Expression von Musclin im Vergleich zu den scheinoperierten Mäusen festgestellt werden.

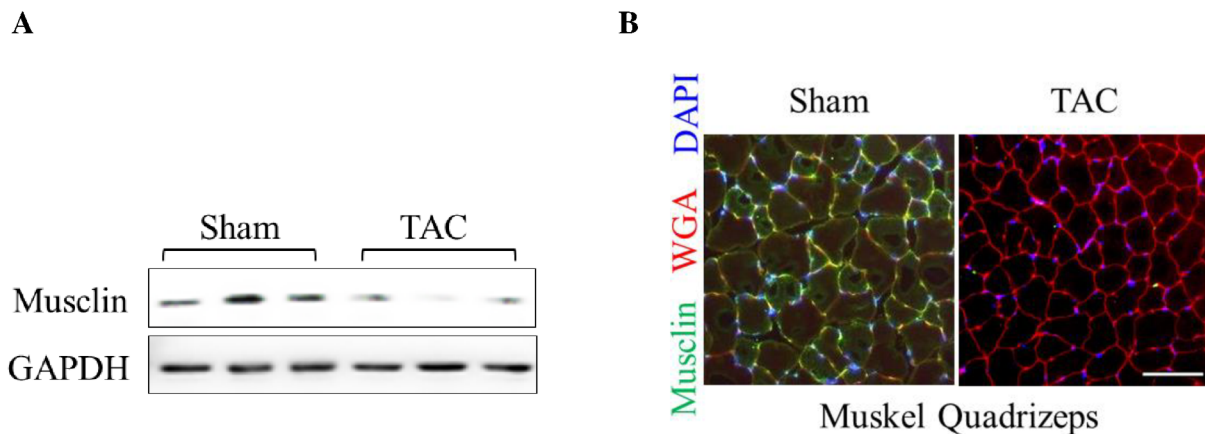


Abbildung 18 Analyse der Musclin Expression im Muskel Quadrizeps während der kardialen Kachexie.

12 Wochen nach TAC oder Sham-OP wurden die Analysen des Muskels Quadrizeps durchgeführt (A) Die Western Blot-Analyse zeigt die Proteinexpression von Musclin (15 kDa) und GAPDH (36 kDa) als Ladekontrolle. (B) Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Bilder der Immunhistochemie des Muskel Quadrizeps mit einem spezifischen Antikörper gegen Musclin (grün), WGA markiert die Zellmembran (rot), das Eindeckmedium enthielt DAPI für eine Zellkernfärbung (blau). Der Maßstabsbalken entspricht 100 μm .

Aufgrund dieser Beobachtung wurde eine absolute quantitative PCR Analyse des Musclin-mRNA-Spiegels in anderen atrophierten Skelettmuskeln wie im Muskel Gastrocnemius und Muskel Trizeps im Zeitverlauf nach TAC- vs. Sham-Operation nach zwei, sechs und zwölf Wochen durchgeführt (Abbildung 19). Die Ergebnisse zeigen, dass die mRNA-Expression von Musclin während des Fortschreitens der Krankheit kontinuierlich abnimmt. Im Endstadium der Herzinsuffizienz wurde die niedrigste Expression gemessen. Die Musclin-Expression nach Scheinoperation (Sham) steigt sogar mit der Zeit im Muskel Gastrocnemius (Abbildung 19 B), wobei diese im Muskel Quadrizeps konstant bleibt (Abbildung 19 A) und im Muskel Trizeps nach 12 Wochen stark abnimmt (Abbildung 19 C). Aufgrund dieser Ergebnisse wurde weiterhin der Fokus auf aus dem Muskel Quadrizeps sezerniertem Musclin gelegt.

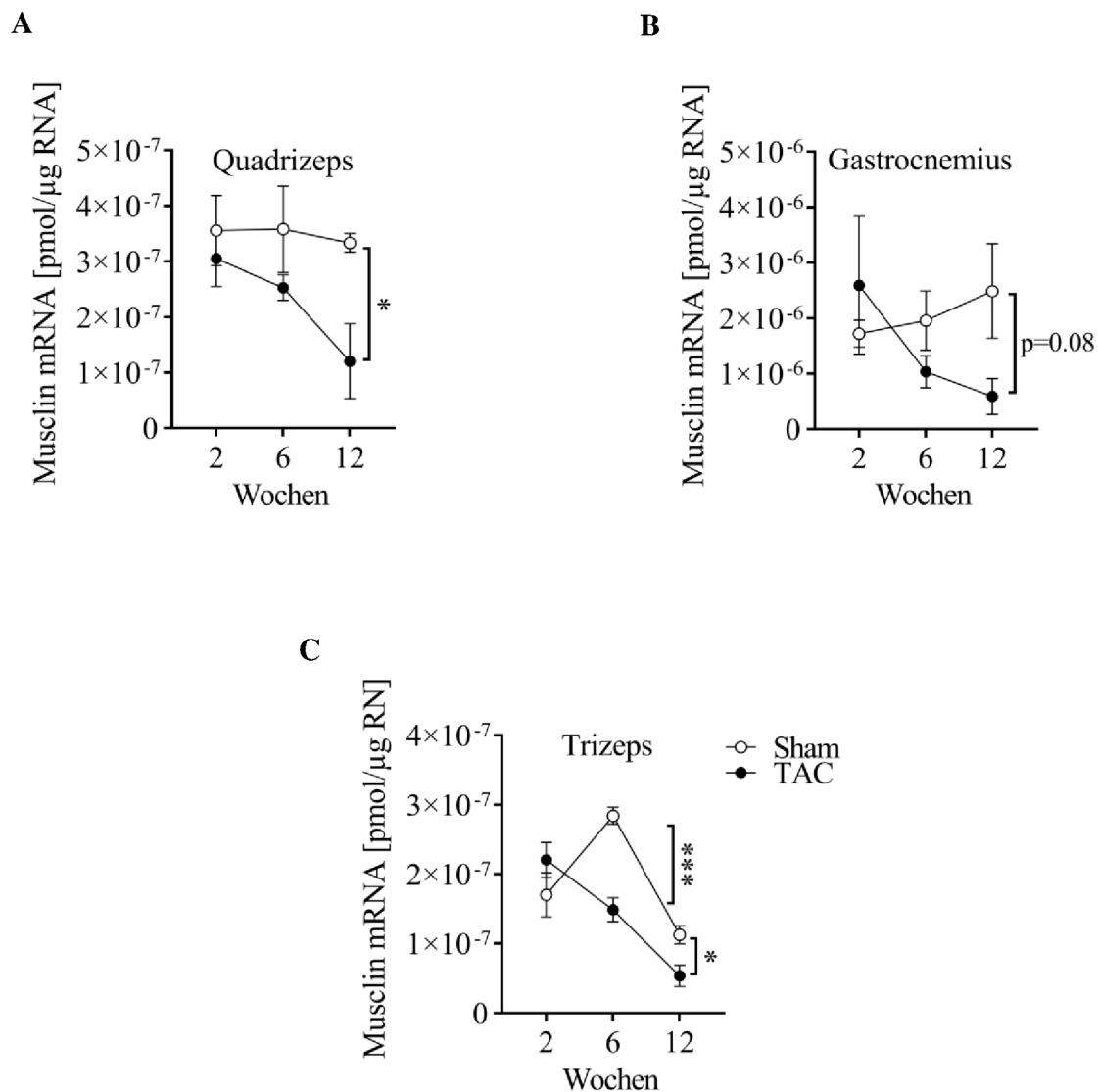


Abbildung 19 Zeitverlauf der Musclin-Expression in Skelettmuskeln während der Entwicklung der kardialen Kachexie.

(A) Analysen der Musclin mRNA-Expression mittels quantitativer PCR nach 2, 6 und 12 Wochen nach TAC im Vergleich zu Sham im Muskel Quadrizeps, (B) im Muskel Gastrocnemius und (C) im Muskel Trizeps. Die Anzahl der untersuchten Mäuse beträgt pro Gruppe $n = 4$. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$

4.2 Die skelettmuskelspezifische Überexpression von Musclin mittels AAV6 mindert die pathologische kardiale Fibrose und verbessert die Herzfunktion nach chronischer Druckbelastung

Da die endogene Musclin-Expression in den atrophierten Skelettmuskeln während einer kardialen Kachexie reduziert war, wurde die funktionelle Wirkung der Musclin-Überexpression im Skelettmuskel als ein möglicher therapeutischer Ansatz untersucht. Dafür wurden C57BL/6 Mäuse einer TAC oder Sham-Operation unterzogen. Zwei Tage nach der Operation wurde den Mäusen in den rechten Muskel Quadrizeps adeno-assoziierte Viren (AAV6-Musclin), welche zu einer Musclin-Überexpression im Skelettmuskel führen, injiziert. Als Kontrolle diente AAV6-Control, das zu einer unspezifischen Luciferase-Expression führte. Im Zeitintervall von drei Wochen wurden die Mäuse einer echokardiographischen Untersuchung unterzogen (Abbildung 20). Das Experiment wurde neun Wochen nach dem operativen Eingriff beendet. Anschließend wurden die Mausorgane molekularbiologisch und histologisch untersucht.

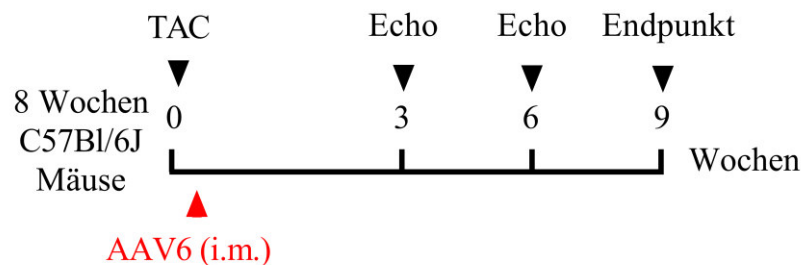


Abbildung 20 Experimenteller Zeitverlauf der skelettmuskelspezifischen Musclin-Überexpression mittels adeno-assoziierten Viren des Subtyps 6 (AAV6).

Adulte (8 Wochen alte) C57Bl/6J männliche Mäuse wurden für 9 Wochen einer chronischen Druckbelastung durch transversaler Aortenkonstriktion (TAC) unter Verwendung einer 27 Gauge Nadel ausgesetzt oder einer Scheinoperation (Sham) unterzogen. Zwei Tage nach dem operativen Angriff wurde den Mäusen in den rechten Muskel Quadrizeps AAV6 intramuskulär injiziert. In einem Zeitintervall von 3 Wochen wurde die Herzfunktion der Mäuse untersucht und am Ende des Experiments wurden die entnommenen Mausorgane den molekularbiologischen und histologischen Verfahren unterzogen.

Genexpression-Analysen im Muskel Quadrizeps und im Herzen zeigten, dass die Überexpression von Musclin mittels AAV6 robust war und spezifisch im Muskel Quadrizeps, aber nicht im Herzen aufgetreten ist (Abbildung 21 A). Die Western Blot-Analysen bestätigten dies.

Aufgrund der unterschiedlichen Expression der Ladekontrolle GAPDH, die im Skelettmuskel viel höher exprimiert war als im Herzgewebe, wurden zusätzlich weitere *House Keeping*-Gene wie Aktin und α Tubulin untersucht (Abbildung 21 B). Auch der Musclin-Proteinspiegel im Plasma von AAV6-Musclin im Vergleich zu Kontrollmäusen (AAV6-Control) war signifikant erhöht (Abbildung 21 C), was eine effektive Musclin-Überexpression und Sezernierung in den Blutkreislauf bestätigt.

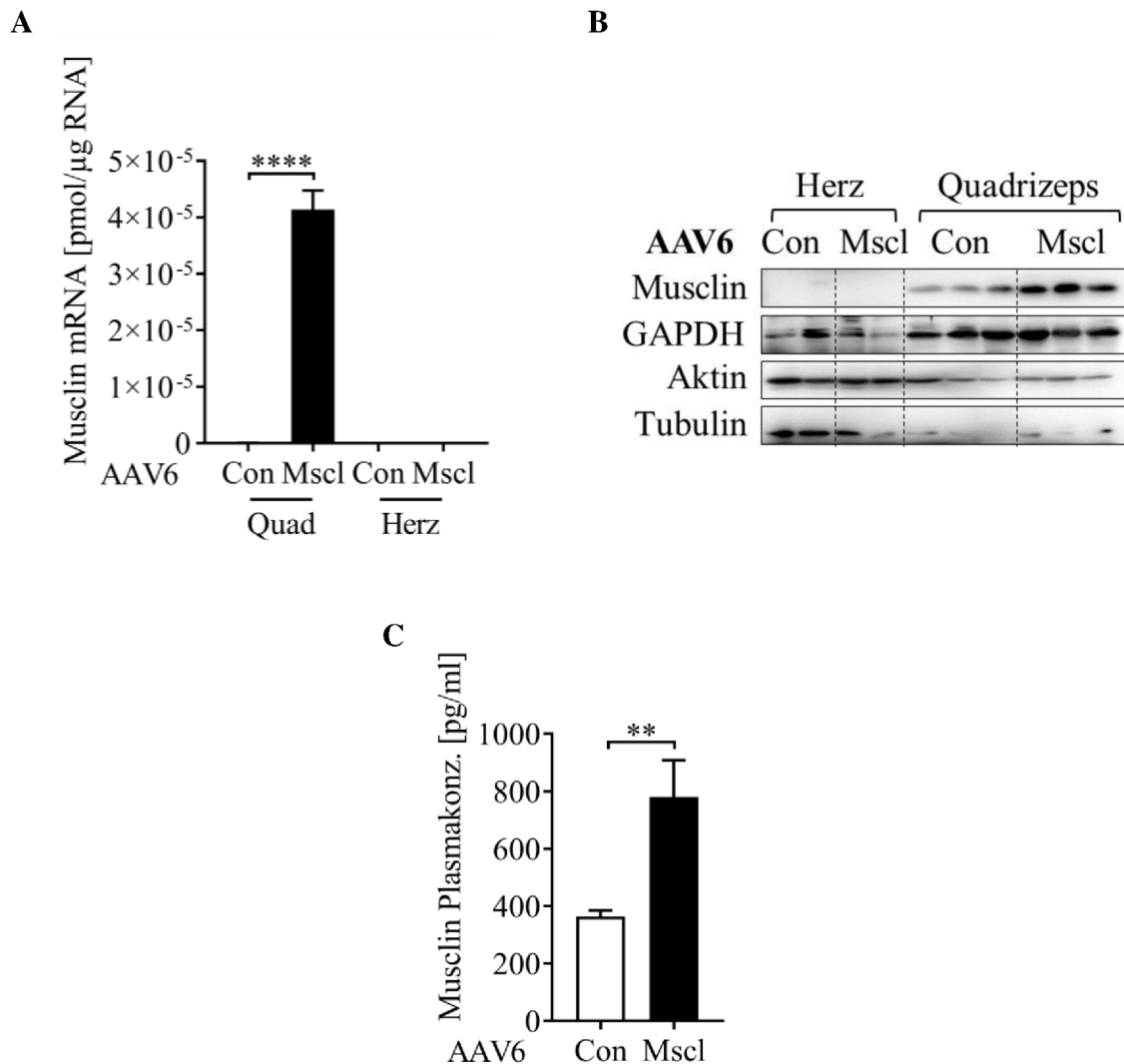


Abbildung 21 Analysen der skelettmuskelspezifischen Musclin-Überexpression.

Nach neunwöchiger transversaler Aortenkonstriktion (TAC) und Scheinoperation (Sham) wurde die Musclin-Expression untersucht. (A) Absolute quantitative PCR-Analyse der Musclin mRNA-Expression im Muskel Quadrizeps (Quad) und im Herzen; n = 12. (B) Die Western Blot-Analysen der Expression von Musclin (15 kDa), GAPDH (36 kDa), Aktin (42 kDa) und α Tubulin (57 kDa) im Herzen und im Muskel Quadrizeps. (C) Bestimmung der Plasmakonzentration von Musclin mittels ELISA-Analyse in scheinerierten Mäusen. Die Anzahl der untersuchten Proben beträgt pro Gruppe n = 21-22. ** p < 0.01; **** p < 0.0001

Nach Aortenkonstriktion entwickelten beide Gruppen eine ähnlich schwere kardiale Hypertrophie gemessen im Herzgewicht zu Tibialänge-Verhältnis (HW/TL) (Abbildung 22 A). Auch ein erhöhtes Verhältnis des Lungengewichts zur Tibialänge (LW/TL) deutete auf ein kardiales Lungenödem hin, das in einem fortgeschrittenen Stadium der Hypertrophie entstehen kann (Abbildung 22 B). Die Musclin-überexprimierenden Mäuse zeigten nach TAC eine Tendenz hingehend einer geringeren Hypertrophieantwort mit weniger Lungenstauung auf. Es konnten aber keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Versuchsgruppen (AAV6-Musclin vs. AAV6-Control) nach TAC festgestellt werden.

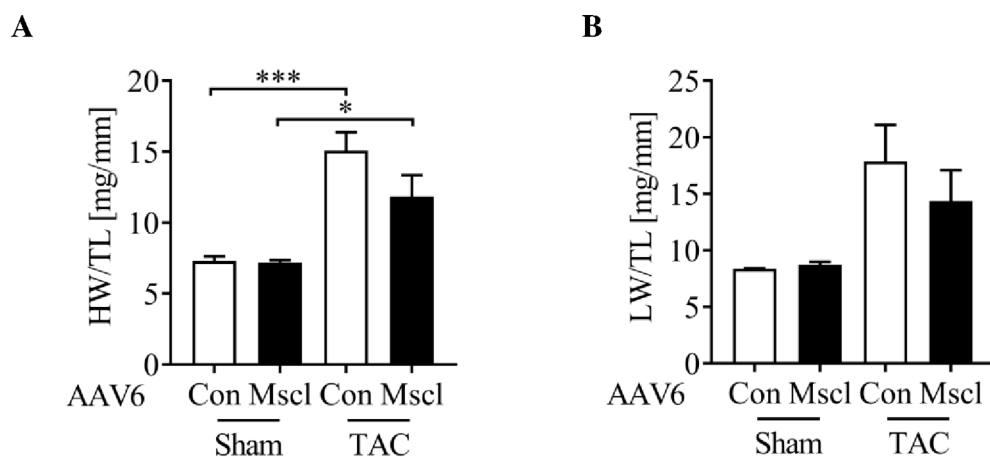


Abbildung 22 Auswirkungen der skelettmuskelspezifischen Musclin-Überexpression auf Entwicklung der Hypertrophie und des Lungenödems nach chronischer Druckbelastung (TAC) vs. Scheinoperation (Sham).

(A) Quantifizierung des Herzgewichts/Tibialänge-Verhältnisses (HW/TL) und (B) des Lungengewichts/Tibialänge-Verhältnisses (LW/TL). Die Anzahl der untersuchten Mäuse beträgt in der Sham-Gruppe $n = 5$ und in der TAC-Gruppe $n = 6-7$. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$

Da in der kardialen Hypertrophie eine Änderung der Genexpression erfolgt, wurden die Auswirkungen der Überexpression von Musclin auf die Expression sog. embryonaler Gene im Herzen untersucht (Abbildung 23). Es konnte eine signifikante Abnahme in der mRNA-Expression des α MHC- und des SERCA2a-Gens (Abbildung 23 A und B) in beiden Mausgruppen nach Aortenkonstriktion (TAC) festgestellt werden. Eine Zunahme an β MHC- und

Acta1- mRNA-Expression (Abbildung 23 C und D) bestätigt die Entwicklung einer kardialen Hypertrophie bei den Tieren nach Druckbelastung.

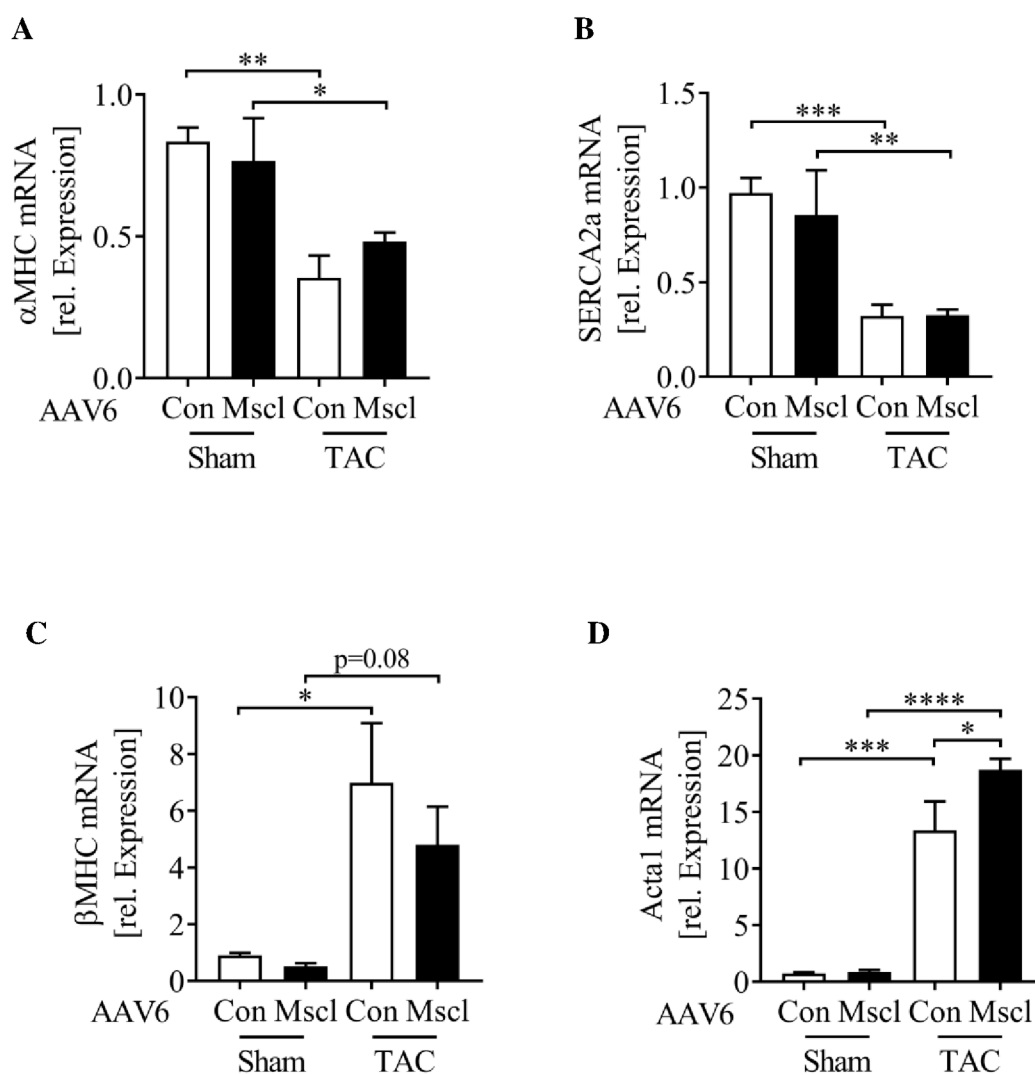
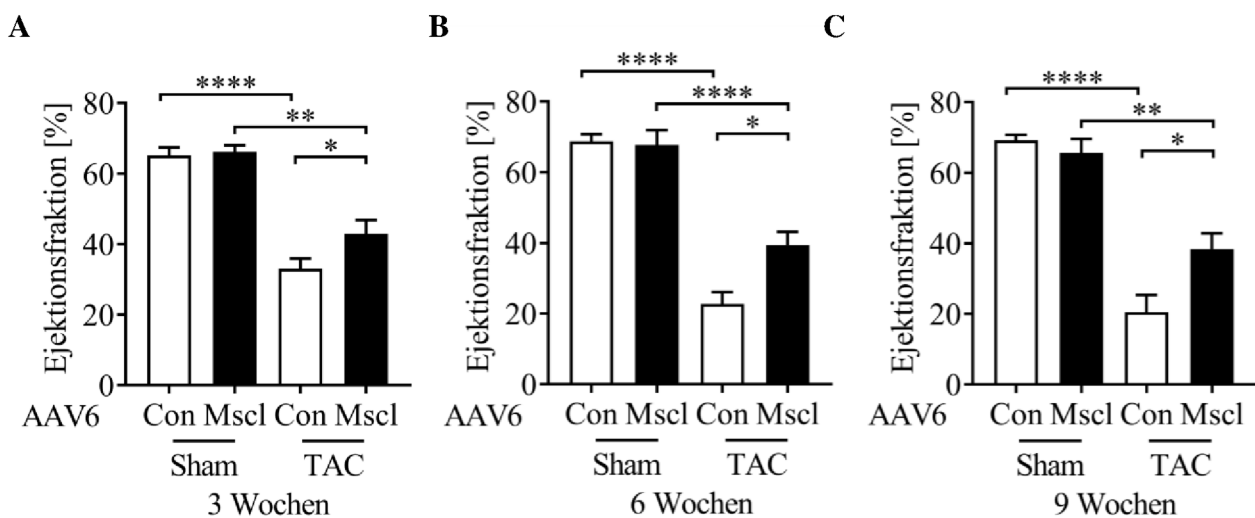


Abbildung 23 Quantitative Analyse der Expression embryonaler Gene.

Analysen der mRNA-Expression von (A) α MHC, (B) SERCA2a, (C) β MHC und (D) Acta1 im Herzgewebe von AAV6 Musclin und AAV6 Control Mäusen nach der chronischen Druckbelastung (TAC) und der Scheinoperation (Sham). Die Anzahl der untersuchten Proben beträgt in der Sham-Gruppe $n = 4-5$ und in der TAC-Gruppe $n = 7-8$. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$

Um die Herzfunktion nach Druckbelastung zu beurteilen, wurden echokardiographische Analysen sowie Herzkatheteruntersuchungen als auch nicht-invasive Blutdruckmessungen durchgeführt. Die echokardiographischen Untersuchungen zeigten eine deutliche Verringerung der Ejektionsfraktion bei allen Kontrollmäusen drei, sechs und neun Wochen nach TAC (Anhang,

Tabelle 43). Bei den mit AAV6-Musclin injizierten Tieren, zeigte sich eine deutliche Verbesserung der Herzfunktion zu allen drei Zeitpunkten (Abbildung 24 A bis C). Blutdruckmessungen mittels Herzkatheter zeigten, dass das Maximum der Druckanstiegsgeschwindigkeit (dp/dt_{max}) als Maß der systolischen Kontraktilität im linken Ventrikel in den Kontrollmäusen um 25 % nach TAC reduziert war. Bei den AAV6-Musclin Mäusen zeigte sich ein Anstieg um 20 %, welcher nach TAC-Operation unverändert blieb (Abbildung 24 D). Zeitgleich zeigten die AAV-Musclin Mäuse im Vergleich zu den AAV6-Control Mäusen eine verbesserte diastolische Relaxation des linken Ventrikels (dp/dt_{min}) nach TAC (Abbildung 24 E). Dies deutet auf eine verbesserte linksventrikuläre Herzfunktion nach skelettmuskelspezifischer Überexpression von Musclin hin. Die nicht-invasive Blutdruckmessung an wachen Mäusen zeigte insbesondere einen leicht erniedrigten systolischen Blutdruck in den mit AAV6-Musclin behandelten Tieren nach TAC, während der diastolische Blutdruck unverändert blieb (Abbildung 24 F und G).



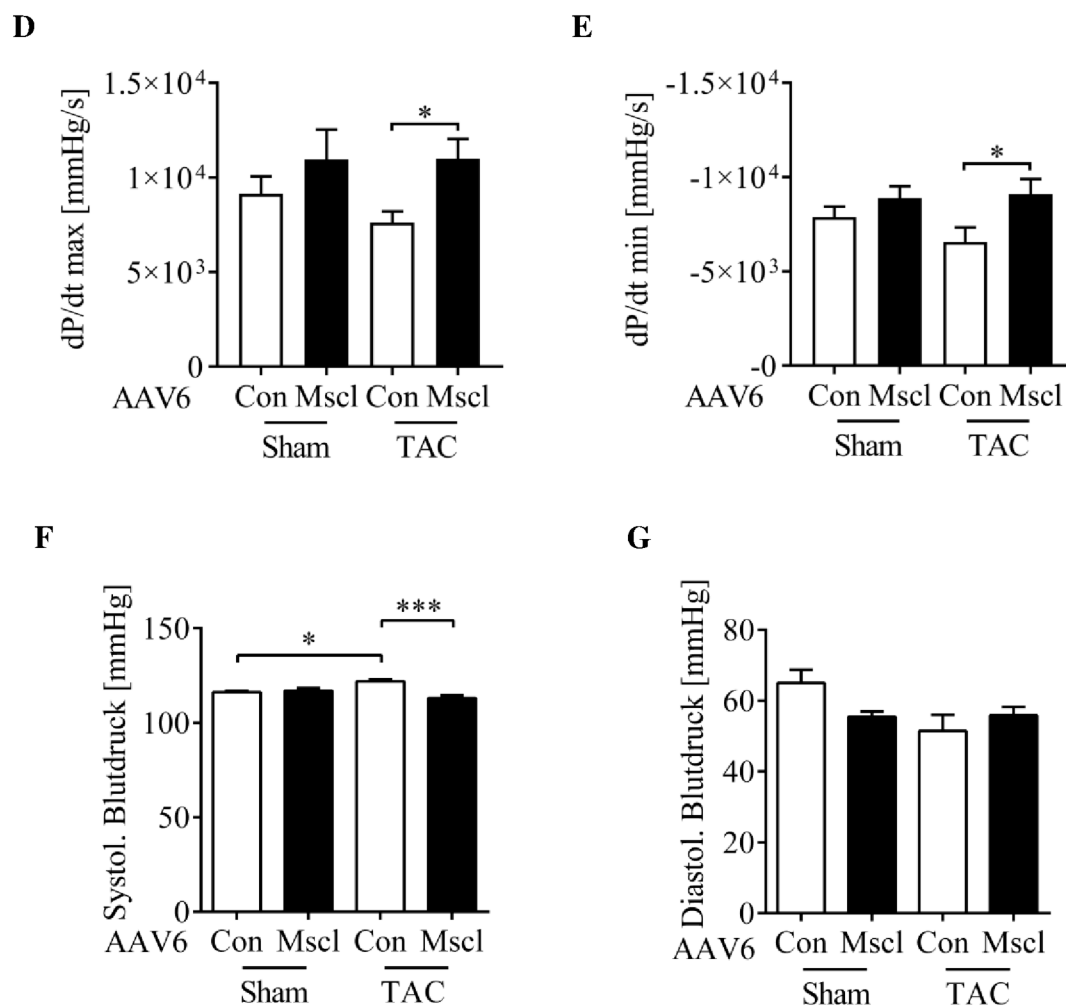


Abbildung 24 Analyse der Herzfunktion nach chronischer Druckbelastung durch transversale Aortenkonstriktion und skelettmuskelspezifischer Musclin-Überexpression.

Bestimmung der Ejektionsfraktion 3 Wochen (A), 6 Wochen (B) und 9 Wochen (C) nach TAC oder Sham-OP. (D) Analyse des Maximums der Druckanstiegsgeschwindigkeit (dP/dt_{max}) und (E) des Minimums der Druckanstiegsgeschwindigkeit (dP/dt_{min}). Bestimmung des systolischen (F) und des diastolischen (G) Blutdrucks 9 Wochen nach TAC vs. Sham. Die Anzahl der untersuchten Mäuse beträgt in der Sham-Gruppe $n = 5$ und in der TAC-Gruppe $n = 6-9$. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$

Histologische Untersuchungen zeigten, dass die Kardiomyozytengröße und die Herzkapillardichte in beiden Gruppen (AAV6-Musclin und AAV6-Control) nach TAC ähnlich erhöht waren (Abbildung 25).

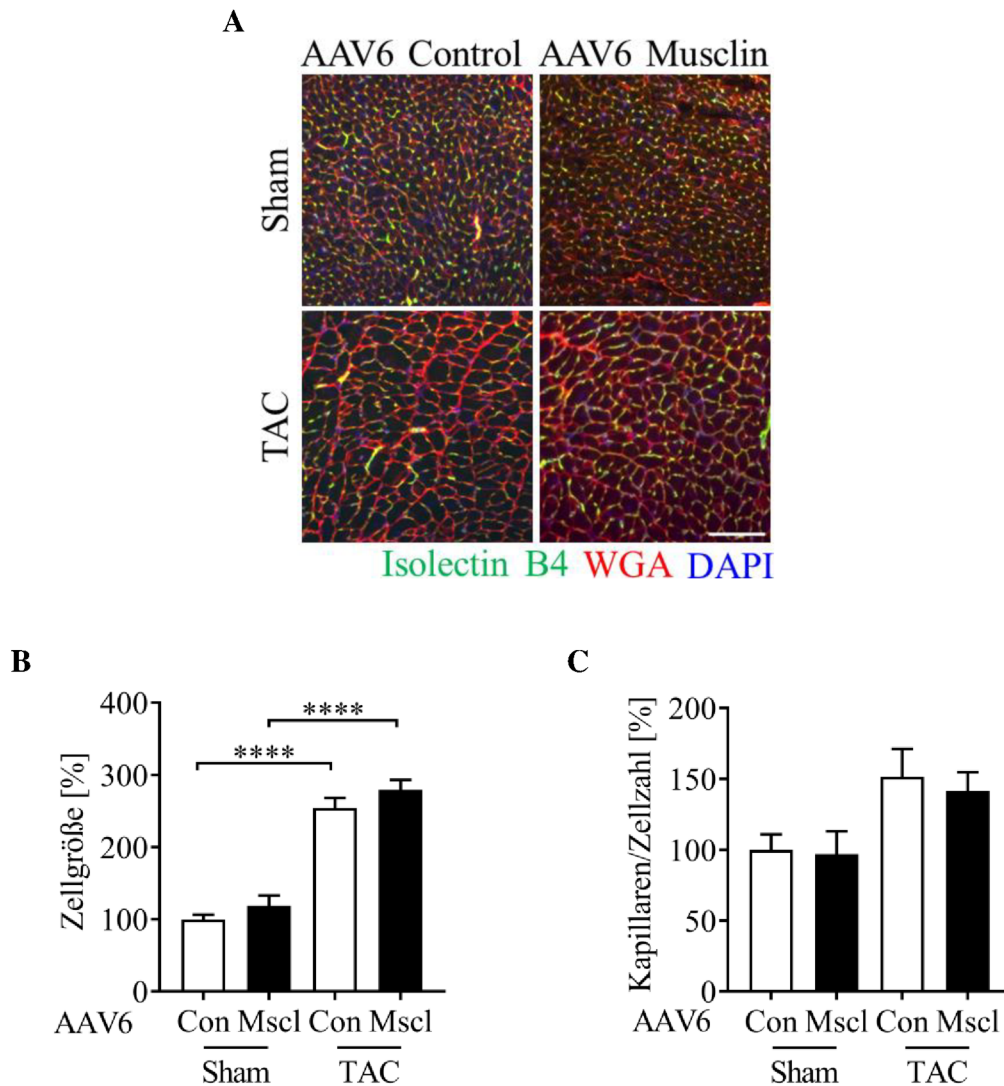


Abbildung 25 Analyse der Hypertrophie auf zellulärer Ebene während skelettmuskelspezifischer Musclin-Überexpression.

(A) Repräsentative Mikroskopbilder von Herzgewebeschnitten nach chronischer kardialer Druckbelastung (TAC) vs. Scheinoperation (Sham). Das Isolectin B4 (grün) stellt die Kapillaren dar, das Weizenkeimagglutinin (WGA) markiert die Zellmembran (rot), das Eindeckmedium enthielt DAPI für eine Zellkernfärbung (blau). Der Maßstabsbalken entspricht 100 μ m. (B) Quantifizierung der Kardiomyozytengröße und (C) der Kapillardichte. Die Anzahl der Proben beträgt in der Sham-Gruppe n = 5 und in der TAC-Gruppe n = 10. **** p < 0.0001

Im Rahmen der kardialen Hypertrophie kam es zu einer gesteigerten Bindegewebsbildung des linken Ventrikels, der sog. Fibrose, welche zur Gewebeersteifung durch Narbenbildung und dadurch zu Herzfunktionsstörungen führte. Histologische Untersuchungen einer Sirius-Rot-Färbung von Herzgewebeschnitten zeigten (Abbildung 26 A), dass die Überexpression von Musclin im Vergleich zu mit AAV6-Control behandelten Mäusen zu einer deutlichen Reduk-

tion der Myokardfibrose führt. Die Größe der fibrotischen Areale war signifikant reduziert (Abbildung 26 B).

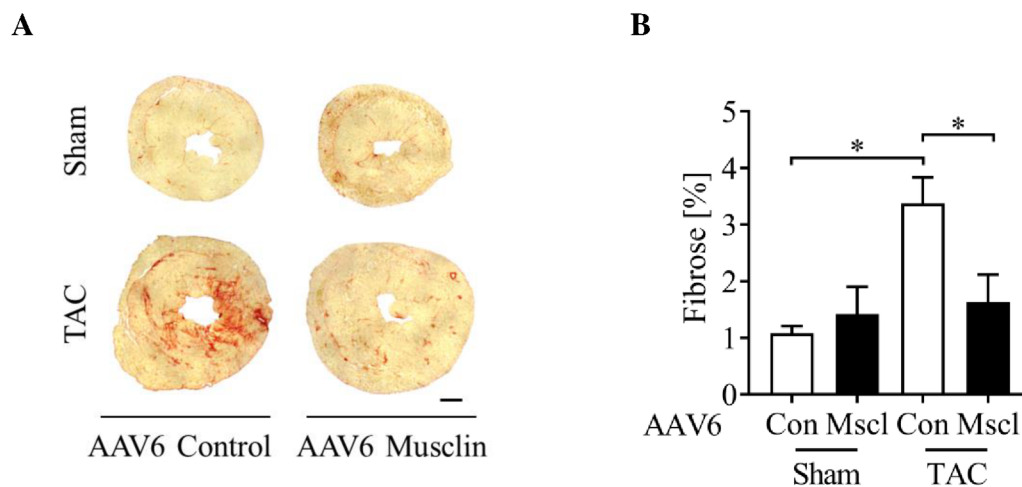


Abbildung 26 Sirius-Rot-Färbung der Herzgewebequerschnitte der AAV6-Musclin und AAV6-Control Mäuse.

(A) Querschnitte der Herzen von den skelettmuskelspezifischen Musclin-Überexpression Mäusen (AAV6-Musclin) und deren Kontrollen (AAV6-Control) 9 Wochen nach TAC und Sham-OP wurden mit Sirius-Rot gefärbt. Die fibrotischen Areale erscheinen in rot. Der Maßstabsbalken entspricht 500 μ m. (B) Quantitative Auswertung der Fibrose in denselben Bedingungen wie in (A). Die Anzahl der untersuchten Mäuse beträgt in der Sham-Gruppe n = 5 und in der TAC-Gruppe n = 8. * p < 0.05

Um zu testen, ob die Musclin-vermittelten positiven Effekte auf die Herzfunktion auch auf eine verbesserte Kardiomyozytenfunktion zurückzuführen sind, wurde die Kontraktilität von isolierten adulten Kardiomyozyten aus AAV6-Musclin und AAV6-Control Mäusen nach TAC mittels der IonOptix-Methode gemessen (Abbildung 27). In der Tat zeigten adulte Kardiomyozyten, die aus Mäusen mit skelettmuskelspezifischer Musclin-Überexpression isoliert worden waren, eine Verbesserung der basalen Kontraktilität der Kardiomyozyten um 25 % (Abbildung 27 A). Nach β -adrenerger Stimulation mit Isoprenalin konnte eine erhöhte inotrope Reaktion beobachtet werden, die als eine Linksverschiebung der Konzentrations-Antwort-Kurve dargestellt wurde (Abbildung 27 B). Mit einer Zunahme der Isoprenalin-Konzentration konnte auch eine Erhöhung der Kardiomyozytenkontraktilität detektiert werden (Abbildung 27 C-D).

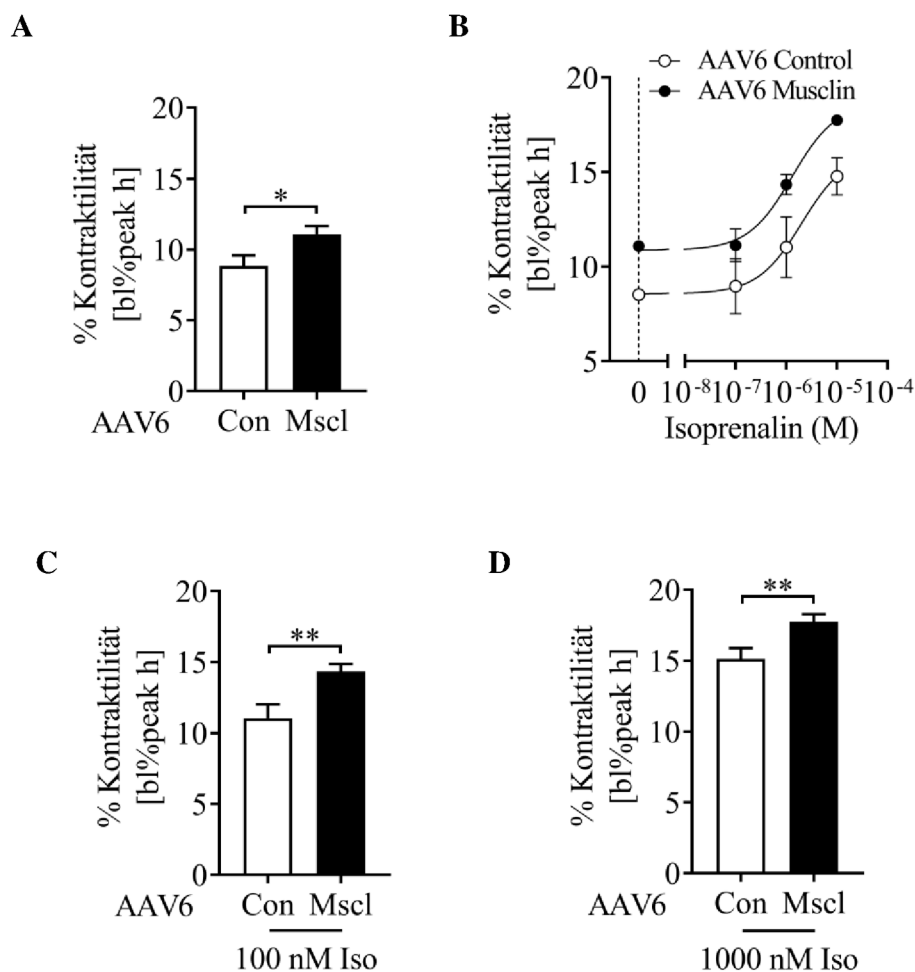


Abbildung 27 Kontraktilitätsmessung an isolierten adulten Kardiomyozyten nach AAV6-vermittelter Überexpression von Musclin und chronischer Druckbelastung von 9 Wochen.

Die Kontraktilität wurde als Basis der Peak-Höhe der prozentualen Veränderung der Sarkomerlänge in Prozent dargestellt (bl/%peak h) (A) Basale Quantifizierung der Kardiomyozytenkontraktilität. (B) Konzentration-Antwort-Kurve der Kontraktilitätsfähigkeit der Kardiomyozyten auf die β -adrenerge Stimulation mit Isoprenalin und eine Quantifizierung der Kardiomyozytenkontraktilität nach Stimulation mit (C) 100 nM und (D) 1000 nM Isoprenalin. Die Anzahl der gemessenen Zellen beträgt pro Gruppe $n = 30$. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

Da in der Literatur beschrieben wurde, dass Musclin die Konzentration der natriuretischen Peptide erhöht (Miyazaki *et al.* 2018), wurde sowohl deren Expressionsniveaus als auch die Expression ihrer Rezeptoren bestimmt (Abbildung 28). Die Analyse der Expression embryonaler Gene zeigte, dass die mRNA-Spiegel der Hypertrophie Marker ANP und BNP nach TAC (Abbildung 28 A und B) signifikant erhöht waren, sich aber nicht zwischen AAV6-Control und AAV6-Musclin unterschieden. Die mRNA-Expression von CNP sowie die von

den Rezeptoren der natriuretischen Peptide NPR-A, NPR-B und NPR-C waren zwischen den Gruppen nicht signifikant verändert (Abbildung 28 C-F).

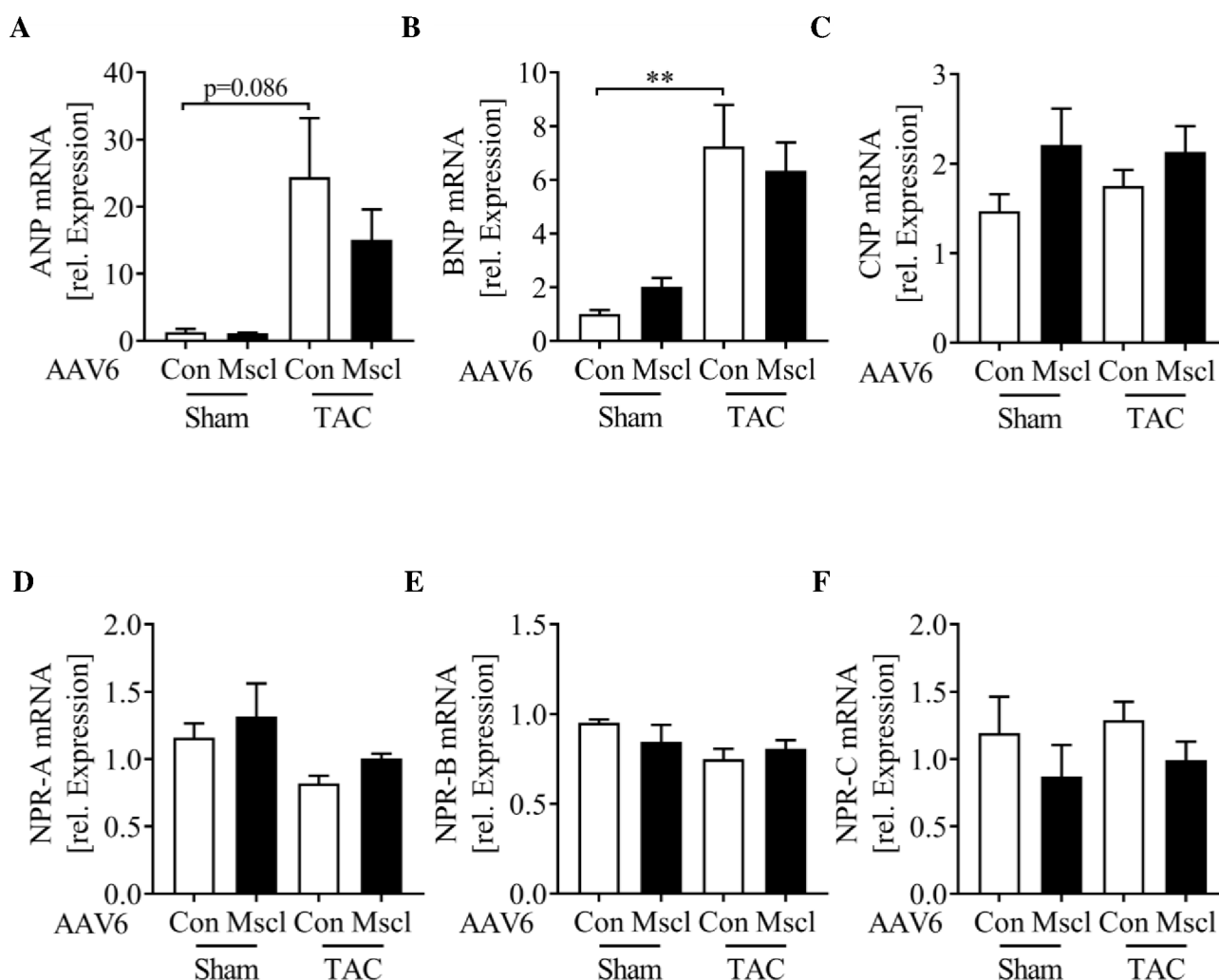


Abbildung 28 Analyse der Genexpression der natriuretischen Peptide und deren Rezeptoren im Herzen nach AAV6-vermittelter Überexpression von Musclin und chronischer Druckbelastung von 9 Wochen.

Quantitative PCR-Analyse der mRNA-Expression (A) des atrialen natriuretischen Peptids (ANP), (B) des brain natriuretischen Peptids (BNP), (C) des C-Type natriuretischen Peptids (CNP) und deren Rezeptoren NPR-A, -B und -C (D-F) 9 Wochen nach TAC vs. Sham-OP. Die Anzahl der untersuchten Mäuse beträgt in der Sham-Gruppe n = 4-6 und in der TAC-Gruppe n = 6-8. ** p < 0.01

Im Einklang mit einem verringerten Abbau von natriuretischen Peptiden als Reaktion auf eine Überexpression von Musclin wurde der Plasmaspiegel von ANP in mit AAV6-Musclin behandelten Mäusen mittels ANP-ELISA gemessen. Tendenziell war erkennbar, dass die ANP

Konzentration nach skelettmuskelspezifischer Musclin-Überexpression im Vergleich zur Kontrolle gestiegen ist (Abbildung 29 A). Diese Eigenschaften von Musclin, die auf einer Hemmung des Abbaus von NPs hindeuten, wurden zusätzlich mittels Western Blot-Analyse untersucht. Durch eine skelettmuskelspezifische Überexpression von Musclin (AAV6-Musclin) konnte ein deutlich erhöhter CNP-Spiegel im Myokard nachgewiesen werden (Abbildung 29 B).

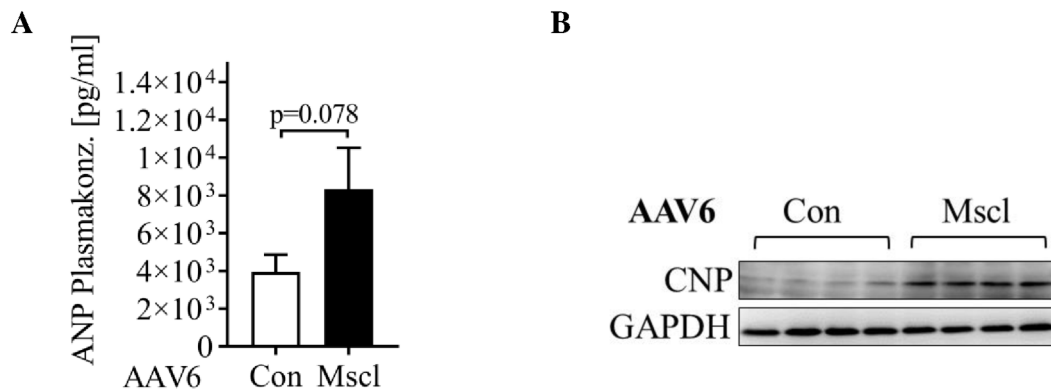


Abbildung 29 Analyse der Konzentration der natriuretischen Peptide nach der skelettmuskelspezifischen Musclin-Überexpression in scheineroperierten Mäusen.

(A) Bestimmung der Plasmakonzentration des atrialen natriuretischen Peptids (ANP) mittels ELISA-Analyse, n = 13. (B) Die Western Blot-Analyse der Expression des C-Typ natriuretischen Peptids (CNP) (72 kDa) und der Ladekontrolle GAPDH (36 kDa) im Herzgewebe der AAV6-Control und der AAV6-Musclin Mäuse.

Zusammenfassend verbesserte die skelettmuskelspezifische Überexpression von Musclin deutlich die Herzfunktion und somit die Kontraktionsfähigkeit der Kardiomyozyten und reduzierte die Fibrose.

4.3 Die skelettmuskelspezifische Deletion von Musclin nach kurzfristiger TAC fördert die linksventrikuläre Dysfunktion und Fibrose

Um zu testen, ob ein Mangel von Musclin im Skelettmuskel ausreichend ist, die linksventrikuläre Herzdysfunktion während einer chronischer Druckbelastung in Mäusen zu verstärken,

wurden Mäuse mit einer skelettmuskelspezifischen induzierbaren Deletion von Musclin unter Verwendung des Cre/LoxP-Systems erzeugt. Die $Ostn^{fl/fl(HSA/TRE-Cre)}$ (Musclin KO) Mäuse ermöglichten gezielt eine zeitlich selektive Ausschaltung von Musclin im Skelettmuskel nach Behandlung mit Doxycyclin (Rao and Monks 2009). Als Kontrolle dienten $Ostn^{fl/fl}$ Mäuse (Musclin WT) derselben Zuchtlinie und desselben Alters. Um die funktionelle Bedeutung des reduzierten Musclin-Spiegels bei der Entwicklung einer pathologischen Belastung zu analysieren, wurden die Musclin WT und Musclin KO Mäuse eine Woche lang mit Doxycyclin im Trinkwasser behandelt und anschließend 2 Wochen lang einer Druckbelastung durch Aortenkonstriktion (TAC) ausgesetzt (Abbildung 30).

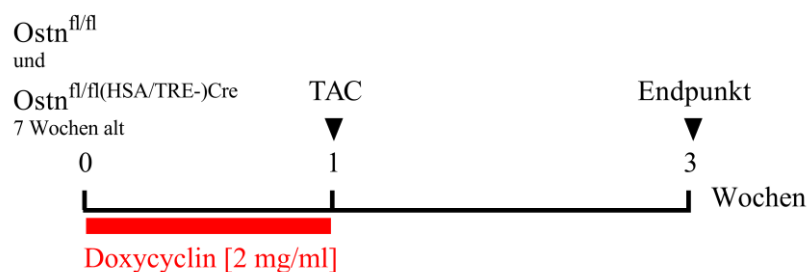


Abbildung 30 Experimenteller Zeitverlauf.

Sieben Wochen alte $Ostn^{fl/fl}$ (Musclin WT) und $Ostn^{fl/fl(HSA/TRE-Cre)}$ (Musclin KO) Mäuse wurden für eine Woche mit Doxycyclin [2 mg/ml] im Trinkwasser behandelt. Danach wurden die Mäuse für zwei Wochen einer transversalen Aortenkonstriktion (TAC) unter Verwendung einer 26 Gauge Nadel ausgesetzt oder einer Scheinoperation (Sham) unterzogen. Am Ende des Versuches wurden die Mausorgane molekularbiologisch und histologisch untersucht.

Zuerst wurde die Wirkung der Doxycyclin-Behandlung auf eine Musclin-Deletion mittels absoluter Quantifizierung der Musclin-Expression überprüft. Auf mRNA-Ebene wiesen die *knock-out* Musclin Mäuse (KO) eine deutliche Herabregulation der Musclin-Expression bis zu 95 % im Vergleich zu Musclin Wildtyp Mäusen (WT) auf (Abbildung 31 A), was auf Proteinebene durch Western Blot-Analyse und Immunfärbung des M. Quadrizeps bestätigt werden konnte (Abbildung 31 B und C). Da Musclin sezerniert wird, wurde der Plasmaspiegel in Musclin KO und WT der scheinoperierten Mäusen mittels Musclin-ELISA analysiert (Abbildung 31 D). Das Defizit des Musclin Proteins wurde durch den signifikant reduzierten Musclin-Plasmaspiegel in Musclin KO Mäusen im Vergleich zu den Wildtyp Mäusen nachgewiesen.

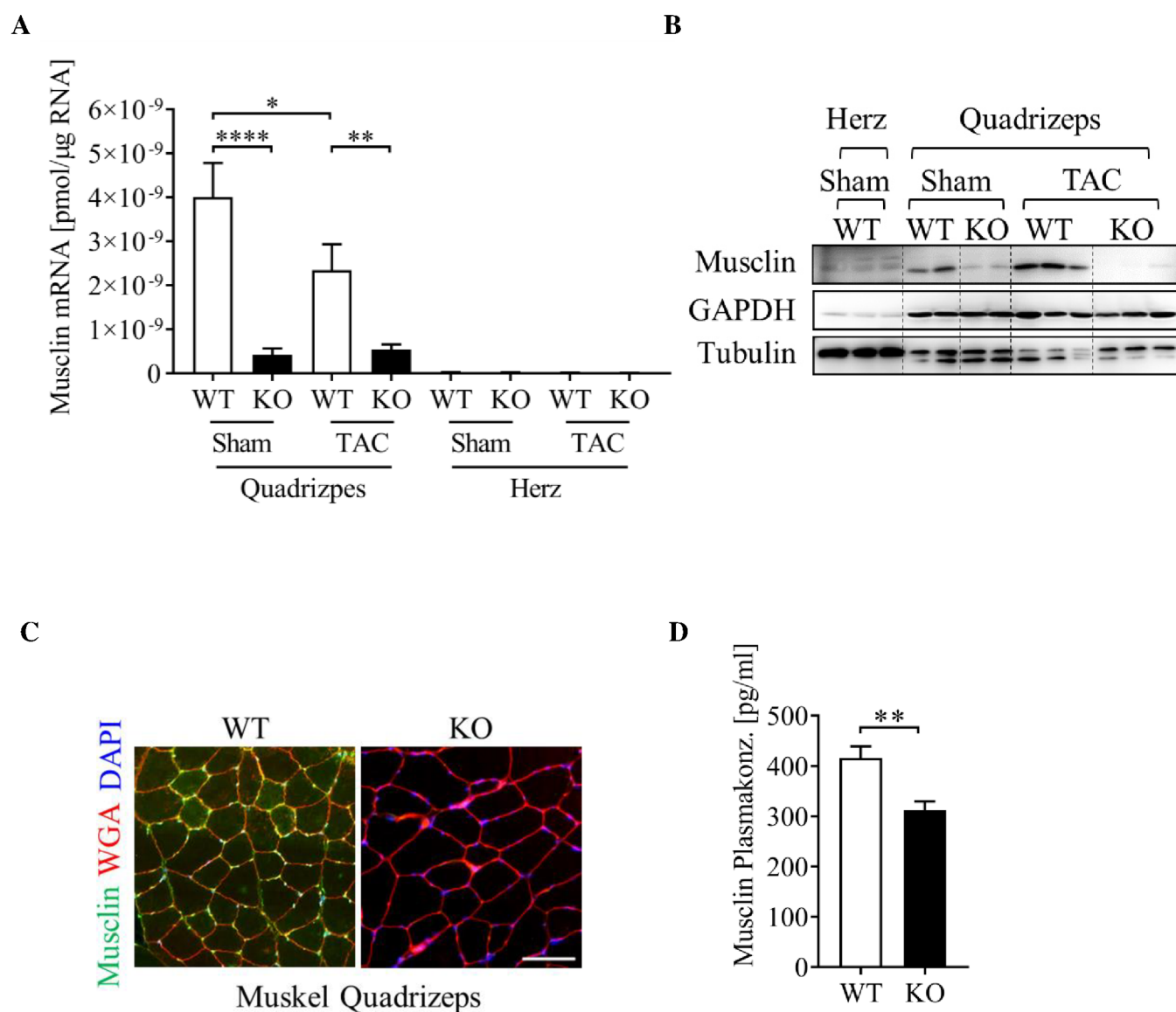


Abbildung 31 Analysen der Musclin-Expression nach Behandlung mit Doxycyclin.

(A) Absolute quantitative PCR-Analyse der Musclin mRNA-Expression nach transversaler Aortenkonstriktion (TAC) und Scheinoperation (Sham) im Muskel Quadrizeps und im Herzgewebe der Musclin KO und WT Mäuse. Die Anzahl der untersuchten Proben beträgt in der Sham-Gruppe $n=8$ und in der TAC-Gruppe $n=12$. (B) Western Blot-Analyse der Musclin-Expression (15 kDa) im Herzgewebe und im Muskel Quadrizeps der Musclin KO und WT Mäuse nach TAC vs. Sham-OP. Aufgrund unterschiedlicher Expression von Ladekontrollen im Herzen und im Skelettmuskel wurde sowohl GAPDH (36 kDa) als auch α Tubulin (57 kDa) dargestellt. (C) Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Bilder der Immunhistochemie des Muskel Quadrizeps mit einem spezifischen Antikörper gegen Musclin (grün), das Weizenkeimagglutinin (WGA) markierte die Zellmembran (rot), das Eindeckmedium enthielt DAPI für eine Zellkernfärbung (blau). Der Maßstabsbalken entspricht 100 μ m. (D) Die Bestimmung der Musclin-Plasmakonzentration mittels ELISA-Analyse in den scheinierten Mäusen. Die Anzahl der untersuchten Mäuse beträgt bei Musclin WT $n=21$ und bei Musclin KO $n=16$. * $p<0.05$; ** $p<0.01$; **** $p<0.0001$

Um den Grad der Hypertrophie zu bestimmen, wurde zunächst das Herzgewicht/Tibiallänge-Verhältnis (HW/TL) berechnet (Abbildung 32 A). Musclin KO und WT Mäuse entwickelten ein ähnliches Ausmaß der Hypertrophie. Das erhöhte Verhältnis von Lungengewicht/Tibiallänge (LW/TL) deutet auf ein kardiales Lungenödem hin (Abbildung 32 B). Es wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen Musclin KO und Musclin WT nach TAC festgestellt.

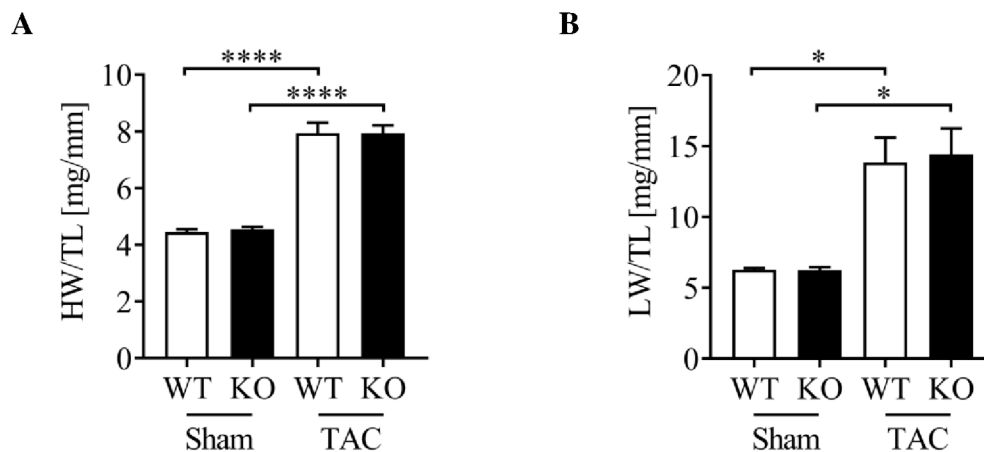


Abbildung 32 Auswirkungen der skelettmuskelspezifischen Deletion von Musclin auf die Entwicklung der Hypertrophie und des Lungenödems nach zweiwöchiger Druckbelastung (TAC) oder Scheinoperation (Sham).

(A) Quantifizierung des Herzgewicht/Tibiallänge-Verhältnisses (HW/TL) und (B) des Lungengewicht/Tibiallänge-Verhältnisses (LW/TL). Die Anzahl der untersuchten Mäuse beträgt in der Sham-Gruppe $n = 6$ und in der TAC-Gruppe $n = 14-18$. * $p < 0.05$; **** $p < 0.0001$

Bei einer kardialen Hypertrophie kommt es zu einer Änderung der Genregulation und der Genexpression. Aus diesem Grund wurden auch hier die Auswirkungen der Deletion von Musclin auf das Expressionsmuster embryonaler Gene im Herzen untersucht (Abbildung 33 A-D). Es konnte eine signifikante Abnahme in der mRNA-Expression der α MHC- und SERCA2a-Gene und eine deutliche erhöhte mRNA-Expression der β MHC- und Acta1-Gene sowohl in Musclin KO als auch Musclin WT nach Aortenkonstriktion festgestellt werden.

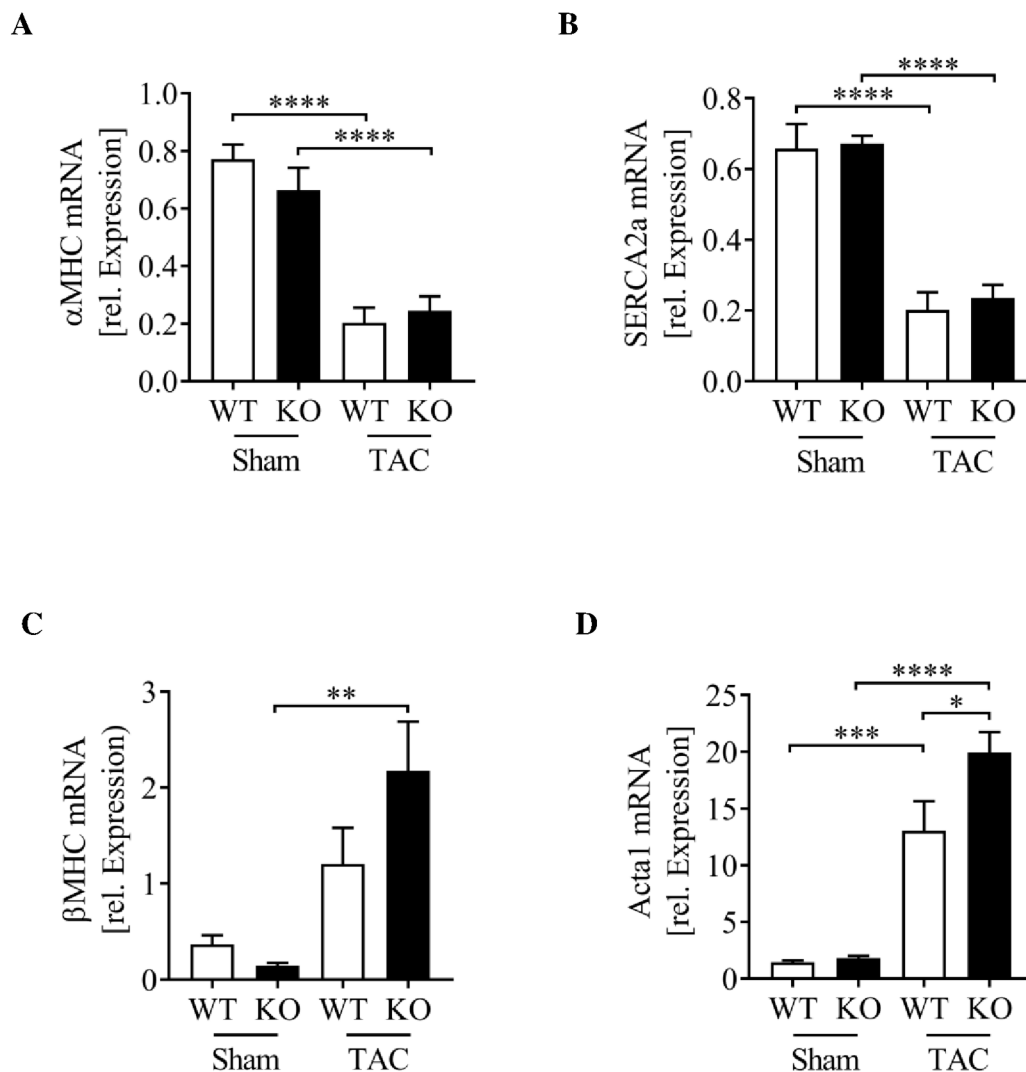


Abbildung 33 Quantitative Analyse der Expression embryonaler Gene.

Analysen der mRNA-Expression im Herzgewebe der Musclin WT und KO Mäuse nach zweiwöchiger chronischer Druckbelastung (TAC) und der Scheinoperation (Sham) von (A) α MHC, (B) SERCA2a, (C) β MHC und (D) Actin1. Die Anzahl der untersuchten Mäuse beträgt in der Sham-Gruppe n=8 und in der TAC-Gruppe n=12. * p<0.05; ** p<0.01; *** p<0.001; **** p<0.0001

Die Auswirkungen der Hypertrophie nach Druckbelastung konnten auch auf zellulärer Ebene gezeigt werden (Abbildung 34 A-C). Die Herzkapillardichte in beiden Mausgruppen (Musclin KO und Musclin WT) nach TAC war ähnlich erhöht, während die Kardiomyozyten signifikant vergrößert in Musclin KO waren im Vergleich zu den Wildtypmäusen nach TAC.

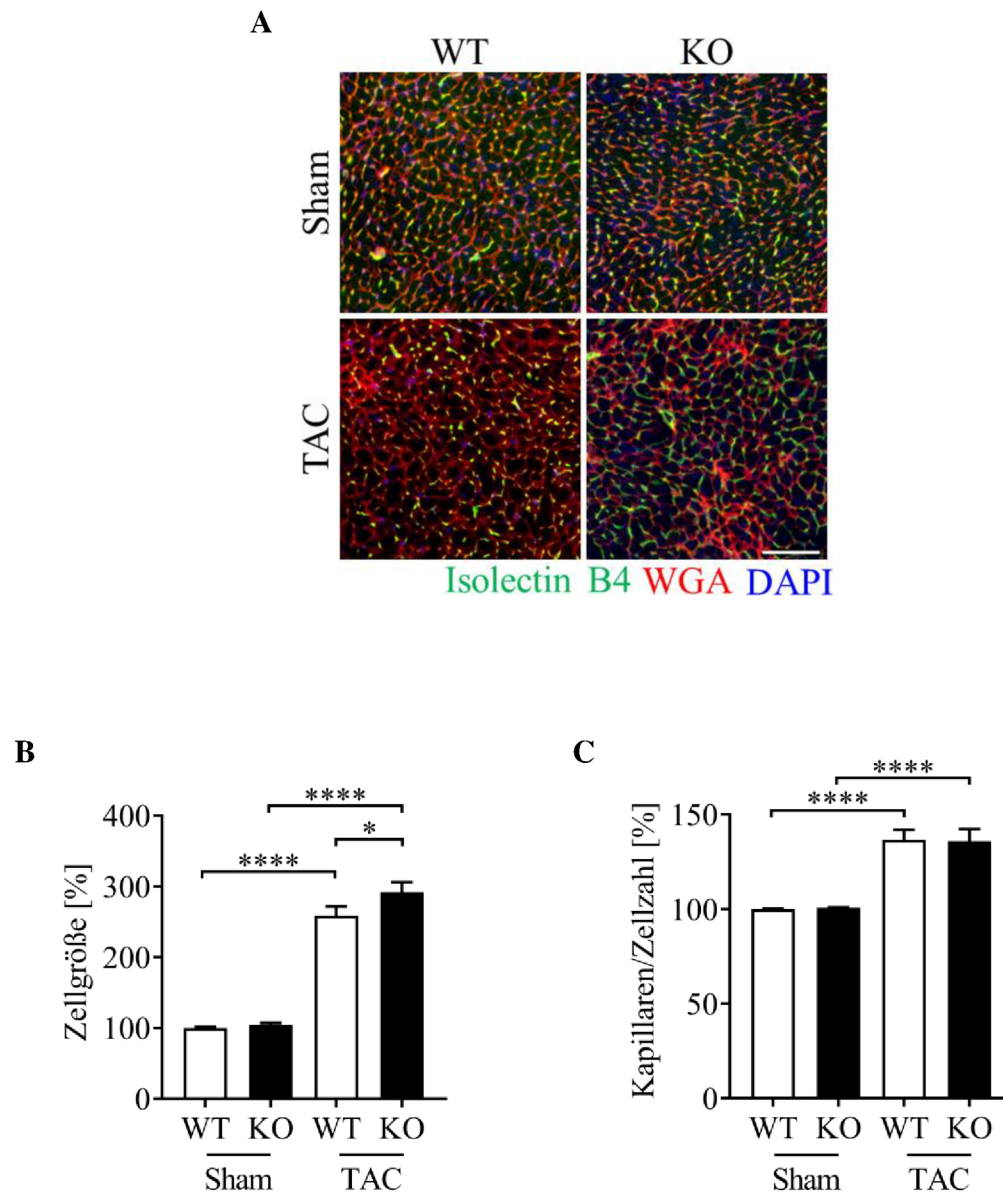
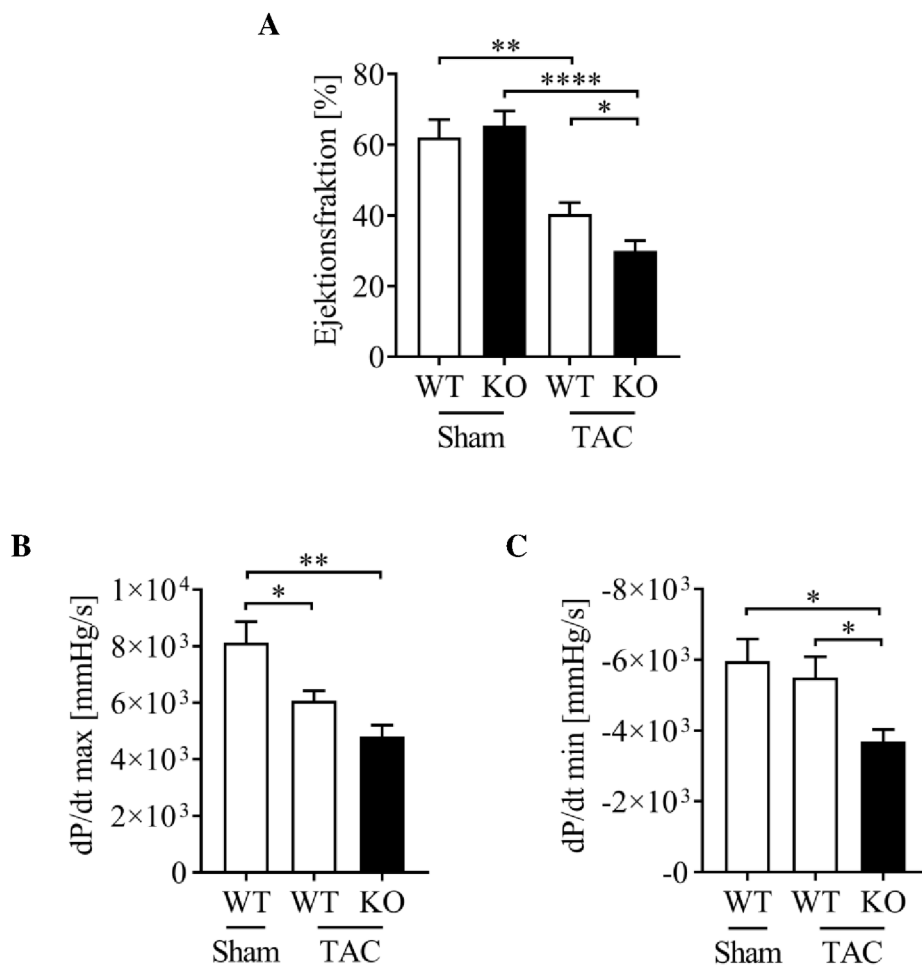


Abbildung 34 Analyse der Hypertrophie auf zellulärer Ebene nach skelettmuskelspezifischer Deletion von Musclin.

(A) Repräsentative Mikroskopbilder von Herzgewebeschnitten nach zweiwöchiger Druckbelastung (TAC) vs. Scheinoperation (Sham). Das Isolectin B4 (grün) stellt die Kapillaren dar, das Weizenkeimagglutinin (WGA) markiert die Zellmembran (rot), das Eindeckmedium enthielt DAPI für eine Zellkernfärbung (blau). Der Maßstabsbalken entspricht 100 μm . (B) Quantifizierung der Kardiomyozytengröße und (C) der Kapillardichte. Die Anzahl der untersuchten Mäuse beträgt pro jeweilige Gruppe $n = 8$. * $p < 0.05$; **** $p < 0.0001$

Um die Auswirkungen der skelettmuskelspezifischen Deletion von Musclin auf die Herzfunktion nach zweiwöchiger Druckbelastung zu beurteilen, wurden echokardiographische Untersuchungen sowie eine Herzkatheteranalyse als auch nicht-invasive Blutdruckmessungen durchgeführt (Abbildung 35, Tabelle 44). Die echokardiographischen Untersuchungen der kardialen systolischen Funktion (Ejektionsfraktion) ergaben eine verstärkte linksventrikuläre Dysfunktion bei den Musclin KO Mäusen im Vergleich zum Wildtyp (WT) (Abbildung 35 A). Weiterhin konnte eine ausgeprägte Herunterregulierung der systolischen Kontraktilität (dP/dt_{max}) im linken Ventrikel (Abbildung 35 B) sowie eine signifikant verschlechterte diastolische Relaxation (dP/dt_{min}) (Abbildung 35 C) während der Katheteruntersuchung bei den Musclin KO Mäusen nach TAC festgestellt werden. Die nicht-invasive Blutdruckmessung zeigte, dass die Musclin KO Mäuse eine leichte Erhöhung des systemischen arteriellen systolischen Blutdrucks hatten, wobei der diastolische Blutdruck unverändert blieb (Abbildung 35 D und E).



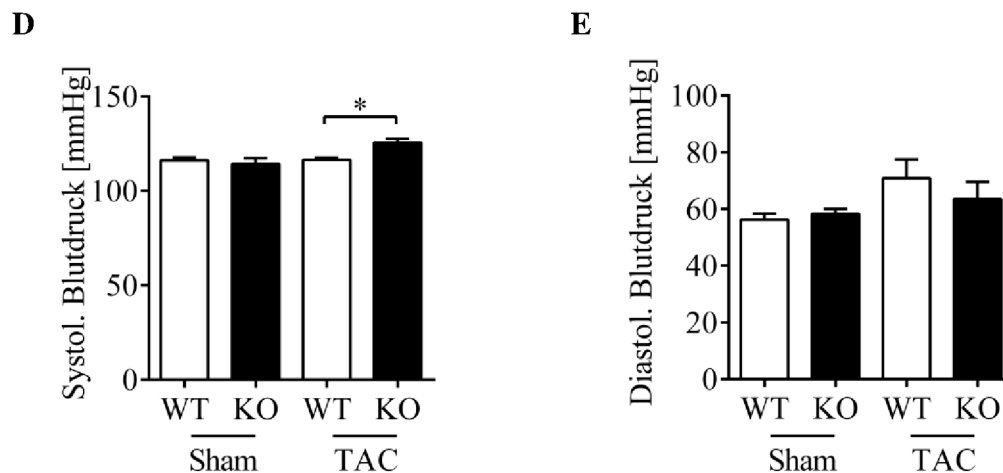


Abbildung 35 Analyse der Herzfunktion nach skelettmuskelspezifischer Deletion von Musclin und zweiwöchiger Druckbelastung durch transversale Aortenkonstriktion (TAC) vs. Sham.

(A) Bestimmung der Ejektionsfraktion, Sham n = 6, TAC n = 14-18. (B) Analyse des Maximums der Druckanstiegsgeschwindigkeit (dp/dt_{max}) und (C) des Minimums der Druckanstiegsgeschwindigkeit (dp/dt_{min}); Sham n = 8, TAC n = 6-11. (D) Bestimmung des systolischen Blutdrucks; Sham n = 8-14, TAC n = 8-9. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; **** $p < 0.0001$

Histologische Analysen einer Sirius-Rot-Färbung von Herzgewebeschnitten ergaben eine stark erhöhte Myokardfibrose als Reaktion auf TAC in den Musclin KO Mäusen im Vergleich zu den WT Mäusen (Abbildung 36 A und B). Das mRNA-Expressionsniveau der profibrotischen Gene zeigte eine deutliche Erhöhung von Kollagen I (Col1a1) und Kollagen III (Col3a1) sowie eine signifikant erhöhte Expression des Glykoproteins Fibronectin (Abbildung 36 C-E). Periostin (Postn), dessen Expression ebenfalls mit der Regulation und Ausbildung der kardialen Fibrose assoziiert ist, wurde in den Musclin KO Mäusen nach TAC im Vergleich zu den Wildtypen (WT) signifikant höher exprimiert (Abbildung 36 F).

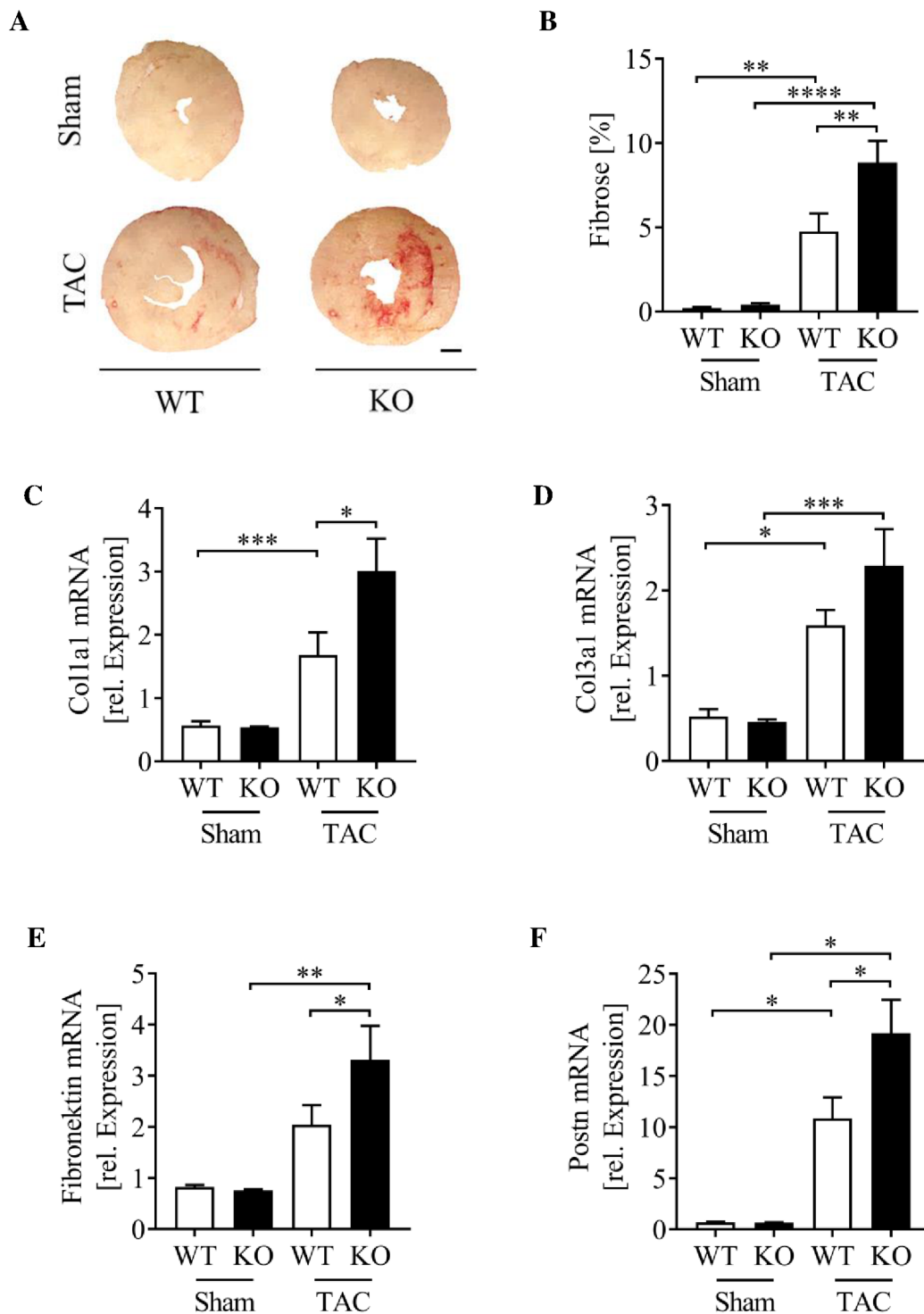


Abbildung 36 Sirius-Rot-Färbung und Expressionsanalysen der fibrotischen Gene.

(A) Querschnitte der Herzgewebe von Musclin WT und Musclin KO Mäusen 2 Wochen nach TAC oder Sham-OP wurden mit Sirius-Rot gefärbt. Die fibrotischen Areale erscheinen in rot. Der Maßstabsbalken entspricht 500 μ m. (B) Quantitative Auswertung der Fibrose in denselben Bedingungen wie in (A); Sham n = 8 und TAC n = 9-10. (C) Quantitative PCR-Analyse der Kollagen I mRNA-Expression (Coll1a1), (D) der Kollagen III mRNA-Expression (Col3a1), (E) der Fibronectin mRNA-Expression und (F) der Periostin mRNA-Expression (Postn). Die Anzahl der untersuchten Mäuse beträgt in der Sham-Gruppe n = 8 und in der TAC-Gruppe n = 12. * p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001

Die quantitative PCR-Analyse der mRNA-Expression zeigte, dass der mRNA-Spiegel von ANP und BNP im Herzgewebe nach TAC im Vergleich zu den Scheinoperierten Tieren (Sham) in beiden Mausgruppen (WT, KO) signifikant erhöht war. Im Gegenteil zu ANP, wo keine Unterschiede in der Expression zwischen Musclin KO und WT nach Druckbelastung festgestellt wurden, konnte eine Tendenz in der Herunterregulation der BNP-Expression gezeigt werden. Der mRNA-Level von CNP war zwischen den Gruppen nicht signifikant verändert.

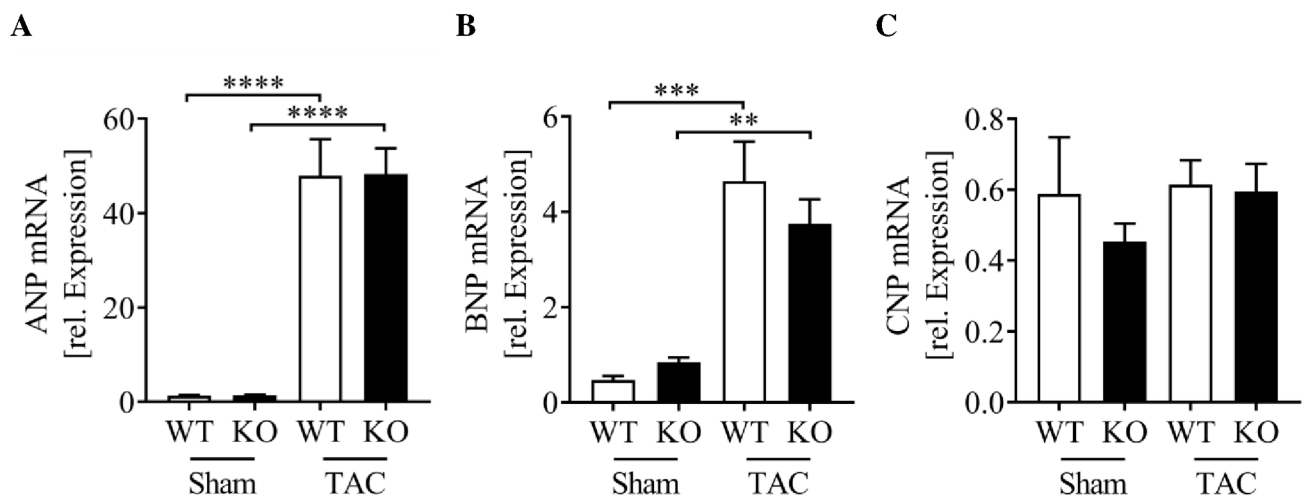


Abbildung 37 Analyse der Genexpression der natriuretischen Peptide im Herzen nach Musclin-Deletion und chronischer Druckbelastung von 2 Wochen.

Quantitative PCR-Analyse der mRNA-Expression (A) des atrialen natriuretischen Peptids (ANP), (B) des brain natriuretischen Peptids (BNP), (C) des C-Type natriuretischen Peptids (CNP). Die Anzahl der untersuchten Mäuse beträgt in der Sham-Gruppe $n = 8$ und in der TAC-Gruppe $n = 12$. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

Zusammengenommen legen diese Ergebnisse nahe, dass ein Musclindefizit im Skelettmuskel das Fortschreiten der Herzinsuffizienz nach einer Druckbelastung beschleunigt und dem kardialen Phänotyp nach langanhaltender, chronischer Druckbelastung entspricht.

4.4 Musclin erhöht die Kardiomyozytenkontraktilität über CNP/NPR-B-vermittelten Signalweg

Im Folgenden wurden die Grundlagen der durch Musclin vermittelten verbesserten Kontraktilität untersucht. Musclin kann durch die Bindung an dem NPR-C Rezeptor den Abbau natriuretischer Peptide hemmen (Miyazaki *et al.* 2018) und deren Signaltransduktion indirekt dadurch verstärken (Abbildung 38).

Es ist in der Literatur bereits bekannt, dass die ANP/NPR-A vermittelten Signalwege hauptsächlich anti-hypertrophe und anti-hypertensive Eigenschaften ausüben, die inotrope Antwort jedoch nicht wesentlich beeinflussen. Die CNP/NPR-B vermittelten Signalwege zeigen hingegen eine verstärkte inotrope Eigenschaften (Pierkes *et al.* 2002; Wollert *et al.* 2003). Beruhend darauf, wurde die inotrope Reaktion von isolierten adulten Kardiomyozyten auf das natriuretische Peptid vom Typ C (CNP) und die anschließende Co-Stimulation von rekombinanten Musclin mittels IonOptix getestet.

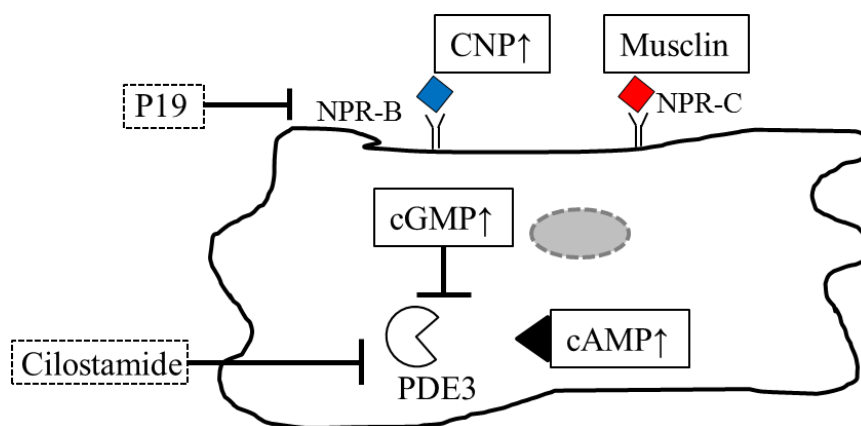
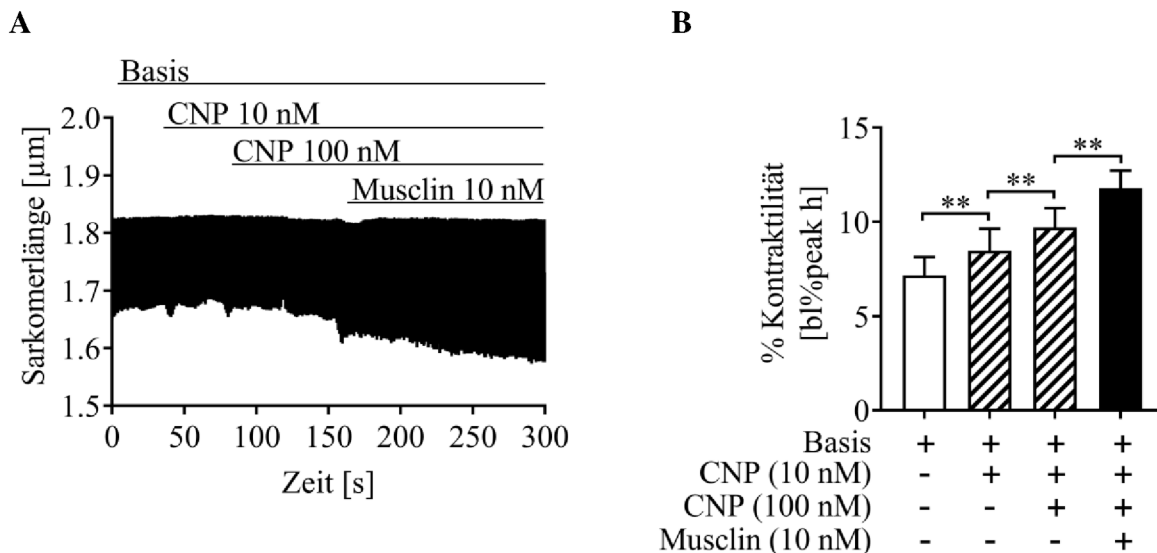


Abbildung 38 Schematische Darstellung der CNP/NPR-C-Signaltransduktion. Mechanismus verbesserter Kardiomyozytenkontraktilität durch Musclin.

Musclin bindet mit hoher Affinität an den Rezeptor NPR-C und verhindert dadurch den Abbau des C-Typ natriuretischen Peptids (CNP), welches an den Rezeptor NPR-B bindet und den CNP/NPR-B-Signalweg induziert. Dadurch erhöht sich die Konzentration von CNP und es kommt zu einer Verstärkung der inotropen Antwort durch vermehrte Stimulation des sekundären Botenstoffes, des zyklischen Guanosinmonophosphats (cGMP). cGMP inhibiert die Phosphodiesterase 3 (PDE 3), die überwiegend den zweiten sekundären Botenstoff, das zyklische Adenosinmonophosphat (cAMP) abbaut. Um die inotrope Signalkaskade zu analysieren, wurden in den folgenden Experimenten der NPR-B Inhibitor (P19) und zusätzlich der PDE 3-Inhibitor (Cilostamid) verwendet.

Die aus Wildtypmäusen isolierten adulten Kardiomyozyten zeigten eine signifikant verbesserte kardiale Kontraktionsfähigkeit nach Stimulation mit zunehmenden Konzentrationen von rekombinantem CNP Protein (10 nM, 100 nM). Die Kardiomyozytenkontraktilität konnte durch die Co-Stimulation mit rekombinantem Musclin (10 nM) signifikant verstärkt werden (Abbildung 39 A und B).

Da der Calcium-Stoffwechsel der Kardiomyozyten für die kontraktile Funktion von zentraler Bedeutung ist, wurden Messungen des cytosolischen Calciumgehalts mittels Fura-2 durchgeführt (Abbildung 39 C und D). Die verbesserte kontraktile Funktion von Kardiomyozyten nach der CNP-Stimulation war mit einem erhöhten systolischen Anstieg der Calciumkonzentration verbunden. Dieser Anstieg konnten durch eine Co-Stimulation mit rekombinantem Musclin (10 nM) weiter signifikant verstärkt werden.



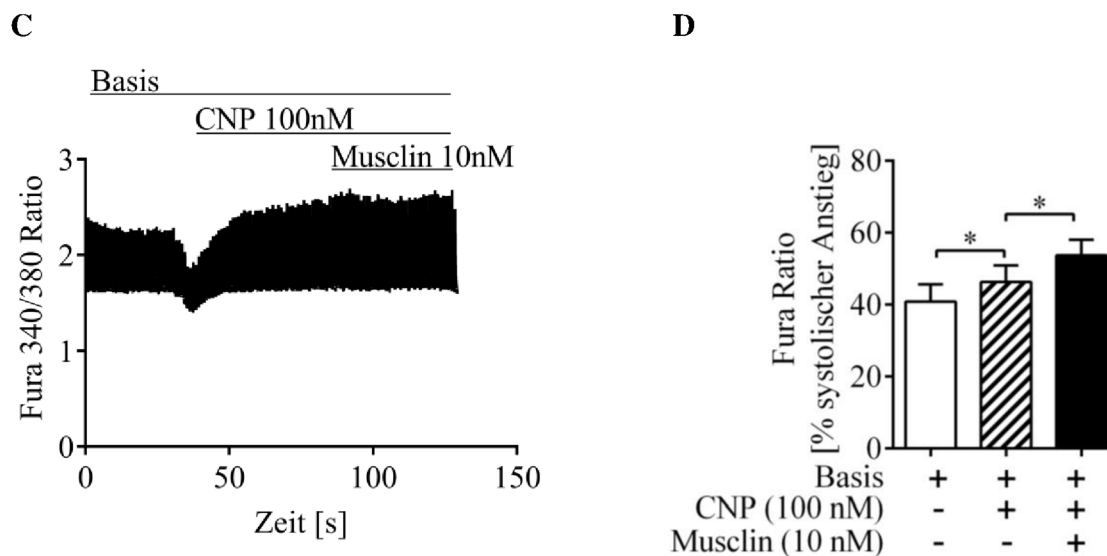


Abbildung 39 Kontraktilitätsmessung adulter Kardiomyozyten nach Stimulation mit CNP und Musclin. Messung der Calciumkonzentration.

Die adulten Kardiomyozyten wurden aus C57/Bl6 Mauserzen isoliert. Die Kontraktilität wurde als Basis der Peak-Höhe der prozentualen Veränderung der Sarkomerlänge in Prozent dargestellt (b1%peak h). (A) Repräsentative Messung der Veränderung der Sarkomerlänge in der Systole nach Stimulation mit rekombinantem CNP (10 nM, 100 nM) und darauffolgender Co-Stimulation mit rekombinantem Musclin (10 nM). (B) Quantifizierung der Kardiomyozytenkontraktilität ausgelöst durch Sarkomerverkürzung in (A), (n = 13). (C) Repräsentative Messung des Calciumgehalts in der Systole nach der CNP-Stimulation (100 nM) und darauffolgender Co-Stimulation mit Musclin (10 nM) und (D) deren Quantifizierung; n = 12. * p<0.05; ** p<0.01

Um zu testen, ob die verstärkte inotrope Wirkung bei CNP durch Musclin über den NPR-B Rezeptor vermittelt wird, wurden die frisch isolierten adulten Kardiomyozyten mit einem 0,5 μ M NPR-B-Inhibitor (P19) behandelt (Abbildung 40). Hierdurch wurde die inotrope Antwort komplett aufgehoben. Sowohl die Stimulation mit CNP als auch darauffolgende Stimulationen mit Musclin bewirkten keine Verstärkung der Kontraktilität.

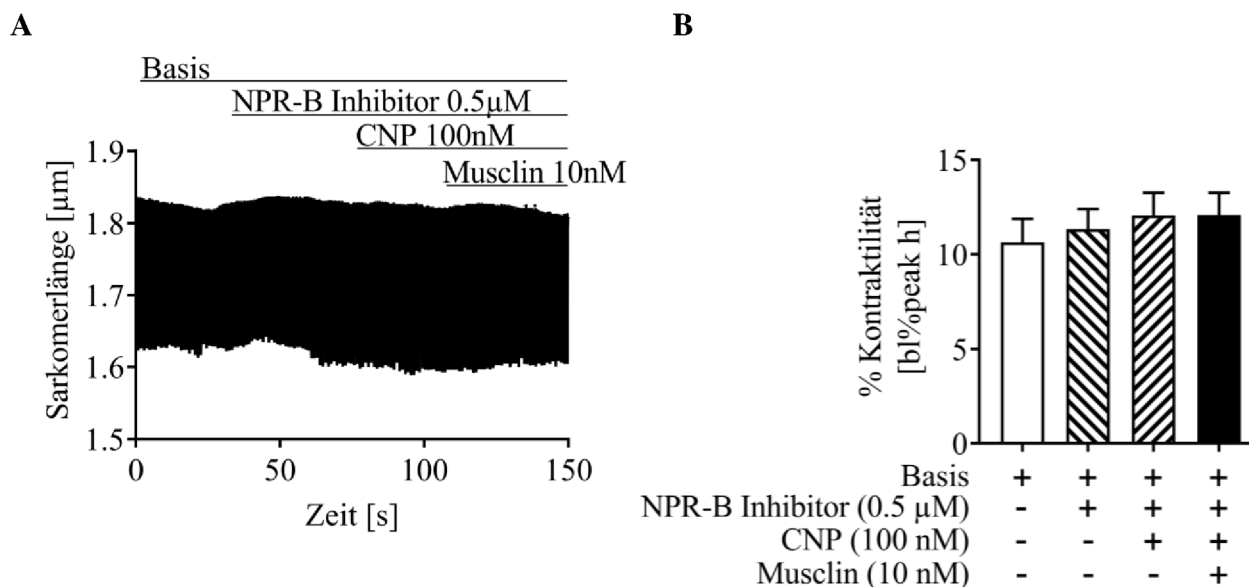


Abbildung 40 Kontraktilitätsmessung adulter Kardiomyozyten während NPR-B-Inhibierung.

Die adulten Kardiomyozyten wurden aus C57/Bl6 Mausherzen isoliert. Die Kontraktilität wurde als Basis der Peak-Höhe der prozentualen Veränderung der Sarkomerlänge in Prozent dargestellt (bl%peak h). (A) Repräsentative Messung der Veränderung der Sarkomerlänge in der Systole nach Stimulation mit NPR-B-Inhibitor (0,5 µM) und darauffolgender Co-Stimulation mit rekombinantem CNP (100 nM) und rekombinantem Musclin (10 nM). (B) Quantifizierung der Kardiomyozytenkontraktilität ausgelöst durch Sarkomerverkürzung in (A). Die Anzahl der gemessenen Zellen beträgt n = 9.

Da die inotrope Reaktion von Musclin während der Stimulation mit CNP deutlich verstärkt wurde, wurde als nächstes die Kontraktilitätsfähigkeit der isolierten Kardiomyozyten während der Stimulation mit rekombinantem Musclin ohne Zugabe von CNP gemessen (Abbildung 41). In der Tat zeigte die alleinige Behandlung von Kardiomyozyten mit Musclin keinen Einfluss auf deren Kontraktilität. Ebenfalls bewirkte eine erhöhte Konzentration von Musclin (10 nM) keine Kontraktionsänderung der Kardiomyozyten, sodass Musclin allein keine Effekte auf die Inotropie ausübt.

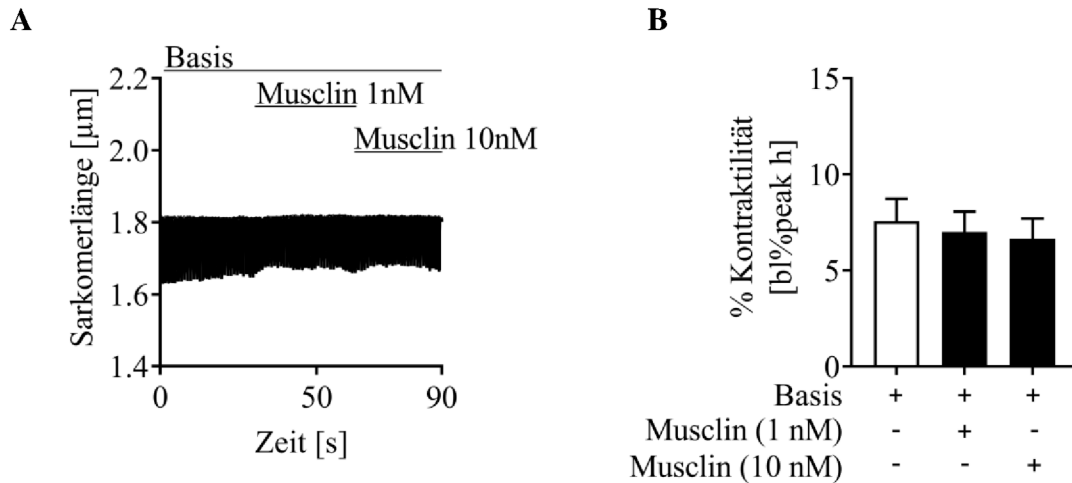


Abbildung 41 Kontraktilitätsmessung adulter Kardiomyozyten während Musclin-Stimulation.

Die adulten Kardiomyozyten wurden aus C57/B16 Mauserzen isoliert. Die Kontraktilität wurde als Basis der Peak-Höhe der prozentualen Veränderung der Sarkomerlänge in Prozent dargestellt (bl%peak h). (A) Repräsentative Messung der Veränderung der Sarkomerlänge in der Systole nach der Stimulation mit und rekombinatem Musclin (1 nM, 10 nM). (B) Quantifizierung der Kardiomyozytenkontraktilität ausgelöst durch Sarkomerverkürzung in (A). Die Anzahl der gemessenen Zellen beträgt n = 5.

Im Einklang mit den vorbeschriebenen Eigenschaften der ANP/NPR-A vermittelten Signalwege, konnten keine pro-kontraktile Effekte nach ANP-Stimulation nachgewiesen werden (Abbildung 42), sodass eine erhöhte Inotropie bei Musclin mit einer CNP- nicht jedoch mit einer ANP-Stimulation hervorgerufen wurde.

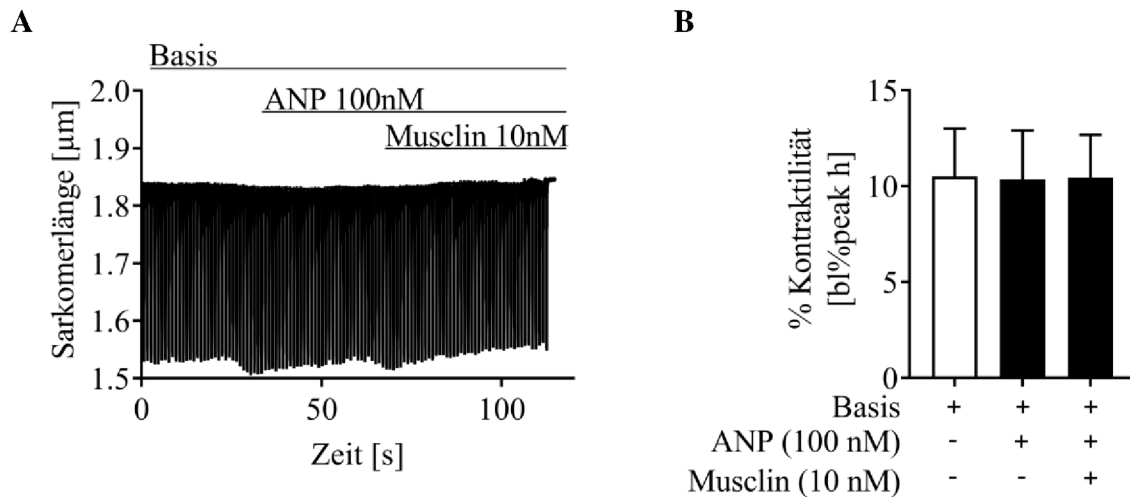


Abbildung 42 Kontraktilitätsmessung adulter Kardiomyozyten während ANP-Stimulation.

Die adulten Kardiomyozyten wurden aus C57/Bl6 Mäuserherzen isoliert. Die Kontraktilität wurde als Basis der Peak-Höhe der prozentualen Veränderung der Sarkomerlänge in Prozent dargestellt (bl%/peak h). (A) Repräsentative Messung der Veränderung der Sarkomerlänge in der Systole nach Stimulation mit rekombinantem ANP (100 nM) und darauffolgender Co-Stimulation mit rekombinantem Musclin (10 nM). (B) Quantifizierung der Kardiomyozytenkontraktilität ausgelöst durch Sarkomerverkürzung in (A). Die Anzahl der gemessenen Zellen beträgt $n = 5$.

Um den CNP/NPR-B vermittelten Signalweg genauer zu betrachten, wurde bei der Messung der Kardiomyozytenkontraktilität unter Verwendung des PKG-Inhibitors die Proteinkinase G (PKG) blockiert (Abbildung 43). PKG wird überwiegend durch cGMP aktiviert und ist somit direkt an der Muskelkontraktion beteiligt. Nach der Inhibierung von PKG wurde die inotrope Reaktion, ausgelöst durch CNP und Musclin, nicht weiter verändert.

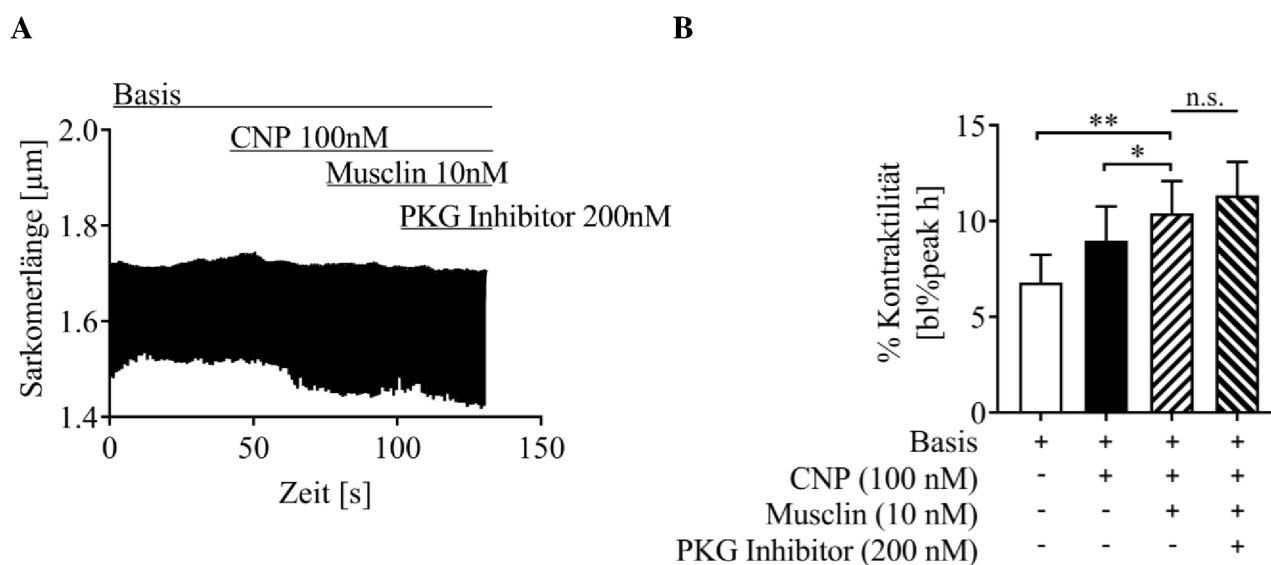


Abbildung 43 Kontraktilitätsmessung adulter Kardiomyozyten während PKG-Inhibierung.

Die adulten Kardiomyozyten wurden aus C57/Bl6 Mausherzen isoliert. Die Kontraktilität wurde als Basis der Peak-Höhe der prozentualen Veränderung der Sarkomerlänge in Prozent dargestellt (bl%/peak h). (A) Repräsentative Messung der Veränderung der Sarkomerlänge in der Systole nach Stimulation mit CNP (100 nM), rekombinantem Musclin (10 nM) und darauffolgender Inhibierung der Proteinkinase G (PKG-Inhibitor). (B) Quantifizierung der Kardiomyozytenkontraktilität ausgelöst durch Sarkomerverkürzung in (A). Die Anzahl der gemessenen Zellen beträgt $n = 5$. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

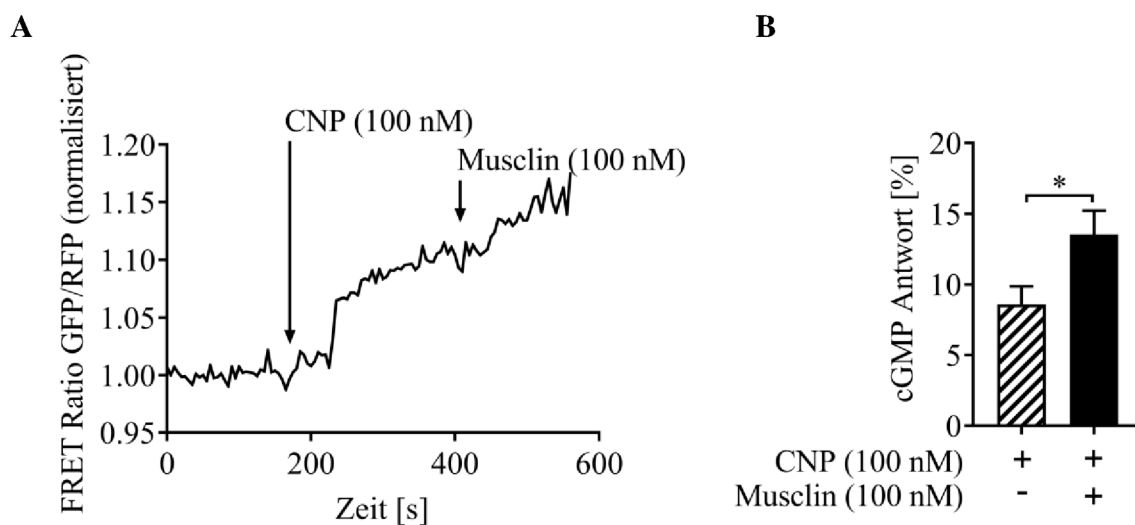
4.5 Musclin beeinflusst die Generierung von cAMP durch cGMP-vermittelte PDE3-Inhibierung in Kardiomyozyten

Das zyklische Guanosinmonophosphat (cGMP) übermittelt als sekundärer Botenstoff das CNP/NPR-B-Signal entweder durch eine Hemmung der Phosphodiesterase 3 (PDE3), wobei der cAMP-Spiegel durch eine positive cGMP/cAMP-Interaktion erhöht wird, oder durch die Stimulierung der Proteinkinase G (PKG). Um zu analysieren, ob die verstärkte inotrope Reaktion durch die CNP/Musclin-Co-Stimulation durch PDE3 vermittelt wird, wurde eine Untersuchung der cGMP- und cAMP-Dynamik in adulten Kardiomyozyten mithilfe des Förster-Resonanzenergietransfers (FRET) durchgeführt (Abbildung 44). Hierfür wurden die adulten Kardiomyozyten entweder aus den cGES-DE5 transgenen Mäusen für die cGMP-Messung

oder aus den Epac2-Camps transgenen Mäusen für die Analysen von cAMP frisch isoliert und die Botenstoffe in Echtzeit gemessen (Nikolaev *et al.* 2006; Nikolaev *et al.* 2010).

Nach der Zugabe von rekombinanten CNP (100 nM) stieg die cGMP-Konzentration und wurde durch die Co-Stimulation mit Musclin (100 nM) signifikant um 5 % erhöht (Abbildung 44 A und B). Für die Messung der cAMP-Konzentration wurden die Kardiomyozyten zunächst mit Isoprenalin (100 nM) behandelt, um eine maximale Aktivierung des Sensors zu gewährleisten (FRET in % des Maximums). Der cAMP-Spiegel stieg durch die CNP-Stimulation und darauffolgende Musclin-Co-Stimulation um etwa 5 % der maximalen Aktivierung signifikant an (Abbildung 44 C und D).

Als nächstes wurde der PDE3-Inhibitor Cilostamid bei der Messung der cAMP-Konzentration eingesetzt. In der Tat bewirkte die Hemmung dieses Enzyms einen verminderten Abbau und somit einen Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration, wodurch die Inotropie positiv beeinflusst wurde. Die Inhibierung von PDE3 mit 10 μ M Cilostamid verhinderte die Zunahme der cAMP-Konzentration in Kardiomyozyten durch Musclin nach CNP-Stimulation und prä-Stimulation mit Isoprenalin (Abbildung 44 E und F).



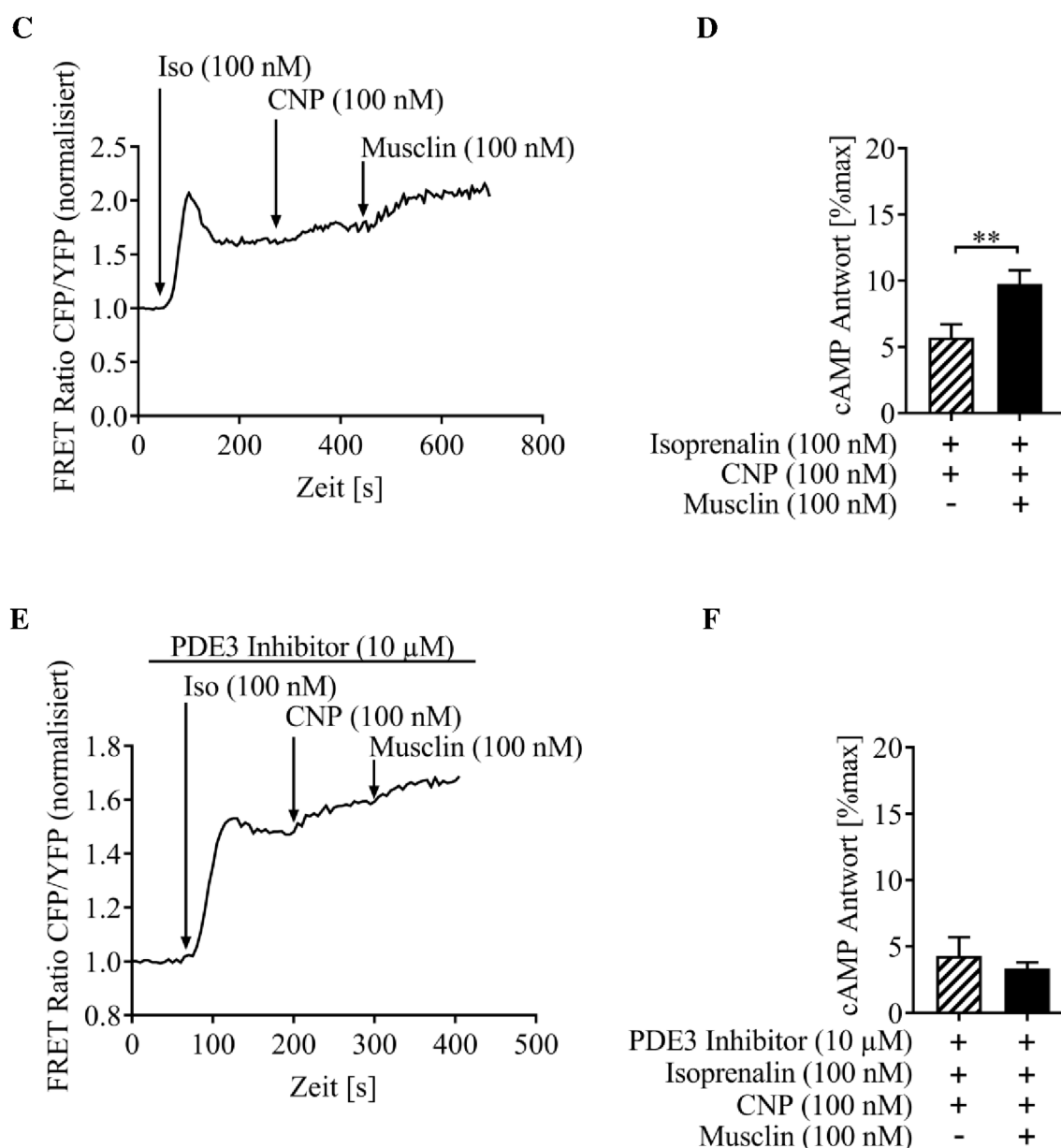


Abbildung 44 Analyse der cGMP- und cAMP-Dynamik in adulten Kardiomyozyten mittels Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer (FRET) basierter Messung.

Isolierte adulte Kardiomyozyten wurden mit rekombinantem CNP (100 nM) und mit rekombinantem Musclin (100 nM) stimuliert. Das Verhältnis von Grün fluoreszierendem Protein (GFP) zu dem Rot fluoreszierendem Protein (RFP) während der cGMP-Messung und das Verhältnis von Cyan fluoreszierendem Protein (CFP) zu Gelb fluoreszierendem Protein (YFP) (CFP/YFP) während der cAMP-Messung wurde nach einer Anregung von 436 nm bestimmt. (A) Repräsentative Messung der cGMP-Antwort während der Stimulation mit CNP (100 nM) und darauffolgender Co-Stimulation mit Musclin (100 nM) (GFP/RFP-Verhältnis) und (B) deren Quantifizierung, (n = 7). (C) Repräsentative Messung der cAMP-Antwort während der Stimulation mit CNP (100 nM) und darauffolgender Co-Stimulation mit Musclin (100 nM) nach der Aktivierung des Sensors mit Isoprenalin (100 nM) (CFP/YFP-Verhältnis) und (D) deren Quantifizierung der FRET basierten Messung des maximalen Isoprenalin-Effekts, (n = 13). (E) Repräsentative Messung der cAMP-Antwort während der Stimulation mit CNP (100 nM) und darauffolgender Co-Stimulation mit Musclin (100 nM) nach dem Aktivierung des Sensors mit Isoprenalin (100 nM) unter Verwendung des PKG-Inhibitors (CFP/YFP-Verhältnis) und (F) deren Quantifizierung, (n = 8). * p<0.05; ** p<0.01

Um die Konsequenzen erhöhter cAMP-Levels festzustellen, wurde die Aktivität verschiedener Schlüsselproteine der cAMP/Proteinkinase A (PKA)-Signalkaskade untersucht. Die Phosphorylierung kontraktiver Proteine wurde in Mäusen mit dem skelettmuskelspezifischen AAV6-Control und AAV6-Musclin neun Wochen nach TAC oder Sham-Operation analysiert (Abbildung 45). Nach experimenteller Aortenkonstriktion führte die skelettmuskelspezifische Überexpression von Musclin zu einer verstärkten Phosphorylierung von Phospholamban an Serin 16, von Troponin I an Serin 23/24 und von CREB (cAMP response element-binding protein) an Serin 133. Die Aktivierung dieser Proteine vermittelt eine verstärkte kardiale Kontraktilität (Bers 2002a). Auch SERCA2a wurde im Herzgewebe der AAV6-Musclin Mäuse nach TAC höher exprimiert.

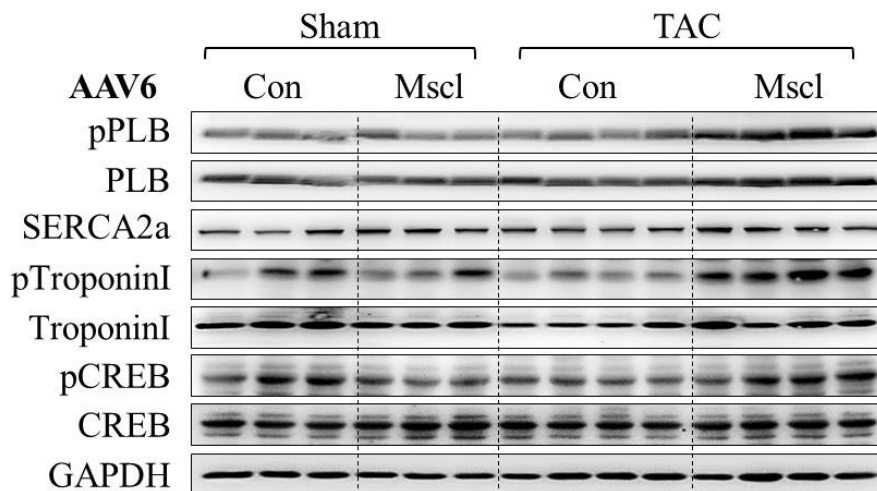


Abbildung 45 Western Blot-Analyse der Aktivität kontraktiver Proteine im Herzen nach chronischer Druckbelastung von 9 Wochen.

Die Phosphorylierung kontraktiver Proteine nach chronischer Druckbelastung und Sheinoperation von 9 Wochen während skelettmuskelspezifischer Musclin-Überexpression und deren Kontrollmäusen. Phosphorylierung von Phospholamban an Serin16 (pPLB, 28 kDa), von Troponin I an Serin 23/24 (28 kDa), und von CREB an Serin 133 (43 kDa). Als Ladekontrolle wurde GAPDH (36 kDa) dargestellt.

Um festzustellen, ob die verstärkte inotrope Reaktion von CNP durch Musclin durch die PDE3-Hemmung vermittelt wurde, wurden frisch isolierte adulte Kardiomyozyten zuerst mit CNP (100 nM) stimuliert und nachfolgend mit dem PDE3-Inhibitor (Cilostamid, 1 µM) behandelt (Abbildung 46). Im Einklang zu früheren Ergebnissen wurde die Kontraktionsfähigkeit der Kardiomyozyten nach der CNP-Stimulation verbessert, während die darauffolgende

Behandlung mit dem PDE3-Inhibitor bei anschließender Stimulation mit Musclin (10 nM) einen weiteren Kontraktilitätsanstieg verhinderte. Diese Effekte deuten darauf hin, dass die durch Musclin hervorgerufene Zunahme der Kontraktilität der Kardiomyozyten durch PDE3-Inhibierung vermittelt wird.

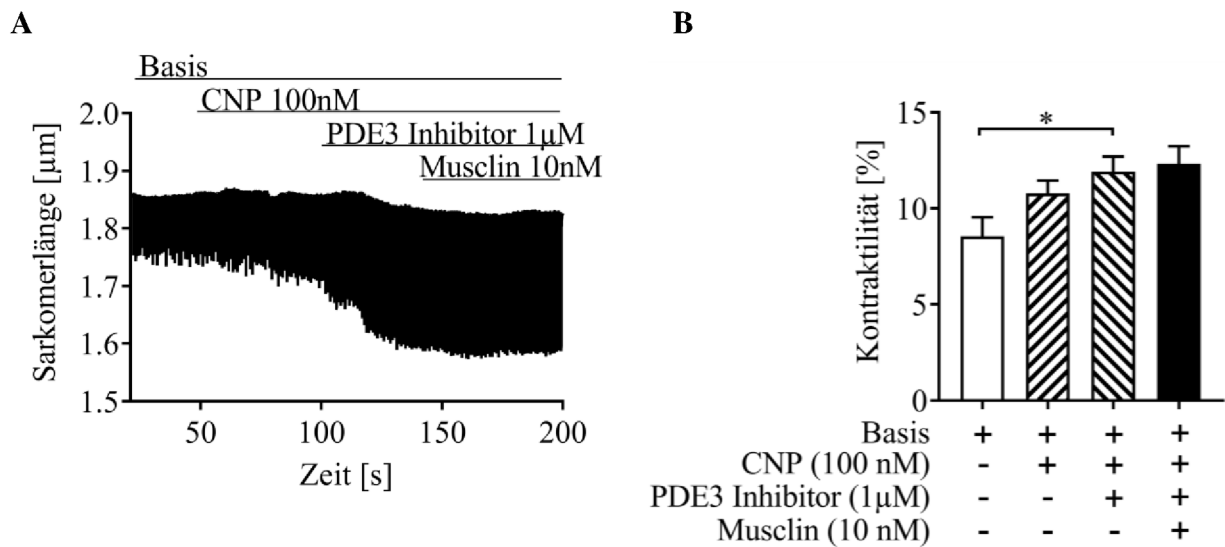


Abbildung 46 Kontraktilitätsmessung adulter Kardiomyozyten während PDE 3-Hemmung.

Die adulten Kardiomyozyten wurden aus C57/Bl6 Mäuserherzen isoliert. Die Kontraktilität wurde als Basis der Peak-Höhe der prozentualen Veränderung der Sarkomerlänge in Prozent dargestellt (b1%peak h). (A) Repräsentative Messung der Veränderung der Sarkomerlänge in der Systole nach Stimulation mit rekombinantem CNP (100 nM) und darauffolgender PDE 3-Inhibierung (1 µM) und anschließender Co-Stimulation der Kardiomyozyten mit rekombinantem Musclin (10 nM). (B) Quantifizierung der Kardiomyozytenkontraktilität ausgelöst durch Sarkomerverkürzung in (A). Die Anzahl der gemessenen Zellen beträgt n = 9. * p < 0.05

Zusammenfassend verbessert Musclin die Kontraktionsfähigkeit von Kardiomyozyten durch PDE3-Hemmung bei Verstärkung der CNP/NPR-B/cGMP-Signaltransduktion. Dadurch wird eine positive cGMP/cAMP-Interaktion und die Aktivierung des PKA-Signalweges in Kardiomyozyten hervorgerufen.

4.6 Deletion von skelettmuskulärem Musclin verursacht verminderte cGMP- und cAMP-Konzentration sowie eine reduzierte Aktivierung von Phospholamban in Kardiomyozyten

Um die Effekte der cGMP/cAMP-Interaktion bei Musclin-Mangel in adulten Kardiomyozyten zu untersuchen, wurde der cGMP- und cAMP-Spiegel mittels ELISA in Musclin KO und Musclin WT Mäusen ermittelt (Abbildung 47 A und B). Während die Kardiomyozyten von Kontrollmäusen (WT) nach zweiwöchiger experimenteller Aortenkonstriktion (TAC) einen signifikanten Anstieg der intrazellulären cGMP- und cAMP-Spiegel zeigten, war der Konzentrationsanstieg beider Botenstoffe in Musclin KO Mäusen verringert.

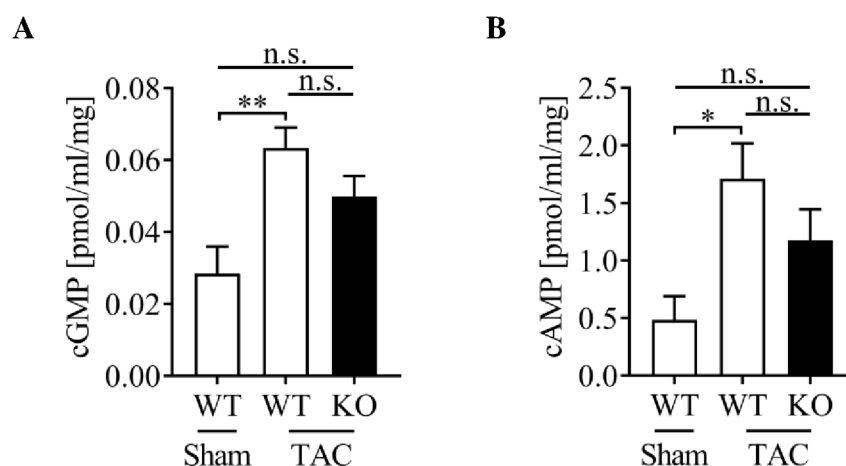


Abbildung 47 Analyse der cGMP- und cAMP-Konzentration in adulten Kardiomyozyten der Musclin KO und WT Mäuse nach zweiwöchiger Druckbelastung.

(A) Analyse der cGMP-Konzentration mittels ELISA normalisiert zu Gesamtproteinkonzentration (pmol/ml/mg) und (B) der cAMP-Konzentration in adulten Kardiomyozyten nach TAC vs. Sham-OP. Die Anzahl der untersuchten Mäuse beträgt bei Musclin WT $n = 8$ und bei Musclin KO $n = 7$. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

Diese Effekte wurden begleitet von einer verringerten Phosphorylierung von Phospholamban (PLB) an Serin 16 (Abbildung 48 A und B). Drei und 14 Tage nach TAC konnte eine deutliche Abnahme der Phosphorylierung von PLB beobachtet werden. Eine geringere PLB-Phosphorylierung führt zu einer verstärkten SERCA2a-Inhibierung und somit zu einer ver-

minderten Calcium-Rückfluss ins SR. Demzufolge kommt es zu einem, für die Herzinsuffizienz charakteristischen systolischen Ca^{2+} -Mangel und erhöhter diastolischer Ca^{2+} -Konzentration im Cytosol. Die SERCA2a-Konzentration blieb unverändert. Die auffällig verringerte Aktivität der kontraktilen Proteine nach Druckbelastung bei den Musclin KO Mäusen im Vergleich zu den Wildtypen korrelierte mit einer verringerten kardialen PKA-Aktivität in den Musclin KO Mäusen, da der Serinrest 16 eine etablierte Phosphorylierungsstelle der PKA ist.

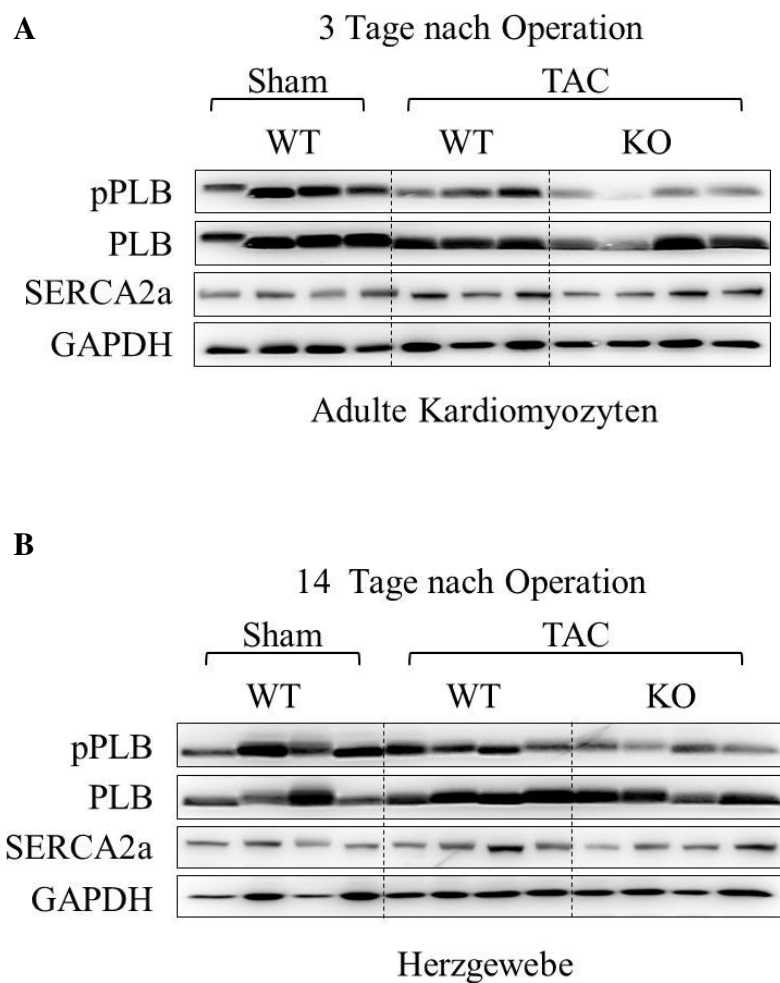


Abbildung 48 Western Blot-Analyse der Phosphorylierung kontraktiler Proteine der Musclin KO und WT Mäuse nach 3 und 14 Tagen Druckbelastung.

Analyse der Phosphorylierung von Phospholamban an Serin 16 (pPLB) (28 kDa) und SERCA2a (110 kDa) (A) in frischisolierten adulten Kardiomyozyten drei Tage nach transversaler Aortenkonstriktion (TAC) vs. Scheinoperation (Sham) und (B) im Herzgewebe 14 Tage nach TAC vs. Sham-OP. Als Ladekontrolle wurde GAPDH (36 kDa) dargestellt.

4.7 Musclin beeinflusst Proliferation und Migration der kardialen Fibroblasten

Eine myokardiale Gewebeveränderung während der pathologischen Hypertrophie wird speziell durch die Aktivierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten ausgelöst, die zur Beeinträchtigung der Herzfunktion beitragen. Ein schnelles Wachstum von Fibroblasten (sog. Fibroblastenproliferation) führt zu verstärkter Myokardfibrose. Zur Analyse der Veränderung der Fibrose im Herzmuskelgewebe als Folge einer skelettmuskelspezifischen Überexpression oder Deletion von Musclin *in vivo*, wurde der direkte Einfluss von Musclin auf isolierte adulte primäre kardiale Fibroblasten *in vitro* untersucht (Abbildung 49, Abbildung 50).

Die Fibroblastenproliferation war nach CNP-Stimulation (100 nM) signifikant vermindert. Die Behandlung von primären Fibroblasten mit Musclin (50 nM) zeigte eine weitere Proliferationsabnahme, die durch CNP/Musclin-Stimulation verstärkt wurde (Abbildung 49 A). Die hemmende Wirkung von CNP und Musclin auf die Fibroblastenaktivität wurde in Gegenwart eines NPR-B-Inhibitors (P19, 500 nM) vollständig aufgehoben (Abbildung 49 B). Dies deutet darauf hin, dass Musclin über den CNP/NPR-B-Signalweg wirkt. Auch das Verwenden des PKG-Inhibitors (200 nM) bei den primären Fibroblasten konnte die anti-proliferative Wirkung von Musclin signifikant verhindern (Abbildung 49 B). Daraus lässt sich hindeuten, dass Musclin die Aktivität von isolierten primären kardialen Fibroblasten durch den CNP/NPR-B/cGMP/PKG-Signalweg beeinflusst.

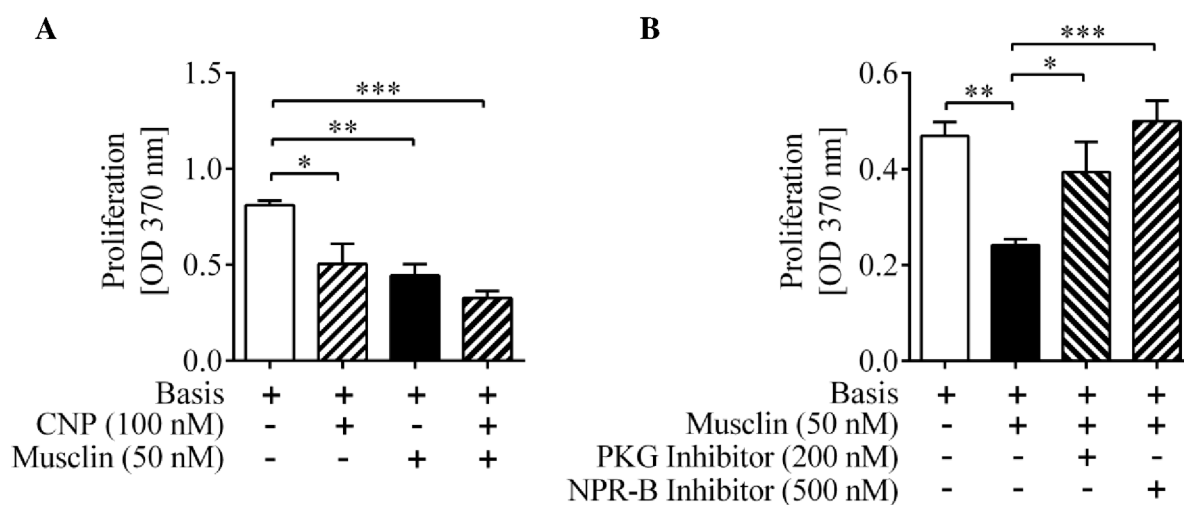


Abbildung 49 Analyse der Proliferation primärer adulter Fibroblasten.

(A) Quantifizierung der Fibroblastenproliferation ermittelt bei 370 nm nach 24 h Stimulation mit dem rekombinanten CNP (100 nM) und dem rekombinanten Musclin (50 nM), (n = 5). (B) Quantifizierung der Fibroblastenproliferation nach Behandlung mit PKG- und NPR-B-Inhibitoren. Die Anzahl der gemessenen Proben beträgt n = 7. * p<0.05; ** p<0.01; *** p<0.001

Die Migrationsfähigkeit der kardialen Fibroblasten wurde mithilfe der etablierten *Scratch*-Methode ermittelt. Bei diesem Experiment wurde eine zellfreie Zone auf einer konfluenten Zellschicht erzeugt und die Rekolonisierung des zellfreien Bereiches durch Fibroblasten nach 4 h quantifiziert. Die Migration der kardialen Fibroblasten wurde nach der Stimulation mit Musclin (50 nM) signifikant gehemmt. Die anti-migratorische Wirkung von Musclin konnte durch Behandlung sowohl mit dem NPR-B-Rezeptorinhibitor (500 nM) als auch mit dem PKG-Inhibitor (200 nM) aufgehoben werden (Abbildung 50).

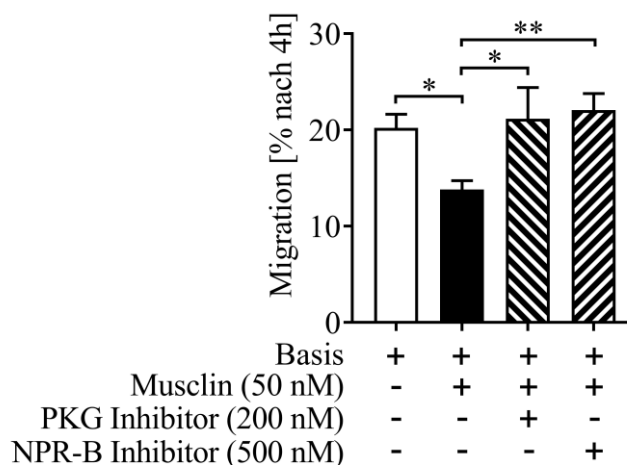


Abbildung 50 Analyse der Migration primärer adulter Fibroblasten.

Die Migrationsfähigkeit kardialer Fibroblasten nach 24 h Stimulation mit 50 nM Musclin und nach Behandlung mit PKG- (200 nM) und NPR-B-Inhibitoren (500 nM). Die Migration der Fibroblasten wurde 4 h nach dem *Scratch* ermittelt. Die Anzahl der untersuchten Proben beträgt $n = 4$. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

Die Western Blot-Analysen der primären kardialen Fibroblasten (Abbildung 51) zeigten eine verminderte Aktivierung von p38-mitogenaktivierter Proteinkinase (p38 MAPK), die für die Aktivierung der kardialen Fibroblasten verantwortlich ist und durch PKG inhibiert werden kann. Die Aktivierung von *extracellular signal-regulated kinases* (ERK), welche die Proliferation und die Signaltransduktion verschiedener Wachstums- und Differenzierungssignale steuert, war nach Stimulation mit Musclin nur leicht vermindert.

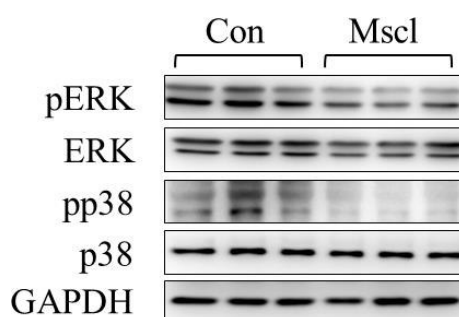


Abbildung 51 Western Blot-Analyse der Aktivität der Mitogen-aktivierten Kinasen (ERK und p38) in primären Fibroblasten nach Musclin-Stimulation.

Die primären Fibroblasten wurden 24 h mit 50 nM Musclin stimuliert und die Aktivierung von *extracellular signal-regulated kinases* (ERK, 44/42 kDa) und p38-mitogenaktivierter Proteinkinase (p38, 43 kDa) in primären Fibroblasten im Vergleich zu den Kontrollzellen ermittelt. Als Ladekontrolle wurde GAPDH (36 kDa) dargestellt.

Zusammenfassend vermindert Musclin die Bildung der Myokardfibrose, indem durch indirekte Aktivierung von PKG die Signaltransduktion der p38-MAP-Kinase in kardialen Fibroblasten hemmt.

5 Diskussion

Etwa 15 bis 20 % der Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz entwickeln eine kardi-ale Kachexie, die durch einen starken Gewichtsverlust gekennzeichnet ist. Die Letalität in dieser Hochrisiko-Patientengruppe ist etwa zwei- bis dreimal höher als bei herzinsuffizienten Patienten ohne Gewichtsverlust (von Haehling *et al.* 2017). Eine gezielte Therapie bei kardialer Kachexie gibt es derzeit nicht. Auch die molekularen Mechanismen, die zur Entwicklung der Erkrankung beisteuern, bleiben weiterhin unklar. In dieser Arbeit wird die Hypothese aufgestellt, dass die Freisetzung von kardio-protectiven Proteinen aus dem atrophierten Skelettmuskel bei herzinsuffizienten, kachektischen Patienten beeinträchtigt sein könnte. In der Tat konnte in dieser Arbeit mithilfe eines Mausmodells der kardialen Kachexie gezeigt werden, dass das sezernierte Protein Musclin in der atrophierten Skelettmuskulatur deutlich herunterreguliert ist, was das Fortschreiten der Herzinsuffizienz negativ beeinflusste.

Musclin wird fast ausschließlich im Skelettmuskel und in geringerer Menge im Knochen exprimiert. Außerdem vermittelt Musclin das endochondrale Knochenwachstum (Thomas *et al.* 2003; Bord *et al.* 2005; Chiba *et al.* 2017; Kanai *et al.* 2017) und ist beteiligt an dem insulin-abhängigen Glucose-Stoffwechsel (Liu *et al.* 2008; Yu *et al.* 2016; Chen *et al.* 2017).

Darüber hinaus zeigt Musclin eine starke Homologie zur Familie der natriuretischen Peptide und ist ein endogener und spezifischer Ligand des natriuretischen Clearance-Rezeptors (NPR-C) (Kita *et al.* 2009). Überdies wirkt Musclin auch lokal im Skelettmuskel und verbessert die körperliche Leistungsfähigkeit durch Förderung der mitochondrialen Biogenese in den Muskelfasern (Subbotina *et al.* 2015). Musclin wird als sezerniertes Protein in die Blutbahn freigesetzt, was auf einen systemischen Einfluss auf das natriuretische Peptidsystem schließen lässt.

5.1 Musclin-Expression bei chronischer Herzinsuffizienz

Die durchgeführten Untersuchungen in dieser Arbeit konnten zeigen, dass Mäuse, die einer langfristigen Druckbelastung durch transversale Aortenkonstriktion (TAC) unterzogen

worden sind, eine chronische Herzinsuffizienz mit einem begleitenden Skelettmuskelschwund und einer Reduktion des Körpergewichts entwickelten (Abbildung 15). Diese Symptome werden auch in fortgeschrittenen Stadien der chronischen Herzinsuffizienz bei Patienten beobachtet und als Syndrom der kardialen Kachexie bezeichnet.

In dem in dieser Arbeit etablierten Mausmodell der kardialen Kachexie war die Musclin-Expression in atrophierten Skelettmuskel stark reduziert (Abbildung 17, Abbildung 18, Abbildung 19). Diese ausgeprägte Herabregulierung des sezernierten Proteins deutete auf einen spezifischen Einfluss auf das Fortschreiten der Herzinsuffizienz hin. Als Ursache wurde hier ein endokriner Wirkmechanismus zwischen Skelettmuskulatur und Herz postuliert. In der Tat konnten nach chronischer Druckbelastung durch TAC die Herzfunktion als auch die Myokardfibrose durch einen therapeutischen Ansatz mittels AAV6-vermittelter, skelettspezifischer Überexpression von Musclin verbessert werden (Abbildung 24). Im Gegenzug dazu führte eine chronische Druckbelastung in skelettmuskelspezifischen Musclin *knock-out* Mäusen zu einem Fortschreiten der Herzinsuffizienz sowie zu einer ausgeprägten maladaptiven Myokardfibrose (Abbildung 35, Abbildung 36). Weiterhin wiesen die *knock-out* Mäuse einen reduzierten Musclin-Spiegel im Blutplasma auf (Abbildung 31). Da Musclin auch in geringeren Mengen in Knochen exprimiert wird (Thomas *et al.* 2003; Bord *et al.* 2005; Kanai *et al.* 2017) und es sich hier um einen skelettmuskelspezifischen *knock-out* handelt, kann sezerniertes Musclin durchaus weiterhin in der Blutbahn vorhanden sein.

5.2 Einfluss von Musclin auf die Kardiomyozytenkontraktilität

Die weiteren Untersuchungen konnten zeigen, dass die verbesserte Herzfunktion bei einer Musclin-Überexpression zumindest teilweise auf eine erhöhte Kontraktilität der Kardiomyozyten zurückzuführen ist. Mechanistisch gesehen, wird die verbesserte Kontraktilität der isolierten adulten Kardiomyozyten nicht direkt durch Musclin beeinflusst, da die positive inotrope Wirkung von Musclin auf Kardiomyozyten das natriuretische Peptid C-Typ (CNP) erfordert (Abbildung 39). Jedoch konnte die inotrope Reaktion nach Inhibierung des natriuretischen Peptid Rezeptors B (NPR-B) mit einem selektiven NPR-B-Inhibitor verringert werden (Abbildung 40). Einerseits ist nicht auszuschließen, dass zusätzliche, durch Musclin vermittelte Effekte auf die anderen natriuretischen Peptide ebenfalls zu einer Erhöhung der ANP- und

BNP-Konzentration *in vivo* führen könnten. Andererseits wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass Kardiomyozyten nach ANP-Stimulation *in vitro* keine inotrope Reaktion durch Musclin signalisiert haben (Abbildung 42). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Musclin auf die Kontraktionsfähigkeit der Kardiomyozyten durch eine verstärkte Aktivierung des CNP/NPR-B-Signalwegs und nicht durch den ANP/NPR-A-Signalweg einwirkt. Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit früheren Studien, die gezeigt haben, dass ANP eher eine anti-hypertrophe und anti-hypertensive Wirkung besitzt als eine inotrope (Pierkes *et al.* 2002; Wollert *et al.* 2003).

Interessanterweise wurde die Verstärkung der inotropen Wirkungen von Musclin in Anwesenheit von CNP auf die Kardiomyozytenkontraktilität nach Hemmung der Phosphodiesterase 3 (PDE3) durch Cilostamid vollständig aufgehoben (Abbildung 46). Diese Untersuchungen deuten darauf hin, dass PDE3 eine wesentliche Rolle bei der Inotropieverstärkung durch CNP und Musclin spielt und Musclin somit ähnlich wie ein PDE3-Inhibitor wirkt.

Da bekannt ist, dass die cGMP-abhängige Proteinkinase (PKG) durch cGMP aktiviert wird und die kardiale Kontraktilität dadurch beeinflusst wird (van Heerebeek *et al.* 2012; Kovács *et al.* 2016), konnte auch gezeigt werden, dass die Inhibierung von PKG durch einen selektiven PKG-Inhibitor eine zusätzliche inotrope Reaktion durch Musclin während der CNP-Stimulation nicht vermindert hat (Abbildung 43). Diese Beobachtungen zeigen, dass PDE3 und nicht PKG eine überwiegende Antwort auf die inotrope Reaktion durch Musclin vermittelt.

Es wird allgemein angenommen, dass CNP direkt die Kontraktilität der Kardiomyozyten erhöht und dadurch die Zunahme der Calcium-Konzentration beeinflusst, was auch in dieser Arbeit beobachtet wurde (Pierkes *et al.* 2002; Wollert *et al.* 2003; Frantz *et al.* 2013; Meier *et al.* 2017). Dennoch haben andere Studien über negative inotrope Wirkung von CNP berichtet (Zhang *et al.* 2005; Moltzau *et al.* 2014). Der Grund für diese gegensätzlichen Beobachtungen könnte an verschiedenen experimentellen Systemen liegen. Bereits die Analysen eines Ganzherzpräparates im Vergleich zu den isolierten Kardiomyozyten könnten unterschiedliche Ergebnisse liefern. Eine bedeutende Rolle könnte auch die Verwendung von unterschiedlichen Krankheitsmodellen oder Spezies spielen. Letztendlich ist auch die Anwendung unterschiedlicher CNP-Konzentration von großer Bedeutung.

Weiterführende Untersuchungen der cGMP- und cAMP-Dynamik in adulten Kardiomyozyten mithilfe des Förster-Resonanzenergietransfers (FRET) konnten eine durch Musclin

vermittelte positive cGMP/cAMP-Interaktion in Kardiomyozyten bestätigen (Abbildung 44). In der Tat kam es zu einer erhöhten cGMP- und cAMP-Antwort in isolierten Kardiomyozyten nach der zusätzlichen Stimulation mit Musclin während einer CNP-Stimulation. Im Gegenzug dazu, hat die Vorbehandlung der Kardiomyozyten mit einem PDE3-Inhibitor einen weiteren Anstieg von cAMP durch Musclin nach der CNP-Anregung verhindert. Im Ganzen zeigen die dargestellten Daten, dass Musclin indirekt die Kontraktionsfähigkeit von Kardiomyozyten durch induzierte PDE3-Hemmung bei Verstärkung der CNP/NPR-B/cGMP-Signaltransduktion erhöht und somit positiv die cGMP/cAMP-Interaktion beeinflusst.

Im Einklang mit den positiven inotropen Effekten von Musclin zeigten die Western Blot-Analysen der verschiedenen Schlüsselproteine der cAMP/Proteinkinase A (PKA)-Signalkaskade eine verstärkte Phosphorylierung von Phospholamban und Troponin I und damit ein verstärktes cAMP/PKA-Signal als Beweis für eine verbesserte ventrikuläre Kontraktibilität (Inotropie) und Entspannung (Lusitropie) (Abbildung 45). Darüber hinaus konnte eine verstärkte Aktivierung des Transkriptionsfaktors CREB durch PKA während der Musclin-Überexpression festgestellt werden. Dies ist nicht nur wichtig für die Regulation der Gentranskription, sondern auch für die Regulation der Immunreaktion. Durch Phosphorylierung von CREB werden pro-inflammatorische Reaktionen begrenzt (Wen *et al.* 2010). Weitere Studien berichten, dass CREB eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der normalen Funktion und Struktur des Herzens spielt (Fentzke *et al.* 1998; Williams and Ford 2001; Ichiki 2006; Watson *et al.* 2010). In diesem Zusammenhang zeigte höchstwahrscheinlich auch die erhöhte Aktivierung von CREB während der Musclin-Überexpression eine kardio-protective Wirkung.

5.3 Zusammenhang von Musclin mit dem natriuretischen Peptidsystem

Musclin ist ein bekannter Ligand des natriuretischen Clearance Rezeptors (NPR-C) und bindet an diesen mit hoher Affinität. Dabei blockiert Musclin den Abbau von natriuretischen Peptiden und erhöht somit deren Konzentration. Demzufolge könnte Musclin die physiologische Rolle der natriuretischen Peptide unterstützen. Die in dieser Arbeit gezeigte verstärkte Aktivierung des CNP-Signalwegs ist möglicherweise die Folge der kompetitiven Bindung von Musclin an NPR-C, wodurch die Degradierung und Internalisierung von CNP einge-

schränkt wird. Zusätzlich konnte in AAV6-Musclin behandelten Mäusen ein erhöhter kardialer CNP-Spiegel nachgewiesen werden, der bereits in früheren Studien belegt wurde (Kanai *et al.* 2017; Miyazaki *et al.* 2018). Der Konzentrationsanstieg von CNP korreliert ebenfalls mit dem erhöhten Musclin-Spiegel. Im Einklang mit dem erhöhten Plasma-Spiegel der natriuretischen Peptide durch Musclin-Überexpression in Mäusen wurde zusätzlich ein Anstieg von ANP im Blut gezeigt. Anhand der vorliegenden Ergebnisse lässt sich feststellen, dass Musclin die natriuretischen Peptid-abhängige Signalkaskade lokal verstärkt.

Neue Erkenntnisse von Adrian Hobbs zeigen, dass NPR-C nicht nur die natriuretischen Peptide bindet und abbaut, sondern auch die biologischen Aktivitäten der natriuretischen Peptide, insbesondere die vaskulären Wirkungen von endothelialelem CNP, vermittelt (Hobbs *et al.* 2004; Khambata *et al.* 2011; Conole *et al.* 2018). Es wurde bereits nachgewiesen, dass die Bindung an NPR-C eine Signalkaskade durch Aktivierung des G_i -Proteins induzieren kann, was zu einer Inhibierung der Adenylylcyclase führt und somit zu einem verringerten cAMP-Spiegel (Anand-Srivastava *et al.* 1996; Murthy and Makhlof 1999). Die Aktivierung des G_i -Proteins bewirkt auch die Entspannung der vaskulären glatten Muskulatur durch Wechselwirkung mit nach innen gerichteten Kaliumkanälen, die mit dem G-Proteingekoppelt sind (Conole *et al.* 2018). Durch die Bindung von Musclin an den NPR-C ist es in diesem Fall nicht ausgeschlossen, dass Musclin direkt Effekte über den NPR-C-Signalweg ausüben könnte. Dieser Signalweg müsste jedoch genauer untersucht werden und ist für diese Studie vermutlich nicht relevant, da Musclin in Gegenwart von CNP einen erhöhten cAMP-Spiegel und somit eine verstärkte Kontraktilität in Kardiomyozyten auslöst (Abbildung 44). Darüber hinaus wurden diese positiven Eigenschaften von Musclin durch einen NPR-B-Rezeptorantagonist vollständig aufgehoben. Dies zeigt, dass Musclin den NPR-B- und nicht den NPR-A- oder den NPR-C-Signalweg verstärkt aktiviert (Abbildung 40).

5.4 PDE 3-Hemmung als therapeutischer Ansatz

Die Phosphodiesterase 3 (PDE3) bindet sowohl cAMP als auch cGMP und fördert deren Abbau, wobei cAMP schneller gebunden und hydrolysiert wird. Infolgedessen wirkt cGMP als kompetitiver Inhibitor der cAMP-Hydrolyse und beeinflusst somit positiv die

cGMP/cAMP-Interaktion (Degerman *et al.* 1997). Interessanterweise wurde kürzlich gezeigt, dass die Verstärkung der cGMP/cAMP-Interaktion für die Kompensation der Herzfunktion während der Druckbelastung verantwortlich ist, bevor sich bei Mäusen eine Herzinsuffizienz entwickelt (Perera *et al.* 2015). In dieser Arbeit gelang der Nachweis, dass aus dem Skelettmuskel sezerniertes Musclin über einen ähnlichen Mechanismus wie der PDE3-Inhibitor wirkt (Abbildung 44, Abbildung 46). Obwohl die Verabreichung von PDE3-Inhibitoren sowohl die Kontraktilität als auch die Lusitropie bei Nagetieren und bei Patienten verstärkt (Stehlik and Movsesian 2006; Qvigstad *et al.* 2010; Hoffman 2011; McMurray *et al.* 2012), erhöht die langfristige pharmakologische Behandlung mit zugelassenen PDE3-Inhibitoren (Amrinon, Cilostazol, Milrinon, Enoximon) die Häufigkeit von Arrhythmien und plötzlichen Herztod (Packer *et al.* 1991; Amsallem *et al.* 2005). Eine spezifische Ursache für die erhöhte Mortalität konnte bis jetzt nicht festgestellt werden. Es wird jedoch angenommen, dass ein anhaltender Anstieg des cAMP-Spiegels in Herzmuskelzellen durch PDE3-Hemmer dafür verantwortlich sein könnte (Movsesian and Kukreja 2011; Hofmann 2018).

Dies könnte gegen Therapieansätze mit Musclin sprechen, allerdings werden neue pharmakologische Interventionen gesucht, die auf die Phosphodiesterase 3 abzielen und wenig bis keine nachteiligen Wirkungen haben, um die Lebensqualität und das Überleben zu erhöhen (Movsesian 2015; Hoffman 2018). Da Musclin über einen indirekten Mechanismus die PDE3-Inhibierung bewirkt, indem es protektiv die CNP-Signalkaskade beeinflusst, könnte Musclin als neuer pharmakologischer Inhibitor der PDE3 genutzt werden. Eine Aktivierung der CNP-Signalkaskade durch Musclin hätte zusätzlich starke anti-fibrotische Effekte, welche bei den selektiven, in klinischen Studien getesteten PDE 3-Inhibitoren nicht bekannt sind. Musclin besitzt daher kombivorteilhafte Eigenschaften die PDE3 zu inhibieren und die Myokardfibrose zu mindern. Diesbezüglich sind weitere Studien in großen Tiermodellen der Herzinsuffizienz erforderlich, um diese Wirkmechanismen von Musclin zu bestätigen und die therapeutische Anwendung als PDE3-Inhibitor bei herzinsuffizienten Patienten zu gewährleisten (Movsesian 2015).

Die Forschungsgruppe von N. Mochizuki berichtete kürzlich, dass Musclin, welches in der Leber von transgenen Mäusen überexprimiert wurde, die Herzfunktion verbesserte und zu einer verminderten Herzhypertrophie nach einem Myokardinfarkt führte (Miyazaki *et al.* 2018). Der zugrunde liegende Mechanismus wurde jedoch nicht genauer untersucht. Die Untersuchungen der genannten Studie postulieren einen Wirkmechanismus von

Musclin über den ANP-Signalweg. In dieser Arbeit wurde jedoch bewiesen, dass eine verstärkt aktivierte CNP/NPR-B-Signalkaskade durch Musclin für die verbesserte Herzfunktion ursächlich ist und nicht die ANP/NPR-A-Signalkaskade. Außerdem wurden keine Auswirkungen von Musclin auf die Herzhypertrophie weder durch Überexpression mittels AAV6-Vektoren (Abbildung 22, Abbildung 25) noch durch die Deletion von Musclin in *knock-out* Mäusen beobachtet (Abbildung 32, Abbildung 34). Diese Diskrepanz könnte sowohl auf die unterschiedlichen Herzinsuffizienzmodelle als auch auf das unterschiedliche Ausmaß der Musclin-Überexpression zurückzuführen sein. In Bezug auf die Plasmaspiegel von Musclin zeigten Miyazaki und Kollegen eine mehr als zehnfache Erhöhung, während in dieser Arbeit die Erhöhung nach Musclin-Überexpression nur etwa doppelt so hoch war (Abbildung 21). Eine weitere Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse könnte möglicherweise die unterschiedliche Prozessierung und Spaltung sowie folgende Freisetzung der Musclin-Fragmente je nach Produktionsort sein. Da die Musclin-Sequenz zwei homologe Domänen am C-terminalen Ende mit zwei möglichen Spaltungsstellen besitzt, könnte Musclin entweder als *full-length* Protein oder als prozessiertes Fragment mit nur einer homologen Domäne die CNP- oder ANP- abhängigen Effekte beeinflussen (Moffatt and Thomas 2009). Daher hat die transgene Überexpression von Musclin in der Leber von Miyazaki und Kollegen möglicherweise zu einer unterschiedlich prozessierten Form von Musclin geführt als die in dieser Arbeit angewandte eher physiologische Musclin-Überexpression im Skelettmuskel via AAV6-Vektoren.

5.5 Musclin und Fibrose

Neben den positiven inotropen Eigenschaften von skelettmuskelspezifischem Musclin wurden andere entscheidende protektive Wirkungen des untersuchten Proteins im Laufe dieser Arbeit ermittelt. Anhand der Ergebnisse konnte festgestellt werden, dass Musclin die Entstehung der Myokardfibrose während der chronischen Druckbelastung stark hemmt (Abbildung 26). Diese Fähigkeiten von Musclin haben ebenfalls zu einer Verbesserung der Herzfunktion beigetragen. Mechanistisch gesehen, deuten die Ergebnisse dieser Studie darauf hin, dass Musclin sowie auch CNP, welches von Fibroblasten exprimiert wird, auf kardiale Fibroblasten wirken und deren Proliferation und Migration *in vitro* hemmen kann.

Im Gegensatz zu *in vitro* Experimenten mit Kardiomyozyten, bei denen Musclin die Kontraktilität verstärkt, hatten Musclin und CNP einen ähnlichen inhibierenden Effekt auf die kardialen Fibroblasten ausgeübt. Es konnte jedoch keine verstärkte Minderung der Proliferation durch Musclin bei gleichzeitiger CNP-Stimulation festgestellt werden (Abbildung 49). Diese Beobachtung lässt sich damit erklären, dass die Fibroblasten im Gegensatz zu den Kardiomyozyten selbst CNP produzieren und somit kann deren Differenzierung durch CNP gehemmt werden (Li *et al.* 2015). Die Verminderung der Proliferation und Migration kann aus diesem Grund möglicherweise nicht durch zusätzliches externes CNP bei gleichzeitiger Musclin-Stimulation verstärkt werden. Jedoch zeigt die Behandlung von Fibroblasten allein mit Musclin den inhibierenden Effekt auf deren Aktivierung (Abbildung 49). Diese Ergebnisse legen nahe, dass Musclin mit dem in Fibroblasten vorhandenen CNP zusammenwirkt und die Fibroblastenaktivierung vermindert. Diese Inhibierung, sowohl durch CNP als auch durch Musclin konnte durch einen NPR-B-Antagonist vollständig aufgehoben werden (Abbildung 49, Abbildung 50). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass Musclin auch in den Fibroblasten den CNP/NPR-B-Signalweg verstärkt. Da die anti-fibrotischen Effekte von Musclin nach der Inhibierung der Proteinkinase G, die ebenfalls anti-fibrotisch wirkt (Matei *et al.* 2018), aufgehoben worden sind, lässt sich schlussfolgern, dass Musclin die Aktivierung von PKG indirekt reguliert.

Eine erhöhte Proliferation und Migration spiegelt die Aktivierung von Fibroblasten wieder, welche für die Bildung einer Myokardfibrose von großer Bedeutung sind. Dabei kommt es zur Phosphorylierung und gleichzeitiger Aktivierung der p38-mitogen-aktivierten Proteinkinase (p38-MAPK) in den kardialen Fibroblasten (Molkentin *et al.* 2017). In dieser Studie wurde p38 durch Musclin deutlich inhibiert (Abbildung 51). Interessanterweise ist PKG für seine anti-fibrotischen Wirkungen bekannt und kann die Aktivierung der p38-MAPK hemmen (Fiedler *et al.* 2006; Begonja *et al.* 2007), was auf einen durch Musclin induzierten CNP/NPR-B/PKG/p38 abhängigen Weg in kardialen Fibroblasten hindeutet. Den genaueren Mechanismus der vermittelten Musclin-Signaltransduktion müsste jedoch in primären kardialen Fibroblasten weiterhin untersucht werden.

5.6 Klinische Bedeutung

Aus klinischer Sicht, verbesserte die Überexpression von Musclin im Skelettmuskel die Herzfunktion und verminderte die Myokardfibrose. Da in dieser Arbeit gezeigt wurde, dass der endogene Musclin-Spiegel im Skelettmuskel bei der chronischen Herzinsuffizienz deutlich herabreguliert war, konnte die Musclin-Überexpression dem Fortschreiten der Erkrankung stark entgegenwirken. Als möglicher Therapieansatz wird körperliches Training bei herzinsuffizienten Patienten diskutiert (Gielen *et al.* 2012; Mann and Rosenzweig 2012). Zum einen wird dadurch die körperliche Leistungsfähigkeit verbessert, zum anderen könnten auch vermehrt schützende Myokine aus dem Muskel ausgeschüttet werden. In dieser Hinsicht wurde vor Kurzem gezeigt, dass körperliches Training bei Mäusen die Musclin-Expression in Muskeln erhöht (Subbotina *et al.* 2015). Im Einklang dieser Beobachtungen und denen dieser Arbeit ist es möglich, dass eine erhöhte skelettmuskelspezifische Musclin-Expression zu vermehrtem Muskelaufbau führt. Dieser wirkt wiederum positiv auf die Gesundheit von herzinsuffizienten Patienten und deren Lebensqualität steigert. Demzufolge könnte Musclin als eine mögliche Gentherapie bei Herzinsuffizienz mit Muskelschwund eingesetzt werden.

5.7 Fazit

Diese Arbeit bietet neue Einblicke in die Rolle von sezernierten Myokinen aus dem Skelettmuskel während der chronischen Herzinsuffizienz. Hier wurden bisher nicht beschriebenen Funktionen von Musclin aufgedeckt. Das untersuchte sezernierte Myokin Musclin aus der Skelettmuskulatur mildert die linksventrikuläre Dysfunktion durch Verstärkung des CNP/NPR-B-Signalwegs und vermittelt daraus resultierende positive Effekte auf die cGMP/cAMP-Interaktion in Kardiomyozyten. Darüber hinaus vermindert Musclin die Bildung der Myokardfibrose, indem durch indirekte Aktivierung von PKG die Signaltransduktion der p38-MAP-Kinase in kardialen Fibroblasten hemmt. Die Kommunikation zwischen der Skelettmuskulatur und des Herzens über Myokine konnte durch die AAV6-vermittelte Überexpression von Musclin im Skelettmuskel verstärkt werden. Dies könnte eine vielversprechende therapeutische Strategie zur Behandlung einer Herzinsuffizienz darstellen. Außerdem konnte durch diese Forschung der molekulare Mechanismus, über den Musclin wirkt, aufgeklärt werden (Abbildung 52).

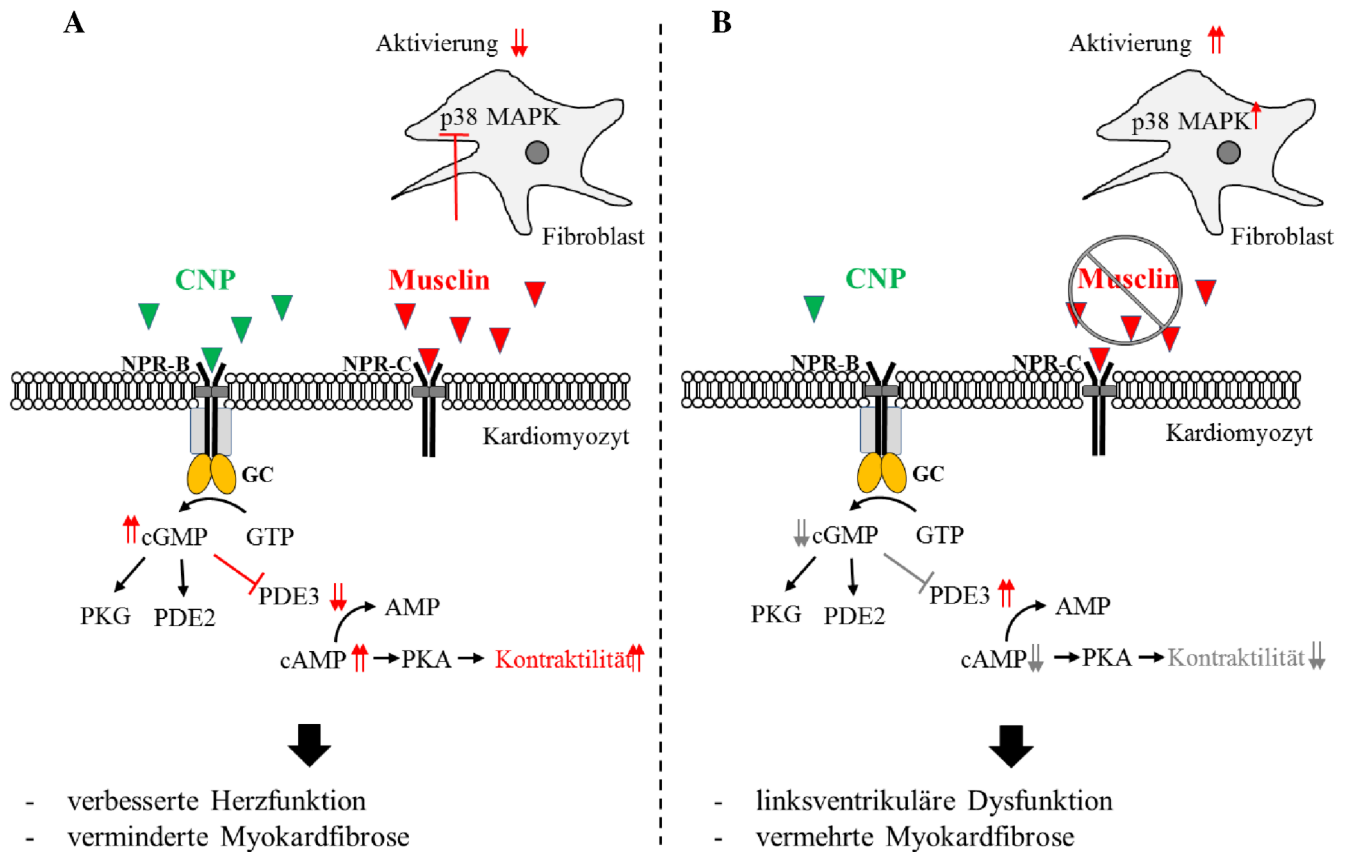


Abbildung 52 Molekularer Regulationsmechanismus von Musclin.

(A) Die Musclin-Überexpression im Skelettmuskel mildert die linksventrikuläre Dysfunktion und die Bildung der Myokardfibrose durch Verstärkung des CNP/NPR-B-Signalwegs und vermittelt positive Effekte auf die cGMP/cAMP-Interaktion in Kardiomyozyten. Musclin hemmt durch Aktivierung von PKG die Signaltransduktion der p38-MAP-Kinase in kardialen Fibroblasten. (B) Beim Musclindefizit werden diese positiven Eigenschaften aufgehoben.

5.8 Ausblick und Limitationen der Studie

Da kardiovaskuläre Erkrankungen eine der häufigsten Todesursachen in Westeuropa darstellen, ist die Entwicklung neuer Therapiestrategien von enormer Bedeutung. Die Herzinsuffizienz ist in fortgeschrittenen Stadien nicht heilbar, dennoch könnte die Progression der Erkrankung und die Entstehung der kardialen Kachexie wahrscheinlich verhindert werden.

Hierfür wurden in dieser Arbeit bis jetzt unbekannte kardio-protective Eigenschaften von Musclin aufgedeckt.

Musclin wird in geringeren Mengen in Knochen exprimiert. Da ein skelettmuskelspezifisches induzierbares Musclin *knock-out* Model verwendet wurde, konnte nicht ausgeschlossen werden, dass abgeleitetes Musclin aus den Knochen auch einen Einfluss auf das Herz haben könnte. Um dies zu verifizieren, müssen sich weitere *in vivo*-Studien mit einem spezifischen Knochen-Musclin *knock-out* anschließen. Darüber hinaus stellt sich die Frage, ob das Defizit an Musclin auch Auswirkungen auf die Funktion anderer wichtiger Organe haben könnte.

Um den gefundenen molekularen Mechanismus der Verstärkung der CNP/NPR-B-Signaltransduktion und den daraus resultierenden positiven Effekten auf die cGMP/cAMP-Interaktion durch Musclin weiter zu untermauern, sollte außerdem untersucht werden, ob sich die verstärkte Antwort durch Musclin in isolierten Kardiomyozyten auch nach Druckbelastung bestätigen lässt.

Weiterhin wäre es von Interesse den molekularen Mechanismus von Musclin in kardialen Fibroblasten genauer zu analysieren. Ein Schwerpunkt könnte auf der Aktivierung des TGF- β /Smad-Signalweges liegen. Musclin wirkt durch verstärkte CNP/NPR-B-Signaltransduktion positiv die cGMP/PKG-Interaktion in Fibroblasten. Dies führt zur indirekten Aktivierung von PKG, welche hinsichtlich der Aktivierung von Smad2/3 interessant ist. Studien haben bereits gezeigt, dass die Phosphorylierung von Smad3 an Serin 309/Threonin 388 durch PKG die Zellkern-Translokation von Smad3 durch TGF- β hemmt (Buxton and Duan 2008), was zu einer Verminderung der Fibroblasten-Aktivierung führte. Auch wurde vor Kurzem berichtet, dass die fibroblastenspezifische Deletion von Smad2/3 in Mäusen die Myokardfibrose verringert hat (Khalil *et al.* 2017). Welche zusätzlichen Effekte Musclin auf die Smad-Aktivierung hat, gilt es weiter zu erforschen.

Alle gezeigten Untersuchungen wurden anhand von Tierversuchen durchgeführt. Durch Tierversuche lassen sich meistens Wirkungen, die den Menschen betreffen, vorhersagen, jedoch sind weitere Analysen der Musclin-Expression in humanen Proben erforderlich. Um die Hypothese dieser Studie zu bestätigen, ist es von immenser Bedeutung die Musclin-Expression in humanen Skelettmuskel von herzinsuffizienten, kachektischen Patienten zu analysieren. Nicht jeder herzinsuffizienter Patient entwickelt eine kardiale Kachexie (Anker *et al.* 1997). Es stellt sich daher die Frage, ob einer Herabregulierung von Musclin in

welchen Patienten nachgewiesen werden kann, welche mit einer schlechteren Prognose korreliert.

Bislang wurden wenige Studien betreffend den Effekten von Musclin auf die Skelettmuskulatur durchgeführt. Subbotina und Kollegen haben gezeigt, dass Musclin die Biogenese von Mitochondrien in der Muskelzelle durch aktives Training in Mäusen fördert. Die histologischen Untersuchungen der Skelettmuskeln von Musclin *knock-out* Mäusen deuteten auf eine geringere Bildung der Muskelfasern Typ II A und B hin (Subbotina *et al.* 2015). Weiteren Analysen des Muskelfaserspektrums wurden jedoch nicht durchgeführt und könnten ein Gegenstand zukünftiger Forschung werden.

6 Literaturverzeichnis

- Ali SR, Ranjbarvaziri S, Talkhabi M, Zhao P, Subat A, Hojjat A, Kamran P, Müller AMS, Volz KS, Tang Z, Red-Horse K, Ardehali R (2014) Developmental Heterogeneity of Cardiac Fibroblasts Does Not Predict Pathological Proliferation and Activation. *Circ Res* 115:625–635 . doi: 10.1161/CIRCRESAHA.115.303794
- Amsallem E, Kasparian C, Haddour G, Boissel J-P, Nony P (2005) Phosphodiesterase III inhibitors for heart failure. *Cochrane Database Syst Rev* CD002230 . doi: 10.1002/14651858.CD002230.pub2
- Anand-Srivastava MB, Sehl PD, Lowe DG (1996) Cytoplasmic domain of natriuretic peptide receptor-C inhibits adenylyl cyclase. Involvement of a pertussis toxin-sensitive G protein. *J Biol Chem* 271:19324–9
- Anker S, Steinborn W, Strassburg S (2004) Cardiac cachexia. *Ann Med* 36:518–529 . doi: 10.1080/07853890410017467
- Anker SD, Morley JE (2015) Cachexia: a nutritional syndrome? *J Cachexia Sarcopenia Muscle* 6:269–271 . doi: 10.1002/jcsm.12088
- Anker SD, Ponikowski P, Varney S, Chua TP, Clark AL, Webb-Peploe KM, Harrington D, Kox WJ, Poole-Wilson PA, Coats AJ (1997) Wasting as independent risk factor for mortality in chronic heart failure. *Lancet* 349:1050–1053 . doi: 10.1016/S0140-6736(96)07015-8
- Aronsen JM, Louch WE, Sjaastad I (2016) Cardiomyocyte Ca²⁺ dynamics: clinical perspectives. *Scand Cardiovasc J* 50:65–77 . doi: 10.3109/14017431.2015.1136079
- Ataman B, Boulting GL, Harmin DA, Yang MG, Baker-Salisbury M, Yap E-L, Malik AN, Mei K, Rubin AA, Spiegel I, Duresi E, Sharma N, Hu LS, Pletikos M, Griffith EC, Partlow JN, Stevens CR, Adli M, Chahrour M, Sestan N, Walsh CA, Berezovskii VK, Livingstone MS, Greenberg ME (2016) Evolution of Osteocrin as an activity-regulated factor in the primate brain. *Nature* 539:242–247 . doi: 10.1038/nature20111
- Banerjee I, Fuseler JW, Price RL, Borg TK, Baudino TA (2007) Determination of cell types and numbers during cardiac development in the neonatal and adult rat and mouse. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293:H1883-91 . doi: 10.1152/ajpheart.00514.2007
- Barrère-Lemaire S, Piot CA, Leclercq F, Nargeot J, Richard S (2000) Facilitation of L-type calcium currents by diastolic depolarization in cardiac cells: impairment in heart failure. undefined
- Begonja AJ, Geiger J, Rukoyatkina N, Rauchfuss S, Gambaryan S, Walter U (2007)

- Thrombin stimulation of p38 MAP kinase in human platelets is mediated by ADP and thromboxane A₂ and inhibited by cGMP/cGMP-dependent protein kinase. *Blood* 109:616–618 . doi: 10.1182/blood-2006-07-038158
- Benjamin EJ, Virani SS, Callaway CW, Chamberlain AM, Chang AR, Cheng S, Chiuve SE, Cushman M, Delling FN, Deo R, de Ferranti SD, Ferguson JF, Fornage M, Gillespie C, Isasi CR, Jiménez MC, Jordan LC, Judd SE, Lackland D, Lichtman JH, Lisabeth L, Liu S, Longenecker CT, Lutsey PL, Mackey JS, Matchar DB, Matsushita K, Mussolino ME, Nasir K, O’Flaherty M, Palaniappan LP, Pandey A, Pandey DK, Reeves MJ, Ritchey MD, Rodriguez CJ, Roth GA, Rosamond WD, Sampson UKA, Satou GM, Shah SH, Spartano NL, Tirschwell DL, Tsao CW, Voeks JH, Willey JZ, Wilkins JT, Wu JH, Alger HM, Wong SS, Muntner P (2018) Heart Disease and Stroke Statistics—2018 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation* 137: . doi: 10.1161/CIR.0000000000000558
- Bers DM (2008) Calcium Cycling and Signaling in Cardiac Myocytes. *Annu Rev Physiol* 70:23–49 . doi: 10.1146/annurev.physiol.70.113006.100455
- Bers DM (2002a) Cardiac excitation–contraction coupling. *Nature* 415:198–205 . doi: 10.1038/415198a
- Bers DM (2002b) Calcium and cardiac rhythms: physiological and pathophysiological. *Circ Res* 90:14–7
- Biernacka A, Dobaczewski M, Frangogiannis NG (2011) TGF- β signaling in fibrosis. *Growth Factors* 29:196–202 . doi: 10.3109/08977194.2011.595714
- Birkeland JA, Sejersted OM, Taraldsen T, Sjaastad I (2005) EC-coupling in normal and failing hearts. *Scand Cardiovasc J* 39:13–23
- Bord S, Ireland DC, Moffatt P, Thomas GP, Compston JE (2005) Characterization of Osteocrin Expression in Human Bone. *J Histochem Cytochem* 53:1181–1187 . doi: 10.1369/jhc.4C6561.2005
- Bowers SLK, Banerjee I, Baudino TA (2010) The extracellular matrix: At the center of it all. *J Mol Cell Cardiol* 48:474–482 . doi: 10.1016/j.yjmcc.2009.08.024
- Breitbart A, Auger-Messier M, Molkenin JD, Heineke J (2011) Myostatin from the heart: local and systemic actions in cardiac failure and muscle wasting. *Am J Physiol Circ Physiol* 300:H1973–H1982 . doi: 10.1152/ajpheart.00200.2011
- Brenner BM, Ballermann BJ, Gunning ME, Zeidel ML (1990) Diverse biological actions of atrial natriuretic peptide. *Physiol Rev* 70:665–699 . doi: 10.1152/physrev.1990.70.3.665
- Brown RD, Ambler SK, Mitchell MD, Long CS (2005) THE CARDIAC FIBROBLAST:

- Therapeutic Target in Myocardial Remodeling and Failure. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 45:657–687 . doi: 10.1146/annurev.pharmtox.45.120403.095802
- Bui AL, Horwich TB, Fonarow GC (2011) Epidemiology and risk profile of heart failure. *Nat Rev Cardiol* 8:30–41 . doi: 10.1038/nrcardio.2010.165
- Burchfield JS, Xie M, Hill JA (2013) Pathological Ventricular Remodeling. *Circulation* 128:388–400 . doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.113.001878
- Buxton ILO, Duan D (2008) Cyclic GMP/Protein Kinase G Phosphorylation of Smad3 Blocks Transforming Growth Factor- β -Induced Nuclear Smad Translocation. *Circ Res* 102:151–153 . doi: 10.1161/CIRCRESAHA.107.170217
- Cabiati M, Sabatino L, Caruso R, Verde A, Caselli C, Prescimone T, Giannessi D, Del Ry S (2013) C-type natriuretic peptide transcriptomic profiling increases in human leukocytes of patients with chronic heart failure as a function of clinical severity. *Peptides* 47:110–114 . doi: 10.1016/J.PEPTIDES.2013.07.019
- Camelliti P, Borg T, Kohl P (2005) Structural and functional characterisation of cardiac fibroblasts. *Cardiovasc Res* 65:40–51 . doi: 10.1016/j.cardiores.2004.08.020
- Cantley LC (2002) The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* 296:1655–7 . doi: 10.1126/science.296.5573.1655
- Chen HH, Burnett JC (1998) C-type natriuretic peptide: the endothelial component of the natriuretic peptide system. *J Cardiovasc Pharmacol* 32 Suppl 3:S22-8
- Chen W-J, Liu Y, Sui Y-B, Yang H-T, Chang J-R, Tang C-S, Qi Y-F, Zhang J, Yin X-H (2017) Positive association between musclin and insulin resistance in obesity: evidence of a human study and an animal experiment. *Nutr Metab (Lond)* 14:46 . doi: 10.1186/s12986-017-0199-x
- Chiba A, Watanabe-Takano H, Terai K, Fukui H, Miyazaki T, Uemura M, Hashimoto H, Hibi M, Fukuhara S, Mochizuki N (2017) Osteocrin, a peptide secreted from the heart and other tissues, contributes to cranial osteogenesis and chondrogenesis in zebrafish. *Development* 144:334–344 . doi: 10.1242/dev.143354
- Conole D, Myers SH, Mota F, Hobbs AJ, Selwood DL (2018) Biophysical screening methods for extracellular domain peptide receptors, application to natriuretic peptide receptor C ligands. *Chem Biol Drug Des.* doi: 10.1111/cbdd.13395
- Conti M, Beavo J (2007) Biochemistry and Physiology of Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases: Essential Components in Cyclic Nucleotide Signaling. *Annu Rev Biochem* 76:481–511 . doi: 10.1146/annurev.biochem.76.060305.150444

- Davis J, Burr AR, Davis GF, Birnbaumer L, Molkenin JD (2012) A TRPC6-Dependent Pathway for Myofibroblast Transdifferentiation and Wound Healing In Vivo. *Dev Cell* 23:705–715 . doi: 10.1016/j.devcel.2012.08.017
- de Bold AJ, Borenstein HB, Veress AT, Sonnenberg H (2001) A rapid and potent natriuretic response to intravenous injection of atrial myocardial extract in rats. Reprinted from *Life Sci.* 28:89-94, 1981. *J Am Soc Nephrol* 12:403-9; discussion 403–8, 408–9
- Degerman E, Belfrage P, Manganiello VC (1997) Structure, localization, and regulation of cGMP-inhibited phosphodiesterase (PDE3). *J Biol Chem* 272:6823–6 . doi: 10.1074/JBC.272.11.6823
- Derynck R, Zhang YE (2003) Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF- β family signalling. *Nature* 425:577–584 . doi: 10.1038/nature02006
- Dickey DM, Flora DR, Bryan PM, Xu X, Chen Y, Potter LR (2007) Differential Regulation of Membrane Guanylyl Cyclases in Congestive Heart Failure: Natriuretic Peptide Receptor (NPR)-B, Not NPR-A, Is the Predominant Natriuretic Peptide Receptor in the Failing Heart. *Endocrinology* 148:3518–3522 . doi: 10.1210/en.2007-0081
- Dirkx E, da Costa Martins PA, De Windt LJ (2013) Regulation of fetal gene expression in heart failure. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis* 1832:2414–2424 . doi: 10.1016/J.BBADIS.2013.07.023
- Dostal D, Glaser S, Baudino TA (2015) Cardiac Fibroblast Physiology and Pathology. In: *Comprehensive Physiology*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, pp 887–909
- Drakos SG, Kfoury AG, Hammond EH, Reid BB, Revelo MP, Rasmusson BY, Whitehead KJ, Salama ME, Selzman CH, Stehlik J, Clayson SE, Bristow MR, Renlund DG, Li DY (2010) Impact of Mechanical Unloading on Microvasculature and Associated Central Remodeling Features of the Failing Human Heart. *J Am Coll Cardiol* 56:382–391 . doi: 10.1016/j.jacc.2010.04.019
- Eisner D, Bode E, Venetucci L, Trafford A (2013) Calcium flux balance in the heart. *J Mol Cell Cardiol* 58:110–117 . doi: 10.1016/j.yjmcc.2012.11.017
- Eisner DA, Caldwell JL, Kistamás K, Trafford AW (2017) Calcium and Excitation-Contraction Coupling in the Heart. *Circ Res* 121:181–195 . doi: 10.1161/CIRCRESAHA.117.310230
- Evans WJ, Morley JE, Argilés J, Bales C, Baracos V, Guttridge D, Jatoi A, Kalantar-Zadeh K, Lochs H, Mantovani G, Marks D, Mitch WE, Muscaritoli M, Najand A, Ponikowski P, Rossi Fanelli F, Schambelan M, Schols A, Schuster M, Thomas D, Wolfe R, Anker SD (2008) Cachexia: A new definition. *Clin Nutr* 27:793–799 . doi: 10.1016/J.CLNU.2008.06.013

- Fan D, Takawale A, Lee J, Kassiri Z (2012) Cardiac fibroblasts, fibrosis and extracellular matrix remodeling in heart disease. *Fibrogenesis Tissue Repair* 5:15 . doi: 10.1186/1755-1536-5-15
- Federmann M, Hess OM (1994) Differentiation between systolic and diastolic dysfunction. *Eur Heart J* 15 Suppl D:2–6
- Fentzke RC, Korcarz CE, Lang RM, Lin H, Leiden JM (1998) Dilated cardiomyopathy in transgenic mice expressing a dominant-negative CREB transcription factor in the heart. *J Clin Invest* 101:2415–2426 . doi: 10.1172/JCI2950
- Feske S, Rao A, Hogan PG (2007) The Ca²⁺–calcineurin–NFAT signalling pathway. *New Compr Biochem* 41:365–401 . doi: 10.1016/S0167-7306(06)41014-0
- Fiedler B, Feil R, Hofmann F, Willenbockel C, Drexler H, Smolenski A, Lohmann SM, Wollert KC (2006) cGMP-dependent protein kinase type I inhibits TAB1-p38 mitogen-activated protein kinase apoptosis signaling in cardiac myocytes. *J Biol Chem* 281:32831–40 . doi: 10.1074/jbc.M603416200
- Fischmeister R, Castro LRV, Abi-Gerges A, Rochais F, Jurevičius J, Leroy J, Vandecasteele G (2006) Compartmentation of Cyclic Nucleotide Signaling in the Heart. *Circ Res* 99:816–828 . doi: 10.1161/01.RES.0000246118.98832.04
- Frantz S, Klaiber M, Baba HA, Oberwinkler H, Völker K, Gaßner B, Bayer B, Abeßer M, Schuh K, Feil R, Hofmann F, Kuhn M (2013) Stress-dependent dilated cardiomyopathy in mice with cardiomyocyte-restricted inactivation of cyclic GMP-dependent protein kinase I. *Eur Heart J* 34:1233–1244 . doi: 10.1093/eurheartj/ehr445
- Fulster S, Tacke M, Sandek A, Ebner N, Tschöpe C, Doehner W, Anker SD, von Haehling S (2013) Muscle wasting in patients with chronic heart failure: results from the studies investigating co-morbidities aggravating heart failure (SICA-HF). *Eur Heart J* 34:512–519 . doi: 10.1093/eurheartj/ehs381
- Garbers DL (1991) Guanylyl cyclase-linked receptors. *Pharmacol Ther* 50:337–45
- Garbers DL, Lowe DG (1994) Guanylyl cyclase receptors. *J Biol Chem* 269:30741–4
- Garrington TP, Johnson GL (1999) Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Curr Opin Cell Biol* 11:211–218 . doi: 10.1016/S0955-0674(99)80028-3
- Gielen S, Sandri M, Kozarez I, Kratzsch J, Teupser D, Thiery J, Erbs S, Mangner N, Lenk K, Hambrecht R, Schuler G, Adams V (2012) Exercise Training Attenuates MuRF-1 Expression in the Skeletal Muscle of Patients With Chronic Heart Failure Independent of Age. *Circulation* 125:2716–2727 . doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.111.047381

- Godard MP, Whitman SA, Song Y-H, Delafontaine P (2012) Skeletal muscle molecular alterations precede whole-muscle dysfunction in NYHA Class II heart failure patients. *Clin Interv Aging* 7:489–97 . doi: 10.2147/CIA.S37879
- Gómez AM, Valdivia HH, Cheng H, Lederer MR, Santana LF, Cannell MB, McCune SA, Altschuld RA, Lederer WJ (1997) Defective excitation-contraction coupling in experimental cardiac hypertrophy and heart failure. *Science* 276:800–6
- Gorski PA, Ceholski DK, Hajjar RJ (2015) Altered Myocardial Calcium Cycling and Energetics in Heart Failure—A Rational Approach for Disease Treatment. *Cell Metab* 21:183–194 . doi: 10.1016/J.CMET.2015.01.005
- Hannema SE, van Duyvenvoorde HA, Prensler T, Yang R-B, Mueller TD, Gassner B, Oberwinkler H, Roelfsema F, Santen GWE, Prickett T, Kant SG, Verkerk AJMH, Uitterlinden AG, Espiner E, Ruivenkamp CAL, Oostdijk W, Pereira AM, Losekoot M, Kuhn M, Wit JM (2013) An Activating Mutation in the Kinase Homology Domain of the Natriuretic Peptide Receptor-2 Causes Extremely Tall Stature Without Skeletal Deformities. *J Clin Endocrinol Metab* 98:E1988–E1998 . doi: 10.1210/jc.2013-2358
- Heineke J, Auger-Messier M, Xu J, Sargent M, York A, Welle S, Molkentin JD (2010) Genetic deletion of myostatin from the heart prevents skeletal muscle atrophy in heart failure. *Circulation* 121:419–25 . doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.109.882068
- Heineke J, Molkentin JD (2006) Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7:589–600 . doi: 10.1038/nrm1983
- Henningsen J, Rigbolt KTG, Blagoev B, Pedersen BK, Kratchmarova I (2010) Dynamics of the Skeletal Muscle Secretome during Myoblast Differentiation. *Mol Cell Proteomics* 9:2482–2496 . doi: 10.1074/mcp.M110.002113
- Hill JA, Olson EN (2008) Cardiac Plasticity. *N Engl J Med* 358:1370–1380 . doi: 10.1056/NEJMra072139
- Hobai IA, O'Rourke B (2001) Decreased sarcoplasmic reticulum calcium content is responsible for defective excitation-contraction coupling in canine heart failure. *Circulation* 103:1577–84
- Hobbs A, Foster P, Prescott C, Scotland R, Ahluwalia A (2004) Natriuretic Peptide Receptor-C Regulates Coronary Blood Flow and Prevents Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury. *Circulation* 110:1231–1235 . doi: 10.1161/01.CIR.0000141802.29945.34
- Hoffman TM (2018) Phosphodiesterase Inhibitors. *Hear Fail Child Young Adult* 517–522 . doi: 10.1016/B978-0-12-802393-8.00040-5
- Hoffman TM (2011) Newer Inotropes in Pediatric Heart Failure. *J Cardiovasc Pharmacol*

58:121–125 . doi: 10.1097/FJC.0b013e3182163ba0

- Hofmann F (2018) A concise discussion of the regulatory role of cGMP kinase I in cardiac physiology and pathology. *Basic Res Cardiol* 113:31 . doi: 10.1007/s00395-018-0690-1
- Horio T, Tokudome T, Maki T, Yoshihara F, Suga S, Nishikimi T, Kojima M, Kawano Y, Kangawa K (2003) Gene Expression, Secretion, and Autocrine Action of C-Type Natriuretic Peptide in Cultured Adult Rat Cardiac Fibroblasts. *Endocrinology* 144:2279–2284 . doi: 10.1210/en.2003-0128
- Ichiki T (2006) Role of cAMP Response Element Binding Protein in Cardiovascular Remodeling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26:449–455 . doi: 10.1161/01.ATV.0000196747.79349.d1
- Ishizaka Y, Kangawa K, Minamino N, Ishii K, Takano S, Eto T, Matsuo H (1992) Isolation and identification of C-type natriuretic peptide in human monocytic cell line, THP-1. *Biochem Biophys Res Commun* 189:697–704
- Jessup M, Brozena S (2003) Heart Failure. *N Engl J Med* 348:2007–2018 . doi: 10.1056/NEJMra021498
- Kakkar R, Lee RT (2010) Intramyocardial Fibroblast Myocyte Communication. *Circ Res* 106:47–57 . doi: 10.1161/CIRCRESAHA.109.207456
- Kalra PR, Clague JR, Bolger AP, Anker SD, Poole-Wilson PA, Struthers AD, Coats AJ (2003) Myocardial production of C-type natriuretic peptide in chronic heart failure. *Circulation* 107:571–3
- Kanai Y, Yasoda A, Mori KP, Watanabe-Takano H, Nagai-Okatani C, Yamashita Y, Hirota K, Ueda Y, Yamauchi I, Kondo E, Yamanaka S, Sakane Y, Nakao K, Fujii T, Yokoi H, Minamino N, Mukoyama M, Mochizuki N, Inagaki N (2017) Circulating osteocrin stimulates bone growth by limiting C-type natriuretic peptide clearance. *J Clin Invest* 127:4136–4147 . doi: 10.1172/JCI94912
- Kapoun AM, Liang F, O’Young G, Damm DL, Quon D, White RT, Munson K, Lam A, Schreiner GF, Protter AA (2004) B-Type Natriuretic Peptide Exerts Broad Functional Opposition to Transforming Growth Factor- β in Primary Human Cardiac Fibroblasts. *Circ Res* 94:453–461 . doi: 10.1161/01.RES.0000117070.86556.9F
- Kass DA, Hare JM, Georgakopoulos D (1998) Murine Cardiac Function. *Circ Res* 82:519–522 . doi: 10.1161/01.RES.82.4.519
- Kehat I, Molkenin JD (2010) Molecular Pathways Underlying Cardiac Remodeling During Pathophysiological Stimulation. *Circulation* 122:2727–2735 . doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.110.942268

- Khalil H, Kanisicak O, Prasad V, Correll RN, Fu X, Schips T, Vagnozzi RJ, Liu R, Huynh T, Lee S-J, Karch J, Molkentin JD (2017) Fibroblast-specific TGF- β -Smad2/3 signaling underlies cardiac fibrosis. *J Clin Invest* 127:3770–3783 . doi: 10.1172/JCI94753
- Khambata RS, Panayiotou CM, Hobbs AJ (2011) Natriuretic peptide receptor-3 underpins the disparate regulation of endothelial and vascular smooth muscle cell proliferation by C-type natriuretic peptide. *Br J Pharmacol* 164:584–97 . doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01400.x
- Kimura K, Yamaguchi Y, Horii M, Kawata H, Yamamoto H, Uemura S, Saito Y (2007) ANP is cleared much faster than BNP in patients with congestive heart failure. *Eur J Clin Pharmacol* 63:699–702 . doi: 10.1007/s00228-007-0309-1
- Kita S, Nishizawa H, Okuno Y, Tanaka M, Yasui A, Matsuda M, Yamada Y, Shimomura I (2009) Competitive binding of musclin to natriuretic peptide receptor 3 with atrial natriuretic peptide. *J Endocrinol* 201:287–295 . doi: 10.1677/JOE-08-0551
- Kovács Á, Alogna A, Post H, Hamdani N (2016) Is enhancing cGMP-PKG signalling a promising therapeutic target for heart failure with preserved ejection fraction? *Neth Heart J* 24:268–74 . doi: 10.1007/s12471-016-0814-x
- Kuhn M (2016) Molecular Physiology of Membrane Guanylyl Cyclase Receptors. *Physiol Rev* 96:751–804 . doi: 10.1152/physrev.00022.2015
- Kuhn M (2003) Structure, Regulation, and Function of Mammalian Membrane Guanylyl Cyclase Receptors, With a Focus on Guanylyl Cyclase-A. *Circ Res* 93:700–709 . doi: 10.1161/01.RES.0000094745.28948.4D
- Kuschyk J, Rudic B, Liebe V, Tülümen E, Borggreffe M, Akin I (2018) Kardiale Kontraktilitätsmodulation zur Behandlung der chronischen Herzinsuffizienz. *Herzschrittmachertherapie + Elektrophysiologie* 29:369–376 . doi: 10.1007/s00399-018-0600-0
- Levine B, Kalman J, Mayer L, Fillit HM, Packer M (1990) Elevated Circulating Levels of Tumor Necrosis Factor in Severe Chronic Heart Failure. *N Engl J Med* 323:236–241 . doi: 10.1056/NEJM199007263230405
- Levitzki A (1988) From epinephrine to cyclic AMP. *Science* (80-) 241:800–806 . doi: 10.1126/SCIENCE.2841758
- Li P, Wang D, Lucas J, Oparil S, Xing D, Cao X, Novak L, Renfrow MB, Chen Y-F (2008a) Atrial Natriuretic Peptide Inhibits Transforming Growth Factor β -Induced Smad Signaling and Myofibroblast Transformation in Mouse Cardiac Fibroblasts. *Circ Res* 102:185–192 . doi: 10.1161/CIRCRESAHA.107.157677

- Li P, Wang D, Lucas J, Oparil S, Xing D, Cao X, Novak L, Renfrow MB, Chen Y-F (2008b) Atrial Natriuretic Peptide Inhibits Transforming Growth Factor β -Induced Smad Signaling and Myofibroblast Transformation in Mouse Cardiac Fibroblasts. *Circ Res* 102:185–192 . doi: 10.1161/CIRCRESAHA.107.157677
- Li Y-X, Cheng K-C, Asakawa A, Kato I, Sato Y, Amitani H, Kawamura N, Cheng J-T, Inui A (2013) Role of Musclin in the Pathogenesis of Hypertension in Rat. *PLoS One* 8:e72004 . doi: 10.1371/journal.pone.0072004
- Li Z-Q, Liu Y-L, Li G, Li B, Liu Y, Li X-F, Liu A-J (2015) Inhibitory effects of C-type natriuretic peptide on the differentiation of cardiac fibroblasts, and secretion of monocyte chemoattractant protein-1 and plasminogen activator inhibitor-1. *Mol Med Rep* 11:159–165 . doi: 10.3892/mmr.2014.2763
- Lin J-W, Tsai C-C, Chen L-J, Niu H-S, Chang CK, Niu C-S (2014) Characterization of Musclin as a New Target for Treatment of Hypertension. *Biomed Res Int* 2014:1–7 . doi: 10.1155/2014/354348
- Liu X, Sun SQ, Hassid A, Ostrom RS (2006) cAMP Inhibits Transforming Growth Factor-beta-Stimulated Collagen Synthesis via Inhibition of Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2 and Smad Signaling in Cardiac Fibroblasts. *Mol Pharmacol* 70:1992–2003 . doi: 10.1124/mol.106.028951
- Liu Y, Huo X, Pang X, Zong Z, Meng X, Liu G (2008) Musclin Inhibits Insulin Activation of Akt/Protein Kinase B in Rat Skeletal Muscle. *J Int Med Res* 36:496–504 . doi: 10.1177/147323000803600314
- Loncar G, Fülster S, von Haehling S, Popovic V (2013) Metabolism and the heart: An overview of muscle, fat, and bone metabolism in heart failure. *Int J Cardiol* 162:77–85 . doi: 10.1016/j.ijcard.2011.09.079
- MacLennan DH, Kranias EG (2003) Phospholamban: a crucial regulator of cardiac contractility. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4:566–577 . doi: 10.1038/nrm1151
- Maisel A, Mueller C, Nowak R, Peacock WF, Landsberg JW, Ponikowski P, Mockel M, Hogan C, Wu AHB, Richards M, Clopton P, Filippatos GS, Di Somma S, Anand I, Ng L, Daniels LB, Neath S-X, Christenson R, Potocki M, McCord J, Terracciano G, Kremastinos D, Hartmann O, von Haehling S, Bergmann A, Morgenthaler NG, Anker SD (2010) Mid-Region Pro-Hormone Markers for Diagnosis and Prognosis in Acute Dyspnea. *J Am Coll Cardiol* 55:2062–2076 . doi: 10.1016/j.jacc.2010.02.025
- Mann DL, Bristow MR (2005) Mechanisms and Models in Heart Failure. *Circulation* 111:2837–2849 . doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.104.500546
- Mann N, Rosenzweig A (2012) Can Exercise Teach Us How to Treat Heart Disease?

Circulation 126:2625–2635 . doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.111.060376

- Masuyama H, Tsuruda T, Sekita Y, Hatakeyama K, Imamura T, Kato J, Asada Y, Stasch J-P, Kitamura K (2009) Pressure-independent effects of pharmacological stimulation of soluble guanylate cyclase on fibrosis in pressure-overloaded rat heart. *Hypertens Res* 32:597–603 . doi: 10.1038/hr.2009.64
- Matei A-E, Beyer C, Györfi A-H, Soare A, Chen C-W, Dees C, Bergmann C, Ramming A, Friebe A, Hofmann F, Distler O, Schett G, Distler JHW (2018) Protein kinases G are essential downstream mediators of the antifibrotic effects of sGC stimulators. *Ann Rheum Dis* 77:459 . doi: 10.1136/annrheumdis-2017-212489
- McMurray JJV, Packer M, Desai AS, Gong J, Lefkowitz MP, Rizkala AR, Rouleau JL, Shi VC, Solomon SD, Swedberg K, Zile MR (2014) Angiotensin–Neprilysin Inhibition versus Enalapril in Heart Failure. *N Engl J Med* 371:993–1004 . doi: 10.1056/NEJMoa1409077
- McMurray JJ V., Adamopoulos S, Anker SD, Auricchio A, Bohm M, Dickstein K, Falk V, Filippatos G, Fonseca C, Gomez-Sanchez MA, Jaarsma T, Kober L, Lip GYH, Maggioni AP, Parkhomenko A, Pieske BM, Popescu BA, Ronnevik PK, Rutten FH, Schwitler J, Seferovic P, Stepinska J, Trindade PT, Voors AA, Zannad F, Zeiher A, Bax JJ, Baumgartner H, Ceconi C, Dean V, Deaton C, Fagard R, Funck-Brentano C, Hasdai D, Hoes A, Kirchhof P, Knuuti J, Kolh P, McDonagh T, Moulin C, Popescu BA, Reiner Z, Sechtem U, Sirnes PA, Tendera M, Torbicki A, Vahanian A, Windecker S, McDonagh T, Sechtem U, Bonnet LA, Avraamides P, Ben Lamin HA, Brignole M, Coca A, Cowburn P, Dargie H, Elliott P, Flachskampf FA, Guida GF, Hardman S, Iung B, Merkely B, Mueller C, Nanas JN, Nielsen OW, Orn S, Parissis JT, Ponikowski P (2012) ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur Heart J* 33:1787–1847 . doi: 10.1093/eurheartj/ehs104
- Meier S, Andressen KW, Aronsen JM, Sjaastad I, Hougen K, Skomedal T, Osnes J-B, Qvigstad E, Levy FO, Moltzau LR (2017) PDE3 inhibition by C-type natriuretic peptide-induced cGMP enhances cAMP-mediated signaling in both non-failing and failing hearts. *Eur J Pharmacol* 812:174–183 . doi: 10.1016/j.ejphar.2017.07.014
- Miller CL, Yan C (2010) Targeting Cyclic Nucleotide Phosphodiesterase in the Heart: Therapeutic Implications. *J Cardiovasc Transl Res* 3:507–515 . doi: 10.1007/s12265-010-9203-9
- Miyata S, Minobe W, Bristow MR, Leinwand LA (2000) Myosin heavy chain isoform expression in the failing and nonfailing human heart. *Circ Res* 86:386–90

- Miyazaki T, Otani K, Chiba A, Nishimura H, Tokudome T, Takano-Watanabe H, Matsuo A, Ishikawa H, Shimamoto K, Fukui H, Kanai Y, Yasoda A, Ogata S, Nishimura K, Minamino N, Mochizuki N (2018) A New Secretory Peptide of Natriuretic Peptide Family, Osteocrin, Suppresses the Progression of Congestive Heart Failure After Myocardial Infarction. *Circ Res* 122:742–751 . doi: 10.1161/CIRCRESAHA.117.312624
- Moffatt P, Thomas G, Sellin K, Bessette M-C, Lafrenière F, Akhouayri O, St-Arnaud R, Lanctôt C (2007) Osteocrin is a specific ligand of the natriuretic Peptide clearance receptor that modulates bone growth. *J Biol Chem* 282:36454–62 . doi: 10.1074/jbc.M708596200
- Moffatt P, Thomas GP (2009) Osteocrin – Beyond just another bone protein? *Cell Mol Life Sci* 66:1135–1139 . doi: 10.1007/s00018-009-8716-3
- Molkentin JD, Bugg D, Ghearing N, Dorn LE, Kim P, Sargent MA, Gunaje J, Otsu K, Davis J (2017) Fibroblast-Specific Genetic Manipulation of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase In Vivo Reveals Its Central Regulatory Role in Fibrosis. *Circulation* 136:549–561 . doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.116.026238
- Moltzau LR, Meier S, Aronsen JM, Afzal F, Sjaastad I, Skomedal T, Osnes J-B, Levy FO, Qvigstad E (2014) Differential regulation of C-type natriuretic peptide-induced cGMP and functional responses by PDE2 and PDE3 in failing myocardium. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 387:407–417 . doi: 10.1007/s00210-013-0953-1
- Moore-Morris T, Guimarães-Camboa N, Banerjee I, Zambon AC, Kisseleva T, Velayoudon A, Stallcup WB, Gu Y, Dalton ND, Cedenilla M, Gomez-Amaro R, Zhou B, Brenner DA, Peterson KL, Chen J, Evans SM (2014) Resident fibroblast lineages mediate pressure overload–induced cardiac fibrosis. *J Clin Invest* 124:2921–2934 . doi: 10.1172/JCI74783
- Movsesian M (2015) New pharmacologic interventions to increase cardiac contractility. *Curr Opin Cardiol* 30:285–291 . doi: 10.1097/HCO.0000000000000165
- Movsesian MA, Kukreja RC (2011) Phosphodiesterase Inhibition in Heart Failure. In: *Handbook of experimental pharmacology*. pp 237–249
- Mudd JO, Kass DA (2008) Tackling heart failure in the twenty-first century. *Nature* 451:919–928 . doi: 10.1038/nature06798
- Murthy KS, Makhlof GM (1999) Identification of the G protein-activating domain of the natriuretic peptide clearance receptor (NPR-C). *J Biol Chem* 274:17587–92
- Nadar S (2017) New Classification for Heart Failure with Mildly Reduced Ejection Fraction: Greater clarity or more confusion? *Sultan Qaboos Univ Med J* 17:e23–e26 . doi: 10.18295/squmj.2016.17.01.005

- Nagaya N, Moriya J, Yasumura Y, Uematsu M, Ono F, Shimizu W, Ueno K, Kitakaze M, Miyatake K, Kangawa K (2004) Effects of Ghrelin Administration on Left Ventricular Function, Exercise Capacity, and Muscle Wasting in Patients With Chronic Heart Failure. *Circulation* 110:3674–3679 . doi: 10.1161/01.CIR.0000149746.62908.BB
- Nikolaev VO, Bünemann M, Hein L, Hannawacker A, Lohse MJ (2004) Novel Single Chain cAMP Sensors for Receptor-induced Signal Propagation. *J Biol Chem* 279:37215–37218 . doi: 10.1074/jbc.C400302200
- Nikolaev VO, Gambaryan S, Lohse MJ (2006) Fluorescent sensors for rapid monitoring of intracellular cGMP. *Nat Methods* 3:23–25 . doi: 10.1038/nmeth816
- Nikolaev VO, Moshkov A, Lyon AR, Miragoli M, Novak P, Paur H, Lohse MJ, Korchev YE, Harding SE, Gorelik J (2010) 2-Adrenergic Receptor Redistribution in Heart Failure Changes cAMP Compartmentation. *Science* (80-) 327:1653–1657 . doi: 10.1126/science.1185988
- Nishizawa H, Matsuda M, Yamada Y, Kawai K, Suzuki E, Makishima M, Kitamura T, Shimomura I (2004) Musclin, a Novel Skeletal Muscle-derived Secretory Factor. *J Biol Chem* 279:19391–19395 . doi: 10.1074/jbc.C400066200
- Pacher P, Nagayama T, Mukhopadhyay P, Bátkai S, Kass DA (2008) Measurement of cardiac function using pressure–volume conductance catheter technique in mice and rats. *Nat Protoc* 3:1422–1434 . doi: 10.1038/nprot.2008.138
- Packer M, Carver JR, Rodeheffer RJ, Ivanhoe RJ, DiBianco R, Zeldis SM, Hendrix GH, Bommer WJ, Elkayam U, Kukin ML, Mallis GI, Sollano JA, Shannon J, Tandon PK, DeMets DL, Group* the PSR (1991) Effect of Oral Milrinone on Mortality in Severe Chronic Heart Failure. *N Engl J Med* 325:1468–1475 . doi: 10.1056/NEJM199111213252103
- Pedersen BK (2011) Muscles and their myokines. *J Exp Biol* 214:337–46 . doi: 10.1242/jeb.048074
- Perera RK, Sprenger JU, Steinbrecher JH, Hübscher D, Lehnart SE, Abesser M, Schuh K, El-Armouche A, Nikolaev VO (2015) Microdomain Switch of cGMP-Regulated Phosphodiesterases Leads to ANP-Induced Augmentation of β -Adrenoceptor-Stimulated Contractility in Early Cardiac Hypertrophy. *Circ Res* 116:1304–1311 . doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.306082
- Piepoli MF, Kaczmarek A, Francis DP, Davies LC, Rauchhaus M, Jankowska EA, Anker SD, Capucci A, Banasiak W, Ponikowski P (2006) Reduced Peripheral Skeletal Muscle Mass and Abnormal Reflex Physiology in Chronic Heart Failure. *Circulation* 114:126–134 . doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.105.605980

- Pierkes M, Gambaryan S, Bokník P, Lohmann SM, Schmitz W, Potthast R, Holtwick R, Kuhn M (2002) Increased effects of C-type natriuretic peptide on cardiac ventricular contractility and relaxation in guanylyl cyclase A-deficient mice. *Cardiovasc Res* 53:852–61
- Ponikowski P, Voors AA, Anker SD, Bueno H, Cleland JGF, Coats AJS, Falk V, González-Juanatey JR, Harjola V-P, Jankowska EA, Jessup M, Linde C, Nihoyannopoulos P, Parissis JT, Pieske B, Riley JP, Rosano GMC, Ruilope LM, Ruschitzka F, Rutten FH, van der Meer P, Filippatos G, McMurray JJ V, Aboyans V, Achenbach S, Agewall S, Al-Attar N, Atherton JJ, Bauersachs J, John Camm A, Carerj S, Ceconi C, Coca A, Elliott P, Erol Ç, Ezekowitz J, Fernández-Golfín C, Fitzsimons D, Guazzi M, Guenoun M, Hasenfuss G, Hindricks G, Hoes AW, Iung B, Jaarsma T, Kirchhof P, Knuuti J, Kolh P, Konstantinides S, Lainscak M, Lancellotti P, Lip GYH, Maisano F, Mueller C, Petrie MC, Piepoli MF, Priori SG, Torbicki A, Tsutsui H, van Veldhuisen DJ, Windecker S, Yancy C, Zamorano JL, Zamorano JL, Aboyans V, Achenbach S, Agewall S, Badimon L, Barón-Esquivias G, Baumgartner H, Bax JJ, Bueno H, Carerj S, Dean V, Erol Ç, Fitzsimons D, Gaemperli O, Kirchhof P, Kolh P, Lancellotti P, Lip GYH, Nihoyannopoulos P, Piepoli MF, Ponikowski P, Roffi M, Torbicki A, Vaz Carneiro A, Windecker S, Sisakian HS, Isayev E, Kurlianskaya A, Mullens W, Tokmakova M, Agathangelou P, Melenovsky V, Wiggers H, Hassanein M, Uuetoa T, Lommi J, Kostovska ES, Juillière Y, Aladashvili A, Luchner A, Chrysohoou C, Nyolczas N, Thorgeirsson G, Marc Weinstein J, Di Lenarda A, Aidargaliyeva N, Bajraktari G, Beishenkulov M, Kamzola G, Abdel-Massih T, Celutkiene J, Noppe S, Cassar A, Vataman E, Abir-Khalil S, van Pol P, Mo R, Straburzynska-Migaj E, Fonseca C, Chioncel O, Shlyakhto E, Otasevic P, Goncalvesová E, Lainscak M, Díaz Molina B, Schaufelberger M, Suter T, Yilmaz MB, Voronkov L, Davies C (2016) 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure. *Eur Heart J* 37:2129–2200 . doi: 10.1093/eurheartj/ehw128
- Porter KE, Turner NA (2009) Cardiac fibroblasts: At the heart of myocardial remodeling. *Pharmacol Ther* 123:255–278 . doi: 10.1016/j.pharmthera.2009.05.002
- Potter LR, Abbey-Hosch S, Dickey DM (2006) Natriuretic Peptides, Their Receptors, and Cyclic Guanosine Monophosphate-Dependent Signaling Functions. *Endocr Rev* 27:47–72 . doi: 10.1210/er.2005-0014
- Qvigstad E, Moltzau LR, Aronsen JM, Nguyen CHT, Hougen K, Sjaastad I, Levy FO, Skomedal T, Osnes J-B (2010) Natriuretic peptides increase β 1-adrenoceptor signalling in failing hearts through phosphodiesterase 3 inhibition. *Cardiovasc Res* 85:763–772 . doi: 10.1093/cvr/cvp364
- Rainer PP, Hao S, Vanhoutte D, Lee DI, Koitabashi N, Molkentin JD, Kass DA (2014) Cardiomyocyte-Specific Transforming Growth Factor β Suppression Blocks Neutrophil Infiltration, Augments Multiple Cytoprotective Cascades, and Reduces Early Mortality

- After Myocardial Infarction. *Circ Res* 114:1246–1257 . doi: 10.1161/CIRCRESAHA.114.302653
- Rao P, Monks DA (2009) A tetracycline-inducible and skeletal muscle-specific Cre recombinase transgenic mouse. *Dev Neurobiol* 69:401–406 . doi: 10.1002/dneu.20714
- Rockman HA, Ross RS, Harris AN, Knowlton KU, Steinhilber ME, Field LJ, Ross J, Chien KR (1991) Segregation of atrial-specific and inducible expression of an atrial natriuretic factor transgene in an in vivo murine model of cardiac hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:8277–81 . doi: 10.1073/pnas.88.21.9907a
- Sampson KJ, Kass RS (2010) Molecular mechanisms of adrenergic stimulation in the heart. *Hear Rhythm* 7:1151–1153 . doi: 10.1016/j.hrthm.2010.02.013
- Sandner P, Stasch JP (2017) Anti-fibrotic effects of soluble guanylate cyclase stimulators and activators: A review of the preclinical evidence. *Respir Med* 122:S1–S9 . doi: 10.1016/j.rmed.2016.08.022
- Sangaralingham SJ, McKie PM, Ichiki T, Scott CG, Heublein DM, Chen HH, Bailey KR, Redfield MM, Rodeheffer RJ, Burnett JC, Jr (2015) Circulating C-type natriuretic peptide and its relationship to cardiovascular disease in the general population. *Hypertens (Dallas, Tex 1979)* 65:1187–94 . doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.115.05366
- Schulze PC, Gielen S, Adams V, Linke A, Möbius-Winkler S, Erbs S, Kratzsch J, Hambrecht R, Schuler G (2003) Muscular levels of proinflammatory cytokines correlate with a reduced expression of insulinlike growth factor-I in chronic heart failure. *Basic Res Cardiol* 98:267–274 . doi: 10.1007/s00395-003-0411-1
- Scriven DRL, Dan P, Moore EDW (2000) Distribution of Proteins Implicated in Excitation-Contraction Coupling in Rat Ventricular Myocytes. *Biophys J* 79:2682–2691 . doi: 10.1016/S0006-3495(00)76506-4
- Segura AM, Frazier OH, Buja LM (2014) Fibrosis and heart failure. *Heart Fail Rev* 19:173–185 . doi: 10.1007/s10741-012-9365-4
- Shi Y, Massagué J (2003) Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 113:685–700
- Soeki T, Kishimoto I, Okumura H, Tokudome T, Horio T, Mori K, Kangawa K (2005) C-type natriuretic peptide, a novel antifibrotic and antihypertrophic agent, prevents cardiac remodeling after myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 45:608–616 . doi: 10.1016/J.JACC.2004.10.067
- Souders CA, Bowers SLK, Baudino TA (2009) Cardiac fibroblast: the renaissance cell. *Circ*

Res 105:1164–76 . doi: 10.1161/CIRCRESAHA.109.209809

- Stehlik J, Movsesian MA (2006) Inhibitors of cyclic nucleotide phosphodiesterase 3 and 5 as therapeutic agents in heart failure. *Expert Opin Investig Drugs* 15:733–742 . doi: 10.1517/13543784.15.7.733
- Stokke MK, Tovsrud N, Louch WE, Øyehaug L, Hougen K, Sejersted OM, Swift F, Sjaastad I (2013) I CaL inhibition prevents arrhythmogenic Ca²⁺ waves caused by abnormal Ca²⁺ sensitivity of RyR or SR Ca²⁺ accumulation. *Cardiovasc Res* 98:315–325 . doi: 10.1093/cvr/cvt037
- Strassburg S, Springer J, Anker SD (2005) Muscle wasting in cardiac cachexia. *Int J Biochem Cell Biol* 37:1938–1947 . doi: 10.1016/j.biocel.2005.03.013
- Subbotina E, Sierra A, Zhu Z, Gao Z, Koganti SRK, Reyes S, Stepniak E, Walsh SA, Acevedo MR, Perez-Terzic CM, Hodgson-Zingman DM, Zingman L V. (2015) Musclin is an activity-stimulated myokine that enhances physical endurance. *Proc Natl Acad Sci* 112:16042–16047 . doi: 10.1073/pnas.1514250112
- Suga S, Nakao K, Hosoda K, Mukoyama M, Ogawa Y, Shirakami G, Arai H, Saito Y, Kambayashi Y, Inouye K (1992a) Receptor selectivity of natriuretic peptide family, atrial natriuretic peptide, brain natriuretic peptide, and C-type natriuretic peptide. *Endocrinology* 130:229–239 . doi: 10.1210/endo.130.1.1309330
- Suga S, Nakao K, Itoh H, Komatsu Y, Ogawa Y, Hama N, Imura H (1992b) Endothelial production of C-type natriuretic peptide and its marked augmentation by transforming growth factor-beta. Possible existence of "vascular natriuretic peptide system". *J Clin Invest* 90:1145–9 . doi: 10.1172/JCI115933
- Suurmeijer AJ, Clément S, Francesconi A, Bocchi L, Angelini A, Van Veldhuisen DJ, Spagnoli LG, Gabbiani G, Orlandi A (2003) α -Actin isoform distribution in normal and failing human heart: a morphological, morphometric, and biochemical study. *J Pathol* 199:387–397 . doi: 10.1002/path.1311
- Swedberg K, Cleland J, Dargie H, Drexler H, Follath F, Komajda M, Tavazzi L, Smiseth OA, Gavazzi A, Haverich A, Hoes A, Jaarsma T, Korewicki J, Lévy S, Linde C, Lopez-Sendon J-L, Nieminen MS, Piérard L, Remme WJ (2005) Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic heart failure: executive summary (update 2005). *Eur Heart J* 26:1115–1140 . doi: 10.1093/eurheartj/ehi204
- Thomas G, Moffatt P, Salois P, Gaumont M-H, Gingras R, Godin É, Miao D, Goltzman D, Lanctôt C (2003) Osteocrin, a Novel Bone-specific Secreted Protein That Modulates the Osteoblast Phenotype. *J Biol Chem* 278:50563–50571 . doi: 10.1074/jbc.M307310200
- Travers JG, Kamal FA, Robbins J, Yutzey KE, Blaxall BC (2016) Cardiac Fibrosis: The

- Fibroblast Awakens. *Circ Res* 118:1021–40 . doi: 10.1161/CIRCRESAHA.115.306565
- Valentova M, von Haehling S, Krause C, Ebner N, Steinbeck L, Cramer L, Doehner W, Murin J, Anker SD, Sandek A (2013) Cardiac cachexia is associated with right ventricular failure and liver dysfunction. *Int J Cardiol* 169:219–224 . doi: 10.1016/j.ijcard.2013.08.134
- van der Wal HH, van Deursen VM, van der Meer P, Voors AA (2017) Comorbidities in Heart Failure. pp 35–66
- van Heerebeek L, Hamdani N, Falcão-Pires I, Leite-Moreira AF, Begieneman MPV, Bronzwaer JGF, van der Velden J, Stienen GJM, Laarman GJ, Somsen A, Verheugt FWA, Niessen HWM, Paulus WJ (2012) Low Myocardial Protein Kinase G Activity in Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. *Circulation* 126:830–839 . doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.111.076075
- von Haehling S (2015) The wasting continuum in heart failure: from sarcopenia to cachexia. *Proc Nutr Soc* 74:367–377 . doi: 10.1017/S0029665115002438
- von Haehling S, Anker MS, Anker SD (2016) Prevalence and clinical impact of cachexia in chronic illness in Europe, USA, and Japan: facts and numbers update 2016. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* 7:507–509 . doi: 10.1002/jcsm.12167
- von Haehling S, Ebner N, dos Santos MR, Springer J, Anker SD (2017) Muscle wasting and cachexia in heart failure: mechanisms and therapies. *Nat Rev Cardiol* 14:323–341 . doi: 10.1038/nrcardio.2017.51
- Walsh K (2009) Adipokines, myokines and cardiovascular disease. *Circ J* 73:13–8
- Wang B, Li J, Fu FH, Chen C, Zhu X, Zhou L, Jiang X, Xiao X (2008) Construction and analysis of compact muscle-specific promoters for AAV vectors. *Gene Ther* 15:1489–1499 . doi: 10.1038/gt.2008.104
- Watson PA, Birdsey N, Huggins GS, Svensson E, Heppe D, Knaub L (2010) Cardiac-specific overexpression of dominant-negative CREB leads to increased mortality and mitochondrial dysfunction in female mice. *Am J Physiol Circ Physiol* 299:H2056–H2068 . doi: 10.1152/ajpheart.00394.2010
- Weber KT, Sun Y, Bhattacharya SK, Ahokas RA, Gerling IC (2013) Myofibroblast-mediated mechanisms of pathological remodelling of the heart. *Nat Rev Cardiol* 10:15–26 . doi: 10.1038/nrcardio.2012.158
- Wen AY, Sakamoto KM, Miller LS (2010) The role of the transcription factor CREB in immune function. *J Immunol* 185:6413–9 . doi: 10.4049/jimmunol.1001829

- Wilkins BJ, Molckentin JD (2004) Calcium–calcineurin signaling in the regulation of cardiac hypertrophy. *Biochem Biophys Res Commun* 322:1178–1191 . doi: 10.1016/J.BBRC.2004.07.121
- Williams SD, Ford DA (2001) Calcium-independent phospholipase A₂ mediates CREB phosphorylation and *c-fos* expression during ischemia. *Am J Physiol Circ Physiol* 281:H168–H176 . doi: 10.1152/ajpheart.2001.281.1.H168
- Wollert KC, Fiedler B, Gambaryan S, Smolenski A, Heineke J, Butt E, Trautwein C, Lohmann SM, Drexler H (2002) Gene transfer of cGMP-dependent protein kinase I enhances the antihypertrophic effects of nitric oxide in cardiomyocytes. *Hypertens (Dallas, Tex 1979)* 39:87–92
- Wollert KC, Yurukova S, Kilic A, Begrow F, Fiedler B, Gambaryan S, Walter U, Lohmann SM, Kuhn M (2003) Increased effects of C-type natriuretic peptide on contractility and calcium regulation in murine hearts overexpressing cyclic GMP-dependent protein kinase I. *Br J Pharmacol* 140:1227 . doi: 10.1038/SJ.BJP.0705567
- Yano M, Ikeda Y, Matsuzaki M (2005) Altered intracellular Ca²⁺ handling in heart failure. *J Clin Invest* 115:556–64 . doi: 10.1172/JCI24159
- Yasui A, Nishizawa H, Okuno Y, Morita K, Kobayashi H, Kawai K, Matsuda M, Kishida K, Kihara S, Kamei Y, Ogawa Y, Funahashi T, Shimomura I (2007) Foxo1 represses expression of musclin, a skeletal muscle-derived secretory factor. *Biochem Biophys Res Commun* 364:358–65 . doi: 10.1016/j.bbrc.2007.10.013
- Yu J, Zheng J, Liu XF, Feng ZL, Zhang XP, Cao LL, Zhou ZP (2016) Exercise improved lipid metabolism and insulin sensitivity in rats fed a high-fat diet by regulating glucose transporter 4 (GLUT4) and musclin expression. *Brazilian J Med Biol Res* 49:e5129 . doi: 10.1590/1414-431X20165129
- Zaccolo M, Movsesian MA (2007) cAMP and cGMP Signaling Cross-Talk. *Circ Res* 100:1569–1578 . doi: 10.1161/CIRCRESAHA.106.144501
- Zhang H, Chen X, Gao E, MacDonnell SM, Wang W, Kolpakov M, Nakayama H, Zhang X, Jaleel N, Harris DM, Li Y, Tang M, Berretta R, Leri A, Kajstura J, Sabri A, Koch WJ, Molckentin JD, Houser SR (2010) Increasing cardiac contractility after myocardial infarction exacerbates cardiac injury and pump dysfunction. *Circ Res* 107:800–9 . doi: 10.1161/CIRCRESAHA.110.219220
- Zhang Q, Moalem J, Tse J, Scholz PM, Weiss HR (2005) Effects of natriuretic peptides on ventricular myocyte contraction and role of cyclic GMP signaling. *Eur J Pharmacol* 510:209–215 . doi: 10.1016/j.ejphar.2005.01.031
- Ziaeeian B, Fonarow GC (2016) Epidemiology and aetiology of heart failure. *Nat Rev Cardiol*

13:368–78 . doi: 10.1038/nrcardio.2016.25

Zincarelli C, Soltys S, Rengo G, Rabinowitz JE (2008) Analysis of AAV serotypes 1-9 mediated gene expression and tropism in mice after systemic injection. *Mol Ther* 16:1073–1080 . doi: 10.1038/mt.2008.76

7 Anhang

Tabelle 43 Echokardiographische Parameter nach AAV6-vermittelter Musclin-Überexpression in WT Mäusen 3, 6 und 9 Wochen nach transversaler Aortenkonstriktion (TAC) dargestellt als Mittelwert \pm SEM.

	Zeit nach OP [Wochen]	Sham		TAC	
		AAV Control n = 5	AAV Musclin n = 5	AAV Control n = 17	AAV Musclin n = 15
Ejektionsfraktion [%]	3	65,1 \pm 2,2	66,13 \pm 1,9	33,1 \pm 2,9	42,9 \pm 3,9
LVEDA [mm]		10,8 \pm 0,5	10 \pm 0,5	13 \pm 1	13,2 \pm 0,9
Wanddicke [mm]		0,6 \pm 0,02	0,7 \pm 0,04	0,9 \pm 0,04	0,9 \pm 0,03
Herzfrequenz [Schläge pro Minute]		571 \pm 17	577 \pm 9	553 \pm 10	570 \pm 7
Ejektionsfraktion [%]	6	68,7 \pm 2,1	67,7 \pm 4,2	22,71 \pm 3,4	39,4 \pm 3,8
LVEDA [mm]		10,5 \pm 0,6	10,1 \pm 0,5	17,8 \pm 2,3	15,2 \pm 1,8
Wanddicke [mm]		0,6 \pm 0,001	0,7 \pm 0,03	0,99 \pm 0,05	0,82 \pm 0,03
Herzfrequenz [Schläge pro Minute]		553 \pm 14	574 \pm 10	535 \pm 20	546 \pm 17
Ejektionsfraktion [%]	9	69,2 \pm 1,6	65,7 \pm 4	20,5 \pm 4,9	38,4 \pm 4,4
LVEDA [mm]		10,8 \pm 0,6	10,4 \pm 0,6	19,2 \pm 2,4	16,1 \pm 2,2
Wanddicke [mm]		0,65 \pm 0,01	0,67 \pm 0,04	0,95 \pm 0,07	0,94 \pm 0,05
Herzfrequenz [Schläge pro Minute]		528 \pm 5,4	543 \pm 12	563 \pm 19,5	569 \pm 12

Tabelle 44 Echokardiographische Parameter der Kontrollmäuse (WT) und der skelettmuskelspezifischen Musclin *knock-out* Mäuse 2 Wochen nach Scheinoperation (Sham) bzw. transversaler Aortenkonstriktion (TAC) dargestellt als Mittelwert \pm SEM.

	Sham		TAC	
	WT n = 6	KO n = 6	WT n = 18	KO n = 14
Ejektionsfraktion [%]	62 \pm 5	65,4 \pm 4	40,4 \pm 3	30 \pm 2,9
LVEDA [mm]	11,1 \pm 1	10,6 \pm 0,4	13,2 \pm 0,7	12 \pm 0,7
Wanddicke [mm]	0,6 \pm 0,04	0,6 \pm 0,03	0,8 \pm 0,03	0,8 \pm 0,03
Herzfrequenz [Schläge pro Minute]	548 \pm 8	567 \pm 18	551 \pm 10	561 \pm 14

8 Abkürzungsverzeichnis

µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromol
AAV	Adeno-assoziierte Viren
ACE	Angiotensin Converting Enzyme
Acta1	Alpha Skeletal Muscle Actin
AG	Arbeitsgruppe
AKT	Serin/Threonin Proteinkinase, PKB
AMCM	Adult Mouse Cardiac Myocyte
ANOVA	Analysis of Variance
ANP	Atriales Natriuretisches Peptid
AP	Aktionspotential
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bl%peak h	% Basis der Peak-Höhe der prozentualen Veränderung der Sarkomerlänge
BMI	Body-Mas-Index
BNP	Brain Natriuretic Peptide
bp	Base Pair (DNA)
BSA	Bovines Serum Albumin
BW	body weigth (Körpergewicht)
Ca ²⁺	Calcium-Ion
CaMKII	calcium/calmodulin dependent protein kinase II
cAMP	Zykliches Adenosinmonophosphat
cDNA	complementary DNA
CFP	Cyan Fluorescent Protein
cGKI	Proteinkinase I
cGMP	Zykliches Guanosinmonophosphat
CMV	cardiac cytomegalusvirus
CNP	C-Typ natriuretisches Peptid

Col1a1	Kollagen I
Col3a1	Kollagen III
Con	Control (Versuchskontrolle)
CRE	Cre-Rekombinase
CREB	cAMP response element-binding protein
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DCM	Dilatative Kardiomyopathie
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dP/dt	Druckanstieg im linken Ventrikel während der Systole
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
Echo	Echokardiographie
ECM	Extrazelluläre Matrix
EIA	Enzymimmunoassay
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
ERK	Extracellular-signal Regulated Kinase
FAC	fractional area change (Flächenänderungsrate)
FBS	Fetal Bovine Serum
FOXO	Forkhead-Box-Protein
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
g	Gramm
G	Gauge
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
Gastro	Muskel Gastrocnemius
GATA	GATA Binding Protein
GC	Guanylylcyclase
GFP	Green Fluorescent Protein
GSK3 β	Glykogensynthasekinase 3 β
GTP	Guanosintriphosphat
GTP	Guanosintriphosphat

h	Stunde
HEK293	Human Embryonic Kidney 293 cells
HFmrEF	Heart Failure with midrange Ejection fraction
HFpEF	Heart Failure with preserved Ejection fraction
HFrEF	Heart Failure with reduced Ejection fraction
HR	Homologer Region
hrluc	Renilla Luciferase
HRP	Horseradish Peroxidase
HSA	human α -skeletal actin
HW	Heart Weigth (Herzgewicht)
i.m.	intramuskulär
I-1	Proteinphosphataseinhibitor 1
ICM	Ischämische Kardiomyopathie
IGF-1	Insulin-like growth factor 1
IGFBP5	Insulin-like growth factor-binding protein 5
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
Iso	Isoproterenol, Isoprenalin
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
kDa	Kilo-Dalton
kg	Kilogramm
KO	<i>knock-out</i>
LAVES	Niedersächsisches Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit
Log	Logarithmus
LTCC	L-Typ Calciumkanal
LVEDA	linksventrikuläre end-diastolische Fläche
LVEDA	LV end-diastolic area
LVEF	Linksventrikuläre Ejektionsfraktion
LW	Lung Weigth (Lungengewicht)
M	Mol
m ²	Quadratmeter
mA	Milliampere

MAPK	mitogen-aktivierte Proteinkinase
MCK	Muskel-Kreatinkinase
MEM	Minimum Essential Media
MHC	Myosin Heavy Chain
MHH	Medizinische Hochschule Hannover
Min.	Minute
ml	Milliliter
MMP	Matrix-Metalloproteasen
mRNA	Messenger-RNA
Msc1	Musclin, Osteocrin
mTOR	Mammalian Target of Rapamycin
Myh6, α MHC	Myosin heavy chain α isoform
Myh7, β MHC	Myosin heavy chain β isoform
NCX	Natrium-Calcium-Austauscher
NFAT	Nuclear Factor of activated T-cells
ng	Nanogramm
nM	Nanomol
nm	Nanometer
NPR-A	Natriuretischer Peptid Rezeptor A
NPR-B	Natriuretischer Peptid Rezeptor B
NPR-C	Natriuretischer Peptid Rezeptor C
O.C.T.	Optimal cutting temperature compound
OD	Optische Dichte
Ostn	Osteocrin, Musclin
P13K	Phosphoinositid-3-Kinase
P19	NPR-B-Inhibitor
p38-MAPK	P38-mitogenaktivierte Proteinkinase
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDE	Phosphodiesterase
pg	Pikogramm
PKA	Proteinkinase A
PKB	Proteinkinase B/AKT

PKC	Proteinkinase C
PKG	Proteinkinase G
PLB	Phospholamban
PLC	Phospholipase C
PMCA	Plasmamembran-Calcium-ATPase
pmol	Pikomol
Postn	Periostin
PP1	Proteinphosphatase 1
qRT-PCR	real-time quantitative PCR
Quad	Muskel Quadrizeps
Rel.	relativ
RFP	Red Fluorescent Protein
RNASeq	RNA-Sequenzierungsanalyse
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
rtTA	reverse tetracycline-controlled transactivator
RyR	Ryanodin-Rezeptorkanal
SERCA2a	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase, Calciumpumpe des sarcoplasmatischen und endoplasmatischen Reticulums
Sham	Scheinoperation
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
TAC	transversale Aortenkonstriktion
TGF- β	Transforming growth factor β
TL	Tibiallänge
T _M	Schmelztemperatur
TN-C	Troponin C
TNF α	Tumornekrosefaktor alpha
TRPC-6	Transient receptor potential cation channel, subfamily C, member 6
u. a.	unter anderem
V	Volt
VASP	Vasodilatator-stimuliertes Phosphoprotein
WGA	Wheat Germ Agglutinin, Weizenkeimagglutinin
WT	Wildtyp

X	X-fache Verdünnung
YFP	Yellow Fluorescent Protein

9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Das kardiale <i>Remodeling</i>	4
Abbildung 2 Arten des linksventrikulären <i>Remodelings</i>	6
Abbildung 3 Signaltransduktion in der Hypertrophie	8
Abbildung 4 Bindungsspezifität der natriuretischen Peptide an Rezeptoren.	11
Abbildung 5 Aktivierung kardialer Fibroblasten.	14
Abbildung 6 Elektromechanische Kopplung und Kontraktion in Kardiomyozyten.	17
Abbildung 7 Interaktionen zwischen zwei Signalwegen während kardialer Kontraktilität.	18
Abbildung 8 Schematische Darstellung des sezernierten Musclin (Ostn)-Proteins mit Homologie zu den natriuretischen Peptiden.	24
Abbildung 9 Musclin <i>knock-out</i> Targeting Strategie.	43
Abbildung 10 Schematische Darstellung der Generierung von induzierbaren skelettmuskelspezifischen Musclin <i>knock-out</i> Maus.....	43
Abbildung 11 Agarose-Gelelektrophorese zur Bestimmung des Genotyps der Musclin WT und KO Mäuse.....	57
Abbildung 12 Transversale Aortenkonstriktion (TAC).	58
Abbildung 13 Experimenteller Zeitverlauf der Induktion kardialer Kachexie in der Maus. ...	64
Abbildung 14 Darstellung der linken Beinmuskulatur der Maus.....	64
Abbildung 15 Analysen des experimentellen Mausmodells der kardialen Kachexie.....	65
Abbildung 16 Visualisierung der RNA-Sequenzierungsanalyse der Genexpression des Muskel Quadrizeps nach chronischer Druckbelastung (TAC) und der Scheinoperation (Sham).....	66
Abbildung 17 Analyse der Musclin mRNA-Expression in verschiedenen Organen.....	67
Abbildung 18 Analyse der Musclin Expression im Muskel Quadrizeps während der kardialen Kachexie.	68
Abbildung 19 Zeitverlauf der Musclin-Expression in Skelettmuskeln während der Entwicklung der kardialen Kachexie.....	69
Abbildung 20 Experimenteller Zeitverlauf der skelettmuskelspezifischen Musclin- Überexpression mittels adeno-assoziierten Viren des Subtyps 6 (AAV6).....	70
Abbildung 21 Analysen der skelettmuskelspezifischen Musclin-Überexpression.	71

Abbildung 22 Auswirkungen der skelettmuskelspezifischen Musclin-Überexpression auf Entwicklung der Hypertrophie und des Lungenödems nach chronischer Druckbelastung (TAC) vs. Scheinoperation (Sham).	72
Abbildung 23 Quantitative Analyse der Expression embryonaler Gene.	73
Abbildung 24 Analyse der Herzfunktion nach chronischer Druckbelastung durch transversale Aortenkonstriktion und skelettmuskelspezifischer Musclin-Überexpression. .	75
Abbildung 25 Analyse der Hypertrophie auf zellulärer Ebene während skelettmuskelspezifischer Musclin-Überexpression.....	76
Abbildung 26 Sirius-Rot-Färbung der Herzgewebequerschnitte der AAV6-Musclin und AAV6-Control Mäuse.	77
Abbildung 27 Kontraktilitätsmessung an isolierten adulten Kardiomyozyten nach AAV6-vermittelter Überexpression von Musclin und chronischer Druckbelastung von 9 Wochen.	78
Abbildung 28 Analyse der Genexpression der natriuretischen Peptide und deren Rezeptoren im Herzen nach AAV6-vermittelter Überexpression von Musclin und chronischer Druckbelastung von 9 Wochen.	79
Abbildung 29 Analyse der Konzentration der natriuretischen Peptide nach der skelettmuskelspezifischen Musclin-Überexpression in scheinoperierten Mäusen.....	80
Abbildung 30 Experimenteller Zeitverlauf.	81
Abbildung 31 Analysen der Musclin-Expression nach Behandlung mit Doxycyclin.	82
Abbildung 32 Auswirkungen der skelettmuskelspezifischen Deletion von Musclin auf die Entwicklung der Hypertrophie und des Lungenödems nach zweiwöchiger Druckbelastung (TAC) oder Scheinoperation (Sham).	83
Abbildung 33 Quantitative Analyse der Expression embryonaler Gene.	84
Abbildung 34 Analyse der Hypertrophie auf zellulärer Ebene nach skelettmuskelspezifischer Deletion von Musclin.	85
Abbildung 35 Analyse der Herzfunktion nach skelettmuskelspezifischer Deletion von Musclin und zweiwöchiger Druckbelastung durch transversale Aortenkonstriktion (TAC) vs. Sham.	87
Abbildung 36 Sirius-Rot-Färbung und Expressionsanalysen der fibrotischen Gene.....	88
Abbildung 37 Analyse der Genexpression der natriuretischen Peptide im Herzen nach Musclin-Deletion und chronischer Druckbelastung von 2 Wochen.....	89

Abbildung 38 Schematische Darstellung der CNP/NPR-C-Signaltransduktion. Mechanismus verbesserter Kardiomyozytenkontraktilität durch Musclin.	90
Abbildung 39 Kontraktilitätsmessung adulter Kardiomyozyten nach Stimulation mit CNP und Musclin. Messung der Calciumkonzentration.	92
Abbildung 40 Kontraktilitätsmessung adulter Kardiomyozyten unter NPR-B-Inhibierung.	93
Abbildung 41 Kontraktilitätsmessung adulter Kardiomyozyten unter Musclin-Stimulation. .	94
Abbildung 42 Kontraktilitätsmessung adulter Kardiomyozyten unter ANP-Stimulation.	95
Abbildung 43 Kontraktilitätsmessung adulter Kardiomyozyten unter PKG-Inhibierung.	96
Abbildung 44 Analyse der cGMP- und cAMP-Dynamik in adulten Kardiomyozyten mittels Fluoreszenzresonanzenergietransfer (FRET) basierter Messung.	98
Abbildung 45 Western Blot-Analyse der Aktivität kontraktiler Proteine im Herzen nach chronischer Druckbelastung von 9 Wochen.	99
Abbildung 46 Kontraktilitätsmessung adulter Kardiomyozyten unter PDE 3-Hemmung.	100
Abbildung 47 Analyse der cGMP- und cAMP-Konzentration in adulten Kardiomyozyten der Musclin KO und WT Mäuse nach zweiwöchiger Druckbelastung.	101
Abbildung 48 Western Blot-Analyse der Phosphorylierung kontraktiler Proteine der Musclin KO und WT Mäuse nach 3 und 14 Tagen Druckbelastung.	102
Abbildung 49 Analyse der Proliferation primärer adulter Fibroblasten.	104
Abbildung 50 Analyse der Migration primärer adulter Fibroblasten.	105
Abbildung 51 Western Blot-Analyse der Aktivität der Mitogen-aktivierten Kinasen (ERK und p38) in primären Fibroblasten nach Musclin-Stimulation.	105
Abbildung 52 Molekularer Regulationsmechanismus von Musclin.	116

10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Geräte	27
Tabelle 2 Softwares	28
Tabelle 3 Materialien	29
Tabelle 4 Chemikalien	30
Tabelle 5 Inhibitoren	32
Tabelle 6 Kits	32
Tabelle 7 Zelllinien	33
Tabelle 8 Zellkulturmedien	33
Tabelle 9 Digestion Buffer (Langendorff)	33
Tabelle 10 10x Perfusion Buffer (Langendorff).....	33
Tabelle 11 1x Perfusion Buffer (Langendorff).....	34
Tabelle 12 Stop Buffer 1 (Langendorff).....	34
Tabelle 13 Stop Buffer 2 (Langendorff).....	34
Tabelle 14 Plating Medium (AMCM).....	34
Tabelle 15 Langzeitmedium (AMCM)	34
Tabelle 16 SADO-MIX Lösung (Fibroblasten)	35
Tabelle 17 Enzymlösung (Fibroblasten)	35
Tabelle 18 Sammelgel für 1 Gel	35
Tabelle 19 Trenngel für 1 Gel	35
Tabelle 20 Lysis-Puffer	36
Tabelle 21 5X Ladepuffer	36
Tabelle 22 10X SDS-Page Elektrophorese-Puffer	36
Tabelle 23 10X Western Blot Transfer-Puffer	36
Tabelle 24 10X TBS-T Western Blot Wasch-Puffer	36
Tabelle 25 LB-Medium	37
Tabelle 26 Agarplatten	37
Tabelle 27 Lösung A für DNA Isolierung	37
Tabelle 28 Lösung B für DNA Isolierung.....	38
Tabelle 29 TBE Puffer	38
Tabelle 30 TE Puffer	38
Tabelle 31 Vektoren	38

Tabelle 32 cDNA-Klone	38
Tabelle 33 Genotypisierungsprimer	39
Tabelle 34 Real Time-PCR Primer	39
Tabelle 35 Klonierungsprimer (Restriktionsschnittstellen sind kursiv markiert)	40
Tabelle 36 Primäre Antikörper	40
Tabelle 37 Sekundäre Antikörper (Western Blot).....	41
Tabelle 38 Sekundäre Antikörper für Immunhistochemie	41
Tabelle 39 Rekombinante Proteine	41
Tabelle 40 Bakterienstämme	42
Tabelle 41 Mausstämme.....	42
Tabelle 42 Färbeprotokoll der Sirius-Rot-Färbung	56
Tabelle 43 Echokardiographische Parameter nach AAV6-vermittelter Musclin-Überexpression in WT Mäusen 3, 6 und 9 Wochen nach transversaler Aortenkonstriktion (TAC) dargestellt als Mittelwert \pm SEM.	137
Tabelle 44 Echokardiographische Parameter der Kontrollmäuse (WT) und der skelettmuskelspezifischen Musclin <i>knock-out</i> Mäuse 2 Wochen nach Scheinoperation (Sham) bzw. transversaler Aortenkonstriktion (TAC) dargestellt als Mittelwert \pm SEM.	137

11 Publikationen und Konferenzbeiträge

Publikationen

Malgorzata Szaroszyk *, Badder Kattih *, Andrea Grund, Mortimer Korf-Klingebiel, Natali Froese, Xiaojing Luo, Michael Wagner, Julio Cordero, Robert Geffers, Sandor Batkai, Thomas Thum, Nadja Bork, Viacheslav O. Nikolaev, Oliver J. Müller, Hugo A. Katus, Ali El-Armouche, Gergana Dobрева, Kai C. Wollert, Johann Bauersachs, Joerg Heineke. „Skeletal muscle derived Musclin protects the heart during pathological overload.“ *Nature Communications* (Revision)

Grund, Andrea, **Malgorzata Szaroszyk**, Janina K Döppner, Mona Malek Mohammadi, Badder Kattih, Mortimer Korf-Klingebiel, Anna Gigina, *et al.* 2019. “A Gene Therapeutic Approach to Inhibit Calcium and Integrin Binding Protein 1 Ameliorates Maladaptive Remodelling in Pressure Overload.” *Cardiovascular Research* 115 (1): 71–82. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvy154>

Appari, Mahesh, Astrid Breitbart, Florian Brandes, **Malgorzata Szaroszyk**, Natali Froese, Mortimer Korf-Klingebiel, Mona Malek Mohammadi, *et al.* 2017. “C1q-TNF-Related Protein-9 Promotes Cardiac Hypertrophy and Failure.” *Circulation Research* 120 (1): 66–77. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.309398>

Zwadlo, Carolin *, Elisa Schmidtmann *, **Malgorzata Szaroszyk ***, Badder Kattih, Natali Froese, Hebke Hinz, Jan Dieter Schmitto, *et al.* 2015. “Antiandrogenic Therapy With Finasteride Attenuates Cardiac Hypertrophy and Left Ventricular Dysfunction.” *Circulation* 131 (12): 1071–81. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.114.012066>

Konferenzbeiträge

Szaroszyk M., Kattih B., Grund A., Gigina A., Korf-Klingebiel M., Bork N., Nikolaev V.O., Wagner M., El-Armouche A., Geffers R., Müller O., Jungmann A., Katus H.A., Wollert K.C., Bauersachs J., and Heineke J. “Muscle Musclin Protects the Heart During Pressure Overload Induced Chronic Heart Failure”. Herbsttagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie, Berlin 11.10.-13.10.2018 (2. Posterpreis)

Auszeichnungen

Posterpreis der Herbsttagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie (2. Preis) für “Muscle Musclin Protects the Heart During Pressure Overload Induced Chronic Heart Failure” (2018)

13 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all jenen danken, die mich im Rahmen dieser Doktorarbeit begleitet und unterstützt haben.

Besonders danken möchte ich meinem Mann Maik und meinem Sohn Til für die Unterstützung und vielen lieben Worte während der Erarbeitung meiner Dissertation.

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern Maria und Marian, die mich auf meinem Weg durch das Studium begleitet haben.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Jörg Heineke für die Überlassung des interessanten Themas und die Möglichkeit, diese Dissertation in seiner Arbeitsgruppe „Experimentelle Kardiologie“ anzufertigen. Ich möchte mich für seine engagierte und sehr gute fachliche Betreuung sowie die immerwährende Diskussionsbereitschaft herzlich bedanken.

Ich möchte mich bei Prof. Jörg Heineke und bei Prof. Nils von Neuhoff für die Übernahme der Gutachtertätigkeit bedanken.

Weiterhin möchte ich mich bei den vielen Kollegen für die Unterstützung bedanken.

Ich danke Dr. Badder Kattih und Dr. Mortimer Korf-Klingebiel für die echokardiographischen Untersuchungen.

Prof. Ali El-Armouche danke ich für die Möglichkeit der Messung der Kardiomyozytenkontraktilität sowie Dr. Badder Kattih für die Durchführung dieser Messung.

Bei Prof. Viacheslav O. Nikolaev möchte ich mich für die FRET-Analysen bedanken.

Ich danke Dr. Andreas Jungmann und Prof. Oliver J. Müller für die Generierung der Adeno-assoziierten Viren.

Mein großer Dank gilt Andrea Grund für die moralische Unterstützung und für die Hilfe bei den kleinen und großen Problemen im Laboralltag.

Ulrike Schrameck und Anna Gigina sowie allen weiteren Kollegen der Arbeitsgruppe danke ich für die Hilfsbereitschaft im Labor.

14 Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die Dissertation „Skelettmuskuläres Musclin als endokriner Regulator der Herzfunktion“ selbstständig verfasst habe.

Bei der Anfertigung wurden folgende Hilfen Dritter in Anspruch genommen: Dr. Badder Kattih und Dr. Mortimer Korf-Klingebl (Durchführung der echokardiographischen Untersuchungen), Dr. Andrea Grund (Langendorff), Dr. Sandor Batkai (Durchführung der invasiven Blutdruckmessung nach Musclin-Überexpression *in vivo*), Dr. Andreas Jungmann und Prof. Oliver J. Müller (Generierung der Adeno-assoziierten Viren), Prof. Ali El-Armouche und Dr. Badder Kattih (Durchführung der Kontraktilitätsmessung), Prof. Viacheslav O. Nikolaev (FRET-basierte Messung der cGMP-und cAMP-Dynamik).

Ich habe keine entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder anderer Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar entgeltliche Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Ich habe die Dissertation an folgender Institution angefertigt: Arbeitsgruppe Heineke: „Experimentelle Kardiologie“, Klinik für Kardiologie und Angiologie, Medizinische Hochschule Hannover.

Die Dissertation wurde bisher nicht für eine Prüfung oder Promotion oder für einen ähnlichen Zweck zur Beurteilung eingereicht.

Ich versichere, dass ich die vorstehenden Angaben nach bestem Wissen vollständig und der Wahrheit entsprechend gemacht habe.

Hannover, 08.05.2020 _____