

Diplomarbeit

**Altersassoziierte Veränderungen der Calcium-Homöostase und
Kontraktilität in Mauskarдиоmyozyten mit einer IGF-1-Rezeptor-
Überexpression**

eingereicht von

Jan Schafmeister

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der gesamten Heilkunde

(Dr. med. univ.)

an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt an der

Universitätsklinik für Innere Medizin

Klinische Abteilung für Kardiologie

unter der Anleitung der Betreuer

Assoz. Prof. Dr. Simon Sedej
Dr. Mahmoud Abdellatif

Graz, den 28.3.2023

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig, ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Graz, am 28.3.2023

Jan Schafmeister eh

Unterschrift

DANKSAGUNG

Schon immer hatte ich den Wunsch Medizin zu studieren und Arzt zu werden. Nach 3 Jahren Ausbildung und 6 Jahren Studium habe ich dieses Ziel nun erreicht und möchte Danke sagen. Danke an alle Menschen die mich in den letzten 9 Jahren unterstützt, motiviert, bei Rückschlägen aufgefangen und wieder aufgebaut haben. Allen voran möchte ich hier meine Familie und insbesondere meine Eltern nennen. Danke, dass ihr immer an mich geglaubt habt und mich bei allem unterstützt. Ohne euch würde ich heute nicht dort sein, wo ich mit Abschluss dieser Arbeit angekommen bin. Danke an alle Freunde, aus Ausbildung und Studium und meine WG in Graz, in welcher ich eine wundervolle Zeit verbringen durfte. Danke an meine Freundin Dana für die Unterstützung im Praktischen Jahr und bei der Fertigstellung dieser Arbeit. Und danke natürlich an alle ärztlichen Kolleginnen und Kollegen, Pflegekräfte, sowie Patientinnen und Patienten, von denen ich in den letzten Jahren so viel lernen durfte. Ganz besonderer Dank gilt auch meinen Betreuern Prof. Dr. Simon Sedej und Dr. Mahmoud Abdellatif, welche mich bei dieser Arbeit von Anfang an unterstützt haben und mich durch ihre freundschaftliche und kollegiale Art immer motiviert haben. Ebenfalls möchte ich der Medizinischen Universität Graz für den Erhalt des Förderungsstipendiums zur Fertigstellung dieser Arbeit danken.

INHALTSVERZEICHNIS

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

DANKSAGUNG

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ZUSAMMENFASSUNG/ABSTRACT

1. EINLEITUNG	1
1.1. ÜBERSICHT	1
1.2. CALCIUM-HOMÖOSTASE IN KARDIOMYOZYTEN	2
1.2.1. CALCIUM-HOMÖOSTASE IN DER SYSTOLE	2
1.2.2. CALCIUM-HOMÖOSTASE IN DER DIASTOLE	4
1.2.3. REGULATION DER SR-CALCIUM-KONZENTRATION	5
1.2.4. REGULATION DER CALCIUM-HOMÖOSTASE DURCH VERÄNDERUNG VON EXPRESSION UND AKTIVITÄT DER CALCIUM-REGULATIONS-PROTEINE	6
1.2.5. EINFLUSS VON MITOCHONDRIEN AUF DIE CALCIUM- HOMÖOSTASE	6
1.3. ALTERSASSOZIIERTE VERÄNDERUNGEN DER CALCIUM- HOMÖOSTASE	8
1.4. VERÄNDERUNGEN DER CALCIUM-HOMÖOSTASE BEI HERZINSUFFIZIENZ	9
1.5. DER IGF-1-SIGNALWEG	10
1.5.1. IGF-1 UND REGULATION DURCH DIE SOMATOTROPE ACHSE	11
1.5.2. IGF-1-TRANSPORT DURCH IGF-BINDUNGSPROTEINE	11
1.5.3. IGF-1-REZEPTOR UND INTRAZELLULÄRE SIGNALKASKADEN	12
1.5.4. PHOSPHOINOSITID-3-KINASE (PI3K)	13
1.5.5. PROTEINKINASE B (AKT)	13
1.5.6. LOKALISATION DES IGF-1-REZEPTORS	14
1.5.7. EFFEKTE VON IGF-1 AUF DIE KARDIALE PHYSIOLOGIE	15
1.5.7.1. <i>WACHSTUM</i>	15
1.5.7.2. <i>METABOLISMUS</i>	15
1.5.7.3. <i>ALTERUNG</i>	16
1.5.8. REGULATION & AUSWIRKUNGEN DES KARDIALEN IGF-1- SIGNALWEGS IM ALTER	18

1.6. HYPOTHESE DER DIPLOMARBEIT	21
2. MATERIAL UND METHODEN	22
2.1. MÄUSE	22
2.2. LÖSUNGEN	22
2.3. ZELLISOLATION	26
2.3.1. HERZENTNAHME UND KANÜLIERUNG	26
2.3.2. ENZYMATISCHE VERDAUUNG AM LANGENDORFF-SYSTEM	29
2.3.3. CALCIUM-AUFBAU	31
2.4. FÄRBUNG MIT FURA-2/AM	32
2.5. MIKROSKOP, FLUORESCENZ- UND KONTRAKTIONSMESSUNGEN	33
2.6. DATENANALYSE	34
2.7. GRAPHISCHE DARSTELLUNG UND STATISTISCHE ANALYSE	36
3. ERGEBNISSE	37
4. DISKUSSION	46
4.1. MÖGLICHE EINSCHRÄNKUNGEN (BIAS)	48
4.1.1. SYSTEMATISCHE BIAS	48
4.1.2. SELEKTIONSBIAS	49
5. LITERATURVERZEICHNIS	50
6. APPENDIX	69

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

	<u>Englisch</u>	<u>Deutsch</u>
ADP	Adenosine diphosphate	Adenosindiphosphat
Akt	Protein kinase B	Proteinkinase B
ATII	Angiotensin II	Angiotensin II
ATP	Adenosine triphosphate	Adenosintriphosphat
ATPase	Adenosine triphosphatase	Adenosintriphosphatase
Ca ²⁺	Calcium ion	Calcium-Ion
CaMKII	Ca ²⁺ /Calmodulin-dependent protein kinase type II	Ca ²⁺ /Calmodulin-abhängige Proteinkinase Typ II
cAMP	Cyclic adenosine monophosphate	Zyklisches Adenosinmonophosphat
CICR	Calcium-Induced Calcium Release	Calcium-induzierte Calcium- Freisetzung
DHPR	Dihydropyridine receptor	Dihydropyridinrezeptor
ERK	Extracellular-Signal- Regulated-Kinase	Extrazelluläre-Signal-regulierte- Kinase
GH	Growth Hormone	Wachstumshormon
Ghrelin	Growth hormone release inducing	Wachstumshormonausschüttung induzierendes Hormon
GHRH	Growth Hormone Releasing Hormone	Wachstumshormon freisetzendes Hormon
GPCR	G-protein coupled receptor	G-Protein gekoppelter Rezeptor
IGF-1	Insulin-like Growth Factor 1	Insulinähnlicher Wachstumsfaktor1
IGF-1R	Insulin-like Growth Factor 1 Receptor	Insulinähnlicher Wachstumsfaktor 1 Rezeptor
IGFBP	Insulin-like Growth Factor binding protein	Insulinähnlicher Wachstumsfaktor bindendes Protein
IL-1 α	Interleukin-1 α	Interleukin-1 α
IL-1 β	Interleukin-1 β	Interleukin-1 β
IL-6	Interleukin-6	Interleukin-6
InsP ₃	Inositol-1,4,5-triphosphate	Inositol-1,4,5-Triphosphat

IRS-1	Insulin receptor substrate-1	Insulinrezeptor Substrat-1
MAPK	Mitogen-activated protein kinase	Mitogenaktivierte Proteinkinase
MCU	Mitochondrial calcium uniporter	Mitochondrialer Calcium-Uniporter
Na ⁺	Sodium ion	Natrium-Ion
NAD ⁺	Nicotinamide adenine dinucleotide	Nikotinamidadenindinukleotid
NCX	Sodium-Calcium Exchanger	Natrium-Calcium-Austauscher
NF κ B	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells	Kernfaktor Kappa-Lichtketten-Verstärker aktivierter B-Zellen
PDK1	Phosphoinositide-dependent protein kinase-1	Phosphoinositidabhängige Proteinkinase-1
PI3K	Phosphoinositide-3-kinase	Phosphoinositid-3-Kinase
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PIP ₃	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate	Phosphatidylinositol-3,4,5-Trisphosphat
PKA	Protein kinase A	Proteinkinase A
PKB	Protein kinase B	Proteinkinase B
PLB	Phospholamban	Phospholamban
PLC	Phospholipase C	Phospholipase C
PMCA	Plasma Membrane Calcium Adenosin triphosphatase	Plasmamembran-Calcium-Adenosin triphosphatase
RANKL	Receptor activator of NF κ B Ligand	Rezeptor-Aktivator von NF κ B Ligand
RTK	Receptor tyrosine kinase	Rezeptortyrosinkinase
RyR2	Ryanodine receptor type 2	Ryanodinrezeptor Typ 2
ROS	Reactive Oxygen Species	Reaktive Sauerstoffspezies
SASP	Senescence-associated secretory phenotype	Seneszenz-assoziiertes sekretorischer Phänotyp

SERCA2a	Sarcoplasmic endoplasmic reticulum Ca ²⁺ ATPase 2a	Sarkoplasmatische/ Endoplasmatische Retikulum Ca ²⁺ ATPase 2a
TNF α	Tumor necrosis factor α	Tumornekrosefaktor α

ZUSAMMENFASSUNG

Der Insulinähnliche Wachstumsfaktor-1-Rezeptor (IGF-1R) ist ein wichtiger Regulator für Zellwachstum, Stoffwechsel und Alterung. In Anbetracht seiner Bedeutung für die Herzfunktion ist der IGF-1R-Signalweg ein potenzielles therapeutisches Ziel für altersbedingte Herzerkrankungen wie Herzinsuffizienz. Die Auswirkungen eines chronisch aktivierten IGF-1R-Signalwegs auf Kardiomyozyten sind im Zusammenhang mit der kardialen Alterung jedoch noch umstritten. Basierend auf unseren früheren In-vivo-Daten, welche zeigen, dass eine lebenslange IGF-1R-Überaktivierung im jungen Alter vorteilhafte bzw. im späteren Alter nachteilige Auswirkungen hat, stellten wir in der vorliegenden Arbeit die Hypothese auf, dass die Auswirkungen des aktivierten IGF-1R-Signalwegs in Kardiomyozyten auf die Ca^{2+} -Homöostase und Kontraktilität auch altersabhängig sind. Zu diesem Zweck verwendeten wir männliche und weibliche junge (3-6 Monate alt) und ältere Mäuse (18-20 Monate alt), welche IGF-1R spezifisch in Kardiomyozyten überexprimierten (IGF1R^{tg}). IGF1R^{tg}-Mäuse, die keine Anzeichen von Herzversagen aufwiesen, wurden mit altersgleichen Wildtyp-Wurfgeschwistern verglichen. Die Kardiomyozyten wurden mit Hilfe der Langendorff-Herzperfusion frisch isoliert und die Sarkomerverkürzung in Kombination mit intrazellulären Ca^{2+} -Veränderungen (FURA-2/AM) gleichzeitig bei verschiedenen Stimulationsfrequenzen (1-4 Hz) gemessen. Im Allgemeinen stellten wir fest, dass die Alterung einen stärkeren negativen Einfluss auf die Amplitude und die Kinetik der Sarkomerverkürzung und der Ca^{2+} -Transienten in IGF-1R-Kardiomyozyten im Vergleich zu WT-Zellen hatte. Unerwartet wurden in jungem Alter keine eindeutigen positiven Auswirkungen der IGF-1R-Signalübertragung auf die Kontraktilität und die Ca^{2+} -Homöostase festgestellt. Im hohen Alter war die Kontraktilitätskinetik in alten IGF-1R-Zellen jedoch beeinträchtigt, allerdings in Verbindung mit einer erhöhten Sarkomerverkürzung und maximalen Ca^{2+} -Transientenamplitude im Vergleich zu WT-Zellen. Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, dass bei alten IGF-1R-Mäusen ohne Anzeichen einer Herzinsuffizienz eine beeinträchtigte Kontraktionskinetik dem Abbau der kontraktilen Kraft und der maximalen Ca^{2+} -Amplitude vorausgeht. Zusammengefasst konnten wir zeigen, dass die Auswirkungen des aktivierten IGF-1R-Signalwegs in Kardiomyozyten auf die Ca^{2+} -Homöostase und Kontraktilität altersabhängig sind.

ABSTRACT

The insulin-like growth factor-1 receptor (IGF-1R) signaling is a key regulator of cellular growth, metabolism and aging. Considering its importance for cardiac function, the IGF-1R pathway is a potential therapeutic target for age-associated cardiac diseases, such as heart failure. However, the effects of chronically activated IGF-1R signaling on cardiomyocytes in the context of cardiac aging are still controversial. Based on our previous *in vivo* data showing that life-long IGF-1R overactivation exerts beneficial and detrimental effects at young and old age, respectively, we hypothesized in the present work that the effects of activated IGF-1R pathway in cardiomyocytes on Ca^{2+} homeostasis and contractility are age-dependent. For this purpose, we used male and female young (3-6 months old) and aged mice (18-20 months old) overexpressing IGF-1R specifically in cardiomyocytes (IGF1R^{tg}). IGF1R^{tg} mice with no signs of heart failure were compared with age-matched wild-type littermates. Cardiomyocytes were freshly isolated using Langendorff-based heart perfusion and their sarcomere shortening/re-lengthening in combination with intracellular Ca^{2+} changes (FURA-2/AM) were simultaneously measured at different pacing frequencies (1-4 Hz). In general, we found that aging had a stronger negative impact on the amplitude and kinetics of sarcomere shortening/re-lengthening and Ca^{2+} transients in IGF-1R cardiomyocytes as compared to WT cells. Surprisingly, no clear beneficial effects of IGF-1R signaling on contractility and Ca^{2+} homeostasis were detected at young age. At old age, however, the contractile kinetics were compromised in old IGF-1R cells, but associated with increased sarcomere shortening and peak Ca^{2+} transient amplitude as compared to WT cells. Our results suggest that impaired contractile kinetics precedes the decline of contractile force and peak Ca^{2+} amplitude in old IGF-1R mice at risk of heart failure. We conclude that life-long activation of IGF-1R pathway in cardiomyocytes exhibits age-dependent effects on cellular Ca^{2+} homeostasis and contractility (i.e. sarcomere shortening).

1. EINLEITUNG

1.1. ÜBERSICHT

In einer dem demographischen Wandel unterliegenden alternden Bevölkerung steigt mit zunehmendem Alter auch die Zahl an Patienten und Patientinnen mit Herzmuskelschwäche. Die Begriffe Alterung und Herzinsuffizienz sind eng miteinander verknüpft, da altersassoziierte zelluläre Veränderungen, wie beispielsweise eine gestörte Ca^{2+} -Homöostase in Kardiomyozyten, die elektromechanische Kopplung und hiermit einhergehend die Kontraktilität in Herzmuskelzellen negativ beeinflussen. Der Insulinähnliche Wachstumsfaktor 1 (IGF-1) ist ein wichtiger Regulator zellulärer Alterung, zellulären Wachstums und Stoffwechsels und stellt einen wichtigen Signalweg für Alterungsprozesse in Kardiomyozyten dar. In Zellen unterschiedlicher Gewebe von Säugetieren entfaltet dieses Protein über den IGF-1-Rezeptor pleiotrope Wirkungen. Im Folgenden wird die Physiologie des IGF-1-Signalwegs im Herzen dargestellt und einige seiner multiplen Effekte beschrieben (Abbildung 1). Hierbei sollen vor allem die Auswirkungen des IGF-1-Signalwegs auf die zelluläre, insbesondere die kardiale Alterung und die damit assoziierte Herzinsuffizienz näher betrachtet werden.

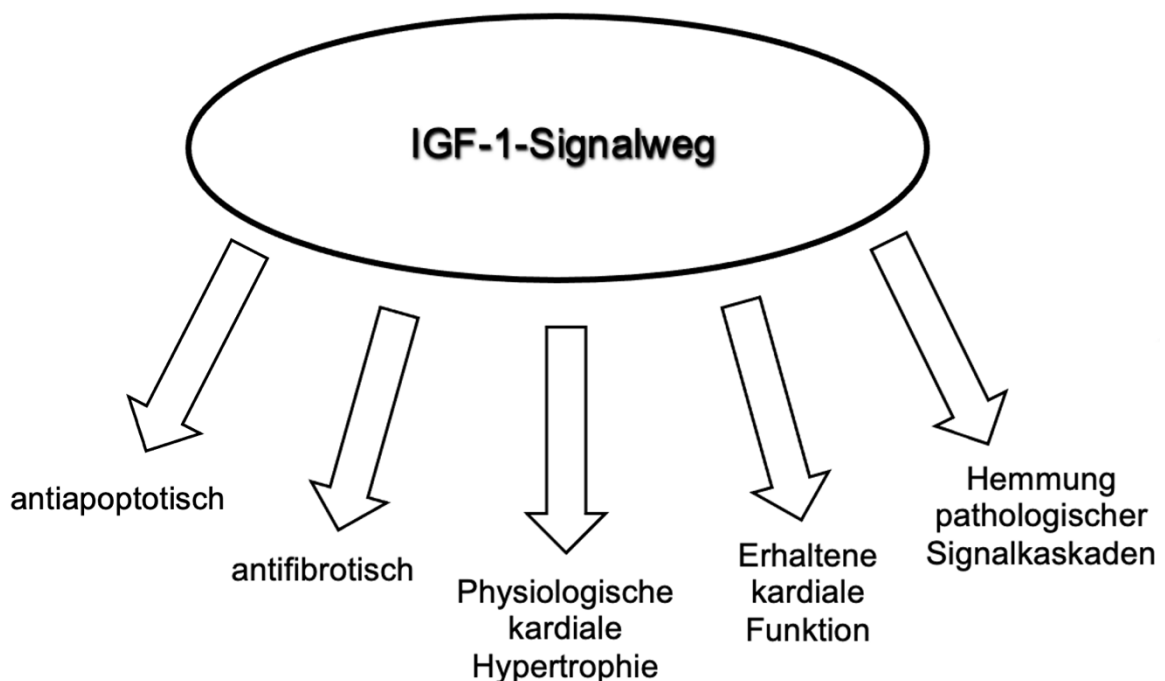


Abbildung 1: Effekte des IGF-1-Signalwegs im Herzen. Übernommen von McMullen, 2008

Der entstehende geringe Ca^{2+} -Einstrom dient vor allem als Auslöser für die massive Ca^{2+} -Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR), indem Ca^{2+} -Ionen den dort lokalisierten Ryanodinrezeptor Typ 2 (RyR2) aktivieren und öffnen. Der kardiale RyR2 stellt das größte Kanalprotein der Zelle dar und besitzt mehrere Phosphorylierungsstellen, welche unter anderem durch Proteinkinase A (PKA) und sekundäre intrazelluläre Messenger wie zyklische ADP-Ribose phosphoryliert werden, wodurch die Offenwahrscheinlichkeit dieses Kanals erhöht wird. (Macgregor *et al.*, 2006; Eisner, 2014) Durch eine erhöhte Offenwahrscheinlichkeit wird ein Ca^{2+} -Auswärtsstrom aus dem sarkoplasmatischen Retikulum generiert, welcher zu einem Anstieg der zytoplasmatischen Ca^{2+} -Konzentration führt und den Großteil des systolischen Ca^{2+} -Transienten ausmacht (Eisner, 2014). Die durch den Ca^{2+} -Einwärtsstrom vermittelte sarkoplasmatische Ca^{2+} -Freisetzung wird als Calcium-induzierte Calciumfreisetzung (calcium-induced calcium release, CICR) bezeichnet (Fabiato 1985; Bers, 2002; Eisner, 2014). Neben spannungsabhängigen L-Typ- Ca^{2+} -Kanälen befinden sich in Kardiomyozyten spannungsabhängige T-Typ- Ca^{2+} -Kanäle, deren Ca^{2+} -Einwärtsstrom jedoch sehr gering ist (Bers, 2002). Das freigesetzte Calcium bindet an Troponin C und ist somit direkter Aktivator der Myofilamente, welche durch die Ca^{2+} -Troponin-C-Bindung eine Kontraktion der Kardiomyozyten erzeugen. Die physiologische Kontraktion generiert isometrische Kraft und eine schnelle Verkürzung und kann über 2 Mechanismen ihre Stärke modulieren. Wie oben beschrieben, ist die Kontraktion stark abhängig von der Amplitude des Ca^{2+} -Transienten, so dass eine Änderung der Amplitude oder der Dauer des Transienten die Kontraktionsstärke beeinflusst. (Bers, 2002) Einen anderen Weg stellt die Adaptation der Ca^{2+} -Sensitivität der Myofilamente dar. So generiert eine Dehnung der Filamente eine größere Sensitivität und bedingt damit eine stärkere Kontraktion. Eine höhere Sensitivität wird ebenfalls durch Koffein und Inotropika (z.B. Dobutamin, Dopamin, Noradrenalin, Adrenalin) erzielt. Die Reduktion der Ca^{2+} -Sensitivität der Myofilamente wird durch lokale Veränderungen erzeugt, die beispielsweise im Rahmen einer Ischämie auftreten. Hierzu gehören die lokale Azidose, sowie erhöhte Phosphat- und Magnesiumkonzentrationen. Bei β -adrenerger Aktivierung wird die Ca^{2+} -Sensitivität herabgesetzt. (Bers, 2002)

1.2.2. CALCIUM-HOMÖOSTASE IN DER DIASTOLE

In der Diastole gilt es den Ausgangszustand, die ursprünglichen intra- und extrazellulären Ionenkonzentrationen und Gradienten entlang des Sarkolemms wiederherzustellen. Um den Ca^{2+} -Haushalt zu regulieren besitzen Kardiomyozyten drei Mechanismen (Abbildung 3).

(1) Zytoplasmatisches Ca^{2+} wird durch eine in der Membran des sarkoplasmatischen Retikulums lokalisierte ATPase 2a (SR- Ca^{2+} ATPase, SERCA2a) in das SR aufgenommen, wobei die SERCA2a-Aktivität neben der Ca^{2+} -Konzentration auch von dem Protein Phospholamban (PLB) moduliert wird. Unphosphoryliertes PLB hemmt die SERCA2a-Aktivität. (Tada & Katz, 1982; Bers, 2002; Eisner, 2014) Durch cAMP-abhängige PKA oder durch Calcium-Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaMKII) wird PLB phosphoryliert und somit aktiviert, beispielsweise bei der β -adrenergen Stimulation (Bers, 2002).

(2) Ein im Sarkolemm befindlicher $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher (NCX) transportiert im Austausch ein Ca^{2+} ins Zytosol und drei Na^+ in den extrazellulären Raum (sog. Vorwärtsmodus). Dieser NCX ist jedoch nicht nur in der Diastole (Relaxationsphase) aktiv, sondern besitzt auch einen sog. Rückwärtsmodus, womit er zu Beginn des Aktionspotenzials zum Ca^{2+} -Einstrom beiträgt (Abbildung 2).

(3) Neben dem NCX als Hauptmechanismus für den Ca^{2+} -Auswärtsstrom, spielt auch eine in der Plasmamembran lokalisierte Ca^{2+} -ATPase (PMCA) eine geringe Rolle, denn diese übernimmt in Ratten-Kardiomyozyten etwa 7-25% der NCX-Leistung im Vorwärtsmodus. (Bassani *et al.*, 1995; Choi & Eisner, 1999). Die beschriebenen Mechanismen führen zu einer Reduktion der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration in der Diastole, wodurch es auch zu einer Dissoziation von Ca^{2+} vom Troponin C kommt, was eine Relaxation der Kardiomyozyten begünstigt (Bers, 2002). Es folgt eine Refraktärzeit von ca. 300 ms bevor eine erneute Kontraktion generiert werden kann. Diese Refraktärzeit ist u.a. auf die Erschöpfung des SR- Ca^{2+} -Gehalts und die Erholung der RyR2-Verfügbarkeit zurückzuführen, wobei letztere neben einer schnellen Erholungszeit von 100-300 ms, über eine langsame Erholungszeit von mehreren Sekunden verfügt. (Satoh *et al.*, 1997; Sham *et al.*, 1998; Bers, 2002) Durch die Abnahme des SR- Ca^{2+} -Gehalts und die Inaktivierung der RyR2 wird der CICR unterbrochen, was die Voraussetzung für die Relaxation der Kardiomyozyten darstellt (Bers, 2002).

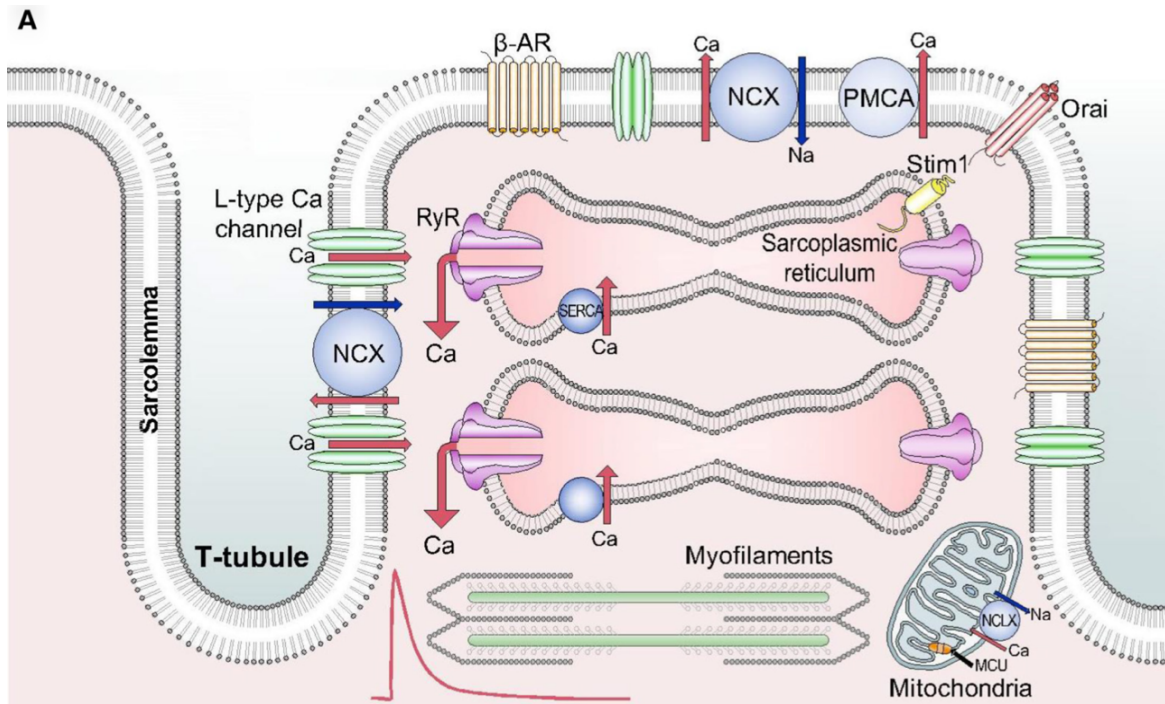


Abbildung 3: Schematische Darstellung der elektromechanischen Kopplung und wichtiger Mechanismen der zellulären Ca²⁺-Homöostase. Übernommen von Eisner *et al.*, 2017.

1.2.3. REGULATION DER SR-CALCIUM-KONZENTRATION

Neben der zytosmatischen Ca²⁺-Konzentration ist vor allem die Aufrechterhaltung des SR-Ca²⁺-Gehalts für die Kontraktilität der Kardiomyozyten essenziell. Wie oben erwähnt erfolgt die Ca²⁺-Aufnahme ins SR durch die SERCA2a, welche in ihrer Aktivität durch PLB moduliert wird. Der sarkoplasmatische Ca²⁺-Gehalt moduliert wiederum die RyR2-Öffnungswahrscheinlichkeit und den initialen Ca²⁺-Einwärtsstrom durch spannungsabhängige L-Typ-Ca²⁺-Kanäle. Ist die SR-Ca²⁺-Konzentration gering, so kommt es zu einer langsameren Inaktivierung des L-Typ-Ca²⁺-Kanals und einem vermehrten Ca²⁺-Einwärtsstrom, da die Ca²⁺-abhängige Inaktivierung aufgrund des kleineren Ca²⁺-Transients reduziert ist. (Sipido *et al.*, 1995; Adachi-Akahane *et al.*, 1996; Eisner, 2014) Ein kleinerer Ca²⁺-Transient bedingt ebenso eine reduzierte Aktivierung des NCX, wodurch der Ca²⁺-Efflux aus der Zelle vermindert wird. (Eisner, 2014) Insgesamt wird durch diese Regulationsmechanismen ein Anstieg des intrazellulären und sarkoplasmatischen Ca²⁺-Gehalts generiert, welcher wiederum den Ca²⁺-Auswärtsstrom erhöht und den Ca²⁺-Einwärtsstrom reduziert. (Trafford *et al.*, 1997; Eisner, 2014) Hierdurch wird ein starker negativer Feedback-Mechanismus zur Kontrolle des SR-Ca²⁺-Gehalts erzielt, der zu einer Abnahme des

Zell- und SR-Ca²⁺-Gehalts führt. Dieser wichtige Feedback-Mechanismus ist essenziell für die Schlag-zu-Schlag-Regulation der Ca²⁺-Konzentration im SR. (Eisner, 2014) An dieser Stelle wird deutlich, wie sehr die Feinmodulation des SR-Ca²⁺-Gehalts die Calcium-Homöostase der Kardiomyozyten beeinflusst und welche negativen Folgen eine gestörte Regulation des SR-Ca²⁺-Gehalts für die Zellintegrität und Kontraktilitätsfunktion darstellt.

1.2.4. REGULATION DER CALCIUM-HOMÖOSTASE DURCH VERÄNDERUNG VON EXPRESSION UND AKTIVITÄT DER CALCIUM-REGULATIONS-PROTEINE

Neben diesen schnellen Regulationsmechanismen können Kardiomyozyten die Expression oder Aktivität wichtiger Ca²⁺-Regulationsproteine modulieren. Hiervon sind vor allem spannungsabhängige L-Typ-Ca²⁺-Kanäle, NCX, SERCA2a und kardiale RyR2 betroffen. Durch diese Anpassung wird der SR-Ca²⁺-Gehalt reguliert. Ziel ist eine enddiastolische SR-Ca²⁺-Konzentration von 1-1,5 mmol/L, welche während der Kontraktion um 50-75% abfällt (Shannon *et al.*, 2003; Eisner *et al.*, 2017). Mechanismen zur Änderung von Aktivität und Expression von Proteinen sind die Erhöhung der SERCA2a-Aktivität und eine Verringerung der Offenwahrscheinlichkeit des RyR2, wodurch eine Erhöhung des SR-Ca²⁺-Gehalts erreicht wird. Dem gegenüber steht eine Erhöhung der Aktivität und Expression des NCX, welche eine Verringerung des SR-Ca²⁺-Gehalts zur Folge haben. (Eisner *et al.*, 2017) Interessanterweise werden durch eine starke Erhöhung des L-Typ-Ca²⁺-Stroms nur geringe Auswirkungen auf den SR-Ca²⁺-Gehalt erzielt (Trafford *et al.*, 2001; Eisner *et al.*, 2017). Diese Mechanismen haben nicht nur physiologische Bedeutung, sondern sind vor allem bei der Herzinsuffizienz vorzufinden. So kommt es bei dieser zu einer Zunahme der NCX-Expression und Aktivität, einer Abnahme der SERCA2a-Expression und Aktivität und einer erhöhten Calcium-Leckage durch RyR2 ins Zytosol, was zu einer Reduktion des SR-Ca²⁺-Gehalts führt. (Hobai & O'Rourke, 2001; Piacentino *et al.*, 2003; Eisner, 2014)

1.2.5. EINFLUSS VON MITOCHONDRIEN AUF DIE CALCIUM-HOMÖOSTASE

Einen wichtigen Beitrag zur intrazellulären Calcium-Homöostase liefern die Mitochondrien in Kardiomyozyten, wobei die physiologische Bedeutung, sowie der

Beitrag zur Gesamtleistung der Ca^{2+} -Regulation noch umstritten sind (Lu *et al.*, 2012). Neben einer perinukleären Lokalisation in Kardiomyozyten bilden Mitochondrien zwei weitere Subpopulationen, welche sich unter der Plasmamembran (subsarkolemmal) und zwischen den Myofibrillen (interfibrillär) befinden und funktionelle Unterschiede aufweisen (Ruiz-Meana *et al.*, 2010). Die innere Mitochondrienmembran enthält einen mitochondrialen Ca^{2+} -Uniporter (MCU), welcher eine wichtige Rolle für die mitochondriale Funktion darstellt (Finkel *et al.*, 2015). Mitochondrien wurden vermehrt in der Nähe des junktionalen SR nachgewiesen und es wurde gezeigt, dass die SR-Ca^{2+} -Freisetzung zu einem starken Ca^{2+} -Einstrom in die Mitochondrien führt (Lu *et al.*, 2012), wodurch viele Enzyme der mitochondrialen Matrix aktiviert werden, welche Stoffwechselreaktionen im Krebs-Zyklus begünstigen (Eisner *et al.*, 2017). Diese physiologische Funktion hat zum Ziel, die ATP-Synthese in den Mitochondrien direkt dem Bedarf anpassen zu können, den eine Kontraktion darstellt. Steigt die Kontraktionskraft, erhöht sich der ATP-Bedarf der Kardiomyozyten. Durch den gesteigerten intrazellulären Ca^{2+} -Gehalt erhöht sich die mitochondriale Ca^{2+} -Konzentration, was zu einer vermehrten ATP-Synthese genutzt wird. Dies geschieht durch die Stimulation von Schlüsseldehydrogenasen durch langsame kumulative Veränderungen der intramitochondrialen Ca^{2+} -Konzentration, wodurch eine gesteigerte Synthese von NADH und ATP erfolgt. (Brandes & Bers, 1997). Der Abfall des mitochondrialen Ca^{2+} -Transienten erfolgt nur relativ langsam, was mit einem geringen Ca^{2+} -Efflux durch den mitochondrialen $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austausch begründet wird. Bei erhöhter Frequenz kommt es durch das langsame Ca^{2+} -Recycling zu einer Abschwächung der Schlag-zu-Schlag-Transienten und es resultiert ein tonischer Anstieg der mitochondrialen Ca^{2+} -Konzentration. (Eisner *et al.*, 2017) Wie oben beschrieben ist der Ca^{2+} -Strom in Mitochondrien im Vergleich zur gesamten aus dem SR freigesetzten Ca^{2+} -Menge gering und hat somit nur einen begrenzten Einfluss auf die globale Calcium-Homöostase und Relaxation in Kardiomyozyten. Die so aus dem Zytosol eliminierte Ca^{2+} -Menge und die Relevanz für die Erregungs-Kontraktionskopplung werden als gering betrachtet (Bers, 2002).

1.3. ALTERSASSOZIIERTE VERÄNDERUNGEN DER CALCIUM-HOMÖOSTASE

Im alternden Herzen sind spezifische altersassoziierte Veränderungen zu beobachten, welche mit einer gestörten Ca^{2+} -Homöostase einhergehen und eine Beeinflussung der kontraktiven Funktion des Herzens bedingen. Verschiedene zelluläre Strukturen ventrikulärer Kardiomyozyten wurden hierbei in Tierversuchen identifiziert (Abbildung 4).

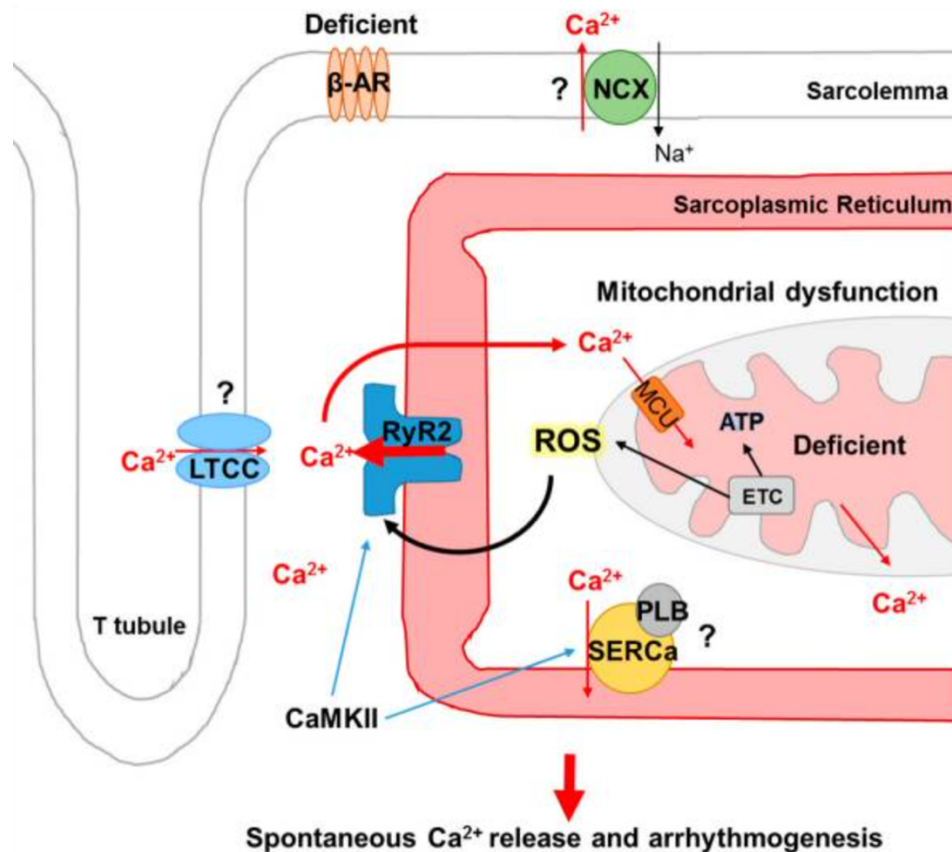


Abbildung 4: Schematische Zusammenfassung der Auswirkungen der kardialen Alterung auf die intrazelluläre Ca^{2+} -Freisetzung in alternden Kardiomyozyten. Übernommen von Hamilton & Terentyev, 2019.

So unterliegen vor allem RyR2, SERCA2a, NCX, spannungsabhängige L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle und Mitochondrien altersassoziierten Veränderungen und begünstigen somit eine myokardiale Dysfunktion. Im Alter kommt es zu einer Reduktion der mitochondrialen Funktion, welche mit einem erhöhten Auftreten reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) einhergeht (Chaudhary *et al.*, 2011). Diese ROS besitzen das Potenzial, Ionenkanäle negativ zu beeinflussen (Zima & Blatter, 2006). Hierzu zählen in Kardiomyozyten i.e.L. die oben genannten Kanalproteine (Kim *et al.*, 2017, Muralidharan *et al.*, 2017). Eine Dysfunktion des RyR2 manifestiert sich primär

durch ein erhöhtes Ca^{2+} -Leck aus dem SR ins Zytosol, welches für die Entstehung diastolischer Ca^{2+} -Sparks verantwortlich ist (Cooper *et al.*, 2013; Howlett *et al.*, 2005; Zhu *et al.*, 2005) und die SR- Ca^{2+} -Konzentrationen und damit einhergehend die Transientenamplituden reduziert (Zhu *et al.*, 2005). Ein weiterer Mechanismus altersassoziierter Veränderungen der Ca^{2+} -Homöostase ist eine Veränderung der Funktion der SERCA2a, welche vor allem auf einer verminderten Expression und einer reduzierten Phosphorylierung des SERCA2a/PLB-Komplexes, einhergehend mit einer reduzierten Aktivität, beruht (Xu & Narayanan, 1998; Schmidt *et al.*, 2000; Kaplan *et al.*, 2007) Spannungsabhängige L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle zeigen in gealterten ventrikulären Kardiomyozyten eine beeinträchtigte Kinetik (Liu *et al.*, 2000), sowie veränderte Verteilungsmuster entlang der T-Tubuli des SR (Kong *et al.*, 2018) Kardiale Alterungsprozesse bedingen ebenfalls eine veränderte Expression und Aktivität des NCX, welcher vor allem für eine mit dem Alter assoziierte längere Aktionspotenzial- und Diastolendauer verantwortlich ist (Janczewski & Lakatta, 2010). Weiterhin ist die β -adrenerge Signaltransduktion und somit die Phosphorylierung intrazellulärer sekundärer Messenger in alten Kardiomyozyten beeinträchtigt (Janczewski & Lakatta, 2010; de Lucia *et al.*, 2018). Hier wurden vor allem eine reduzierte Phosphorylierung von CaMKII beobachtet (Xu & Narayanan, 1998).

1.4. VERÄNDERUNGEN DER CALCIUM-HOMÖOSTASE BEI HERZINSUFFIZIENZ

Bei der Herzinsuffizienz ist die intrazelluläre Ca^{2+} -Homöostase gestört (Samuel *et al.*, 2018; Janczewski & Lakatta, 2010) Pathophysiologisch zeigt sich vor allem eine Beeinträchtigung der Regulation der Ca^{2+} -Konzentration im SR. Diese ist deutlich vermindert und bedingt so einen signifikant reduzierten systolischen Ca^{2+} -Transienten, welcher mit verminderter Kontraktilität und eingeschränkter inotroper Kompetenz des Herzens einhergeht. (Hobai & O'Rourke, 2001; Piacentino *et al.*, 2003) Ursächlich wurden mehrere Mechanismen identifiziert, welche eine Verminderung des SR- Ca^{2+} -Gehalts bedingen. So sind in betroffenen Herzen die Expressionsniveaus verschiedener Kanäle verändert. Eine Abnahme der SERCA2a-Expression in ventrikulären Kardiomyozyten bedingt eine reduzierte Ca^{2+} -Wiederaufnahme in das SR, wodurch während der nächsten Systole der durch den CICR-bedingte systolische Ca^{2+} -Transient deutlich vermindert wird. Die

reduzierte SERCA2a-Aktivität wird vor allem durch eine verminderte Expression oder Hypophosphorylierung von PLB vermittelt (Periasamy *et al.*, 2007; Briston *et al.*, 2011) und erhöht mit zunehmender RyR-Dichte (Li *et al.*, 2015) die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von Ca²⁺-Funken (Walker *et al.*, 2014; Walker *et al.*, 2015). Hierdurch werden integrierte Schutzfunktionen beeinträchtigt, wodurch die Entstehung von Ca²⁺-Wellen gefördert wird, welche Ca²⁺-induzierte Arrhythmien auslösen können. Gleichzeitig ist die Expression des NCX erhöht, wodurch der Ca²⁺-Auswärtsstrom verstärkt und die intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration gesenkt wird (Hasenfuss, 1998; Eisner, 2014). Ebenfalls spielt der RyR2 eine zentrale Rolle in der Pathophysiologie der Herzinsuffizienz. Dieser zeigt während der Diastole ein physiologisches Ca²⁺-Leck, welches im Rahmen der Herzinsuffizienz erhöht ist und somit eine Reduktion des SR-Ca²⁺-Gehalts bedingt. Dieses erhöhte Ca²⁺-Leck besitzt ebenfalls ein arrhythmogenes Potenzial und begünstigt die Entstehung von Ca²⁺-Wellen, welche sich über die gesamte Zelle ausbreiten. (Marx *et al.*, 2000; Pogwizd *et al.*, 2001) Assoziiert mit Herzkrankheiten ist nicht nur eine gestörte Funktion des RyR2, sondern auch eine veränderte Expression und Verteilung dieser Rezeptoren. Nach Li *et al.* (2015) kommt es zu einer Verschiebung der RyR2-Verteilung, sodass an Zellenden mit geringerer Dichte an T-Tubuli eine erhöhte Zahl an RyR2 vorliegt und somit die Rezeptordichte in diesem Zellbereichen verändert ist. So ist in ventrikulären Kardiomyozyten die Anzahl der T-Tubuli reduziert, woraus ein Verlust der strukturellen Kopplung zwischen L-Typ-Ca²⁺-Kanälen und RyR2 resultiert. Dieser Zustand bedingt sog. verwaiste RyR2, eine verminderte Synchronizität und Amplitude des systolischen Ca²⁺-Transienten. (Louch *et al.*, 2006; Song *et al.*, 2006)

1.5. DER IGF-1-SIGNALWEG

Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) ist ein 7,6 kDa großes Peptidhormon, welches zu 50% mit humanem Insulin strukturverwandt ist. Es besteht aus einer Sequenz von 70 Aminosäuren und wird primär in der Leber, aber auch in anderen Geweben wie Herz, Skelettmuskel und Gehirn synthetisiert. (Troncoso *et al.*, 2014, De Meyts & Whittaker, 2002) Im menschlichen Körper entfaltet IGF-1 über den in verschiedenen Geweben exprimierten IGF-1-Rezeptor pleiotrope Wirkungen. Hierzu zählen Effekte auf physiologisches Wachstum, zelluläres Altern, sowie Metabolismus. (Troncoso *et al.*, 2014)

1.5.1. IGF-1 UND REGULATION DURCH DIE SOMATOTROPE ACHSE

Die Synthese wird durch die somatotrope Achse stimuliert und reguliert. Die Inkretion von Wachstumshormon (Somatotropin, GH) aus dem Hypophysenvorderlappen (Adenohypophyse) erfolgt durch die hypothalamische Freisetzung von Wachstumshormon-freisetzendem Hormon (Growth Hormone Releasing Hormone, GHRH), sowie Ghrelin (Growth Hormone Release Inducing), welches appetitanregend wirkt und in der Magenschleimhaut produziert wird und spezifische Stimuli, wie enteral resorbierte Proteine (Milman *et al.*, 2016). Durch die Wachstumshormon-Stimulation, als wichtigsten Regulator der hepatischen IGF-1-Inkretion, gelangt IGF-1 in den systemischen Blutkreislauf und entfaltet an verschiedenen Organen seine Wirkung. Das Wachstumshormon bedingt ebenfalls eine Insulin-Freisetzung, durch welche hepatische Wachstumshormon-Rezeptoren hochreguliert werden und die IGF-1-Sekretion somit verstärkt wird (Leung *et al.*, 2000). Darüber hinaus wird IGF-1 in verschiedenen Geweben durch Wachstumshormon-Stimulation exprimiert, wirkt jedoch vorrangig lokal durch autokrine und parakrine Mechanismen (Stewart & Rotwein, 1996). Im Sinne eines negativen Feedback-Mechanismus hemmt zirkulierendes IGF-1 direkt die hypophysäre Wachstumshormon-Freisetzung. Weitere Mechanismen der Rückkopplungsschleife sind die Hemmung der Wachstumshormon-Inkretion durch das Wachstumshormon selbst, als auch durch neuroendokrine Signale, wie beispielsweise Insulin (Ceda *et al.*, 1985). Die beschriebene Achse ist während der gesamten Lebensspanne von Bedeutung, zeigt jedoch deutliche Unterschiede im Laufe des Lebens. So ändern sich die Wachstumshormon- und IGF-1-Spiegel von der Geburt bis zum Tod und erreichen ihren Höchststand ungefähr im 2. Lebensjahrzehnt, von wo sie dann bis zum Beginn des 6. Lebensjahrzehnt wieder abfallen und das restliche Leben in einer Plateauphase stagnieren. (Yamamoto *et al.*, 1991)

1.5.2. IGF-1-TRANSPORT DURCH IGF-BINDUNGSPROTEINE

Nach seiner systemischen Freisetzung liegt IGF-1 vor allem gebunden an IGF-Bindungsproteine (IGFBP) vor. Diese Bindungsproteine bilden Komplexe, in welche IGF-1 eingelagert und somit vor vorzeitigem Zerfall geschützt wird (Rajaram *et al.*, 1997; Baxter, 2000). IGFBP werden ebenfalls in der Leber synthetisiert und durch hypophysäres Wachstumshormon positiv und Insulin negativ reguliert. Im Blut

zirkulierendes IGF-1 ist zu einem Großteil an IGFBP-3 gebunden. Durch diese Bindung werden der Abbau und die Ausscheidung von systemischem IGF-1 geschützt, sowie die Serumkonzentration an freiem, biologisch aktivem IGF reguliert. (Rajaram *et al.*, 1997; Baxter, 2000; Holly & Perks, 2012)

1.5.3. IGF-1-REZEPTOR UND INTRAZELLULÄRE SIGNALKASKADEN

Zirkulierendes IGF-1 bindet an IGF-1-Rezeptoren (IGF-1R), welche zur Gruppe der Rezeptortyrosinkinasen (RTK) gehören. Die Bindung von IGF-1 an den hochaffinen IGF-1R in der Zellmembran induziert eine komplexe Signalkaskade (Abbildung 5), für welche eine sequenzielle Phosphorylierung innerhalb der katalytischen Domäne des IGF-1R benötigt wird (Foncea *et al.*, 1997; Adams *et al.*, 2000; Ward *et al.*, 2001).

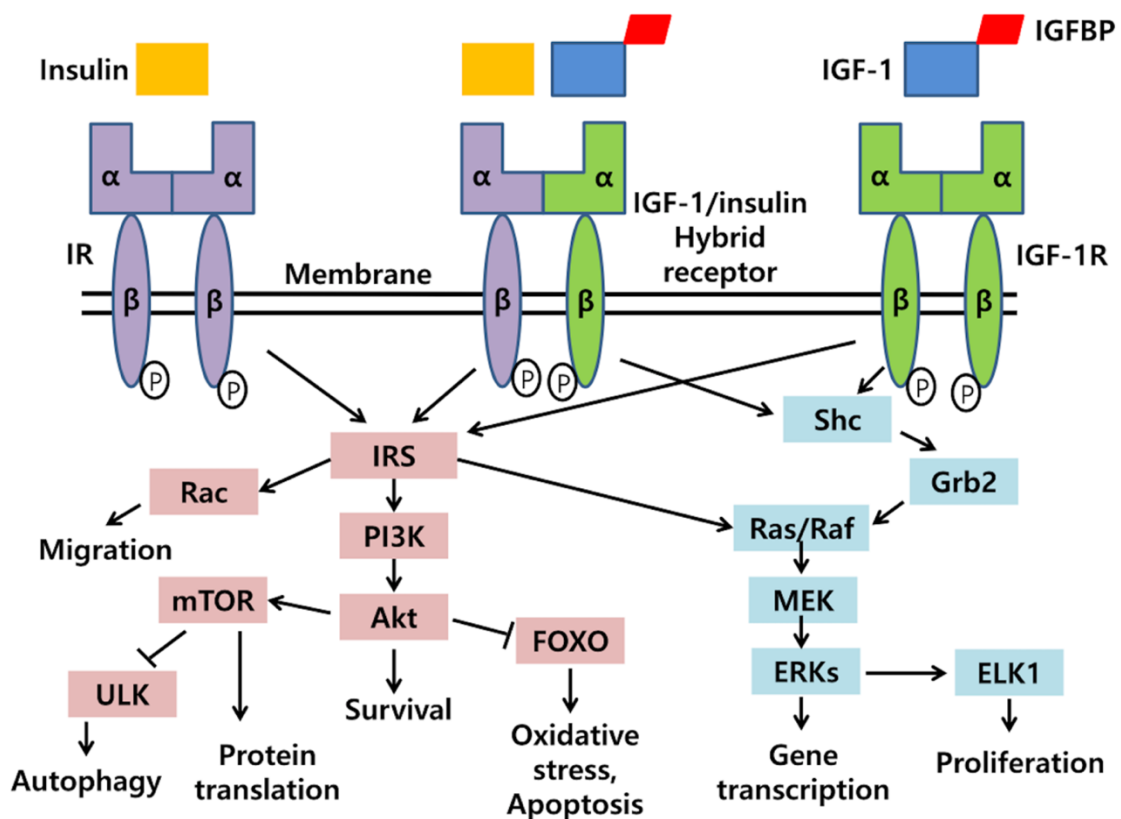


Abbildung 5: Insulinähnlicher Wachstumsfaktor 1 (IGF-1) und Insulin-Signalwege in Kardiomyozyten. Übernommen von Lee & Kim, 2017.

Hierzu zählt vor allem die Phosphorylierung der Insulinrezeptor-Substratmoleküle (IRS) (Adams *et al.*, 2000; Troncoso *et al.*, 2014). Weiterhin kommt es zu einer

Aktivierung des Phosphoinositid-3-Kinase-Signalwegs (PI3K), sowie der Mitogen-aktivierten Proteinkinase-Signalkaskade (MAPK). Durch die IGF-1R-Signaltransduktion werden komplexe intrazelluläre Netzwerke aktiviert, wodurch die zelluläre Proliferation, Differenzierung und Hypertrophie, sowie der zelluläre Stoffwechsel reguliert werden. (Foncea *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2008; Troncoso *et al.*, 2013) Die durch IGF-1-Bindung induzierten Signalwege lassen sich in kanonische und, durch neuere Studien beschriebene, nicht-kanonische, G_i-Protein-vermittelte Pfade differenzieren. In Kardiomyozyten sind zwei durch IGF-1 induzierte kanonische Signalwege beschrieben; der PI3K-/Akt-Signalweg und der extrazelluläre signalregulierte-Kinase Weg (ERK). Beide Signalwege sind an der prohypertrophen und proüberlebensfördernden Wirkung von IGF-1 in Kardiomyozyten beteiligt. (Foncea *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2008) Durch IGF-1R-Aktivierung werden ERK und Akt, sowie Phospholipase C (PLC) aktiviert. Letztere stellt einen Anteil des nicht-kanonischen Signalwegs dar und induziert einen Anstieg der Inositol-1,4,5-Triphosphat-Konzentration (InsP₃), wodurch Ca²⁺-Signale im Zellkern moduliert werden. (Ibarra *et al.*, 2003) Im Folgenden soll auf das zentrale nachgeschaltete Ziel des IGF-1-Signalwegs eingegangen werden, den PI3K-Akt-Signalweg, dessen Funktion durch zwei essenzielle Enzyme reguliert wird.

1.5.4. PHOSPHOINOSITID-3-KINASE (PI3K)

PI3K ist eine an vielen Prozessen beteiligte Lipidkinase, welche aus einer regulatorischen und einer katalytischen Untereinheit besteht (Xie *et al.*, 2018). Durch die IGF1R-vermittelte Aktivierung der PI3K wird die Phosphorylierung von Lipiden in der Plasmamembran katalysiert, wodurch intrazelluläre sekundäre Botenstoffe (Messenger), wie Phosphatidylinositol-3,4,5-Trisphosphat (PIP₃), produziert werden. PIP₃ führt zur Rekrutierung von Enzymen aus dem Zytosol zur Plasmamembran, um sie später zu aktivieren. Hierzu gehört beispielsweise Akt, welches mit der phosphoinositidabhängigen Proteinkinase-1 (PDK1) komplexiert vorliegt (Whitman *et al.*, 1988)

1.5.5. PROTEINKINASE B (AKT)

Akt ist eine Proteinkinase (Proteinkinase B, PKB) und stellt einen weiteren wichtigen Bestandteil innerhalb der IGF1R-PI3K-Akt-Signalkaskade dar (Ferrara *et al.*, 1988) Zwei Phosphorylierungsschritte initiieren und aktivieren den Akt-Signalweg (Kerber

et al., 1975; Lockie *et al.*, 2012). Diese duale Phosphorylierung der Akt ist essenziell, um die maximale Kinaseaktivität zu erreichen (Okazaki *et al.*, 1993). Aktivierte PKB induziert weitere intrazelluläre Phosphorylierungsschritte, wobei die Phosphorylierungen mehrere Zellkompartimente betreffen können. So können die Ziele der aktivierten PKB zytosolisch, nukleär oder mitochondrial liegen, wodurch ebenfalls vielfältige Wirkungen erzielt werden. (Xiao, 2017)

1.5.6. LOKALISATION DES IGF-1-REZEPTORS

Die Wirkung von IGF-1 durch die Bindung an den IGF-1R wird nicht nur durch die Induktion verschiedener intrazellulärer Signalwege, sondern auch durch die Lokalisation des IGF-1R bestimmt. Analog zu anderen sarkolemmalen Rezeptoren, wie Endothelin-1-, Angiotensin-II- (ATII) und β -adrenergen Rezeptoren, wurden auch bei IGF-1R zwei getrennte Rezeptor pools nachgewiesen. (Tadevosyan *et al.*, 2010; Vaniotis *et al.*, 2010; Merlen *et al.*, 2013) Der IGF-1R-Komplex ist sarkolemmal und nukleär lokalisiert, wodurch er nicht nur die plasmatische, sondern auch die nukleäre Signalübertragung moduliert und die Genexpression beeinflusst. In Kardiomyozyten ist ein großer Anteil des IGF-1R in perinukleären T-Tubuli lokalisiert, welche der Kernhülle anliegen. Durch die beschriebene Lokalisationsverteilung wird eine schnelle und direkte interorganelle Kommunikation zwischen Zellmembran und Zellkern vermittelt. (Bers, 2013; Troncoso *et al.*, 2013) Diese Verteilung ist nicht nur in adulten Kardiomyozyten von Bedeutung. So wurden in neonatalen Kardiomyozyten unreife sarkolemmale Einstülpungen, sog. prä-T-Tubuli, beschrieben, welche eine perinukleäre Basis für sarkolemmale Rezeptoren darstellen und die Expression kardialer Gene fördern. (Troncoso *et al.*, 2013) Neben der Genexpression spielen die prä-T-Tubuli eine zentrale Rolle für die elektromechanische Kopplung im Laufe der Differenzierung von neonatalen zu adulten Kardiomyozyten. So ist die Architektur und Verteilung der T-Tubuli in adulten Kardiomyozyten für den CICR und somit für die elektromechanische Kopplung von großer Bedeutung. (Troncoso *et al.*, 2013)

1.5.7. EFFEKTE VON IGF-1 AUF DIE KARDIALE PHYSIOLOGIE

1.5.7.1. WACHSTUM

Experimentelle Studien im Mausmodell zeigten, dass sowohl IGF-1 als auch der IGF-1R während der Differenzierung von Skelettmuskelzellen einer Hochregulierung unterliegen und dass eine selektive Überexpression von IGF-1 in Kardiomyozyten zu einer erhöhten intrazellulären Proteinkonzentration und zu Zellwachstum führt. (Glass, 2005; Troncoso *et al.*, 2013) Die Hypertrophie erfolgt primär physiologisch im Rahmen des Wachstums und als Adaptation an Belastungen des Herzkreislaufsystems (z.B. körperliche Aktivität). Die adaptive Hypertrophie wird über die Aktivierung des PI3K-Signalwegs induziert. Dem gegenüber steht die maladaptive bzw. pathologische Hypertrophie, welche u.a. durch Signalwege bei Herzinsuffizienz induziert wird, die G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR) nachgeschaltet sind. (Heineke & Molkentin 2006; McMullen *et al.*, 2007; Moellendorf *et al.*, 2012)

1.5.7.2. METABOLISMUS

Die Auswirkungen von IGF-1 auf den Stoffwechsel werden vor allem durch seine Wirkung an verschiedenen Rezeptoren bedingt. Der IGF-1R und der Insulinrezeptor (IR) besitzen ähnliche Kinasedomänen, welche zu über 80% strukturidentisch sind. Demnach können sowohl IGF-1 als auch Insulin über den IGF-1R ihre Wirkungen entfalten. (DeBosch & Muslin, 2008) Beide Rezeptoren weisen gemeinsame nachgeschaltete Signalwege auf (PI3K/Akt). Es wurde bereits vielfach postuliert, dass der Insulin-/IGF-1-Signalweg als ein einziger Signalmechanismus zu verstehen ist, der je nach gebundenem Liganden verschiedene Wirkungen besitzt. So wurden dem Insulin Wirkungen auf den Metabolismus und dem IGF-1 Wirkungen auf Proteinsynthese und Wachstum zugeordnet. (Nagoshi *et al.*, 2011) Allerdings zeigte sich, dass beide Peptide verschiedene Akt-Isoformen im PI3K/Akt-Signalweg verwenden und so verschiedene Wirkungen entfalten. IGF-1 wirkt demnach über Akt1 und kontrolliert dadurch ein physiologisches Herzmuskelwachstum, sowie die Kontrolle des Zellwachstums. Insulin hingegen wirkt über Akt2 und reguliert hierdurch den Metabolismus und das Überleben von Kardiomyozyten. (Muslin, 2011) Neben den IGF-1R und IR wurden zusätzlich Hybrid-Holorezeptoren, bestehend aus IR und IGF-1R, nachgewiesen (DeBosch &

Muslin, 2008). Diese können durch beide Hormone aktiviert werden, wobei hier vorrangig IGF-1 als Ligand anzusehen ist. Insulin entfaltet seine Wirkungen in Experimenten nur in supraphysiologischen Dosen. Diese chimären Rezeptoren wurden in vielen Geweben nachgewiesen. Hierzu zählen die Skelettmuskulatur, die Herzmuskulatur, glatte Muskelzellen der Koronarien, Endothelzellen, Fibroblasten, Fettgewebe und weitere Gewebetypen (Pierre-Eugene *et al.*, 2012) Untersuchungen zeigten, dass eine fettreiche Diät die IGF-1-Signalübertragung in Kardiomyozyten negativ beeinflussen kann. Sie induziert mitochondriale Dysfunktion, intrazelluläre Ca^{2+} -Dysregulation und eine abnormale IGF-1-Signaltransduktion. (Marsh & Davidoff, 2012) Neuere Arbeiten zeigten weitere wichtige Funktionen von IGF-1 auf den kardiomyozytären Stoffwechsel. So ist beispielsweise hepatisch synthetisiertes und sezerniertes IGF-1 essenziell für die Synthese von Kreatin, welches für Kardiomyozyten ein essenzielles Substrat darstellt und für die kardiale Energiehomöostase genutzt wird. Durch hepatische Deletion von IGF-1 wurde gezeigt, dass das myokardiale Kreatin reduziert wurde. Ursächlich wurden hier Auswirkungen von IGF-1 auf die Regulierung des kardiomyozytären Kreatintransporter-Gens beschrieben. (Scharin *et al.*, 2012) Weiterhin wurde gezeigt, dass IGF-1 einen Großteil zur Aufrechterhaltung der kardialen Bioenergetik unter Nährstoffstressbedingungen beisteuert. Durch eine vermehrte mitochondriale Ca^{2+} -Aufnahme und die Erhöhung der mitochondrialen Atmung fördert IGF-1 den Metabolismus der Mitochondrien und die Synthese von ATP. (Troncoso *et al.*, 2011)

1.5.7.3. ALTERUNG

Der IGF-1-Signalweg spielt nicht nur in der jungen Lebensphase eine wichtige Rolle für Wachstum und Stoffwechsel, sondern ist auch mit Einflüssen auf die Lebensspanne assoziiert. Physiologisch kommt es mit zunehmendem Alter zu einer Reduktion der zirkulierenden Wachstumshormon- und IGF-1-Spiegel im Blut, wodurch der zelluläre Alterungsprozess induziert wird. (Troncoso *et al.*, 2013) Der IGF-1/Akt-Signalweg wurde als wesentlicher Regulator des zellulären Alterns von Kardiomyozyten identifiziert, welcher molekularbiologische und strukturelle Veränderungen im alternden Herzen induziert, welche mit einer chronischen Entzündungsreaktion einhergehen. Diese ist durch die erhöhte Expression proinflammatorischer Zytokine, Chemokine und Proteasen charakterisiert und wird

als Seneszenz-assoziiertes sekretorischer Phänotyp (SASP) bezeichnet. Hierzu zählen IL-1 α , IL-1 β , IL-6, NF κ B-Ligand, TNF α und RANKL. (Freund *et al.*, 2010; Tchknioia *et al.*, 2013) Die chronische Inflammation, welche u.a. durch den IGF-1-Signalweg vermittelt wird und als wesentliches Merkmal zellulären Alterns gilt, fördert die strukturellen Umbauprozesse des Herzens, welche vor allem durch Hypertrophie, linksventrikuläre Dilatation und Fibrose gekennzeichnet sind. (Fontana *et al.*, 2012) Diese, durch die altersassoziierte Reduktion des systemischen IGF-1-Spiegels induzierten, strukturellen Veränderungen bedingen konsekutiv eine progressive Verschlechterung der kardiovaskulären Funktion und fördern das Entstehen und Fortschreiten kardiovaskulärer Erkrankungen (Ungvari *et al.*, 2012). Im Tiermodell zeigte sich damit einhergehend eine Beeinträchtigung der kardialen Kontraktilität, Herzatrophie, sowie eine verminderte belastungsinduzierte hypertrophe Adaptationsreaktion ventrikulärer Kardiomyozyten (Li *et al.*, 2008; Groban *et al.*, 2011; Hua *et al.*, 2012). Eine erhöhte Herzmuskelsteifigkeit kennzeichnet die Entstehung einer diastolischen Dysfunktion, welche durch verschiedene Mechanismen zu erklären ist (Moellendorf *et al.*, 2012). Eine beeinträchtigte Ca²⁺-Clearance aus dem Zytosol ins SR, welche mit einer Abnahme der SERCA2a-Expressionsniveaus in Kardiomyozyten assoziiert ist, wird im zunehmenden Alter beobachtet. Bei kardiomyozytenspezifischer Überexpression von IGF-1 zeigt sich jedoch eine verminderte Abnahme der SERCA2a-Expression und eine weniger stark eingeschränkte zytoplasmatische Ca²⁺-Wiederaufnahme in das SR. (Li *et al.*, 2006) Durch weitere altersassoziierte Veränderungen der extrazellulären Matrix oder intrinsischer Faktoren in Kardiomyozyten wird die diastolische Dysfunktion ebenfalls beeinflusst. Hierzu zählen, neben der schon erwähnten reduzierten Ca²⁺-Wiederaufnahme, eine langsamere Ca²⁺-Dissoziation im Querbrückenzyklus (Frayse *et al.*, 2012), Modulationen der Titin-Struktur (Nagueh *et al.*, 2004), sowie Phosphorylierungsschritte intrazellulärer Enzyme (Krüger *et al.*, 2008). Ebenso wurde eine signifikante endotheliale Dysfunktion und Endothelzellapoptose bei erhöhtem oxidativem Stress beschrieben (Bailey-Downs *et al.*, 2011) Des Weiteren kommt es im alten Myokard zu einer verminderten Adaptation an hämodynamischen Stress und Ischämie (Isoyama & Nitta-Komatsubara, 2002). Neben dem Abfall der systemischen IGF-1-Konzentration kommt es zur lokalen IGF-1-Synthese durch kardiale Fibroblasten. Hierdurch wird die Kollagensynthese

durch Fibroblasten und damit einhergehend eine kardiale Fibrose begünstigt, welche die Herzmuskelsteifigkeit erhöht. Ebenfalls wird die Hypertrophie umliegender Kardiomyozyten begünstigt. (Horio *et al.*, 2005; Takeda *et al.*, 2009)

1.5.8. REGULATION & AUSWIRKUNGEN DES KARDIALEN IGF-1-SIGNALWEGS IM ALTER

Die Effekte des IGF-1-/IGF-1R-Signalwegs hinsichtlich der kardialen Alterung sind trotz intensiver Forschung im Bereich der Herzalterung und Herzinsuffizienzentstehung noch immer unvollständig geklärt und sogar umstritten. Transgene Mäuse mit einer IGF-1-Überexpression in Kardiomyozyten zeigten in Experimenten einen signifikanten Anstieg des systemischen IGF-1-Spiegels um 80%. Unter diesem erhöhten IGF-1-Plasmaspiegel präsentierten sich hypertrophierte Herzen mit einer normalen Herzfunktion. Die Zunahme der Herzgröße wurde hierbei durch zelluläre Hyperplasie hervorgerufen. (Reiss *et al.*, 1996) Ein anderes Mausmodell, unter Verwendung des α -Skelett-Actin-Promotors und damit verbundener Transgenexpression in Kardiomyozyten und Myozyten der Skelettmuskulatur, zeigte keine erhöhten IGF-1-Serumspiegel. In jungen Mäuseherzen zeigte sich zunächst eine physiologische kardiale Hypertrophie mit verbesserter systolischer Funktion, welche jedoch in alten Mäuseherzen zunehmend in den Zustand einer pathologischen Hypertrophie mit reduzierter systolischer Funktion und gesteigerter interstitieller Fibrose überging. (Delaughter *et al.*, 1999) In einer weiteren experimentellen Studie wurde eine Überexpression von humanem IGF-1R in Kardiomyozyten induziert. Hierdurch kam es ebenfalls zu einer physiologischen kardialen Hypertrophie, welche, im Gegensatz zur Arbeitsgruppe von Reiss *et al.*, nicht durch Zellhypertrophie, sondern durch Hyperplasie hervorgerufen wurde. In diesen Kardiomyozyten zeigten sich keine Anzeichen von histopathologischen Veränderungen und eine verbesserte systolische Herzfunktion, welche sich ebenfalls im zunehmenden Alter der Mäuse und auch im direkten Vergleich mit gleichaltrigen Kontrolltieren zeigte. In diesen Mauscardiomyozyten wurde eine signifikant erhöhte Aktivität von PI3K und Akt nachgewiesen, welche einen Bestandteil des IGF-1/IGF-1R-Signalwegs und einen möglichen Regulationsmechanismus darstellen. (McMullen *et al.*, 2003) Einhergehend mit der altersbedingten Abnahme der mRNA-Expression von Wachstumshormon, nimmt mit zunehmendem Alter physiologisch auch der IGF-1-

Serumspiegel ab (Crew *et al.*, 1987; Leifke *et al.*, 2000). Interessanterweise nimmt die myokardiale Expression von IGF-1R in gealterten Herzen jedoch zu, während systemische IGF-1- und lokale IGF-1R-Spiegel in anderen Geweben bei Mäusen mit zunehmendem Alter abnehmen. Vermutet wird ein kompensatorischer Mechanismus durch eine Induktion der IGF-1R-Expression in alternden Kardiomyozyten, welcher die altersbedingten Umbauprozesse (Remodeling) im Herzen fördert. (Ock *et al.*, 2015) Neuere Studien zeigen, dass dieses altersassoziierte Remodeling mit der Entwicklung einer diastolischen Funktionsstörung einhergeht, wohingegen die systolische Funktion nahezu erhalten bleibt (Dai *et al.*, 2012). Eine Unterbrechung der IGF-1R-Signaltransduktion verlangsamte diesen Alterungsprozesse in Kardiomyozyten und zeigte eine verminderte Fibrosierung und eine abgeschwächte Hypertrophie des Myokards im Vergleich zu gleichaltrigen Wildtyp-Mäusen (Ock *et al.*, 2015) Sehr alte Mäuse (105-130 Wochen) mit einer IGF-1R-Deletion zeigten trotz altersbedingter Hypertrophie eine erhaltene Kontraktilität und fraktionelle Verkürzung, jedoch keine Unterschiede in Überlebensraten und Herzstruktur (Ock *et al.*, 2015) Frühere Studien an anderen Tierspezies haben zudem gezeigt, dass eine Reduktion der IGF-1-Signaltransduktion mit einer Lebensverlängerung assoziiert ist (Brown-Borg, 1996; Kimura *et al.*, 1997; Clancy *et al.*, 2001). Im Mausmodell konnte mit einer Überexpression des Klotho-Gens, wodurch die Tyrosinphosphorylierung von IR und IGF-1R gehemmt wurde, eine verlängerte Lebensspanne von Mäusen erzielt werden (Kurosu, 2005). Mäuse mit einer heterozygoten IGF-1R-Ausschaltung lebten 33% länger als die Kontrolltiere (Holzenberger *et al.*, 2002; Xu *et al.*, 2013). Der IGF-1/IGF-1R/Akt-Signalweg wurde als wesentlicher Regulator der Kardiomyozytenalterung identifiziert und neuere experimentelle Erkenntnisse sprechen dafür, dass physiologische IGF-1R-Signale die Alterung von Kardiomyozyten fördern und eine IGF-1R-Deletion eine strukturelle Verschlechterung im gealterten Herzen verhindert (Ock *et al.*, 2015).

Dem gegenüber stehen die Ergebnisse einer früheren Studie, welche zeigte, dass die Aktivierung des IGF-1R-Signalwegs für eine erhaltene Herzfunktion im alternden Herzen notwendig ist, da die Herzmuskelrelaxation in alten Mäusen mit einer kardialen Inaktivierung des IGF-1R reduziert ist (Moellendorf *et al.*, 2012). Weiterhin zeigte eine kardiomyozytenspezifische Überexpression von IGF-1, bei altersentsprechendem IGF-1R-Expressionsmuster, eine verbesserte diastolische

Funktion, welche auf eine erhaltene Ca^{2+} -Wiederaufnahme ins SR zurückzuführen ist. Eine verminderte Abnahme des SERCA2a-Expressionsniveaus wurde hierbei als Mechanismus verantwortlich gemacht. (Li *et al.*, 2006)

Eine Analogie der genannten positiven Effekte einer Abschwächung der IGF-1R-Signaltransduktion hinsichtlich kardiovaskulärer Erkrankungen im menschlichen Organismus ließ sich in Humanstudien nicht eindeutig zeigen. Assoziationen zwischen kardiovaskulären Erkrankungen, kardiovaskulär bedingter Mortalität und IGF-1-Spiegeln bleiben beim Menschen ungeklärt. (Milman *et al.*, 2014) Humanstudien zeigten, dass höhere zirkulierende IGF-1-Spiegel mit einem höheren Risiko für die Entwicklung einer kongestiven Herzinsuffizienz assoziiert sind, wobei diese Ergebnisse nicht durch alle Studien unterstützt werden konnten (Andreassen *et al.*, 2009; Vasan *et al.*, 2003). In Bevölkerungsstudien konnte beispielsweise gezeigt werden, dass Menschen mit einem niedrigen zirkulierenden IGF-1-Spiegel ein um 1,5-2,5-fach erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre Mortalität aufweisen (Juul *et al.*, 2002; Laughlin *et al.*, 2004; Friedrich *et al.*, 2009; Svensson *et al.*, 2012). Die NHANES III-Studie hingegen zeigte keine signifikante Korrelation zwischen kardiovaskulärer Mortalität und IGF-1-Spiegeln (Saydah *et al.*, 2007).

Dem gegenüber stehen die Ergebnisse großer epidemiologischer Studien (Rotterdam-Studie & Framingham-Studie) in welchen beobachtet wurde, dass der Plasma-IGF-1-Spiegel negativ mit dem Risiko der Herzinsuffizienzentstehung korreliert. So ist ein niedriger zirkulierender IGF-1-Spiegel mit einem höheren Risiko für die Entstehung einer koronaren Herzkrankheit assoziiert und zeigte bei älteren Patienten und Patientinnen ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer kongestiven Herzinsuffizienz (Spallarossa *et al.*, 1996; Vasan *et al.*, 2003). Interessanterweise konnte jedoch auch gezeigt werden, dass sowohl hohe als auch niedrige zirkulierende IGF-1-Spiegel mit einem erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Mortalität assoziiert sind. (van Bunderen *et al.*, 2010) Verschiedene Studien konnten zeigen, dass die Aktivität der GH/IGF-1-Signalachse auch in alternden Menschen und Labortieren reduziert war und dass verminderte IGF-1-Plasmaspiegel mit einer Verschlechterung der kardiovaskulären Funktion und einem Fortschreiten von Herzkreislauferkrankungen korrelierten. (Troncoso *et al.*, 2013)

Die im Alter beschriebene Überexpression von IGF-1R, jedoch nicht von IGF-1, könnte einen Kompensationsmechanismus darstellen, welcher das altersbedingte

kardiale Remodeling fördert und Erscheinungen wie linksventrikuläre Hypertrophie, diastolische Dysfunktion, interstitielle Fibrose und eine eingeschränkte chronotrope Kompetenz bedingt. (Fontana *et al.*, 2012; Roof *et al.*, 2015).

1.6. HYPOTHESE DER DIPLOMARBEIT

Im Alter zeigt sich eine erhöhte Aktivität des IGF-1R-Signalwegs in Kardiomyozyten, welcher bei einer systemischen Abnahme des zirkulierenden IGF-1-Spiegels, durch eine erhöhte myokardiale Expression des IGF-1-Rezeptors induziert wird. Diese erhöhte Aktivität ist mit einem kardialen Alterungsprozess und einer Abnahme der myokardialen Funktionen assoziiert. (Abdellatif *et al.*, 2022) In dieser Arbeit wurden die Auswirkungen einer chronischen Aktivierung des IGF-1R-Signalwegs hinsichtlich der Kontraktilität und der Calcium-Homöostase untersucht. Hierbei wurde die Hypothese überprüft, dass eine chronische Aktivierung des IGF-1R-Signalwegs gegensätzliche Effekte auf die Funktion von Kardiomyozyten hat und dass diese Effekte der IGF-1-Signalgebung durch das Alter bestimmt werden. Es wurde erwartet, dass eine chronische Verstärkung des IGF-1R-Signalwegs positive Effekte auf die Funktion junger Kardiomyozyten besitzt, während sie in alten Kardiomyozyten negative Effekte und eine Abnahme der myokardialen Funktionen bedingt.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. MÄUSE

In dieser Diplomarbeit wurden genetisch veränderte männliche Mäuse (FVB/N Stamm) mit einer Überexpression des IGF-1-Rezeptors in Kardiomyozyten (IGF-1R^{+/-}) verwendet, während deren Wildtypen (WT, Wurfgeschwister) zur Kontrolle dienten. Diese Mäuse wurden den Experimenten in zwei Lebensphasen unterzogen: junge Mäuse wurden in einem Alter von 3-6 Monaten für die Versuche freigegeben, alte Mäuse in einem Alter von 18-20 Monaten.

2.2. LÖSUNGEN

Die Durchführung der Experimente beruhte zunächst auf dem Erstellen von Lösungen. Die zur Herstellung der Perfusionslösung verwendeten Reagenzien, welche als Basis für alle weiteren Lösungen diente, sind der Tabelle 1 zu entnehmen. Nach Abwiegen und Einfüllen in einen 1 Liter Standzylinder wurden die Reagenzien in 900 ml destilliertem Wasser gelöst. Anschließend wurde der pH-Wert mit 5 M NaOH auf 7,4 bei Raumtemperatur eingestellt, was einem pH-Wert von 7,2 bei 37°C entspricht. Nach korrekter Einstellung des pH-Wertes wurde die Lösung mit destilliertem Wasser auf 1000 ml aufgefüllt und steril gefiltert.

Tabelle 1: Reagenzien für die Herstellung der Perfusionslösung

Reagenz	Hersteller	Kat. Nr.	Mol-Gewicht [g/mol]	Endkonzentration [mM]	Gewicht für 1 L [g]
NaCl	Roth	3957.1	58,44	135	7,889
KCl	Roth	P017.1	74,56	4,7	0,350
KH ₂ PO ₄	Roth	P018.1	136,09	0,6	0,082
HNa ₂ PO ₄ dibasic	Merck	S0876	141,96	0,6	0,085
MgSO ₄ *7H ₂ O	Roth	P037.1	246,48	1,2	0,296
HEPES	Roth	6763.1	238,31	10	2,383
Taurin	Merck	T0625	125,15	30	3,755

Anschließend wurde am Tag der Isolation zur Herstellung des Perfusionspuffers noch 2,3-Butandion-2-monoxim (BDM) und Glukose gelöst (Tabelle 2).

Tabelle 2: Reagenzien für die Herstellung des Perfusionspuffers

Reagenz	Hersteller	Kat. Nr.	Mol-Gewicht [g/mol]	Endkonzentration [mM]	Gewicht für 1 L [g]
Perfusionslösung	Siehe oben				
2,3-Butanedion-2- monoxim	Merck	B0753	101,1	10	0,337
Glukose	Merck	50-99-7	180,16	10	0,6

Für die Herstellung der Kanülierungslösung wurden 150 ml des Perfusionspuffers entnommen und darin 150 µl Calciumchlorid (Stammlösung 1M) gelöst (Tabelle 3).

Tabelle 3: Reagenzien zur Herstellung der Kanülierungslösung

Reagenz	Hersteller	Kat. Nr.	gegebene C	Endkonzentration	Volumen
Perfusionspuffer	Siehe oben				150 ml
CaCl ₂	Fluka	21115	1 M	1 mM	150 µl

Aus dem hergestellten Perfusionspuffer wurden weitere Lösungen hergestellt. Hierzu mussten jeweils eine 100 mM und eine 10 mM CaCl₂-Lösung hergestellt werden. Ein großes Falcon-Tube wurde für die Herstellung der Kardiomyozyten-Verdauungslösung verwendet (Tabelle 4). Die Enzyme wurden langsam, auf Eis liegend, aufgetaut und erst kurz vor dem Perfusionsstart mit der Kardiomyozyten-Verdauungslösung in das Langendorff-System hinzugegeben.

Tabelle 4: Reagenzien zur Herstellung der Kardiomyozyten-Verdauungslösung

Reagenz	Hersteller	Kat. Nr.	gegebene C	Endkonzentration	Volumen
Perfusionspuffer	Siehe oben				20 ml
Liberase Research Grade	TM Roche	05401127001	5 mg/ml		300 µl
Trypsin	GIBCO	15090-046	10 x 2,5%		111 µl
1/100 CaCl ₂	Siehe oben		10 mM	12,5 µM	25 µl

Aus dem Perfusionspuffer wurden ebenfalls die Stopplösungen 1 (Tabelle 5) und 2 (Tabelle 6) hergestellt.

Tabelle 5: Reagenzien zur Herstellung der Stopplösung 1

Reagenz	Hersteller	Kat. Nr.	gegebene C	Endkonzentration	Volumen
Perfusionspuffer	Siehe oben				2,25 ml
BCS					0,25 ml
1/100 CaCl ₂	Siehe oben		10 mM	12,5 µM	3,125 µl

Tabelle 6: Reagenzien zur Herstellung der Stopplösung 2

Reagenz	Hersteller	Kat. Nr.	gegebene C	Endkonzentration	Volumen
Perfusionspuffer	Siehe oben				19 ml
BCS					1 ml
1/100 CaCl ₂	Siehe oben		10 mM	12,5 µM	25 µl

Die Stopplösung 2 diente als Basis für die Herstellung der einzelnen Calcium-Aufbaulösungen mit verschiedenen Calcium-Konzentrationen: 0,125, 0,25 und 0,5 mM (Tabelle 7).

Tabelle 7: Reagenzien zur Herstellung der Calcium-Aufbaustufen

Calcium-Aufbaustufe	Volumen Stopplösung 2 [ml]	Endkonzentration CaCl ₂ [mM]	Volumen von 100 mM CaCl ₂ [µl]
1	8	0,125	10
2	4	0,25	10
3	8	0,5	40

Anschließend erfolgte die Herstellung der Normal-Tyrode-Lösung (Tabelle 8) und der pH-Wert mit 5M NaOH auf 7,4 bei Raumtemperatur eingestellt und steril gefiltert. Die Glukose wurde der Stammlösung erst bei der jeweiligen Versuchsdurchführung beigefügt.

Tabelle 8: Reagenzien zur Herstellung der Normal-Tyrode-Lösung

Reagenz	Hersteller	Kat. Nr.	Mol-Gewicht [g/mol]/C	Endkonzentration [mM]	Gewicht für 1 L [g]
NaCl	Roth	3957.1	58,44	140	8,182
KCl	Roth	P017.1	74,56	4	0,298
MgCl ₂ *6H ₂ O	Roth	HN03.2	203,3	1	0,203
HEPES	Roth	6763.1	238,31	10	2,383
CaCl ₂ (Stammlösung 1M)	Fluka	21115	110,98	1	1 ml
Glukose	Merck	50-99-7	180,16	5	0,3 für 333 ml

2.3. ZELLISOLATION

2.3.1. HERZENTNAHME UND KANÜLIERUNG

Für die Herzentnahme und Präparation benötigt man chirurgisches Besteck, welches aus folgenden Instrumenten besteht:

- Anatomische Pinzette
- Chirurgische Pinzette
- Hautschere
- Spatel
- Nadeln zur Fixation
- Styropor-Unterlage
- Stereomikroskop
- 2 kleine Pinzetten
- Chirurgischer Faden SERAFLEX USP 5/0
- Mikroschere (Dissektionsschere)
- Gefäß mit gekühlter Kanülierungslösung
- Petrischale mit Kanülierungslösung
- 1 ml Spritze
- Kanüle mit Kerbe

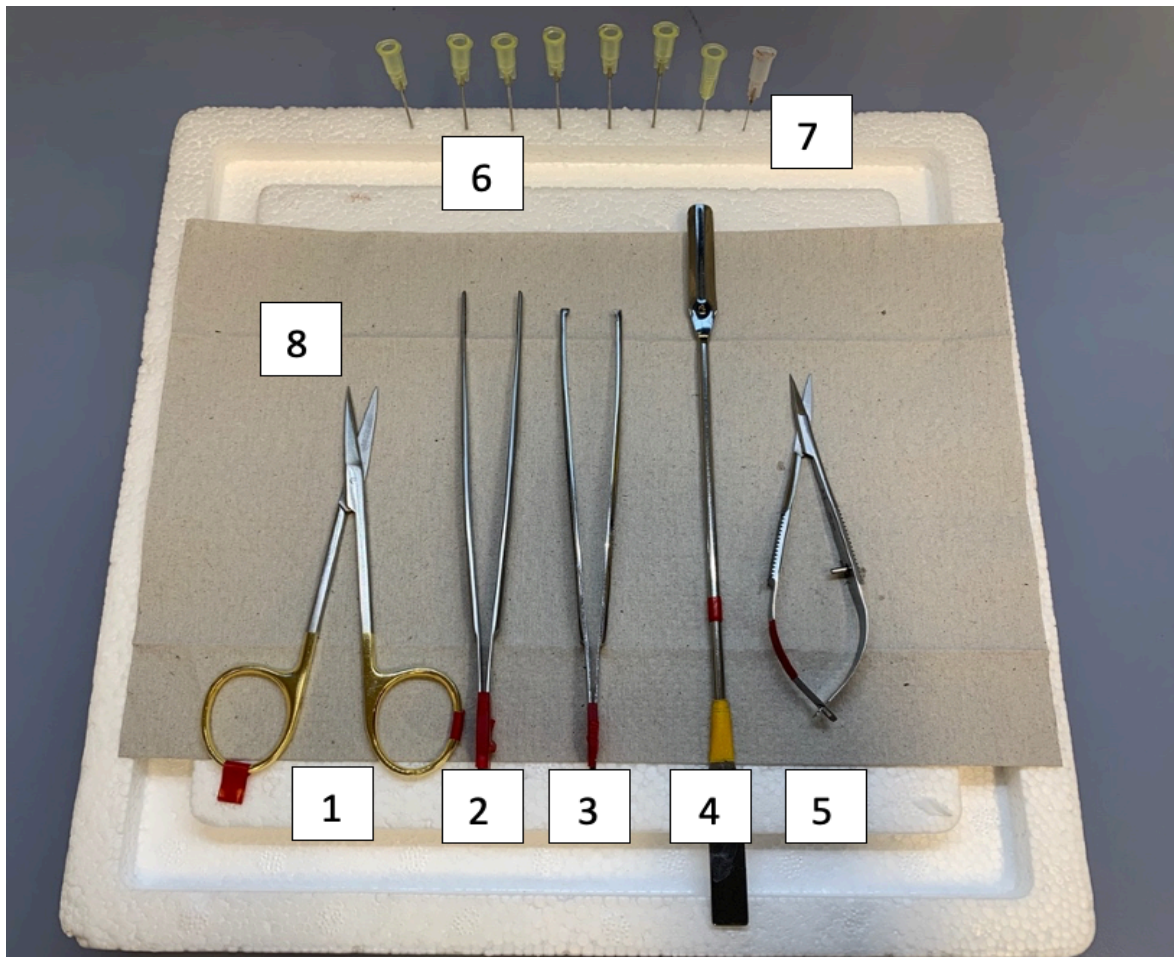


Abbildung 6: Verwendetes Sezierbesteck. 1: Hautschere; 2: anatomische Pinzette; 3: chirurgische Pinzette; 4: Spatel; 5: Mikroschere; 6: Nadeln zur Fixation; 7: Kanüle mit Kerbe; 8: Styropor-Unterlage

Vor der Kanülierung mussten die Versuchstiere heparinisiert werden, um unter anderem eine Thrombenbildung in den Koronargefäßen, mit eingeschränkter

Perfusion der Enzymlösungen zu verhindern. Hierzu wurden 100 µl Heparin in 900 µl 0,9% NaCl gelöst und in einer 1 ml Spritze aufgezogen. Das Versuchstier wurde vor der Heparinisierung mittels Isoflurannarkose (5% Isofluran, 95% O₂) in einer Induktionsbox sediert. Nach der intraperitonealen Injektion von 100 µl (= 50 IE) Heparinlösung erwachte die Maus aus der Narkose und wurde für 15 Minuten in den Käfig gesetzt, um die Heparinwirkung zu erreichen. Ein weiterer wichtiger Punkt der Vorbereitung war das Entlüften der mit Kanülierungslösung befüllten Spritze, welche zum perfundieren der Koronargefäße vorgesehen war. Diese Spritze musste komplett entlüftet werden, um Luftembolien der Koronargefäße vorzubeugen, welche eine enzymatische Verdauung unmöglich gemacht hätten. Für den Beginn der Herzentnahme wurde das Versuchstier erneut und tief mit Isofluran (5% Isofluran, 95% O₂) sediert, auf die Styropor-Unterlage gelegt und mit einem Genickbruch getötet. Die Extremitäten wurden an der Unterlage befestigt, um den Thorax bestmöglich darzustellen. Mit der chirurgischen Pinzette wurde das Fell ungefähr auf Höhe des Sternums angehoben und es erfolgte ein medianer Schnitt mit der Schere, wodurch ein freiliegendes, annähernd ovales Fenster über dem Thorax entstand. Mit der gleichen Pinzette wurde dann der knöcherne Thorax am unteren Rand angehoben und das Diaphragma durch Eröffnen des kranialen Abdomens dargestellt. Dieses wurde von der unteren ventralen Thoraxapertur abgesetzt und es erfolgte beidseitig jeweils ein Schnitt in der Axillarlinie durch die Rippen. Das so entstandene Thoraxschild konnte nun mobilisiert werden und wurde nach kranial umgeklappt und mit einer weiteren Kanüle fixiert, um die Thoraxorgane darzustellen. Es folgte die topographische Orientierung im Thorax. Hierbei war vor allem bei jungen Mäusen auf den häufig noch stark ausgeprägten Thymus zu achten, welcher bis auf die Herzbasis ragen konnte. Mit der anatomischen Pinzette galt es, das Herz möglichst zügig freizulegen und von Perikard und anderen Strukturen zu befreien. Im Anschluss wurde das Herz im Bereich der *Aorta ascendens* angehoben und die Aorta mit einer Schere unterhalb der Pinzette abgesetzt. Hierbei war darauf zu achten, dass die Aorta nicht zu weit proximal abgesetzt wird, da dies die Kanülierung deutlich erschwerte. Das entnommene Herz wurde in die eisgekühlte Kanülierungslösung transferiert, gegeben und mit dem Spatel vorsichtig umgerührt, um mechanisch die mit Blut gefüllten Ventrikel zu leeren und andere am Herz verbliebene Gewebe wie Thymus oder Lunge vom Herzen zu trennen. Anschließend wurde das Herz mit dem Spatel vorsichtig aus

dem Becherglas in die mit Kanülierungslösung gefüllte Petrischale gegeben. Mit den beiden Feinpinzetten wurde das Herz vor der Kanüle fixiert und der Aortenstumpf zwischen den Atrien aufgesucht. Vorsichtig wurde die Aorta mit den Pinzetten erfasst und über die Kanüle gezogen, sodass ihr distales Ende proximal der Nadeleinkerbung zu liegen kam. Die Fixierung der Aorta an der Kanüle erfolgte mit chirurgischem Faden. Dieser wurde schon vorher auf die Kanüle gezogen und musste nun ans Kanülenende und über die Aorta gelegt werden. Über der Einkerbung wurde der Faden zum ersten Mal festgezogen.

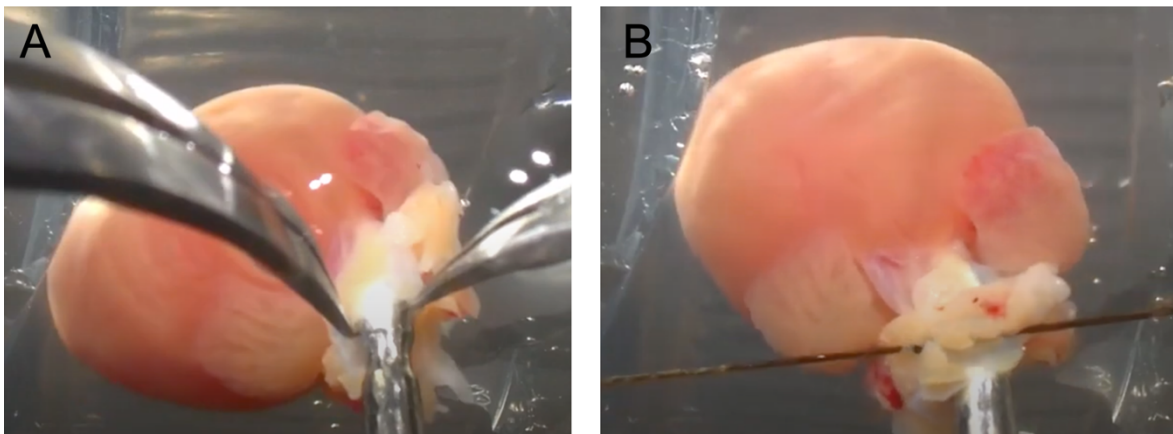


Abbildung 7: Aufsuchen der Aorta und deren Kanülierung (A) und Fixierung der Aorta an der Kanüleneinkerbung mit chirurgischem Faden (B) (Video Tutorials: Murine Cardiomyocyte Isolation, 2022)

Es erfolgte eine retrograde Perfusion mit der in der Spritze befindlichen Kanülierungslösung um das Herz und die Koronargefäße von Blut zu befreien. Bei richtiger Lage sah man sofort eine Abblassung der Koronargefäße, sowie der Ventrikel.

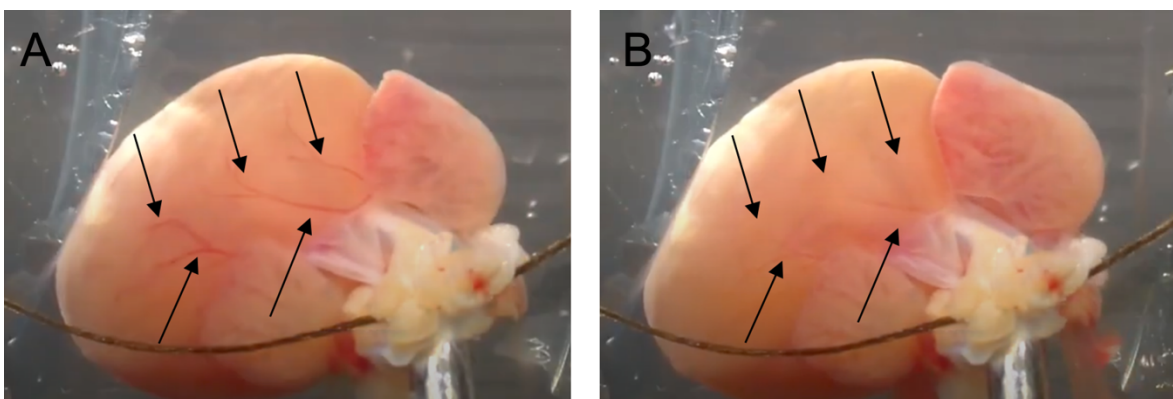


Abbildung 8: Zustand der Koronargefäße vor retrograder Perfusion mit Kanülierungslösung (A) und Ablassen der Koronargefäße bei retrograder Perfusion mit Kanülierungslösung (B) (Video Tutorials: Murine Cardiomyocyte Isolation, 2022)

Zur Sicherung der Aorta wurde ein chirurgischer Knoten angelegt, die überstehenden Fadenenden abgeschnitten und das Herz mit der Kanülierungslösung weiter vorsichtig gespült. Im Anschluss wurde die Kanüle mit dem Herz von der Spritze entfernt und an das Langendorff-System montiert (Abbildung 9 und 10).

2.3.2. ENZYMATISCHE VERDAUUNG AM LANGENDORFF-SYSTEM

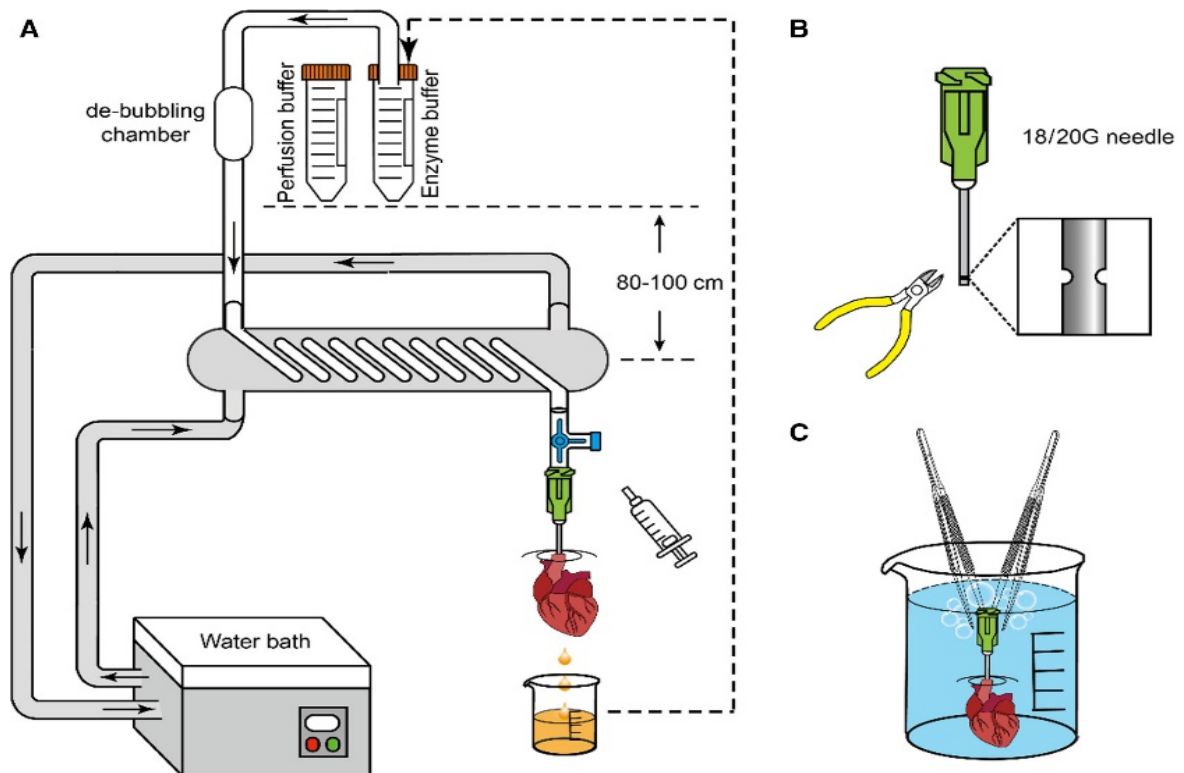


Abbildung 9: Schematischer Aufbau des Langendorff-Systems

Das System besteht aus zwei Glasbehältern, in welche jeweils Perfusionspuffer und Myozytenverdauungslösung gegeben werden. Beide Gefäße werden über jeweils einen Schlauch über einen Drei-Wege-Hahn zusammengeführt. Von diesem geht eine weitere Leitung ab, welche über eine Peristaltikpumpe in eine Blasenfalle führt. Anschließend an die Blasenfalle befindet sich ein Konnektor zum Anbringen der Kanüle mit dem extrahierten Herz. Beide Glasbehälter, sowie die Blasenfalle sind doppelwandig aufgebaut und an einen externen Wasserkreislauf angeschlossen, über welchen die Lösungen durch warmes, zirkulierendes Wasser erwärmt werden können. Übernommen von Li *et al.*, 2020.

Das am Langendorff-System (Abbildung 9 und 10) angeschlossene Wasserbad wurde eingeschaltet und auf 39,5°C eingestellt um die Perfusionslösung bis zum Eintritt in das kanülierte Herz auf eine Temperatur von 37°C zu erwärmen. Die weiter oben befindlichen Behälter wurden schon vor der Herzentnahme mit den jeweiligen Lösungen befüllt. Bei der Kardiomyozyten-Verdauungslösung war darauf zu achten,

dass die Enzyme, Liberase und Trypsin, erst kurz vor dem Perfusionsstart mit der Kardiomyozyten-Verdauungslösung hinzugegeben wurden. Die angeschlossene Rollpumpe wurde gestartet und eine Perfusionsrate von 2 ml/Min eingestellt. Der Anschluss des kanülierten Herzens an das Langendorff-System erfolgte bei laufender Rollpumpe mit einer Laufrate von 2 ml/Min. Mit Perfusionspuffer wurde das Herz für insgesamt 1,5 Minuten perfundiert. In dieser Zeit wurden die vorher aufgetauten Enzyme, Liberase und Trypsin, zu der Kardiomyozyten-Verdauungslösung hinzugegeben. Nach 1,5 Minuten wurde der Fluss am Dreiwegehahn umgestellt, so dass nun die Kardiomyozyten-Verdauungslösung das Herz für eine Dauer von 7,5 Minuten perfundierte, um durch eine enzymatische Verdauung der Extrazellulärmatrix einzelne Kardiomyozyten aus ihrem Zellverband zu isolieren. Nach vollständig durchgeführter Perfusion mit der Enzymlösung wurde das Herz ungefähr an der AV-Ebene abgesetzt, um ventrikuläre Kardiomyozyten zu erhalten. Das Herz wurde in Stopplösung 1 transferiert und mit einer Mikoschere in kleine Gewebestücke zerteilt. Anschließend wurde die Dissziation und Suspension der Zellen mechanisch durchgeführt, indem die Gewebestücke in der Stopplösung 2 in Pasteur-Pipetten mit unterschiedlich großen Öffnungen wiederholt aspiriert wurden. Hierdurch wurden die Zellen, zusätzlich zur Enzymverdauung, aus ihren Zellverbänden gelöst und mit einem 200 µm Nylon-Maschenfilter von unverdautem Herzgewebe getrennt. Nach Verwendung der dritten Pasteur-Pipette mit dem kleinsten Öffnungslumen wurde die aspirierte Lösung in das im Eppendorf-Tube befindliche Mesh gegeben. Nach Überwindung der Oberflächenspannung sammelte sich die Zellsuspension im Eppendorf-Tube. Zusätzlich konnte man das Mesh noch etwas komprimieren, um die restlichen Zellen zu erhalten. Das Mesh wurde im Anschluss mitsamt dem verdauten, organischen Material entsorgt. Das Eppendorf-Tube mit der Zellsuspension wurde für 10 Minuten stehen gelassen, damit sich die Zellen am Grund absetzen konnten. So entstand nach dieser Wartezeit ein Pellet, welches eine erste morphologische Beurteilung zuließ. So waren hier vor allem Größe und Farbe maßgeblich, um die durchgeführte enzymatische Verdauung zu beurteilen. Die Größe war nicht ausschlaggebend für die Qualität der Zellen, da diese u.a. auch von dem Alter der Maus abhing. Alte Mäuse, mit deutlich größeren Herzen, brachten im Allgemeinen auch größere Pellets hervor. Dem hingegen war jedoch die Farbe des Pellet ein Indikator für die Zellqualität in der Suspension. Sehr helle, fast weiß wirkende Pellets, oder helle

Auflagerungen auf dem restlichen Pellet sprachen hier meist für einen sehr großen Anteil an morphologisch beschädigten Zellen. Diese setzten sich an dem Pellet meist oben ab.

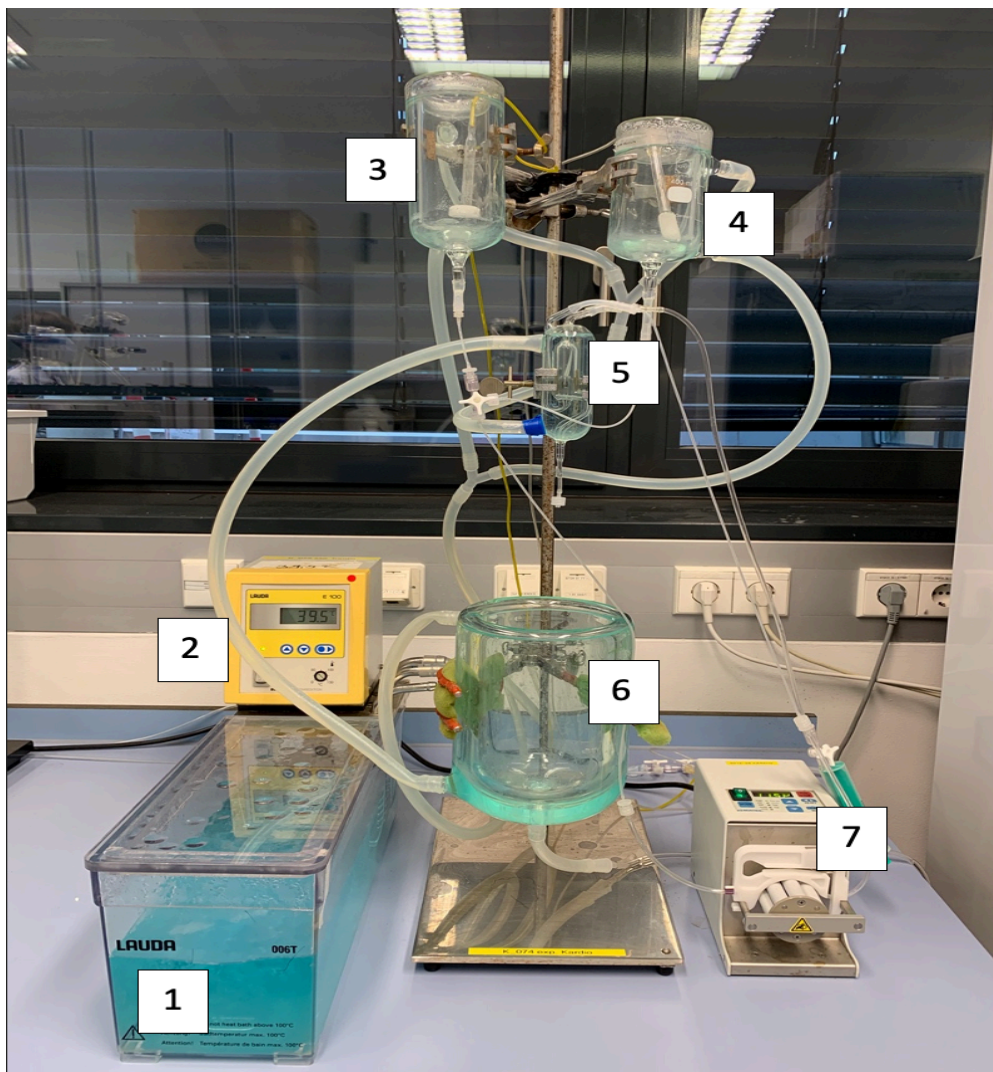


Abbildung 10: Aufbau und Bestandteile des Langendorff-Systems. 1: Wasserbad; 2: Temperaturregler; 3: Perfusionspuffer; 4: Kardiomyozyten-Verdauungslösung; 5: Blasenfalle; 6: Wärmekammer; 7: Peristaltikpumpe

2.3.3. CALCIUM-AUFBAU

Nach dem Absetzen der Kardiomyozyten wurde der Überstand der Stopplösung 1 abpipettiert, 125 μM Calcium-Aufbaulösung hinzugegeben und das Eppendorf-Tube so für 10 Minuten stehen gelassen. Anschließend wurde der Überstand entfernt und die nächsthöhere Calcium-Aufbaustufe (250 μM) hinzugegeben. Nach jeweils 10 Minuten Inkubationszeit und der letzten Calcium-Aufbaulösung (500 μM) wurde der Überstand wieder entfernt und die Normal-Tyrode-Lösung zu den Kardiomyozyten gegeben.

2.4. FÄRBUNG MIT FURA-2/AM

Der ratiometrische Calcium-empfindliche Farbstoff FURA-2/AM (50 μ g) wurde in 50 μ l Dimethylsulfoxid (DMSO, Merck) gelöst, um eine 1 mM Stammlösung herzustellen, welche aliquotiert und anschließend bis zur Verwendung bei -20°C gelagert wurde. Kardiomyozyten wurden mit 1 μ M FURA-2/AM für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Während dieser Inkubationszeit wurden die Kontrollzellen schon unter dem Mikroskop angeschaut, um eine erste Einschätzung der Zellqualität zu erhalten. Nach 20 Minuten wurde nicht aufgenommenes FURA-2/AM mit Normal-Tyrode-Lösung ausgewaschen und FURA-2/AM-beladene und nicht spontan kontrahierende Kardiomyozyten für die Messung verwendet.

FURA-2/AM ist ein Acetoxymethylester-Derivat von Fura-2, das lipophil und zellmembrandurchlässig ist, was eine Diffusion des Farbstoffes in die Zellen ermöglicht. Die intrazellulären Esterasen spalten das Acetoxymethylester von FURA-2/AM, wodurch der Farbstoff in den Zellen erhalten bleibt. FURA-2/AM wird mit einer Lichtwellenlänge von 340 nm und 380 nm angeregt. Je nach Calciumbindungszustand und intrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationen verschiebt sich das Maximum der Fluoreszenzabsorption von 3-facher Erhöhung der Absorption bei 340 nm im calciumgesättigten Zustand zu 10-facher Reduktion der Absorption bei einer Erregungswellenlänge von 380 nm von einer Erregungswellenlänge im calciumfreien Zustand. Das Maximum der Fluoreszenzemission (>505 nm) verändert sich nur gering im calciumgesättigten und calciumfreien Zustand. Nach Anregung mit entsprechenden Lichtwellenlängen wird das Verhältnis der jeweiligen Fluoreszenzintensitäten verwendet (F_{340}/F_{380} Ratio). (Fluorescence Excitation and Emission Fundamentals, o. D). Die Differenz zwischen Erregungs- und Emissionswellenlänge wird als Stokes-Verschiebung bezeichnet. Diese basiert auf einem Energieverlust zwischen Absorption und Emission. Ein Teil der eintreffenden Energie der Photonen wird in Schwingungsenergie bzw. Wärme umgewandelt, das emittierte Licht hat somit eine niedrigere Energiedichte und folglich eine größere Wellenlänge. Die ratiometrische Eigenschaft von FURA-2/AM umgeht die ungleichmäßige Farbstoffverteilung aufgrund der intraorganellen Kompartimentierung und minimiert den Fluoreszenzverlust, bedingt durch die photochemische Zerstörung der Fluorophor-Moleküle durch das Anregungslicht (Photobleichung) (Fluorescence Excitation and Emission Fundamentals, o. D).

2.5. MIKROSKOP, FLUORESCENZ- UND KONTRAKTIONSMESSUNGEN

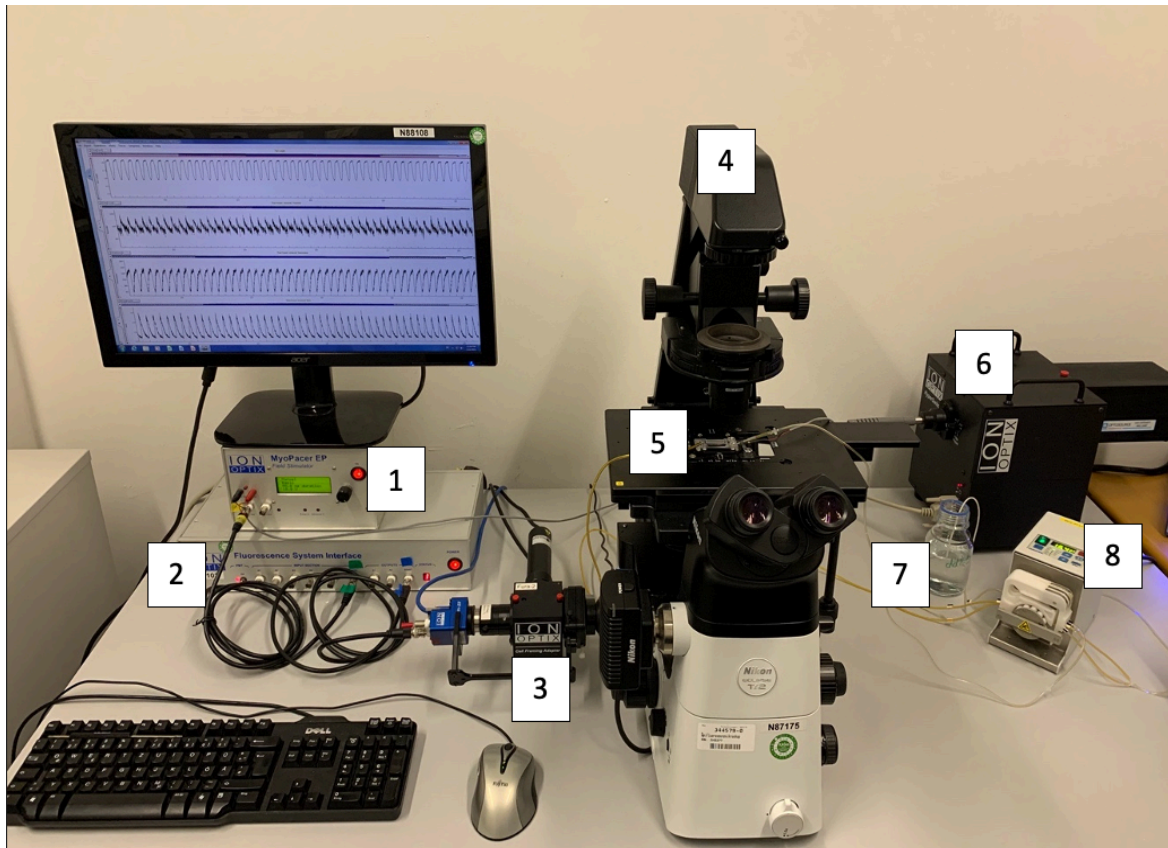


Abbildung 11: Mikroskop, Aufbau des Setups zur Messung von Calcium-Transienten und Kontraktibilität. 1: Feldstimulator; 2: Fluorescence System Interface; 3: Cell Framing Adapter; 4: Nikon Eclipse Ti2; 5: Perfusionskammer; 6: Lichtquelle; 7: Normal-Tyrode-Lösung; 8: Peristaltikpumpe

Die Messungen der isolierten Kardiomyozyten erfolgten mithilfe eines Nikon Eclipse Ti2 Epifluoreszenzmikroskops, an welches eine Lichtquelle (HyperSwitch Light Source, IonOptix) angeschlossen wurde. Hinzu kamen ein Cell Framing Adapter, welches für die Darstellung einzelner Kardiomyozyten nötig war, eine Myo-Cam zur Darstellung der Kontraktionen der einzelnen Zellen, sowie ein Fluorescence System Interface. Weitere Bestandteile des Setups waren eine Perfusionskammer, ein Feldstimulator, die Software IonWizard (Version 7.2 revision 2; alles von IonOptix Irland). Kardiomyozyten wurden mittels Feldstimulator mit einer Frequenz von 1 Hz elektrisch stimuliert. Unter Stimulation wurde nun eine Zelle ausgewählt, die morphologisch (z.B. quergestreift) und funktionell (z.B. nicht spontan kontrahierend) intakt war. Die Zellen wurden jeweils für 120 Sekunden mit 1 Hz, 2 Hz, 3 Hz und 4 Hz stimuliert. Nach der 4 Hz-Stimulation erfolgte erneut eine Stimulation mit 1 Hz für 120 Sekunden bis zum Erreichen eines Steady-State.

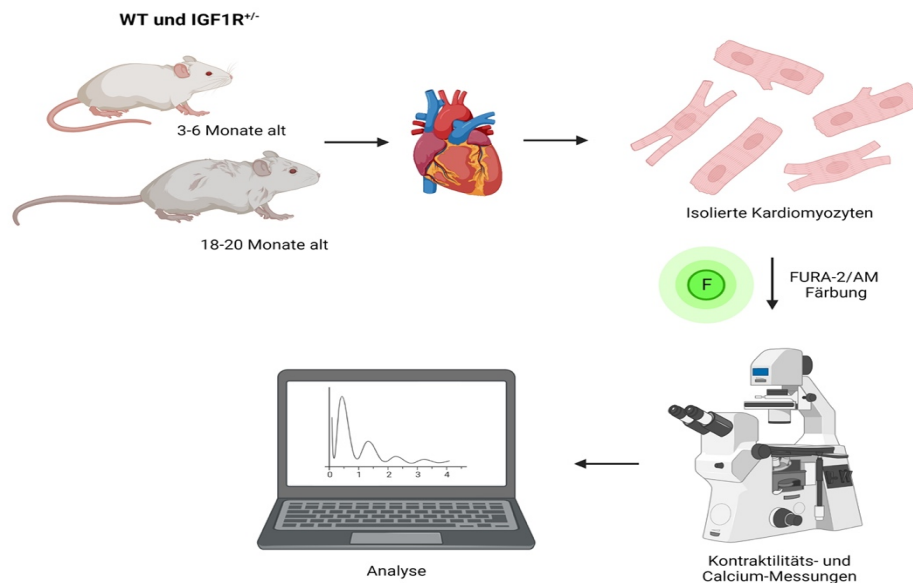


Abbildung 12: Schematische Übersicht der experimentellen Arbeitsschritte.
(erstellt mit Biorender; <https://app.biorender.com>)

2.6. DATENANALYSE

Nach Abschluss aller Experimente und Messungen erfolgte die Auswertung der gemessenen Daten mithilfe der IonOptix-Software. Bei den zunächst dargestellten Base Traces wurde auf der Zeitachse ein Intervall von ca. 30 Sekunden ausgewählt. Dieser gewählte Rahmen sollte für die Analyse der einzelnen Frequenzen stets gleichbleiben und für die Analyse der nächsten Frequenzstufe nur auf der Zeitachse verschoben werden. Bei dem zu analysierenden Intervall war darauf zu achten, dass die Amplituden sowohl bei der Sarkomerverkürzung als auch bei den Calcium-Transienten möglichst gleich blieben und die Analyse in Intervallen mit Steady-State erfolgte. Jegliches Signalartefakt im Steady-State konnten mithilfe der Software exkludiert und aus der Analyse entfernt werden. Das Programm errechnete aus den einzelnen Amplituden Mittelwerte einzelner Parameter und modellierte so eine gemittelte Kurve für jede Frequenz, sowohl für die Sarkomerverkürzung als auch für die Calcium-Transienten. Alle Analyseschritte erfolgten „verblindet“. Die Entblindung erfolgte wie weiters beschrieben. Die ermittelten Daten wurden chronologisch gespeichert und in einer Excel-Datei zusammengefügt. Hierbei wurden die Messzeitpunkte abgeglichen und es erfolgte eine Entblindung der Daten. Die entsprechenden Gruppen IGF-Y, IGF-O, WT-Y und WT-O wurden in der Excel-Datei ergänzt. Im nächsten Schritt wurde ein weiteres Blatt in der Excel-Datei angelegt, in welchem die Werte der einzelnen Frequenzen zusammengetragen

wurden. Anschließend erfolgte die Bestimmung von Außerreißern mithilfe der 1,5-Interquartilbereich-Regel und des Standardfehlers (SEM). Der limitierende Faktor waren hierbei die Baseline-Fluoreszenzwerte außerhalb des 1,5-Interquartilbereichs (oberhalb des oberen Quartils, Q3 oder unterhalb des unteren Quartils, Q1). Diese Zellen wurden nicht in die Auswertung einbezogen.

		1 Hz				3 Hz			
		IGF,Y	IGF,O	WT,Y	WT,O	IGF,Y	IGF,O	WT,Y	WT,O
	Q1	0,691	0,694	0,729	0,742	0,798	0,796	0,801	0,864
	Q3	0,873	0,850	0,919	0,939	0,957	1,012	1,013	1,048
	IQR	0,182	0,156	0,190	0,197	0,159	0,216	0,212	0,185
1,5*IQR rule	outlier low	0,418	0,460	0,444	0,447	0,560	0,472	0,483	0,587
	outlier high	1,146	1,084	1,204	1,235	1,196	1,336	1,331	1,325
		2 Hz				4 Hz			
		IGF,Y	IGF,O	WT,Y	WT,O	IGF,Y	IGF,O	WT,Y	WT,O
	Q1	0,731	0,731	0,769	0,796	0,855	0,813	0,836	0,887
	Q3	0,923	0,928	0,984	0,983	1,004	1,068	1,093	1,104
	IQR	0,192	0,197	0,215	0,188	0,149	0,255	0,257	0,217
1,5*IQR rule	outlier low	0,443	0,436	0,447	0,514	0,631	0,431	0,451	0,561
	outlier high	1,211	1,224	1,307	1,264	1,228	1,451	1,479	1,430

Abbildung 13: Identifikation von Außerreißern mithilfe der 1,5-Interquartilbereich-Regel

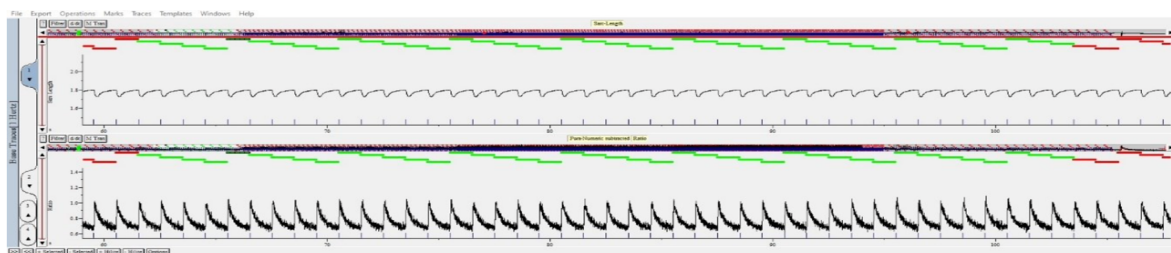


Abbildung 14: Beispiel Transientenanalyse

Im oberen Graphen der Abbildung ist die Sarkomerverkürzung einer ausgewählten Zelle bei einer Frequenz von 1 Hz über die Zeit dargestellt. Der untere Graph zeigt die gemessenen Fluoreszenz-Signale als F340/380 Fura-2/AM Ratio.

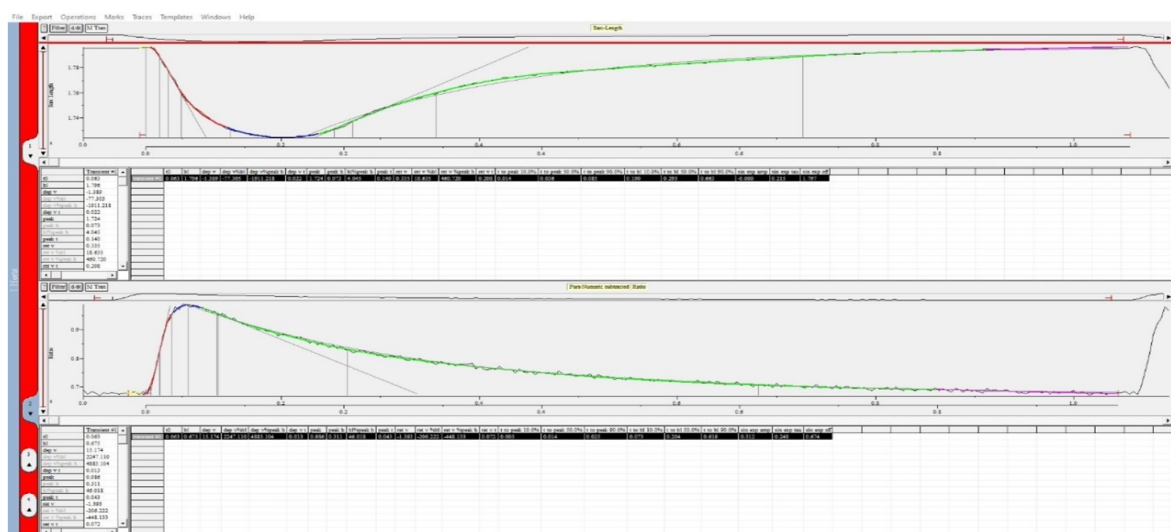


Abbildung 15: Beispiel Kurvenmodell

Die obere Abbildung zeigt die gemittelten Transienten der Sarkomerlänge der Zellen über die Zeit. Die untere Abbildung zeigt die gemittelten Transienten der gemessenen Fluoreszenz-Signale als F340/380 Fura-2/AM Ratio.

2.7. GRAPHISCHE DARSTELLUNG UND STATISTISCHE ANALYSE

Nach Identifikation und Elimination der Ausreißer wurden die Mittelwerte der einzelnen Frequenzen in das Programm GraphPadPrism 8.4.0 übertragen und Daten mittels einer 1-Wege-ANOVA- und einer 2-Wege-ANOVA analysiert.

Für die 1-Wege-ANOVA wurde eine Gauß'sche Normalverteilung angenommen. Gleiche Standardabweichungen wurden nicht angenommen, weshalb der Brown-Forsythe und Welch-ANOVA-Test durchgeführt wurden. Im Mehrvergleichstest wurde nicht für multiple Vergleiche korrigiert. Hier wurde der ungepaarte T-Test und die Welch-Korrektur verwendet. Die Signifikanz wurde mit $p < 0,05$ festgelegt und das Confidence-Intervall mit 95% angegeben.

Für die eine 2-Wege-ANOVA wurde keine Spharizität (gleiche Variabilität der Unterschiede) der Werte angenommen. Es wurde eine Geisser-Greenhouse-Korrektur verwendet. Für den Fall, dass während der Analyse keine fehlenden Werte auftraten, wurde das ANOVA-Modell verwendet, bei fehlenden Werten wurde die Option eines mixed-effects-Modells gewählt. Werte wurden in dem Modell nicht berücksichtigt und ein einfacheres System wurde angepasst, wenn sie den Wert Null oder negative Zahlenwerte annahmen. Der Tukey-Test wurde als Mehrvergleichstest herangezogen und eine Signifikanz von $p < 0,05$ festgelegt. Das Confidence-Intervall wurde mit 95% angegeben.

3. ERGEBNISSE

Diastolische (Baseline) Sarkomerlänge und FURA-2/AM Fluoreszenz

IGF1R-O Kardiomyozyten zeigten in allen Frequenzen die niedrigsten Sarkomerlängen, welche sich bei höheren Frequenzen und einer damit einhergehenden verkürzten Diastole, abermals reduzierten (Abbildung 16A). Diese Gruppe zeigte im Vergleich zu allen anderen Gruppen signifikante Unterschiede in der diastolischen Sarkomerlänge (IGF1R-Y vs. IGF1R-O, $P=0.005$; WT-O vs. IGF1R-O $P=0.002$). IGF1R-Y Kardiomyozyten zeigten bei 1 Hz und 2 Hz ähnliche Werte wie WT-Y, hatten jedoch bei 3 und 4 Hz größere Sarkomerlängen, welche jedoch das Signifikanzniveau nicht erreicht haben. WT-O Kardiomyozyten zeigten initial die größte Sarkomerlänge, welche bei zunehmender Frequenz vergleichbar mit den IGF1R-O Zellen abfiel. Signifikante Unterschiede gab es zwischen WT-O und IGF1R-O Kardiomyozyten in Frequenzen von 1 bis 3 Hz (WT-O vs. IGF1R-O, 1 Hz: $P=0.018$; 2 Hz: $P=0.03$; 3 Hz: $P=0.024$; Abbildung 16A).

Die F_{340}/F_{380} Ratio stieg in allen Gruppen mit zunehmender Frequenz. Signifikante Unterschiede lagen hierbei nicht vor (Abbildung 16B). Im Vergleich einzelner Gruppen in einzelnen Frequenzen wurden keine relevanten Signifikanzen festgestellt.

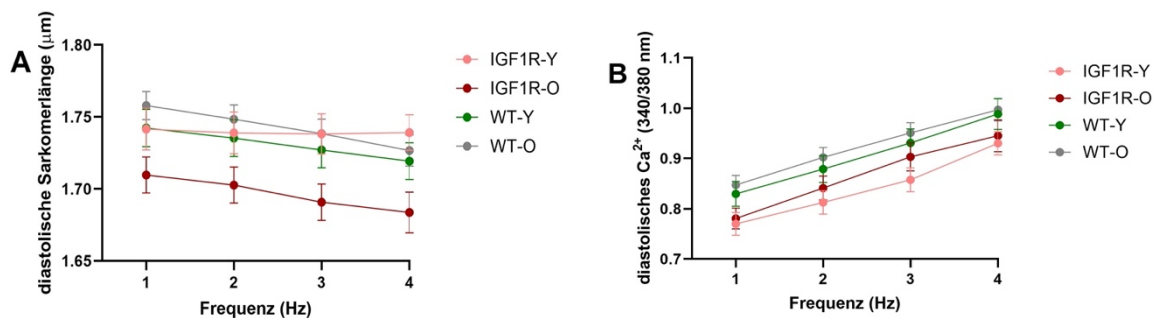


Abbildung 16: Diastolische (Baseline) Sarkomerlänge und FURA-2/AM Fluoreszenz

(A) Die diastolische (Baseline) Sarkomerlänge ist ein prädiktiver Wert für die Zellgesundheit und die Kontraktilität der Zelle. **(B)** Die diastolische (Baseline) FURA-2/AM Fluoreszenz stellt indirekt die diastolische Calcium-Konzentration (nicht-kalibrierte Werte) dar. Dieser Wert wurde vorab für die Definition von Ausreißern herangezogen, da Fehl- oder Minderbelastungen der Zellen zu einem vermehrten Auftreten von Rauscharakterfakten geführt hätten.

N (WT-Y) = 33 Zellen; N (WT-O) = 54 Zellen; N (IGF1R-Y) = 29 Zellen; N (IGF1R-O) = 28 Zellen

Maximale (systolische) Amplitude der Sarkomerlänge und der FURA-2/AM Fluoreszenz

Ähnlich zu der diastolischen Sarkomerlänge zeigten IGF1R-O Zellen die niedrigsten systolischen Sarkomerlängen, welche bei zunehmender Frequenz weiterhin abnahmen, zumindest bis zu einer Frequenz von 3 Hz (Abbildung 17A). IGF1R-Y und WT-Y Kardiomyozyten zeigten, analog zur diastolischen (Baseline) Sarkomerlänge, ähnliche Werte bei Frequenzen von 1 Hz und 2 Hz. WT-O Zellen hatten bei zunehmender Frequenz annähernd konstant abnehmende Sarkomerlängen. Analog zu den signifikanten Unterschieden der diastolischen (Baseline) Sarkomerlängen bestanden auch hier im Vergleich der gleichen Gruppen signifikante Unterschiede (IGF1R-Y vs. IGF1R-O, $P=0.002$; IGF1R-O vs. WT-O, $P=0.006$). Innerhalb der Frequenzen 1 bis 3 Hz zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen WT-O und IGF1R-O (1 Hz: $P<0.001$; 2 Hz: $P=0.005$; 3 Hz: $P=0.015$; Abbildung 17A).

Alle Gruppen zeigten bei zunehmender Frequenz einen relativ konstanten Anstieg der maximalen Amplitude der FURA-2/AM Fluoreszenz (systolische F_{340}/F_{380} Ratio; Abbildung 17B). Lediglich IGF1R-O Kardiomyozyten zeigten in der 4 Hz Frequenz eine abnehmende FURA-2/AM Fluoreszenz. IGF1R-Y Zellen zeigten in allen Frequenzen die kleinste maximale Amplitude der FURA-2/AM Fluoreszenz, wohingegen WT-Y Mäuse in allen Frequenzen die höchsten Werte aufwiesen, welche eine Signifikanz erreicht haben ($P=0.049$; Abbildung 17B).

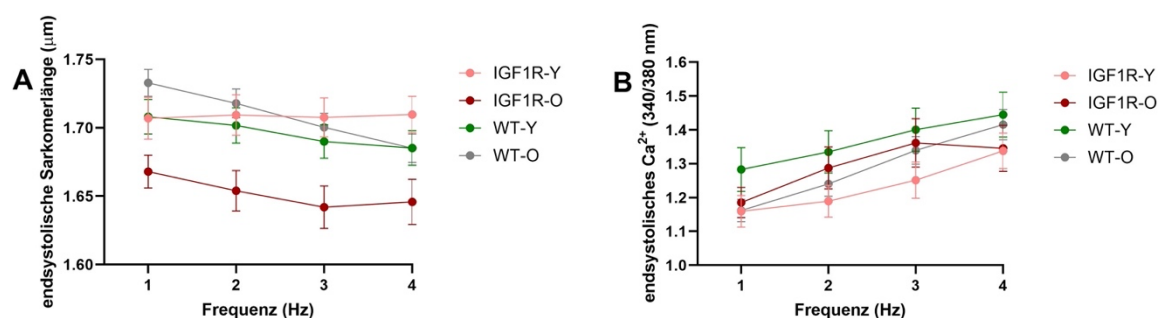


Abbildung 17: Maximale (systolische) Amplitude der Sarkomerlänge (A) und der FURA-2/AM Fluoreszenz (B)

N (WT-Y) = 33 Zellen; N (WT-O) = 54 Zellen; N (IGF1R-Y) = 29 Zellen; N (IGF1R-O) = 28 Zellen

Relative Verkürzung der Sarkomerlänge und relativer Anstieg der FURA-2/AM Fluoreszenz

IGF1R-O Kardiomyozyten zeigten von 1 bis 3 Hz die größte relative Verkürzung. Lediglich bei 4 Hz näherten sich die Werte denen der anderen Gruppen an (Abbildung 18A). Diese zeigten in allen Frequenzen annähernd ähnliche Verläufe. IGF1R-O Zellen zeigten signifikante Unterschiede zu allen anderen Gruppen (IGF1R-Y vs. IGF1R-O, $P=0.008$; WT-O vs. IGF1R-O, $P=0.05$).

WT-O Zellen zeigten hierbei den geringsten relativen Anstieg der FURA-2/AM Konzentration. Dieser nahm mit steigender Frequenz zu (Abbildung 18B). Die anderen Gruppen zeigten deutlich höhere Werte, welche bei zunehmender Frequenz abnahmen, so dass bei einer Frequenz von 4 Hz alle Gruppen annähernd ähnliche Werte aufwiesen. WT-O Kardiomyozyten zeigten hier signifikante Unterschiede zu den anderen Gruppen (WT-O vs. IGF1R-O, $P=0.027$; WT-Y vs. WT-O; $P=0.004$; Abbildung 18B).

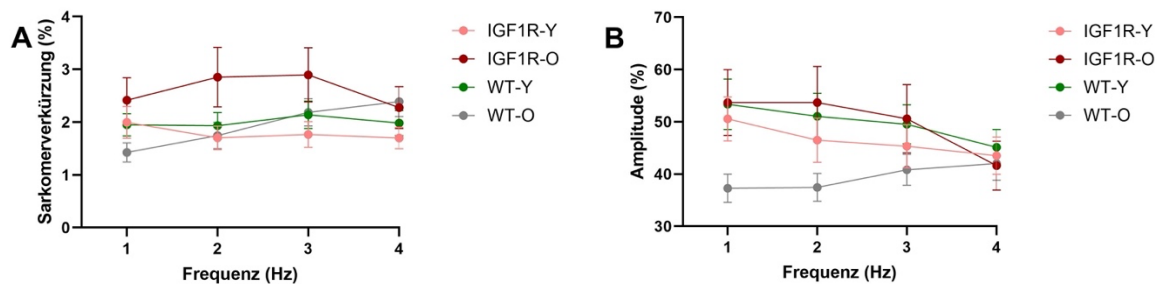


Abbildung 18: Relative Verkürzung der Sarkomerlänge und relativer Anstieg FURA-2/AM Fluoreszenz

(A) relative Sarkomerverkürzung von der Baseline bis zur maximalen Amplitude (von der maximalen diastolischen zur systolischen Sarkomerlänge). (B) Relativer Anstieg der FURA-2AM Fluoreszenz von der Baseline bis zur maximalen Amplitude (von der diastolischen zur systolischen FURA-2/AM Fluoreszenz).

N (WT-Y) = 33 Zellen; N (WT-O) = 54 Zellen; N (IGF1R-Y) = 29 Zellen; N (IGF1R-O) = 28 Zellen

Geschwindigkeit der systolischen Sarkomerverkürzung und des systolischen FURA-2/AM-Fluoreszenz-Anstiegs

Im Gegensatz zu der WT-O Gruppe, die den Trend zur geringsten Geschwindigkeit zeigte, welche über die Frequenzen deutlich zunahm, waren die Geschwindigkeitswerte der systolischen Sarkomerverkürzung von IGF1R-O, IGF1R-Y und WT-Y Kardiomyozyten bei 1 Hz vergleichbar mit WT-O Kardiomyozyten (Abbildung 19A). Die Kontraktionsgeschwindigkeit nahm bei IGF1R-O Mäusen mit zunehmender Frequenz bis zu 3 Hz zu. IGF1R-Y und WT-Y Zellen zeigten ähnliche Werte. Insgesamt konnten zu diesem Parameter keine Signifikanzen nachgewiesen werden (Abbildung 19A).

WT-Y Kardiomyozyten zeigten bei dem systolischen FURA-2/AM-Fluoreszenz-Anstieg die schnellste Kinetik mit leicht ansteigenden Geschwindigkeiten über die gegebenen Frequenzen und wiesen signifikant höhere Geschwindigkeiten im Vergleich zu IGF1R-Y Zellen auf (WT-Y vs. IGF1R-Y, $P=0.001$; Abbildung 19B). WT-O und IGF1R-O Zellen zeigten in den Frequenzen 1 und 2 Hz ähnlich niedrige Geschwindigkeiten und divergierten dann bei zunehmender Frequenz auseinander. WT-O Zellen zeigten bei zunehmender Frequenz konstant größer werdende Geschwindigkeiten und näherten sich bei 4 Hz der WT-Y Gruppe an. IGF1R-O Mäuse zeigten von 2 auf 3 Hz nur einen geringen Zuwachs an Geschwindigkeit, bei 4 Hz nahm diese dann deutlich ab. Weitere signifikante Unterschiede wurden zwischen jungen und alten Gruppen deutlich (IGF1R-Y vs. IGF1R-O, $P=0.022$; Abbildung 19B).

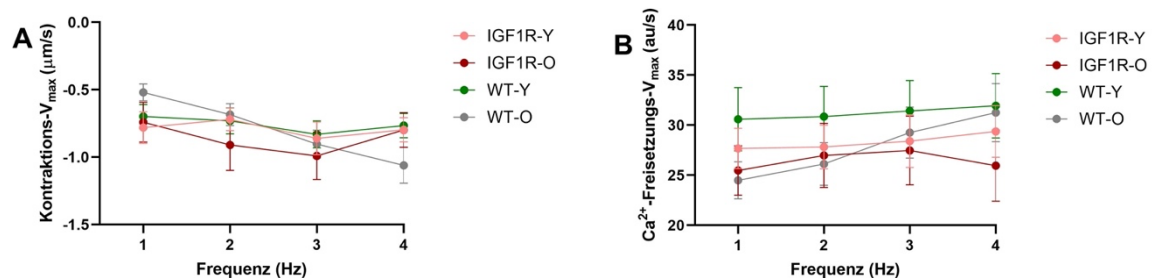


Abbildung 19: Geschwindigkeit der systolischen Sarkomerverkürzung (A) und Geschwindigkeit des systolischen FURA-2/AM-Fluoreszenz-Anstiegs (B)

N (WT-Y) = 33 Zellen; N (WT-O) = 54 Zellen; N (IGF1R-Y) = 29 Zellen; N (IGF1R-O) = 28 Zellen

Zeit bis zur maximalen Geschwindigkeit der systolischen Sarkomerverkürzung und zur maximalen Geschwindigkeit des systolischen FURA-2/AM-Fluoreszenz-Anstiegs

IGF1R-O Zellen erreichten die maximale Kontraktionsgeschwindigkeit am spätesten und zeigten signifikante Unterschiede zur WT-O Gruppe (WT-O vs. IGF1R-O, $P=0.002$; Abbildung 20A). Diese zeigte bei 1 Hz noch die geringste Dauer, welche bei zunehmender Frequenz deutlich abnahm. IGF1R-Y Zellen zeigten von 1 bis 3 Hz einen Abfall der Zeit bis zur maximalen Kontraktionsgeschwindigkeit, bei 4 Hz stieg diese jedoch deutlich an. WT-Y Kardiomyozyten zeigten ein ähnliches Verhalten im Bereich von 1 bis 3 Hz, hatten jedoch gering höhere Werte (längere Zeiten bis zum Erreichen der maximalen Kontraktionsgeschwindigkeit; Abbildung 20A).

Ähnlich wie bei der systolischen Sarkomerverkürzung erreichten IGF1R-O Kardiomyozyten die maximale Geschwindigkeit des systolischen FURA-2/AM-Fluoreszenz-Anstiegs später als die anderen Gruppen und mit signifikanten Unterschieden (IGF1R-Y vs. IGF1R-O; $P<0.001$, WT-O vs. IGF1R-O, $P=0.003$; Abbildung 20B). Signifikante Unterschiede innerhalb einzelner Frequenzen bestanden bei 3 Hz zwischen IGF1R-Y und IGF1R-O ($P=0.027$) und bei 4 Hz zwischen IGF1R-Y und IGF1R-O ($P=0.015$; Abbildung 20B).

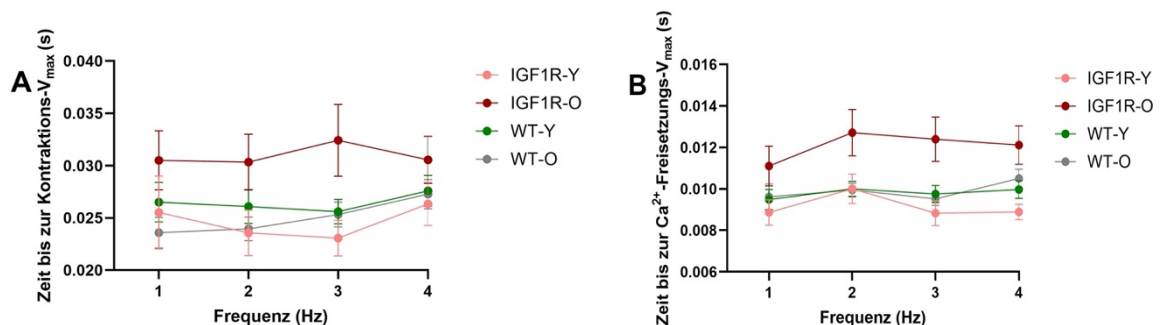


Abbildung 20: Zeit bis zur maximalen Geschwindigkeit der systolischen Sarkomerverkürzung (A) und Zeit bis zur maximalen Geschwindigkeit des systolischen FURA-2/AM-Fluoreszenz-Anstiegs (B)

N (WT-Y) = 33 Zellen; N (WT-O) = 54 Zellen; N (IGF1R-Y) = 29 Zellen; N (IGF1R-O) = 28 Zellen

Geschwindigkeit der diastolischen Sarkomerverlängerung und des diastolischen FURA-2/AM-Fluoreszenz-Abfalls

Alle Gruppen zeigten vergleichbare Geschwindigkeiten der diastolischen Sarkomerverlängerung und des diastolischen FURA-2/AM-Fluoreszenz-Abfalls (Abbildung 21 A und B).

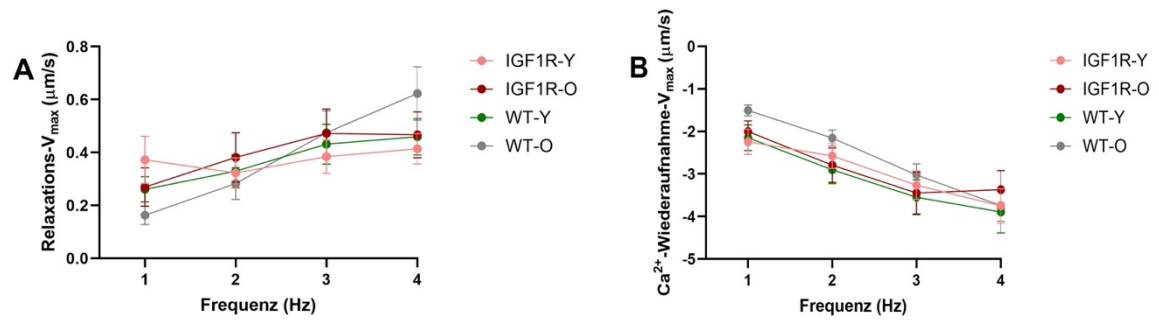


Abbildung 21: Geschwindigkeit der diastolischen Sarkomerverlängerung (A) und des diastolischen FURA-2/AM-Fluoreszenz-Abfalls

N (WT-Y) = 33 Zellen; N (WT-O) = 54 Zellen; N (IGF1R-Y) = 29 Zellen; N (IGF1R-O) = 28 Zellen

Zeit bis zum Erreichen der maximalen Geschwindigkeit der Sarkomerverlängerung der maximalen Geschwindigkeit des FURA-2/AM-Fluoreszenz-Abfalls

IGF1R-O Kardiomyozyten benötigten über alle Frequenzen mehr Zeit als die anderen Gruppen um die maximale Relaxationsgeschwindigkeit der Sarkomerverlängerung zu erreichen (Abbildung 22A). Ähnlich verhielten sich WT-O Zellen, gefolgt von WT-Y und IGF1R-Y Zellen mit der geringsten benötigten Zeit. Alle Gruppen zeigten eine ähnliche frequenzabhängig verkürzte Dauer bis zum Erreichen der maximalen Geschwindigkeit der Sarkomerverlängerung. Innerhalb der einzelnen Frequenzen lagen signifikante Unterschiede zwischen IGF1R-Y und IGF1R-O (1 Hz: $P=0.001$; 2 Hz: $P=0.05$; 3 Hz: $P=0.007$; 4 Hz: $P=0.002$) vor.

IGF1R-O Kardiomyozyten benötigten über alle Frequenzen die meiste Zeit um die maximale Geschwindigkeit des FURA-2/AM-Fluoreszenz-Abfalls zu erreichen, die im Vergleich zu allen anderen Gruppen statistisch signifikant war (IGF1R-Y vs. IGF1R-O, $P=0.009$; WT-O vs. IGF1R-O: $P=0.006$; Abbildung 22B). IGF1R-Y und WT-Y Zellen zeigten bei 1 und 2 Hz vergleichbare Werte, divergierten jedoch bei 3 und 4 Hz auseinander. IGF1R-Y Zellen benötigten bei höheren Frequenzen (3 und 4 Hz) weniger Zeit bis zum Erreichen der maximalen Geschwindigkeit des FURA-2/AM-Fluoreszenz-Abfalls, während WT-Y Zellen mehr Zeit benötigten. WT-O Zellen verhielten sich ähnlich wie WT-Y Zellen. Die WT-O Kardiomyozyten zeigten bei 1 und 2 Hz zunächst die geringste Zeit bis zum Erreichen der maximalen Geschwindigkeit des FURA-2AM-Fluoreszenz-Abfalls, verlangsamten jedoch deutlich bei 3 und 4 Hz (Abbildung 22B).

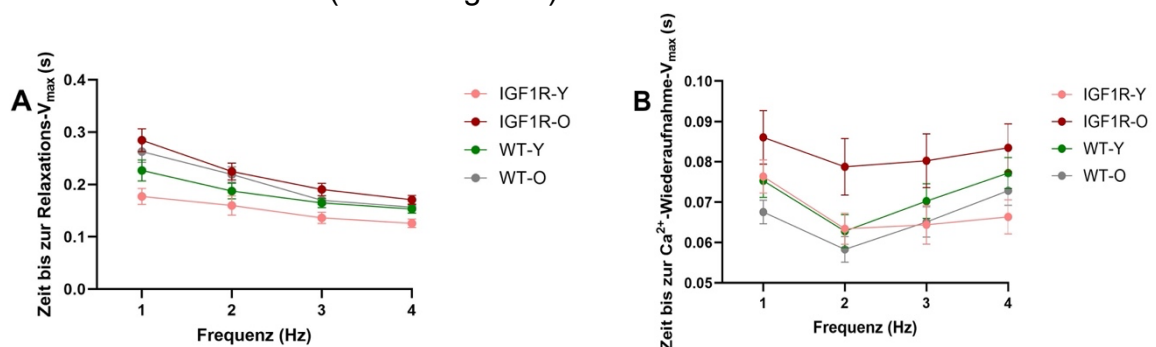


Abbildung 22: Zeit bis zum Erreichen der maximalen Geschwindigkeit der Sarkomerverlängerung (A) und des FURA-2/AM-Fluoreszenz-Abfalls (B)

N (WT-Y) = 33 Zellen; N (WT-O) = 54 Zellen; N (IGF1R-Y) = 29 Zellen; N (IGF1R-O) = 28 Zellen

Zeit bis zum Erreichen der halb-maximalen systolischen Sarkomerlänge und der halb-maximalen systolischen FURA-2/AM Fluoreszenzamplitude

IGF1R-O Kardiomyozyten benötigten in allen Frequenzen die meiste Zeit, um die halb-maximale systolische Sarkomerlänge zu erreichen, welche von 1 bis 4 Hz kontinuierlich abnahm, und zeigten signifikante Unterschiede zu WT-O Zellen ($P=0.032$; Abbildung 23A). Die Werte bei WT-Y und WT-O waren vergleichbar. IGF1R-Y Zellen benötigten über alle Frequenzen die geringste Zeit um 50% der minimalen systolischen Sarkomerlänge zu erreichen und zeigten hierbei signifikante Unterschiede zu WT-Y Zellen ($P=0.026$; Abbildung 23A). Weiters bestand Signifikanz zwischen IGF1R-O und IGF1R-Y ($P=0.009$). Innerhalb einzelner Frequenzen konnten wir signifikante Unterschiede zwischen IGF1R-Y und IGF1R-O (1 Hz: $P=0.005$; 2 Hz: $P=0.003$; 3 Hz: $P=0.007$; 4 Hz: $P=0.012$), sowie zwischen WT-O und IGF1R-O (1 Hz: $P=0.017$; 2 Hz: $P=0.019$; Abbildung 23A) feststellen. IGF1R-O Zellen zeigten über alle Frequenzen einen deutlich langsameren Anstieg der halb-maximalen FURA-2/AM-Fluoreszenzamplitude in der Systole, mit signifikanten Unterschieden zu WT-O (WT-O vs. IGF1R-O, $P<0.001$) und zu den jungen Kardiomyozyten (IGF1R-Y vs. IGF1R-O, $P<0.0001$). IGF1R-Y Zellen benötigten signifikant weniger Zeit als WT-Y Kardiomyozyten um die halb-maximale systolische FURA-2/AM-Fluoreszenzamplitude zu erreichen ($P=0.015$; Abbildung 23B).

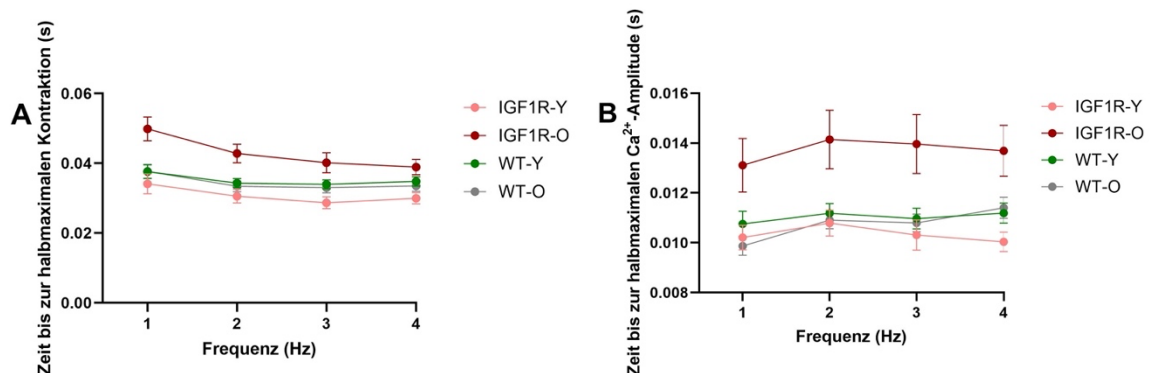


Abbildung 23: Zeit bis zum Erreichen der halb-maximalen systolischen Sarkomerlänge (A) und der halb-maximalen systolischen FURA-2/AM-Fluoreszenzamplitude

N (WT-Y) = 33 Zellen; N (WT-O) = 54 Zellen; N (IGF1R-Y) = 29 Zellen; N (IGF1R-O) = 28 Zellen

Zeit bis zum Erreichen der 90% der diastolischen (Baseline) Sarkomerlänge und der diastolischen FURA-2/AM-Fluoreszenz

Es konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden (Abbildung 24 A und B).

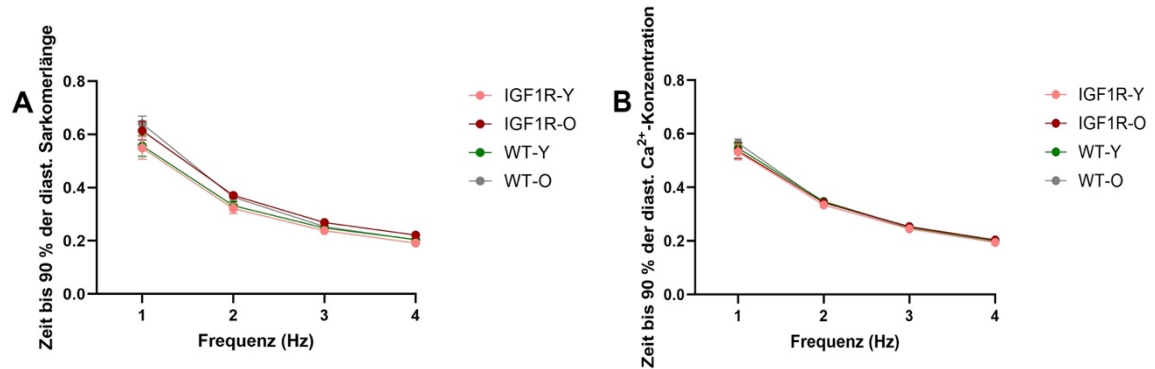


Abbildung 24: Zeit bis zum Erreichen der 90% der diastolischen (Baseline) Sarkomerlänge (A) und 90% der FURA-2/AM-Fluoreszenz in der Diastole (B)

N (WT-Y) = 33 Zellen; N (WT-O) = 54 Zellen; N (IGF1R-Y) = 29 Zellen; N (IGF1R-O) = 28 Zellen

4. DISKUSSION

Ziel der vorliegenden Arbeit war es herauszufinden, welche Effekte eine chronische Aktivierung des IGF-1R-Signalwegs in Mauskardiomyozyten hinsichtlich der Kontraktilität und Calcium-Homöostase besitzt. Unsere Ergebnisse zeigen, dass IGF1R-O Kardiomyozyten im Vergleich mit gleichaltrigen Kardiomyozyten vom Wildtyp mehr Zeit bis zum Erreichen der maximalen Geschwindigkeit der systolischen Sarkomerverkürzung und der maximalen Geschwindigkeit des systolischen FURA-2/AM-Fluoreszenz-Anstiegs benötigten. Ebenfalls war die Zeit bis zum Erreichen der halb-maximalen systolischen Sarkomerlänge bzw. bis zum Erreichen der halb-maximalen systolischen FURA-2/AM Fluoreszenzamplitude im Vergleich zu Wildtypen verlängert. Diese kinetischen Parameter sind indikativ für eine langsamere Kontraktionskinetik und Kraftentwicklung der Kardiomyozyten. Die gewonnenen Ergebnisse sind kongruent mit der Hypothese, dass eine chronische Aktivierung des IGF-1R-Signalwegs negative Auswirkungen auf die Funktion gealterter Kardiomyozyten hinsichtlich ihrer Kontraktilität und Ca^{2+} -Homöostase besitzt. Weiterhin zeigten transgene Zellen eine verlängerte Zeit bis zum Erreichen der maximalen Geschwindigkeit des FURA-2/AM-Fluoreszenz-Abfalls. Dieser Parameter charakterisiert die diastolische Ca^{2+} -Regulation und ist hinweisend, dass eine chronische IGF-1R-Signaaktivität ebenfalls negative Auswirkungen auf die Ca^{2+} -Homöostase und Relaxationskinetik besitzt. Interessanterweise zeigten alte IGF1R-Zellen eine kürzere Baseline (diastolische) Sarkomerlänge, sowie eine kleinere maximale (systolische) Amplitude der Sarkomerlänge im Vergleich mit Wildtyp-Zellen. Weiterhin wiesen IGF1R-O Zellen die höchste relative Verkürzung der Sarkomerlängen und, im Vergleich mit gleichaltrigen Wildtypen, einen größeren relativen Anstieg der FURA-2/AM Fluoreszenz auf. Zusammenfassend zeigte sich in transgenen Kardiomyozyten eine verbesserte Kontraktilität und ein höherer intrazellulärer Ca^{2+} -Anstieg im Zusammenhang mit einer kleineren Sarkomerlänge und einer geringeren FURA-2/AM Fluoreszenz, was auf einen Kompensationsmechanismus in IGF1R-Zellen hinweist.

Junge Wildtyp-Zellen zeigten im Vergleich mit gleichaltrigen transgenen Zellen eine größere maximale (systolische) Amplitude der FURA-2/AM Fluoreszenz, sowie eine höhere Geschwindigkeit des systolischen FURA-2/AM-Fluoreszenz-Anstiegs. Diese Befunde zeigen, dass eine chronische IGF-1R-Aktivierung ebenfalls deutliche

Effekte auf die Ca^{2+} -Homöostase in jungen Kardiomyozyten besitzt. Diese lassen sich jedoch nicht eindeutig einer positiven oder negativen Beeinflussung zuordnen. Transgene Zellen benötigten weniger Zeit bis zum Erreichen der halb-maximalen systolischen Sarkomerlänge und bis zum Erreichen der halb-maximalen systolischen FURA-2/AM Fluoreszenzamplitude. Diese Befunde sprechen für eine IGF-1R-abhängige verbesserte Kinetik der Kontraktion und Ca^{2+} -Homöostase gegenüber Wildtypzellen. Zusammenfassend sprechen die vorliegenden Ergebnisse i.e.L. für negative Effekte in einer chronischen IGF-1R-Signaltransduktion in gealterten Kardiomyozyten, welche sich sowohl in systolischen und diastolischen Parametern als auch in der Kontraktilität und der Ca^{2+} -Homöostase manifestieren. Eindeutig positive Effekte auf die Funktion junger Kardiomyozyten ließen sich nicht eindeutig darstellen. Letztere Ergebnisse sind kongruent mit den Ergebnissen von Li *et al.* (2006), welche ebenfalls keine signifikanten IGF-1-assoziierten Auswirkungen hinsichtlich der Kontraktionsfunktion in jungen Kardiomyozyten gefunden haben. Dem hingegen zeigen unsere Befunde jedoch widersprüchliche Ergebnisse in gealterten Kardiomyozyten. Li *et al.* beschreiben eine im Alter durch IGF-1 induzierte Abschwächung der kontraktilen Dysfunktion in Kardiomyozyten und sprechen dem Insulinähnlichen Wachstumsfaktor 1 positive Effekte auf die Kardiomyozytenfunktion im Alter zu. Transgene Zellen mit einer kardiomyozytenspezifischen IGF-1-Expression zeigten im Vergleich zu gleichaltrigen Wildtypen eine höhere Verkürzungs- und Verlängerungsgeschwindigkeit, sowie eine kürzere Verlängerungsdauer. Mehrere Forschungsgruppen zeigten bereits widersprüchliche Ergebnisse hinsichtlich der Auswirkungen von IGF-1 auf die Funktion junger und alter Kardiomyozyten, bedienten sich allerdings meisten der Verwendung des IGF-1 und führten nur Messungen von Kontraktilitätsparametern ohne Ca^{2+} -Amplitude und Kinetik durch. Unsere Arbeit hingegen bedient sich einer kardiomyozytenspezifischen Überexpression des IGF-1-Rezeptors, weshalb direkte Vergleiche mit anderen Studien nur eingeschränkt möglich sind, da sich erhöhte oder reduzierte IGF-1-Konzentrationen nicht direkt auf die Aktivität des IGF-1R-Signalwegs übertragen lassen (Abdellatif *et al.*, 2022) Weiterhin haben wir neben Parametern der Kontraktilität auch Parameter der Ca^{2+} -Homöostase in Kardiomyozyten gemessen. Unsere Ergebnisse können positive Effekte einer IGF-1-Signalgebung im Alter nicht unterstützen und zeigen, dass eine vermehrte IGF-1R-Aktivität einige kinetische

Parameter der systolischen und diastolischen Funktion von Kontraktilität und Ca^{2+} -Homöostase negativ beeinflussen kann. Pathophysiologisch kann über eine veränderte IGF-1-assoziierte Expression von Proteinen spekuliert werden, welche die intrazelluläre Ca^{2+} -Homöostase regulieren und somit zu einer Beeinträchtigung dieser und der Kontraktilität führen. Anschließend an Li *et al.* sind hier vor allem SERCA2a und NCX zu erwähnen, welche maßgeblich den systolischen und diastolischen Ca^{2+} -Haushalt beeinflussen. Obwohl die derzeitige Literatur hinsichtlich der Wirkung des IGF-1 teils sehr widersprüchlich ist, legen einige Publikationen nahe, dass es im Alter physiologisch zu einer Reduktion der zirkulierenden IGF-1-Spiegel kommt, welche im Herzen einen Kompensationsmechanismus induzieren, welcher durch eine Überexpression des IGF-1R charakterisiert ist. Sollte diese Überexpression mit einer veränderten Expression von Proteinen und einer Verschlechterung von Kontraktilität und Ca^{2+} -Homöostase einhergehen, könnte eine therapeutische Inhibierung dieses Rezeptors oder eine Beeinflussung nachgeschalteter Ziele des IGF-1/IGF-1R-Signalwegs einen Ansatz für Therapieverfahren der altersassoziierten Herzinsuffizienz darstellen. Unsere Arbeit ist hinweisend auf i.e.L. negative Effekte einer chronischen IGF-1R-Aktivierung in alten Kardiomyozyten, benötigt jedoch weitere Messungen, beispielsweise im späteren Alter (>20 Monate alte IGF-1R Mäuse mit Herzinsuffizienz), und weiterführende Untersuchungen um ursächliche Mechanismen der IGF-1R-induzierten Dysfunktion zu klären.

4.1. MÖGLICHE EINSCHRÄNKUNGEN (BIAS)

4.1.1. SYSTEMATISCHE BIAS

Systematische Fehler in dieser Arbeit können durch die Verwendung identischer Protokolle für jede Zelle weitestgehend ausgeschlossen werden. Jedes Versuchstier durchlief zunächst genau festgelegte und standardisierte Schritte bis zur Herzentnahme. Die Zellisolation, sowie die Messungen und die Auswertung der Ergebnisse erfolgte ebenfalls für jede Tier und jede Zelle nach einem klar festgelegten Schema.

4.1.2. SELEKTIONSBIAS

Bei der Auswahl der im Mikroskop zu messenden Zellen wurden vor allem subjektive, nicht messbare Charakteristika der isolierten Kardiomyozyten herangezogen. So gab es vor allem morphologische und funktionelle Kriterien, welche verwendet wurden. Zellen mit einer klaren Abgrenzung der Zellmembran und einer nahezu rechteckigen Form wurden hierbei bevorzugt, da Zellen mit inkonstanter Form im Allgemeinen anfälliger für Messfehler waren. Weiterhin zeigten diese Zellen im Stimulationsprotokoll keine Arrhythmien. Vor Beginn des Protokolls wurden die Zellen für einige Zeit mit einer Frequenz von 1 Hz stimuliert, bis sie ein Steady-State erreicht haben. Zellen, welche beispielsweise erst im Verlauf des Protokolls mit der Kontraktion begannen, wurden somit ausgeschlossen. Weiterhin wurde subjektiv zwischen den kontrahierenden Zellen unterschieden. Zellen mit einer vermeintlich besseren Kontraktilität wurden hierbei präferiert. In den verschiedenen Gruppen zeigten sich weiterhin Unterschiede in den Anteilen an morphologisch und funktionelle intakten Zellen. Alte Populationen wiesen hierbei generell weniger intakte Zellen auf als die jungen Populationen. In der alten Population zeigten sich Unterschiede zwischen transgenen Zellen und Wildtypen, einhergehend mit einer reduzierten Funktionalität in transgenen Zellen. Dies zeigt, dass diese Zelle den Isolationsprozess und die Färbung mit FUR-2/AM im schlechteren Zustand überstanden haben.

5. LITERATURVERZEICHNIS

Abdellatif M, Trummer-Herbst V, Heberle AM, Humnig A, Pendl T, Durand S, Cerrato G, Hofer SJ, Islam M, Voglhuber J, Ramos Pittol JM, Kepp O, Hoefler G, Schmidt A, Rainer PP, Scherr D, von Lewinski D, Bisping E, McMullen JR, Diwan A, Eisenberg T, Madeo F, Thedieck K, Kroemer G, Sedej S. Fine-Tuning Cardiac Insulin-Like Growth Factor 1 Receptor Signaling to Promote Health and Longevity. *Circulation*. 2022 Jun 21;145(25):1853-1866. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.122.059863. Epub 2022 May 26. PMID: 35616058; PMCID: PMC9203038.

Adachi-Akahane S, Cleemann L, Morad M. Cross-signaling between L-type Ca²⁺ channels and ryanodine receptors in rat ventricular myocytes. *J Gen Physiol*. 1996 Nov;108(5):435-54. doi: 10.1085/jgp.108.5.435. PMID: 8923268; PMCID: PMC2229354.

Adams TE, Epa VC, Garrett TP, Ward CW. Structure and function of the type 1 insulin-like growth factor receptor. *Cell Mol Life Sci*. 2000 Jul;57(7):1050-93. doi: 10.1007/PL00000744. PMID: 10961344.

Andreassen M, Kistorp C, Raymond I, Hildebrandt P, Gustafsson F, Kristensen LØ, Faber J. Plasma insulin-like growth factor I as predictor of progression and all cause mortality in chronic heart failure. *Growth Horm IGF Res*. 2009 Dec;19(6):486-90. doi: 10.1016/j.ghir.2009.03.003. Epub 2009 Apr 26. PMID: 19398211.

Bailey-Downs LC, Mitschelen M, Sosnowska D, Toth P, Pinto JT, Ballabh P, Valcarcel-Ares MN, Farley J, Koller A, Henthorn JC, Bass C, Sonntag WE, Ungvari Z, Csiszar A. Liver-specific knockdown of IGF-1 decreases vascular oxidative stress resistance by impairing the Nrf2-dependent antioxidant response: a novel model of vascular aging. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2012 Apr;67(4):313-29. doi: 10.1093/gerona/glr164. Epub 2011 Oct 21. PMID: 22021391; PMCID: PMC3309870.

Bassani JW, Yuan W, Bers DM. Fractional SR Ca release is regulated by trigger Ca and SR Ca content in cardiac myocytes. *Am J Physiol*. 1995 May;268(5 Pt 1):C1313-9. doi: 10.1152/ajpccell.1995.268.5.C1313. PMID: 7762626.

Baxter RC. Insulin-like growth factor (IGF)-binding proteins: interactions with IGFs and intrinsic bioactivities. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2000 Jun;278(6):E967-76. doi: 10.1152/ajpendo.2000.278.6.E967. PMID: 10826997.

Bers DM. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature*. 2002 Jan 10;415(6868):198-205. doi: 10.1038/415198a. PMID: 11805843.

Bers DM. Membrane receptor neighborhoods: snuggling up to the nucleus. *Circ Res*. 2013 Jan 18;112(2):224-6. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.112.300494. PMID: 23329788; PMCID: PMC3566243.

Brandes R, Bers DM. Intracellular Ca²⁺ increases the mitochondrial NADH concentration during elevated work in intact cardiac muscle. *Circ Res*. 1997 Jan;80(1):82-7. doi: 10.1161/01.res.80.1.82. PMID: 8978326.

Brown-Borg HM, Borg KE, Meliska CJ, Bartke A. Dwarf mice and the ageing process. *Nature*. 1996 Nov 7;384(6604):33. doi: 10.1038/384033a0. PMID: 8900272.

Ceda GP, Hoffman AR, Silverberg GD, Wilson DM, Rosenfeld RG. Regulation of growth hormone release from cultured human pituitary adenomas by somatomedins and insulin. *J Clin Endocrinol Metab*. 1985 Jun;60(6):1204-9. doi: 10.1210/jcem-60-6-1204. PMID: 3889029.

Chaudhary KR, El-Sikhry H, Seubert JM. Mitochondria and the aging heart. *J Geriatr Cardiol*. 2011 Sep;8(3):159-67. doi: 10.3724/SP.J.1263.2011.00159. PMID: 22783302; PMCID: PMC3390067.

Choi HS, Eisner DA. The role of sarcolemmal Ca²⁺-ATPase in the regulation of resting calcium concentration in rat ventricular myocytes. *J Physiol*. 1999 Feb

15;515 (Pt 1)(Pt 1):109-18. doi: 10.1111/j.1469-7793.1999.109ad.x. PMID: 9925882; PMCID: PMC2269121.

Clancy DJ, Gems D, Harshman LG, Oldham S, Stocker H, Hafen E, Leivers SJ, Partridge L. Extension of life-span by loss of CHICO, a Drosophila insulin receptor substrate protein. *Science*. 2001 Apr 6;292(5514):104-6. doi: 10.1126/science.1057991. PMID: 11292874.

Cooper LL, Li W, Lu Y, Centracchio J, Terentyeva R, Koren G, Terentyev D. Redox modification of ryanodine receptors by mitochondria-derived reactive oxygen species contributes to aberrant Ca²⁺ handling in ageing rabbit hearts. *J Physiol*. 2013 Dec 1;591(23):5895-911. doi: 10.1113/jphysiol.2013.260521. Epub 2013 Sep 16. PMID: 24042501; PMCID: PMC3872760.

Crew MD, Spindler SR, Walford RL, Koizumi A. Age-related decrease of growth hormone and prolactin gene expression in the mouse pituitary. *Endocrinology*. 1987 Oct;121(4):1251-5. doi: 10.1210/endo-121-4-1251. PMID: 3653026.

Dai DF, Chen T, Johnson SC, Szeto H, Rabinovitch PS. Cardiac aging: from molecular mechanisms to significance in human health and disease. *Antioxid Redox Signal*. 2012 Jun 15;16(12):1492-526. doi: 10.1089/ars.2011.4179. Epub 2012 Apr 3. PMID: 22229339; PMCID: PMC3329953.

DeBosch BJ, Muslin AJ. Insulin signaling pathways and cardiac growth. *J Mol Cell Cardiol*. 2008 May;44(5):855-64. doi: 10.1016/j.yjmcc.2008.03.008. Epub 2008 Mar 19. PMID: 18423486; PMCID: PMC2442827.

Delaughter MC, Taffet GE, Fiorotto ML, Entman ML, Schwartz RJ. Local insulin-like growth factor I expression induces physiologic, then pathologic, cardiac hypertrophy in transgenic mice. *FASEB J*. 1999 Nov;13(14):1923-9. doi: 10.1096/fasebj.13.14.1923. PMID: 10544175.

de Lucia C, Eguchi A, Koch WJ. New Insights in Cardiac β -Adrenergic Signaling During Heart Failure and Aging. *Front Pharmacol*. 2018 Aug 10;9:904. doi: 10.3389/fphar.2018.00904. PMID: 30147654; PMCID: PMC6095970.

De Meyts P, Whittaker J. Structural biology of insulin and IGF1 receptors: implications for drug design. *Nat Rev Drug Discov*. 2002 Oct;1(10):769-83. doi: 10.1038/nrd917. PMID: 12360255.

Eisner D. Calcium in the heart: from physiology to disease. *Exp Physiol*. 2014 Oct;99(10):1273-82. doi: 10.1113/expphysiol.2013.077305. Epub 2014 Aug 15. PMID: 25128325.

Eisner DA, Caldwell JL, Kistamás K, Trafford AW. Calcium and Excitation-Contraction Coupling in the Heart. *Circ Res*. 2017 Jul 7;121(2):181-195. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.117.310230. PMID: 28684623; PMCID: PMC5497788.

Fabiato A. Rapid ionic modifications during the aequorin-detected calcium transient in a skinned canine cardiac Purkinje cell. *J Gen Physiol*. 1985 Feb;85(2):189-246. doi: 10.1085/jgp.85.2.189. PMID: 3981128; PMCID: PMC2215801.

Finkel T, Menazza S, Holmström KM, Parks RJ, Liu J, Sun J, Liu J, Pan X, Murphy E. The ins and outs of mitochondrial calcium. *Circ Res*. 2015 May 22;116(11):1810-9. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.305484. PMID: 25999421; PMCID: PMC6296495.

Fluorescence Excitation and Emission Fundamentals. (o. D.). olympus-lifescience.com. Abgerufen am 8. Februar 2023, von <https://www.olympus-lifescience.com/en/microscope-resource/primer/lightandcolor/fluoroexcitation/>

Foncea R, Andersson M, Ketterman A, Blakesley V, Sapag-Hagar M, Sugden PH, LeRoith D, Lavandero S. Insulin-like growth factor-I rapidly activates multiple signal transduction pathways in cultured rat cardiac myocytes. *J Biol Chem*. 1997 Aug 1;272(31):19115-24. doi: 10.1074/jbc.272.31.19115. PMID: 9235900.

Foncea R, Gálvez A, Pérez V, Morales MP, Calixto A, Meléndez J, González-Jara F, Díaz-Araya G, Sapag-Hagar M, Sugden PH, LeRoith D, Lavandero S. Extracellular regulated kinase, but not protein kinase C, is an antiapoptotic signal of insulin-like growth factor-1 on cultured cardiac myocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000 Jul 5;273(2):736-44. doi: 10.1006/bbrc.2000.3008. PMID: 10873673.

Fontana L, Vinciguerra M, Longo VD. Growth factors, nutrient signaling, and cardiovascular aging. *Circ Res.* 2012 Apr 13;110(8):1139-50. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.111.246470. PMID: 22499903; PMCID: PMC3376758.

Frayse B, Weinberger F, Bardswell SC, Cuello F, Vignier N, Geertz B, Starbatty J, Krämer E, Coirault C, Eschenhagen T, Kentish JC, Avkiran M, Carrier L. Increased myofilament Ca²⁺ sensitivity and diastolic dysfunction as early consequences of Mybpc3 mutation in heterozygous knock-in mice. *J Mol Cell Cardiol.* 2012 Jun;52(6):1299-307. doi: 10.1016/j.yjmcc.2012.03.009. Epub 2012 Mar 23. PMID: 22465693; PMCID: PMC3370652.

Freund A, Orjalo AV, Desprez PY, Campisi J. Inflammatory networks during cellular senescence: causes and consequences. *Trends Mol Med.* 2010 May;16(5):238-46. doi: 10.1016/j.molmed.2010.03.003. Epub 2010 May 3. PMID: 20444648; PMCID: PMC2879478.

Friedrich N, Haring R, Nauck M, Lüdemann J, Roskopf D, Spilcke-Liss E, Felix SB, Dörr M, Brabant G, Völzke H, Wallaschofski H. Mortality and serum insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF binding protein 3 concentrations. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009 May;94(5):1732-9. doi: 10.1210/jc.2008-2138. Epub 2009 Feb 17. PMID: 19223521.

Glass DJ. Skeletal muscle hypertrophy and atrophy signaling pathways. *Int J Biochem Cell Biol.* 2005 Oct;37(10):1974-84. doi: 10.1016/j.biocel.2005.04.018. PMID: 16087388.

Groban L, Lin M, Kassik KA, Ingram RL, Sonntag WE. Early-onset growth hormone deficiency results in diastolic dysfunction in adult-life and is prevented by growth hormone supplementation. *Growth Horm IGF Res.* 2011 Apr;21(2):81-8. doi: 10.1016/j.ghir.2011.01.003. Epub 2011 Mar 2. PMID: 21371927; PMCID: PMC3085723.

Hamilton S, Terentyev D. Altered Intracellular Calcium Homeostasis and Arrhythmogenesis in the Aged Heart. *Int J Mol Sci.* 2019 May 14;20(10):2386. doi: 10.3390/ijms20102386. PMID: 31091723; PMCID: PMC6566636.

Hasenfuss G. Alterations of calcium-regulatory proteins in heart failure. *Cardiovasc Res.* 1998 Feb;37(2):279-89. doi: 10.1016/s0008-6363(97)00277-0. PMID: 9614485.

Heineke J, Molkentin JD. Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006 Aug;7(8):589-600. doi: 10.1038/nrm1983. PMID: 16936699.

Hobai IA, O'Rourke B. Decreased sarcoplasmic reticulum calcium content is responsible for defective excitation-contraction coupling in canine heart failure. *Circulation.* 2001 Mar 20;103(11):1577-84. doi: 10.1161/01.cir.103.11.1577. PMID: 11257088.

Holly JM, Perks CM. Insulin-like growth factor physiology: what we have learned from human studies. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2012 Jun;41(2):249-63, v. doi: 10.1016/j.ecl.2012.04.009. Epub 2012 May 8. PMID: 22682629.

Holzenberger M, Dupont J, Ducos B, Leneuve P, Géloën A, Even PC, Cervera P, Le Bouc Y. IGF-1 receptor regulates lifespan and resistance to oxidative stress in mice. *Nature.* 2003 Jan 9;421(6919):182-7. doi: 10.1038/nature01298. Epub 2002 Dec 4. PMID: 12483226.

Horio T, Maki T, Kishimoto I, Tokudome T, Okumura H, Yoshihara F, Suga S, Takeo S, Kawano Y, Kangawa K. Production and autocrine/paracrine effects of

endogenous insulin-like growth factor-1 in rat cardiac fibroblasts. *Regul Pept.* 2005 Jan 15;124(1-3):65-72. doi: 10.1016/j.regpep.2004.06.029. PMID: 15544842.

Howlett SE, Grandy SA, Ferrier GR. Calcium spark properties in ventricular myocytes are altered in aged mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006 Apr;290(4):H1566-74. doi: 10.1152/ajpheart.00686.2005. Epub 2005 Dec 3. PMID: 16327019.

Hua Y, Zhang Y, Ren J. IGF-1 deficiency resists cardiac hypertrophy and myocardial contractile dysfunction: role of microRNA-1 and microRNA-133a. *J Cell Mol Med.* 2012 Jan;16(1):83-95. doi: 10.1111/j.1582-4934.2011.01307.x. PMID: 21418519; PMCID: PMC3823095.

Ibarra C, Estrada M, Carrasco L, Chiong M, Liberona JL, Cardenas C, Díaz-Araya G, Jaimovich E, Lavandero S. Insulin-like growth factor-1 induces an inositol 1,4,5-trisphosphate-dependent increase in nuclear and cytosolic calcium in cultured rat cardiac myocytes. *J Biol Chem.* 2004 Feb 27;279(9):7554-65. doi: 10.1074/jbc.M311604200. Epub 2003 Dec 6. PMID: 14660553.

Isoyama S, Nitta-Komatsubara Y. Acute and chronic adaptation to hemodynamic overload and ischemia in the aged heart. *Heart Fail Rev.* 2002 Jan;7(1):63-9. doi: 10.1023/a:1013701923065. PMID: 11790923.

Janczewski AM, Lakatta EG. Modulation of sarcoplasmic reticulum Ca(2+) cycling in systolic and diastolic heart failure associated with aging. *Heart Fail Rev.* 2010 Sep;15(5):431-45. doi: 10.1007/s10741-010-9167-5. PMID: 20419345; PMCID: PMC2945822.

Juul A, Scheike T, Davidsen M, Gyllenborg J, Jørgensen T. Low serum insulin-like growth factor I is associated with increased risk of ischemic heart disease: a population-based case-control study. *Circulation.* 2002 Aug 20;106(8):939-44. doi: 10.1161/01.cir.0000027563.44593.cc. PMID: 12186797.

Kaplan P, Jurkovicova D, Babusikova E, Hudecova S, Racay P, Sirova M, Lehotsky J, Drgova A, Dobrota D, Krizanova O. Effect of aging on the expression of intracellular Ca(2+) transport proteins in a rat heart. *Mol Cell Biochem.* 2007 Jul;301(1-2):219-26. doi: 10.1007/s11010-007-9414-9. Epub 2007 Feb 15. PMID: 17549608.

Kerber RE, Miller RA, Najjar SM. Myocardial ischemic effects of isometric, dynamic and combined exercise in coronary artery disease. *Chest.* 1975 Apr;67(4):388-94. doi: 10.1378/chest.67.4.388. PMID: 1122766.

Kim J, Wende AR, Sena S, Theobald HA, Soto J, Sloan C, Wayment BE, Litwin SE, Holzenberger M, LeRoith D, Abel ED. Insulin-like growth factor I receptor signaling is required for exercise-induced cardiac hypertrophy. *Mol Endocrinol.* 2008 Nov;22(11):2531-43. doi: 10.1210/me.2008-0265. Epub 2008 Sep 18. PMID: 18801929; PMCID: PMC2582541.

Kim TY, Terentyeva R, Roder KH, Li W, Liu M, Greener I, Hamilton S, Polina I, Murphy KR, Clements RT, Dudley SC Jr, Koren G, Choi BR, Terentyev D. SK channel enhancers attenuate Ca²⁺-dependent arrhythmia in hypertrophic hearts by regulating mito-ROS-dependent oxidation and activity of RyR. *Cardiovasc Res.* 2017 Mar 1;113(3):343-353. doi: 10.1093/cvr/cvx005. PMID: 28096168; PMCID: PMC5852621.

Kimura KD, Tissenbaum HA, Liu Y, Ruvkun G. daf-2, an insulin receptor-like gene that regulates longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans*. *Science.* 1997 Aug 15;277(5328):942-6. doi: 10.1126/science.277.5328.942. PMID: 9252323.

Kong CHT, Bryant SM, Watson JJ, Gadeberg HC, Roth DM, Patel HH, Cannell MB, Orchard CH, James AF. The Effects of Aging on the Regulation of T-Tubular I_{Ca} by Caveolin in Mouse Ventricular Myocytes. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2018 May 9;73(6):711-719. doi: 10.1093/gerona/glx242. PMID: 29236992; PMCID: PMC5946816.

Krüger M, Kötter S, Grützner A, Lang P, Andresen C, Redfield MM, Butt E, dos Remedios CG, Linke WA. Protein kinase G modulates human myocardial passive stiffness by phosphorylation of the titin springs. *Circ Res*. 2009 Jan 2;104(1):87-94. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.108.184408. Epub 2008 Nov 20. PMID: 19023132.

Laughlin GA, Barrett-Connor E, Criqui MH, Kritz-Silverstein D. The prospective association of serum insulin-like growth factor I (IGF-I) and IGF-binding protein-1 levels with all cause and cardiovascular disease mortality in older adults: the Rancho Bernardo Study. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004 Jan;89(1):114-20. doi: 10.1210/jc.2003-030967. PMID: 14715837.

Lee WS, Kim J. Insulin-like growth factor-1 signaling in cardiac aging. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2018 May;1864(5 Pt B):1931-1938. doi: 10.1016/j.bbadis.2017.08.029. Epub 2017 Aug 25. PMID: 28847512.

Leifke E, Gorenai V, Wichers C, Von Zur Mühlen A, Von Büren E, Brabant G. Age-related changes of serum sex hormones, insulin-like growth factor-1 and sex-hormone binding globulin levels in men: cross-sectional data from a healthy male cohort. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2000 Dec;53(6):689-95. doi: 10.1046/j.1365-2265.2000.01159.x. PMID: 11155090.

Li H, Lichter JG, Seidel T, Tomaselli GF, Bridge JH, Sachse FB. Cardiac Resynchronization Therapy Reduces Subcellular Heterogeneity of Ryanodine Receptors, T-Tubules, and Ca²⁺ Sparks Produced by Dyssynchronous Heart Failure. *Circ Heart Fail*. 2015 Nov;8(6):1105-14. doi: 10.1161/CIRCHEARTFAILURE.115.002352. Epub 2015 Aug 20. PMID: 26294422; PMCID: PMC4651794.

Li Q, Ceylan-Isik AF, Li J, Ren J. Deficiency of insulin-like growth factor 1 reduces sensitivity to aging-associated cardiomyocyte dysfunction. *Rejuvenation Res*. 2008 Aug;11(4):725-33. doi: 10.1089/rej.2008.0717. PMID: 18729805; PMCID: PMC2980767.

Li Q, Wu S, Li SY, Lopez FL, Du M, Kajstura J, Anversa P, Ren J. Cardiac-specific overexpression of insulin-like growth factor 1 attenuates aging-associated cardiac diastolic contractile dysfunction and protein damage. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007 Mar;292(3):H1398-403. doi: 10.1152/ajpheart.01036.2006. Epub 2006 Nov 3. PMID: 17085535.

Liu SJ, Wyeth RP, Melchert RB, Kennedy RH. Aging-associated changes in whole cell K(+) and L-type Ca(2+) currents in rat ventricular myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000 Sep;279(3):H889-900. doi: 10.1152/ajpheart.2000.279.3.H889. PMID: 10993747.

Lockie TP, Rolandi MC, Guilcher A, Perera D, De Silva K, Williams R, Asrress KN, Patel K, Plein S, Chowienczyk P, Siebes M, Redwood SR, Marber MS. Synergistic adaptations to exercise in the systemic and coronary circulations that underlie the warm-up angina phenomenon. *Circulation*. 2012 Nov 27;126(22):2565-74. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.112.094292. Epub 2012 Nov 1. PMID: 23124033.

Louch WE, Mørk HK, Sexton J, Strømme TA, Laake P, Sjaastad I, Sejersted OM. T-tubule disorganization and reduced synchrony of Ca²⁺ release in murine cardiomyocytes following myocardial infarction. *J Physiol*. 2006 Jul 15;574(Pt 2):519-33. doi: 10.1113/jphysiol.2006.107227. Epub 2006 May 18. PMID: 16709642; PMCID: PMC1817777.

Lu X, Ginsburg KS, Kettlewell S, Bossuyt J, Smith GL, Bers DM. Measuring local gradients of intramitochondrial [Ca²⁺] in cardiac myocytes during sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ release. *Circ Res*. 2013 Feb 1;112(3):424-31. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.111.300501. Epub 2012 Dec 14. PMID: 23243207; PMCID: PMC3566246.

Macgregor AT, Rakovic S, Galione A, Terrar DA. Dual effects of cyclic ADP-ribose on sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ release and storage in cardiac myocytes isolated from guinea-pig and rat ventricle. *Cell Calcium*. 2007 Jun;41(6):537-46. doi: 10.1016/j.ceca.2006.10.005. Epub 2006 Dec 5. PMID: 17156839.

Marsh SA, Davidoff AJ. Heart smart insulin-like growth factor 1. *Hypertension*. 2012 Mar;59(3):550-1. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.188441. Epub 2012 Jan 23. PMID: 22275529.

Marx SO, Reiken S, Hisamatsu Y, Jayaraman T, Burkhoff D, Rosemlit N, Marks AR. PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts. *Cell*. 2000 May 12;101(4):365-76. doi: 10.1016/s0092-8674(00)80847-8. PMID: 10830164.

McMullen JR, Amirahmadi F, Woodcock EA, Schinke-Braun M, Bouwman RD, Hewitt KA, Mollica JP, Zhang L, Zhang Y, Shioi T, Buerger A, Izumo S, Jay PY, Jennings GL. Protective effects of exercise and phosphoinositide 3-kinase(p110alpha) signaling in dilated and hypertrophic cardiomyopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Jan 9;104(2):612-7. doi: 10.1073/pnas.0606663104. Epub 2007 Jan 3. PMID: 17202264; PMCID: PMC1766433.

McMullen JR. Role of insulin-like growth factor 1 and phosphoinositide 3-kinase in a setting of heart disease. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2008 Mar;35(3):349-54. doi: 10.1111/j.1440-1681.2007.04873.x. PMID: 18290876.

McMullen JR, Shioi T, Huang WY, Zhang L, Tarnavski O, Bisping E, Schinke M, Kong S, Sherwood MC, Brown J, Riggi L, Kang PM, Izumo S. The insulin-like growth factor 1 receptor induces physiological heart growth via the phosphoinositide 3-kinase(p110alpha) pathway. *J Biol Chem*. 2004 Feb 6;279(6):4782-93. doi: 10.1074/jbc.M310405200. Epub 2003 Nov 3. PMID: 14597618.

Merlen C, Farhat N, Luo X, Chatenet D, Tadevosyan A, Villeneuve LR, Gillis MA, Nattel S, Thorin E, Fournier A, Allen BG. Intracrine endothelin signaling evokes IP3-dependent increases in nucleoplasmic Ca²⁺ in adult cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol*. 2013 Sep;62:189-202. doi: 10.1016/j.yjmcc.2013.05.021. Epub 2013 Jun 10. PMID: 23756157; PMCID: PMC3770605.

Milman S, Atzmon G, Huffman DM, Wan J, Crandall JP, Cohen P, Barzilai N. Low insulin-like growth factor-1 level predicts survival in humans with exceptional

longevity. *Aging Cell*. 2014 Aug;13(4):769-71. doi: 10.1111/ace.12213. Epub 2014 Mar 12. PMID: 24618355; PMCID: PMC4116456.

Milman S, Huffman DM, Barzilai N. The Somatotrophic Axis in Human Aging: Framework for the Current State of Knowledge and Future Research. *Cell Metab*. 2016 Jun 14;23(6):980-989. doi: 10.1016/j.cmet.2016.05.014. PMID: 27304500; PMCID: PMC4919980.

Moellendorf S, Kessels C, Peiseler L, Raupach A, Jacoby C, Vogt N, Lindecke A, Koch L, Brüning J, Heger J, Köhrer K, Gödecke A. IGF-IR signaling attenuates the age-related decline of diastolic cardiac function. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2012 Jul 15;303(2):E213-22. doi: 10.1152/ajpendo.00538.2011. Epub 2012 May 15. PMID: 22589390.

Muralidharan P, Cserne Szappanos H, Ingley E, Hool LC. The cardiac L-type calcium channel alpha subunit is a target for direct redox modification during oxidative stress-the role of cysteine residues in the alpha interacting domain. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2017 Dec;44 Suppl 1:46-54. doi: 10.1111/1440-1681.12750. Epub 2017 Sep 20. PMID: 28306174.

Muslin AJ. Akt2: a critical regulator of cardiomyocyte survival and metabolism. *Pediatr Cardiol*. 2011 Mar;32(3):317-22. doi: 10.1007/s00246-010-9879-2. Epub 2011 Jan 30. PMID: 21279637.

Nagoshi T, Yoshimura M, Rosano GM, Lopaschuk GD, Mochizuki S. Optimization of cardiac metabolism in heart failure. *Curr Pharm Des*. 2011 Dec;17(35):3846-53. doi: 10.2174/138161211798357773. PMID: 21933140; PMCID: PMC3271354.

Nagueh SF, Shah G, Wu Y, Torre-Amione G, King NM, Lahmers S, Witt CC, Becker K, Labeit S, Granzier HL. Altered titin expression, myocardial stiffness, and left ventricular function in patients with dilated cardiomyopathy. *Circulation*. 2004 Jul 13;110(2):155-62. doi: 10.1161/01.CIR.0000135591.37759.AF. Epub 2004 Jul 6. PMID: 15238456.

Ock S, Lee WS, Ahn J, Kim HM, Kang H, Kim HS, Jo D, Abel ED, Lee TJ, Kim J. Deletion of IGF-1 Receptors in Cardiomyocytes Attenuates Cardiac Aging in Male Mice. *Endocrinology*. 2016 Jan;157(1):336-45. doi: 10.1210/en.2015-1709. Epub 2015 Oct 15. PMID: 26469138; PMCID: PMC4701888.

Okazaki Y, Kodama K, Sato H, Kitakaze M, Hirayama A, Mishima M, Hori M, Inoue M. Attenuation of increased regional myocardial oxygen consumption during exercise as a major cause of warm-up phenomenon. *J Am Coll Cardiol*. 1993 Jun;21(7):1597-604. doi: 10.1016/0735-1097(93)90374-a. PMID: 8496525.

Piacentino V 3rd, Weber CR, Chen X, Weisser-Thomas J, Margulies KB, Bers DM, Houser SR. Cellular basis of abnormal calcium transients of failing human ventricular myocytes. *Circ Res*. 2003 Apr 4;92(6):651-8. doi: 10.1161/01.RES.0000062469.83985.9B. Epub 2003 Feb 20. PMID: 12600875.

Pierre-Eugene C, Pagesy P, Nguyen TT, Neuillé M, Tschank G, Tennagels N, Hampe C, Issad T. Effect of insulin analogues on insulin/IGF1 hybrid receptors: increased activation by glargine but not by its metabolites M1 and M2. *PLoS One*. 2012;7(7):e41992. doi: 10.1371/journal.pone.0041992. Epub 2012 Jul 26. PMID: 22848683; PMCID: PMC3406060.

Pogwizd SM, Schlotthauer K, Li L, Yuan W, Bers DM. Arrhythmogenesis and contractile dysfunction in heart failure: Roles of sodium-calcium exchange, inward rectifier potassium current, and residual beta-adrenergic responsiveness. *Circ Res*. 2001 Jun 8;88(11):1159-67. doi: 10.1161/hh1101.091193. PMID: 11397782.

Rajaram S, Baylink DJ, Mohan S. Insulin-like growth factor-binding proteins in serum and other biological fluids: regulation and functions. *Endocr Rev*. 1997 Dec;18(6):801-31. doi: 10.1210/edrv.18.6.0321. PMID: 9408744.

Reiss K, Cheng W, Ferber A, Kajstura J, Li P, Li B, Olivetti G, Homcy CJ, Baserga R, Anversa P. Overexpression of insulin-like growth factor-1 in the heart is coupled with myocyte proliferation in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Aug

6;93(16):8630-5. doi: 10.1073/pnas.93.16.8630. PMID: 8710922; PMCID: PMC38724.

Roof SR, Boslett J, Russell D, del Rio C, Alecusan J, Zweier JL, Ziolo MT, Hamlin R, Mohler PJ, Curran J. Insulin-like growth factor 1 prevents diastolic and systolic dysfunction associated with cardiomyopathy and preserves adrenergic sensitivity. *Acta Physiol (Oxf)*. 2016 Apr;216(4):421-34. doi: 10.1111/apha.12607. Epub 2015 Oct 8. PMID: 26399932; PMCID: PMC4777672.

Ruiz-Meana M, Fernandez-Sanz C, Garcia-Dorado D. The SR-mitochondria interaction: a new player in cardiac pathophysiology. *Cardiovasc Res*. 2010 Oct 1;88(1):30-9. doi: 10.1093/cvr/cvq225. Epub 2010 Jul 8. PMID: 20615915.

Samuel TJ, Rosenberry RP, Lee S, Pan Z. Correcting Calcium Dysregulation in Chronic Heart Failure Using SERCA2a Gene Therapy. *Int J Mol Sci*. 2018 Apr 5;19(4):1086. doi: 10.3390/ijms19041086. PMID: 29621141; PMCID: PMC5979534.

Satoh H, Blatter LA, Bers DM. Effects of $[Ca^{2+}]_i$, SR Ca^{2+} load, and rest on Ca^{2+} spark frequency in ventricular myocytes. *Am J Physiol*. 1997 Feb;272(2 Pt 2):H657-68. doi: 10.1152/ajpheart.1997.272.2.H657. PMID: 9124422.

Saydah S, Graubard B, Ballard-Barbash R, Berrigan D. Insulin-like growth factors and subsequent risk of mortality in the United States. *Am J Epidemiol*. 2007 Sep 1;166(5):518-26. doi: 10.1093/aje/kwm124. Epub 2007 Jun 29. PMID: 17602136.

Scharin Täng M, Redfors B, Lindbom M, Svensson J, Ramunddal T, Ohlsson C, Shao Y, Omerovic E. Importance of circulating IGF-1 for normal cardiac morphology, function and post infarction remodeling. *Growth Horm IGF Res*. 2012 Dec;22(6):206-11. doi: 10.1016/j.ghir.2012.09.002. Epub 2012 Oct 24. PMID: 23102937.

Schmidt U, del Monte F, Miyamoto MI, Matsui T, Gwathmey JK, Rosenzweig A, Hajjar RJ. Restoration of diastolic function in senescent rat hearts through

adenoviral gene transfer of sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase. *Circulation*. 2000 Feb 22;101(7):790-6. doi: 10.1161/01.cir.101.7.790. PMID: 10683354.

Sham JS, Song LS, Chen Y, Deng LH, Stern MD, Lakatta EG, Cheng H. Termination of Ca²⁺ release by a local inactivation of ryanodine receptors in cardiac myocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Dec 8;95(25):15096-101. doi: 10.1073/pnas.95.25.15096. PMID: 9844021; PMCID: PMC24581.

Shannon TR, Guo T, Bers DM. Ca²⁺ scraps: local depletions of free [Ca²⁺] in cardiac sarcoplasmic reticulum during contractions leave substantial Ca²⁺ reserve. *Circ Res*. 2003 Jul 11;93(1):40-5. doi: 10.1161/01.RES.0000079967.11815.19. Epub 2003 Jun 5. PMID: 12791706.

Sipido KR, Callewaert G, Carmeliet E. Inhibition and rapid recovery of Ca²⁺ current during Ca²⁺ release from sarcoplasmic reticulum in guinea pig ventricular myocytes. *Circ Res*. 1995 Jan;76(1):102-9. doi: 10.1161/01.res.76.1.102. PMID: 8001267.

Stewart CE, Rotwein P. Growth, differentiation, and survival: multiple physiological functions for insulin-like growth factors. *Physiol Rev*. 1996 Oct;76(4):1005-26. doi: 10.1152/physrev.1996.76.4.1005. PMID: 8874492.

Song LS, Sobie EA, McCulle S, Lederer WJ, Balke CW, Cheng H. Orphaned ryanodine receptors in the failing heart. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Mar 14;103(11):4305-10. doi: 10.1073/pnas.0509324103. Epub 2006 Mar 6. PMID: 16537526; PMCID: PMC1449688.

Spallarossa P, Brunelli C, Minuto F, Caruso D, Battistini M, Caponnetto S, Cordera R. Insulin-like growth factor-I and angiographically documented coronary artery disease. *Am J Cardiol*. 1996 Jan 15;77(2):200-2. doi: 10.1016/s0002-9149(96)90600-1. PMID: 8546095.

Svensson J, Carlzon D, Petzold M, Karlsson MK, Ljunggren Ö, Tivesten A, Mellström D, Ohlsson C. Both low and high serum IGF-I levels associate with cancer

mortality in older men. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012 Dec;97(12):4623-30. doi: 10.1210/jc.2012-2329. Epub 2012 Sep 26. PMID: 23015658.

Tada M, Katz AM. Phosphorylation of the sarcoplasmic reticulum and sarcolemma. *Annu Rev Physiol.* 1982;44:401-23. doi: 10.1146/annurev.ph.44.030182.002153. PMID: 6280588.

Tadevosyan A, Maguy A, Villeneuve LR, Babin J, Bonnefoy A, Allen BG, Nattel S. Nuclear-delimited angiotensin receptor-mediated signaling regulates cardiomyocyte gene expression. *J Biol Chem.* 2010 Jul 16;285(29):22338-49. doi: 10.1074/jbc.M110.121749. Epub 2010 May 12. PMID: 20463030; PMCID: PMC2903375.

Takeda N, Manabe I, Uchino Y, Eguchi K, Matsumoto S, Nishimura S, Shindo T, Sano M, Otsu K, Snider P, Conway SJ, Nagai R. Cardiac fibroblasts are essential for the adaptive response of the murine heart to pressure overload. *J Clin Invest.* 2010 Jan;120(1):254-65. doi: 10.1172/JCI40295. Epub 2009 Dec 21. PMID: 20038803; PMCID: PMC2798693.

Trafford AW, Díaz ME, Eisner DA. Coordinated control of cell Ca²⁺ loading and triggered release from the sarcoplasmic reticulum underlies the rapid inotropic response to increased L-type Ca²⁺ current. *Circ Res.* 2001 Feb 2;88(2):195-201. doi: 10.1161/01.res.88.2.195. PMID: 11157672.

Trafford AW, Díaz ME, Negretti N, Eisner DA. Enhanced Ca²⁺ current and decreased Ca²⁺ efflux restore sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ content after depletion. *Circ Res.* 1997 Oct;81(4):477-84. doi: 10.1161/01.res.81.4.477. PMID: 9314828.

Troncoso R, Ibarra C, Vicencio JM, Jaimovich E, Lavandero S. New insights into IGF-1 signaling in the heart. *Trends Endocrinol Metab.* 2014 Mar;25(3):128-37. doi: 10.1016/j.tem.2013.12.002. Epub 2013 Dec 28. PMID: 24380833.

Troncoso R, Vicencio JM, Parra V, Nemchenko A, Kawashima Y, Del Campo A, Toro B, Battiprolu PK, Aranguiz P, Chiong M, Yakar S, Gillette TG, Hill JA, Abel ED,

Leroith D, Lavandero S. Energy-preserving effects of IGF-1 antagonize starvation-induced cardiac autophagy. *Cardiovasc Res*. 2012 Feb 1;93(2):320-9. doi: 10.1093/cvr/cvr321. Epub 2011 Dec 1. PMID: 22135164; PMCID: PMC3286200.

Ungvari Z, Csiszar A. The emerging role of IGF-1 deficiency in cardiovascular aging: recent advances. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2012 Jun;67(6):599-610. doi: 10.1093/gerona/gls072. Epub 2012 Mar 26. PMID: 22451468; PMCID: PMC3348495.

van Bunderen CC, van Nieuwpoort IC, van Schoor NM, Deeg DJ, Lips P, Drent ML. The association of serum insulin-like growth factor-I with mortality, cardiovascular disease, and cancer in the elderly: a population-based study. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010 Oct;95(10):4616-24. doi: 10.1210/jc.2010-0940. Epub 2010 Jul 7. PMID: 20610588.

Vaniotis G, Del Duca D, Trieu P, Rohlicek CV, Hébert TE, Allen BG. Nuclear β -adrenergic receptors modulate gene expression in adult rat heart. *Cell Signal*. 2011 Jan;23(1):89-98. doi: 10.1016/j.cellsig.2010.08.007. Epub 2010 Aug 21. PMID: 20732414; PMCID: PMC5053815.

Vasan RS, Sullivan LM, D'Agostino RB, Roubenoff R, Harris T, Sawyer DB, Levy D, Wilson PW. Serum insulin-like growth factor I and risk for heart failure in elderly individuals without a previous myocardial infarction: the Framingham Heart Study. *Ann Intern Med*. 2003 Oct 21;139(8):642-8. doi: 10.7326/0003-4819-139-8-200310210-00007. PMID: 14568852.

Video Tutorials: Murine Cardiomyocyte Isolation. (2022, 10. August). IonOptix. Abgerufen am 18. Januar 2023, von <https://www.ionoptix.com/resource/ionoptix-video-tutorials-murine-cardiomyocyte-isolation/>

Walker MA, Kohl T, Lehnart SE, Greenstein JL, Lederer WJ, Winslow RL. On the Adjacency Matrix of RyR2 Cluster Structures. *PLoS Comput Biol*. 2015 Nov 6;11(11):e1004521. doi: 10.1371/journal.pcbi.1004521. PMID: 26545234; PMCID: PMC4636394.

Walker MA, Williams GSB, Kohl T, Lehnart SE, Jafri MS, Greenstein JL, Lederer WJ, Winslow RL. Superresolution modeling of calcium release in the heart. *Biophys J*. 2014 Dec 16;107(12):3018-3029. doi: 10.1016/j.bpj.2014.11.003. PMID: 25517166; PMCID: PMC4269784.

Ward CW, Garrett TP, McKern NM, Lou M, Cosgrove LJ, Sparrow LG, Frenkel MJ, Hoyne PA, Elleman TC, Adams TE, Lovrecz GO, Lawrence LJ, Tulloch PA. The three dimensional structure of the type I insulin-like growth factor receptor. *Mol Pathol*. 2001 Jun;54(3):125-32. doi: 10.1136/mp.54.3.125. PMID: 11376122; PMCID: PMC1187049.

Whitman M, Downes CP, Keeler M, Keller T, Cantley L. Type I phosphatidylinositol kinase makes a novel inositol phospholipid, phosphatidylinositol-3-phosphate. *Nature*. 1988 Apr 14;332(6165):644-6. doi: 10.1038/332644a0. PMID: 2833705.

Xiao, J. (2017). *Exercise for Cardiovascular Disease Prevention and Treatment: From Molecular to Clinical, Part 2 (Advances in Experimental Medicine and Biology Book 1000) (English Edition) (1st ed. 2017)*. Springer.

Xu A, Narayanan N. Effects of aging on sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-cycling proteins and their phosphorylation in rat myocardium. *Am J Physiol*. 1998 Dec;275(6):H2087-94. doi: 10.1152/ajpheart.1998.275.6.H2087. PMID: 9843808.

Xu J, Gontier G, Chaker Z, Lacube P, Dupont J, Holzenberger M. Longevity effect of IGF-1R(+/-) mutation depends on genetic background-specific receptor activation. *Aging Cell*. 2014 Feb;13(1):19-28. doi: 10.1111/ace.12145. Epub 2013 Sep 11. PMID: 23898955; PMCID: PMC4326867.

Yamamoto H, Sohmiya M, Oka N, Kato Y. Effects of aging and sex on plasma insulin-like growth factor I (IGF-I) levels in normal adults. *Acta Endocrinol (Copenh)*. 1991 May;124(5):497-500. doi: 10.1530/acta.0.1240497. PMID: 2028707.

Zhu X, Altschafli BA, Hajjar RJ, Valdivia HH, Schmidt U. Altered Ca²⁺ sparks and gating properties of ryanodine receptors in aging cardiomyocytes. *Cell Calcium*. 2005 Jun;37(6):583-91. doi: 10.1016/j.ceca.2005.03.002. Epub 2005 Apr 7. PMID: 15862349.

Zima AV, Blatter LA. Redox regulation of cardiac calcium channels and transporters. *Cardiovasc Res*. 2006 Jul 15;71(2):310-21. doi: 10.1016/j.cardiores.2006.02.019. Epub 2006 Mar 6. PMID: 16581043.

6. APPENDIX

Anhang 1: 1-Wege-ANOVA, multiple Vergleiche, individuelle P-Werte

	IGF1R-Y vs. IGF1R-O	IGF1R-Y vs. WT-Y	IGF1R-Y vs. WT-O	IGF1R-O vs. WT-Y	IGF1R-O vs. WT-O	WT-Y vs. WT-O
Baseline SARC	0,005 **	0,187	0,647	0,01 **	0,0021 **	0,208
Baseline FURA	0,634	0,231	0,133	0,46	0,284	0,725
Baseline to Peak % SARC	0,008 **	0,053	0,558	0,03 *	0,05 *	0,794
Baseline to Peak % FURA	0,34	0,201	0,011 *	0,97	0,027 *	0,004 **
Dep v SARC	0,322	0,447	0,985	0,17	0,634	0,789
Dep v SARC	0,022 *	0,001 **	0,756	0,0003 ***	0,46	0,109
Dep v t SARC	0,001 ***	0,098	0,728	0,001 ***	0,002 **	0,199
Dep v t FURA	0,001 ***	0,100	0,085	0,004 **	0,003 **	0,725
Peak SARC	0,002 **	0,103	0,955	0,001 **	0,006 **	0,328
Peak FURA	0,322	0,049 *	0,456	0,24	0,936	0,298
Ret v SARC	0,659	0,954	0,910	0,693	0,922	0,895
Ret v FURA	0,911	0,762	0,579	0,684	0,637	0,442
Ret v t SARC	0,065	0,151	0,12	0,293	0,668	0,543
Ret v t FURA	0,009 **	0,420	0,707	0,036 *	0,006 **	0,262
T to Peak 50 % SARC	0,009 **	0,026 *	0,066	0,044 *	0,032 *	0,601
T to Peak 50 % FURA	<0,0001 ****	0,015 *	0,315	0,0003 ***	0,0004 ***	0,456
T to Baseline 90 % SARC	0,725	0,928	0,761	0,788	0,979	0,821
T to Baseline 90 % FURA	0,946	0,928	0,920	0,981	0,971	0,99

Anhang 2: 2-Wege-ANOVA, multiple Vergleiche, angepasste P-Werte

	IGF1-R-Y vs. IGF1-R-O				IGF1-R-Y vs. WT-Y				IGF1-R-O vs. WT-O				IGF1-R-Y vs. WT-Y				IGF1-R-O vs. WT-O				WT-Y vs. WT-O							
	Frequenz (Hertz)				Frequenz (Hertz)				Frequenz (Hertz)				Frequenz (Hertz)				Frequenz (Hertz)				Frequenz (Hertz)							
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Baseline SARC	0,350	0,249	0,069	0,026*	1	0,998	0,833	0,686	0,788	0,948	1	0,876	0,278	0,181	0,018*	0,024*	0,773	0,849	0,893	0,972	0,773	0,849	0,893	0,972	0,773	0,849	0,893	0,972
Baseline FURA	0,985	0,824	0,603	0,981	0,294	0,251	0,200	0,433	0,053	0,023*	0,02	0,171	0,43	0,721	0,996	0,759	0,09	0,211	0,519	0,941	0,941	0,896	0,941	0,996	0,941	0,896	0,941	0,996
Baseline to Peak % SARC	0,853	0,254	0,211	0,571	0,999	0,905	0,726	0,802	0,373	0,989	0,637	0,203	0,767	0,459	0,56	0,164	0,299	0,61	0,995	0,247	0,954	0,999	0,688	0,247	0,954	0,999	0,688	
Baseline to Peak % FURA	0,976	0,811	0,903	0,989	0,972	0,878	0,874	0,988	0,05	0,29	0,815	0,99	1	0,988	0,999	0,93	0,096	0,146	0,529	0,027*	0,052	0,271	0,911	0,027*	0,052	0,271	0,911	
Dep v SARC	0,997	0,797	0,929	1	0,945	1	0,998	0,995	0,223	0,99	0,993	0,363	0,995	0,835	0,859	0,997	0,523	0,695	0,973	0,49	0,983	0,959	0,263	0,49	0,983	0,959	0,263	
Dep v FURA	0,900	0,996	0,966	0,865	0,865	0,848	0,877	0,926	0,656	0,946	0,996	0,962	0,583	0,816	0,825	0,601	0,989	0,996	0,975	0,355	0,583	0,948	0,999	0,355	0,583	0,948	0,999	
Dep v t SARC	0,665	0,218	0,087	0,515	0,994	0,791	0,615	0,959	0,957	0,999	0,698	0,981	0,647	0,534	0,258	0,691	0,149	0,147	0,609	0,618	0,706	0,998	0,999	0,618	0,706	0,998	0,999	
Dep v t FURA	0,216	0,185	0,027*	0,015*	0,856	1	0,574	0,235	0,817	1	0,737	0,036*	0,446	0,116	0,116	0,175	0,568	0,102	0,066	0,998	1	0,968	0,828	0,998	1	0,968	0,828	
Peak SARC	0,201	0,051	0,016*	0,022*	1	0,98	0,786	0,548	0,494	0,965	0,976	0,474	0,111	0,082	0,084	0,245	0,001***	0,005**	0,015*	0,426	0,766	0,917	1	0,426	0,766	0,917	1	
Peak FURA	0,977	0,596	0,607	1	0,415	0,26	0,284	0,587	1	0,827	0,559	0,677	0,606	0,949	0,977	0,724	0,973	0,916	0,993	0,351	0,567	0,848	0,982	0,351	0,567	0,848	0,982	
Ret v SARC	0,811	0,95	0,859	0,957	0,682	1	0,963	0,957	0,15	0,964	0,820	0,280	1	0,967	0,986	1	0,557	0,812	1	0,645	0,95	0,98	0,558	0,645	0,95	0,98	0,558	
Ret v FURA	0,924	0,972	0,89	0,92	0,996	0,878	0,950	0,996	0,117	0,619	0,841	1	0,983	0,997	0,999	0,86	0,305	0,483	0,873	0,220	0,205	0,706	0,995	0,220	0,205	0,706	0,995	
Ret v t SARC	0,001**	0,05*	0,007**	0,002**	0,22	0,656	0,183	0,092	0,008**	0,068	0,076	0,031*	0,224	0,333	0,311	0,431	0,89	0,994	0,479	0,602	0,438	0,977	0,991	0,602	0,438	0,977	0,991	
Ret v t FURA	0,604	0,235	0,23	0,101	0,998	1	0,798	0,239	0,32	0,736	0,999	0,650	0,523	0,217	0,596	0,811	0,068	0,053	0,213	0,426	0,82	0,804	0,841	0,426	0,82	0,804	0,841	
T to Peak 50 % SARC	0,005**	0,003**	0,007**	0,012*	0,748	0,399	0,077	0,114	0,737	0,665	0,226	0,392	0,017*	0,031*	0,216	0,412	0,017*	0,019*	0,138	1	0,973	0,966	0,925	1	0,973	0,966	0,925	
T to Peak 50 % FURA	0,085*	0,06	0,042*	0,011*	0,867	0,933	0,805	0,179	0,948	0,998	0,899	0,087	0,215	0,098	0,099	0,125	0,036	0,058	0,069	0,496	0,954	0,989	0,982	0,496	0,954	0,989	0,982	
T to Baseline 90 % SARC	0,643	0,159	0,09	0,002*	0,999	0,973	0,869	0,438	0,3	0,245	0,622	0,462	0,708	0,256	0,275	0,09	0,959	0,977	0,459	0,339	0,390	0,968	0,998	0,339	0,390	0,968	0,998	
T to Baseline 90 % FURA	1	0,937	0,619	0,196	0,978	0,754	0,801	0,418	0,773	0,897	0,992	0,854	0,990	0,985	0,965	0,930	0,814	1	0,618	0,904	0,981	0,748	0,618	0,904	0,981	0,748		