

Aus dem
Institut der Herz- und Kreislaufphysiologie
der Medizinischen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Prof. Dr. rer.nat. Axel Gödecke

**Die Bedeutung der autokrinen und parakrinen IGF-1 Rezeptor abhängigen
Signaltransduktion im Endothel der Maus**

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

vorgelegt von
Nora Constanze Vogt

2021

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.: Nora Constanze Vogt

Dekan/in: Prof. Dr. med. N. Klöcker

Erstgutachter/in: Prof. Dr. rer. nat. A. Gödecke

Zweitgutachter/in: Prof. Dr. rer. nat. B. Stork

In Gedenken an Schirin

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in

IGF-1R signaling attenuates the age-related decline of diastolic cardiac function
AM J Physiol Endocrinol Metab. 2012 Jul15
Sarah Moellendorf et al.

Der Einfluss der endogenen, endothelspezifischen IGF1 - Signaltransduktion auf die
Muskulatur der Maus bei Ausdauertraining (Posterpräsentation)
N. Vogt et al.
DKOU 2015, Berlin

Zusammenfassung

Das Endothel stellt als einschichtige Zellschicht die Schnittstelle zwischen den Geweben aller Organe und dem Blut dar und ist für einen Austausch von Nährstoffen, Botenstoffen, Blutgasen sowie den Abtransport der vom Gewebe gebildeten Stoffe maßgeblich. In gestörten Reaktionen des Endothels auf lokale Gegebenheiten liegen zahlreiche Fehlfunktionen und Pathologien begründet. Eine endotheliale Dysfunktion ist beispielsweise verantwortlich für Arteriosklerose. Hier sind unter anderem VEGF, Insulin und das eng verwandte Hormon IGF-1 beteiligt. Letzterem kommt bei der zudem eine Bedeutung beim *Remodelling* nach Myokardinfarkt, der Tumorangiogenese oder der Anpassung der Muskulatur an Training zu.

Ziel der Arbeit war die Entwicklung eines endothelspezifischen *Knock-Out* Modells um einen postulierten endogenen Effekt des IGF1R auf die Muskulatur von Skelett und Herzen zu analysieren. Es erfolgte zunächst die Zucht transgener Mäuse mit einem endothelspezifischen Knockout für den IGF1R. *Western Blot* Analysen zeigten eine deutliche Reduktion des IGF1-Rezeptors in verschiedenen Organen der KO-Tiere. Daten der quantitativen PCR zeigen, dass der IGF1R in Endothelzellen des KO nicht mehr exprimiert wurde.

Mittels freiwilligem Laufradlaufen über 16 Wochen als Modell für Ausdauertraining wurde der Trainingseffekt auf die quergestreifte Muskulatur bei Mäusen untersucht. Laufstrecke und –geschwindigkeit wurde mittels Powerlab registriert. Kapillarisation des M. Plantaris sowie der Faserdurchmesser wurden mittels Immunfluoreszenz analysiert und sowohl in trainierten als auch sedentären Tieren untersucht.

Bei gleicher mittlerer Geschwindigkeit legten KO Tiere eine geringe Strecke zurück. Morphologisch zeigte sich eine Zunahme der Kapillaranzahl pro mm² in beiden Gruppen. Bei WT Tieren wurde eine signifikante Steigerung des Kapillar-zu-Muskelfaser-Verhältnisses nach Ausdauertraining festgestellt, welche einherging mit einer Zunahme des mittleren Muskelfaserquerschnitts. Im Gegensatz dazu war der Faserquerschnitt bei KO-Tieren bereits basal erhöht und zeigte keinen weiteren Anstieg nach freiwilligem Laufradtraining.

Unsere Daten zeigen, dass die endogene IGF1-Signaltransduktion keinen Einfluss auf die Kapillarneubildung bei Ausdauertraining hat. Interessanterweise weisen unsere Ergebnisse aber auf einen parakrinen, IGF1R vermittelten Effekt des Endothels auf die Muskelfaserdurchmesser hin.

Summary

The endothelium as a single-layered cell surface, represents the interface between the tissues of all organs and the blood and is essential for the exchange of nutrients, messenger substances, blood gases and the removal of substances produced by the tissue. Numerous malfunctions and pathologies are caused by disturbed reactions of the endothelium to local conditions. Endothelial dysfunction, for example, is responsible for arteriosclerosis. Among other things, VEGF, insulin and the closely related hormone IGF-1 are involved here. The latter is also important in remodelling after myocardial infarction, tumour angiogenesis or the adaptation of muscles to training.

The aim of this work was to develop an endothelium-specific knock-out model to analyze a postulated endogenous effect of IGF1R on skeletal and cardiac muscle. First, transgenic mice were bred with an endothelium-specific knockout for IGF1R. Western blot analyses showed a significant reduction of the IGF1 receptor in various organs of the KO animals. Data from quantitative PCR show that IGF1R was no longer expressed in endothelial cells of the KO.

By means of voluntary running for 16 weeks as a model for endurance training, the training effect on the striated muscles in mice was investigated. Running distance and speed was registered by Powerlab. Capillarization of M. Plantaris as well as fiber diameters were analyzed by immunofluorescence and examined in both trained and sedentary animals. KO animals covered a shorter distance at the same average speed. Morphologically, an increase in the number of capillaries per mm² was observed in both groups. In WT animals, a significant increase in capillary to muscle fiber ratio was observed after endurance training, which was accompanied by an increase in mean muscle fiber cross section. In contrast, the fiber cross section in KO animals was already basally increased and showed no further increase after voluntary walker training.

Our data show that endogenous IGF-1 signal transduction has no influence on capillary formation during endurance training. Interestingly, however, our results indicate a paracrine, IGF1R-mediated effect of the endothelium on muscle fiber diameters

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ATP	Adenosintriphosphat
°C	Grad Celsius
Ca	Kalzium
CD	Cluster of differentiation
cre	Causes Recombination
DMEM	Dulbecco's
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EKG	Elektrokardiogramm
eNOS	Endotheliale NO-Synthase
g	Gramm
GDP	Guanosindiphosphat
GH	Growth hormon
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
H₂O	Wasser
HIF1	Hypoxie-induzierter Faktor 1
HZV	Herzzeitvolumen
IGF-1	Insulin-like growth factor 1
IGF1R	Insulin-like growth factor 1 receptor
IGF-BP	Insulin-like growth factor Bindeproteine
IRS	Insulinrezeptor Substrate
kDa	Kilo Dalton
km	Kilometer
KO	Knock Out
L	Liter
loxP	Locus of crossover P
M.	Musculus
m²	Quadratmeter
mA	Milliampère

min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimol
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
NGS	Normal goat Serum
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
O₂	Sauerstoff
PBS	Physiologische Pufferlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PI3	Phosphoinositid-3-Kinase
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat
PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5-Trisphosphat
PKB	Proteinkinase B
rpm	Revolutions per minute
RT PCR	Real Time Polymerasekettenreaktion
SOS	Son of Sevenless
SPF	Spezifiziert Pathogenfrei
VEGF	Vascular endothelial Growthfactor
VEGF-R	Vascular endothelial Growthfactor receptor
vs	Versus
WT	Wildtyp
µg	Mikrogramm
µm	Mikrometer

Inhalt

1	Einleitung.....	1
1.1	Charakteristika des IGF-1	3
1.2	Regulierung des IGF-1	4
1.3	Der IGF1R	5
1.3.1	Aufbau des IGF1R	5
1.4	Vorkommen des IGF1R.....	6
1.5	Die Signaltransduktion des IGF1R	6
1.6	Die Rolle des IGF-1 in der Angiogenese	8
1.6.1	Die Rolle der Angiogenese unter physiologischer Belastung im Skelettmuskel.....	10
1.6.2	Die Rolle der Angiogenese unter physiologischer Belastung im Herzmuskel.....	11
1.7	Ziele der Arbeit.....	14
2	Material und Methoden	15
2.1	Geräte und Hersteller.....	15
2.1.1	Chemikalien	16
2.1.2	Antikörper	17
2.1.3	Primer.....	17
2.1.4	Sonstige Materialien	17
2.1.5	Verwendete Software	17
2.2	Versuchstiere	17
2.3	Methoden	19
2.3.1	Genotypisierung der Mäuse mittels Schwanzspitzenbiopsie	19
2.3.2	Wiegen der Mäuse.....	20
2.3.3	Präparation der Organe für Proteinanalysen.....	21
2.3.4	Proteinextraktion aus Organen	21
2.3.5	Western Blot – Auftrennung der Proteine	22
2.3.6	Färben der Nitrozellulosemembran mit spezifischem Antikörper – Proteinnachweis	22
2.3.7	Histologie und Immunhistologie.....	23
2.3.8	Präparation und Zellisolation aus Mauslunge.....	25
2.3.9	Endothelzellisolation mit antikörperbehafteten Kugeln	26

2.3.10	mRNA Extraktion und Transkription.....	29
2.3.11	Quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (qPCR).....	30
2.3.12	Laufräder und Bedingungen.....	31
2.4	Statistik.....	33
3	Ergebnisse.....	34
3.1	Nachweis der Inaktivierung des IGF1 Rezeptors in Endothelzellen	34
3.1.1	Genotypisierung	34
3.1.2	Immunhistologische Färbungen zur Darstellung des Endothels	36
3.1.3	WesternBlot Analysen ganzer Organe	37
3.1.4	Endothelzellisolation und Quantifizierung des Anteils von IGF1R im Endothel mittels <i>realtime</i> PCR	38
3.2	Phänotypisierung der tie2IGFRKO Maus	40
3.2.1	Gewicht der Mäuse unter basalen Bedingungen im Vergleich.....	40
3.2.2	Gewicht der Tiere mit und ohne Ausdauertraining im Vergleich	41
3.2.3	Herzgewicht, Herzindex und Tibialänge der Tiere mit und ohne Training im Vergleich	42
3.2.4	Nutzung der Laufräder durch die WT und tie2IGFRKO Tiere.....	43
3.2.5	Die Kapillarisation des Myokards nach Training.....	45
3.2.6	Die Kapillarisation des Skelettmuskels nach Training	47
3.2.7	Größe der Muskelfasern des Plantarismuskels nach Training.....	51
4	Diskussion.....	53
4.1	Beeinflussung der Kapillarisation von Skelett- und Herzmuskulatur unter basalen Bedingungen und unter physiologischer Belastung durch ein Fehlen des IGF1R im Endothel der Maus	53
5	Literaturverzeichnis	61

1 Einleitung

Die Versorgung der Zellen des menschlichen Körpers mit Sauerstoff, Nährstoffen und Botenstoffen sowie der Abtransport von Stoffwechselendprodukten erfolgt über das Blut. Damit der Transport des Blutes durch den menschlichen Körper gewährleistet ist, wird ein feines Gefäßnetz mit einer Gesamtoberfläche von etwa 1000 m² benötigt. Ausgekleidet wird diese beträchtliche Oberfläche der Gesamtheit an Gefäßen von einer einschichtigen „Zelltapete“, dem Endothel. Das Endothel dient als Barriere zwischen Blut und Gewebe und übt somit zum einen eine lebensnotwendige Schrankenfunktion, zum anderen eine ebenso lebensnotwendige Austauschfunktion zwischen diesen beiden Kompartimenten aus. Die über das Endothel hergestellte Barriere dient einer selektiven Permeabilität und wird zum einen gebildet durch die Zellzwischenräume, zum anderen wird sie auch durch die Zelle selbst gewährleistet. Wie wichtig ein intaktes Endothel für den Organismus ist, zeigt sich unter anderem bei einer Gefäßdysfunktion, ausgelöst durch Erkrankungen wie Diabetes mellitus oder Atherosklerose.

Gebildet wird das Endothel zunächst im Rahmen der Vaskulogenese während der Embryonalentwicklung in der Phase der Gastrulation. Hierbei entstehen aus dem Mesoderm Angioblasten, Vorläuferzellen von Endothelzellen (Flamme et al., 1995). Aus den Angioblasten entwickeln sich als erste Stufe der Gefäßbildung primitive Blutgefäße, später kleiden die sich unter dem essentiellen Einfluss von *vascular endothelial growth factor* (VEGF) differenzierenden Endothelzellen das gesamte Gefäßsystem aus (Risau, 1997).

Generell können neue Gefäße im weiteren Verlauf der Entwicklung des Menschen über zwei Mechanismen entstehen: die sprossende Neovaskularisierung, auch Angiogenese genannt, bei welcher aus einem bestehenden Gefäßlumen ein neues auswächst, und die nicht-sprossende Neovaskularisierung (auch Intussusception genannt), bei welcher ein bereits bestehendes Gefäßlumen sich teilt oder vergrößert (Risau, 1997, Potente et al., 2011).

Die Neovaskularisation ist ein Prozess, bei welchem Endothelzellen durch Bildung von pro-angiogenetischen Faktoren, von denen der wohl wichtigste der VEGF ist, in unterversorgten Geweben zu Migration und Zellteilung angeregt werden (Maciag et al., 1979). Dieser Prozess der Gefäßneubildung tritt im adulten Organismus physiologisch

lediglich bei Wundheilung, bei Wachstum und in bestimmten Phasen des weiblichen Zyklus in der Schleimhaut des Uterus auf.

Zusätzlich zu den Funktionen der Gefäßneubildung und der selektiven Permeabilität zum angrenzenden Gewebe ist das Endothel in der Lage, eine Reihe an weiteren, für die Homöostase des Organismus notwendigen, Funktionen auszuüben. So werden über das Endothel bedeutende Anteile der Regulation der Organdurchblutung, der Entzündungsreaktion und der Blutgerinnung initiiert und ausgeführt. Reguliert werden diese Vorgänge zum einen über im angrenzenden Gewebe anfallende Metabolite und lokale physikalische Faktoren wie beispielsweise die Strömungsgeschwindigkeit des Blutes, zum anderen erfolgt eine Regulation über eine hormonelle Steuerung.

Eine solche hormonelle Regulation des Endothels erfolgt unter vielen anderen auch über den Insulin-ähnlichen-Wachstumsfaktor (*Insulin like growth factor 1*, im Folgenden IGF-1 genannt). Damit das Hormon an seinem Zielgewebe eine Reaktion hervorrufen kann, ist auf den Zellen des Zielgewebes die Expression eines für IGF-1 spezifischen Rezeptors essentiell. Damit folglich das Hormon IGF-1 eine Wirkung auf das Endothel entfalten kann, muss dieses den Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktor Rezeptor (IGF1R) exprimieren. Historisch wurde der IGF1R erstmalig im Endothel von Schweinearterien sowie deren Pulmonalarterien und Fettgewebkapillaren mittels Bindung radioaktiv markierter Hormone nachgewiesen (Bar and Boes, 1984). Zusätzlich ergaben neuere Untersuchungen der Expression des IGF1R auf molekularer Ebene, sowohl mittels DNA- als auch Proteinnachweises, dass dieser im Endothel sogar stärker exprimiert wird als der dem IGF1R stark verwandte Insulinrezeptor (Back et al., 2012).

Zunächst ging man davon aus, dass IGF-1 ausschließlich in der Leber gebildet wird und seine Wirkung überwiegend auf das Wachstum von Knorpel und Knochen entfaltet (Daughaday et al., 1976). Heute ist bekannt, dass IGF-1 in nahezu allen Geweben zu einem geringen Anteil gebildet wird und dort eine sowohl para- als auch autokrine Wirkung entfalten kann (Long et al., 1991, Delafontaine et al., 1996, Wang et al., 1997, Le Roith et al., 2001). Auch der IGF1R wird, um die postulierte sowohl para- als auch autokrine Wirkung vermitteln zu können, in verschiedenen Geweben exprimiert (Haskell and Tucker, 1994).

Es konnte gezeigt werden, dass IGF-1 eine wichtige Rolle im kardiovaskulären System spielt. So wird am Herzen das kardiale Wachstum, die kardiale Kontraktilität und eine

verbesserte kardiale Funktion nach Myokardinfarkt über IGF-1 gefördert (Ren et al., 1999, Jackson et al., 2015).

Auch andere Zellen im Herzen, wie beispielsweise kardiale Fibroblasten, werden über den IGF1R zu einem verstärkten Wachstum angeregt (Reiss et al., 1995). Zusätzlich gibt es Hinweise darauf, dass von nicht-myokardialen Zellen des Herzens, darunter auch Endothelzellen, IGF-1 gebildet wird, welches dann wiederum para- und autokrin seine Wirkung vermittelt (Long et al., 1991).

Im Endothel selbst ist eine erhöhte Aktivität des IGF1R unter anderem verantwortlich für eine herabgesetzte Insulinsensitivität sowie eine erhöhte Proliferationsrate in Rahmen von Reparaturprozessen (Abbas et al., 2011, Imrie et al., 2012). Diese Daten lassen ein hohes therapeutisches Potential des IGF-1 und des IGF1R im Bereich des kardiovaskulären Systems und insbesondere am Endothel vermuten (Ren et al., 1999).

1.1 Charakteristika des IGF-1

Der IGF-1 (früher auch Somatomedin C genannt) ist ein aus 70 Aminosäuren bestehendes, 7,5 kDa kleines Wachstumshormon aus der Gruppe der Peptidhormone welches eine 50%-ige Strukturhomologie zu dem anabolen Hormon Insulin aufweist (Baxter, 2001, Clemmons, 2012, Tahimic et al., 2013). Gebildet wird IGF-1 zu großen Teilen in der Leber und von dieser ins Blut abgegeben (Sjogren et al., 1999). Zusätzlich wird IGF-1 wie bereits beschrieben auch von nahezu allen anderen Körperzellen gebildet. Da es seine Wirkung hier jedoch para- oder autokrin entfaltet, macht die so ins Blut gelangte Menge von IGF-1 lediglich einen geringen Anteil an der Konzentration des zirkulierenden IGF-1 aus, wie in einem Mausmodell mit Leberspezifischen *Knock Out* (KO) für die Bildung von IGF-1 gezeigt werden konnte (Sjogren et al., 2002a).

Im Blut zirkuliert IGF-1 zu großen Teilen gebunden an spezifische Transportproteine, den IGF-bindenden Proteinen (IGF-BP). Zur Familie der IGF-BP gehören sechs derzeit bekannte Proteine, welche in Kombination mit einer sogenannten Säure-instabilen Untereinheit (*acid-labile subunit*) Komplexe mit IGF-1 eingehen und als solche im Blut zirkulieren (Baxter, 2001, Bach et al., 2005). Vermutlich liegt nur 1% des im Körper zirkulierenden IGFs in freier und somit bioaktiver Form vor (Livingstone, 2013). Hierdurch wird das Hormon vor Proteolyse geschützt und so die Plasmahalbwertszeit von 15 Minuten auf circa 16 Stunden verlängert (Baxter, 2000, Clemmons, 2007).

1.2 Regulierung des IGF-1

Der adäquate Reiz für die Ausschüttung von IGF-1 ist die Ausschüttung des Wachstumshormons (*growth hormon* = GH) aus dem Vorderlappen der Hypophyse. Die Regulation unterliegt sowohl einem pulsatilem, Alters- und Tagesabhängigem Profil als auch einem komplexen Rückkopplungsmechanismus zur Feinregulation.

Lebensphasen, in welchen das Wachstum von Skelett und Muskulatur besonders hoch ist, sind gekennzeichnet durch einen hohen Serumspiegel von Wachstumshormon. So finden sich die höchsten Spiegel von GH während der Pubertät (Zadik et al., 1985) und sinkende Serumspiegel von GH und IGF-1 mit zunehmendem Alter (Iranmanesh et al., 1991). Zusätzlich zu diesen altersdingten Schwankungen unterliegt die Ausschüttung von GH einem zirkadianen Rhythmus, bei dem die höchsten Werte während des Schlafens zu verzeichnen sind. Diese tageszeitlichen Schwankungen scheinen allerdings keine Auswirkung auf die Menge des zirkulierenden IGF-1 zu haben (Faje and Barkan, 2010). Auf hormoneller Ebene wird die Sekretion von GH als Antwort auf die Sekretion von GH-freisetzendem Hormon (GHRH) aus dem Hypothalamus stimuliert und wird postprandial durch Somatostatin aus dem Pankreas sowie im Magen gebildetes Ghrelin gebremst. Die Rückkopplung erfolgt des weiteren als negativer Feedback-Mechanismus von IGF-1 auf die Hypophyse.

Eine zusätzliche Funktion in der Regulation des Wachstumshormons IGF-1 übernehmen die IGF-BP. Über die Regulation der Menge der im Blut zirkulierenden spezifischen Bindeproteine, wobei insbesondere das IGF-BP3 eine große Rolle zu spielen scheint, wird indirekt die Menge des freien, bioaktiven IGF-1 herauf- oder herabreguliert (Baxter, 2000, Baxter, 2001). Da der größte Teil des im Blut zirkulierenden IGF-1 an die spezifischen IGF-BP gebunden ist, wird aktuell angenommen, dass eine Regulation des bioaktiven IGF-1 größtenteils durch eine Veränderung der Serumkonzentrationen der entsprechenden Bindeproteine erfolgt (Baxter, 2000, Baxter, 2001).

1.3 Der IGF1R

1.3.1 Aufbau des IGF1R

IGF-1 bindet in seiner freien Form extrazellulär in der Zellmembran verankerte Rezeptoren auf der Zielzelle. Hauptsächlich bindet IGF-1 an den IGF1R (Duan et al., 2010). Durch seine große Strukturhomologie zum Insulin sowie eine große Homologie der jeweiligen Rezeptoren untereinander, welche in der Liganden-bindenden Domäne bis zu 65% beträgt, ist IGF-1 in der Lage, sowohl den IGF1R als auch den IR zu binden (Sarfstien and Werner, 2013).

Bei den beiden genannten Rezeptoren handelt es sich um transmembranäre Moleküle mit je zwei Untereinheiten, welche bei Ligandenbindung dimerisieren und so ein Tetramer bilden. Dabei können sowohl zwei gleichartige Rezeptoren dimerisieren, als auch zwei unterschiedliche, beispielsweise ein IR mit einem IGF1R (De Meyts and Whittaker, 2002). Diese heterodimeren Rezeptoren scheinen eine höhere Affinität zu IGF-1 als zu Insulin zu haben, wobei die Rolle dieser Hybridrezeptoren zum Zeitpunkt dieser Arbeit allerdings noch unklar ist (Soos et al., 1993, Surinya et al., 2002, Benyoucef et al., 2007, Cabail et al., 2015, Cai et al., 2017).

Eine dieser Untereinheiten des IGF1R besteht wiederum selbst aus je zwei Untereinheiten, einer extrazellulären α -Untereinheit und einer transmembranären β -Untereinheit. Der IGF1R hat in seiner aktiven Form eine Gesamtgröße von ca. 460 kDa (Lee and Kim, 2018) und setzt sich aus je einer α -Untereinheit und einer β -Untereinheit zusammen. Die α und β Untereinheiten sind über Disulfidbrücken miteinander verbunden. Bindet ein IGF-1-Molekül von extrazellulär an die α -Domänen des Rezeptors, so dimerisieren zwei Halbrezeptoren aus je zwei Untereinheiten und es entsteht der aktive, tetramere IGF1R. Die β –Untereinheiten verfügen jeweils über eine Tyrosinkinaseaktivität. Die Aktivität dieser Kinasen setzt ein, sobald durch die Bindung des Hormons eine Konformationsänderung der α -Untereinheiten stattgefunden hat und diese nun nicht mehr sterisch die Aktivität der Kinasen an den beiden β –Untereinheiten hemmen. Zunächst phosphoryliert die Kinase dann unter ATP-Verbrauch Tyrosinreste an der intrazellulären Domäne des Rezeptors selbst. Durch diese Autophosphorylierung werden Bindungsstellen für weitere Proteine frei, welche wichtig für die intrazelluläre Weiterleitung des Signals sind.

1.4 Vorkommen des IGF1R

Insulin und IGF-1 haben nicht nur in ihrer Struktur, sondern außerdem in der durch den Rezeptor hervorgerufenen Signaltransduktion eine hohe Analogie. Dieses Wissen verleitet zu der Frage, worin der Unterschied zwischen Insulin und dem schon dem Namen nach sehr ähnlichen Wachstumshormon IGF-1 besteht. Der Unterschied in der Wirkung der beiden Hormone IGF-1 und Insulin wird zunächst darin begründet, dass eine stärkere Affinität der jeweiligen Hormone für den entsprechenden eigenen Rezeptor besteht, zum anderen durch eine unterschiedliche Verteilung der Rezeptoren über die Gewebe. Dies ist wichtig, da ein Hormon generell nur dann seine Wirkung auf das Zielgewebe entfalten kann, wenn der entsprechende Rezeptor von diesem exprimiert wird.

So ist beispielsweise im Gegenteil zum Insulinrezeptor der IGF1R nicht oder nur in sehr geringer Expression im Gewebe der Leber zu finden und ebenfalls weniger stark im Fettgewebe exprimiert, wohingegen besonders hohe Expressionslevel in Geweben des Zentralnervensystems nachzuweisen sind (Sarfstein et al., 2006, Dupont and LeRoith, 2001). Da der IGF1R nahezu ubiquitär vorkommt sind mittlere Proteinspiegel in vielen Organen zu finden (Sarfstein et al., 2006).

Wurde zunächst angenommen, dass diese unterschiedliche Verteilung der Rezeptoren zusammen mit der stärkeren Affinität der Hormone zu ihren jeweiligen Rezeptoren hauptsächlich für die Unterschiede in der Wirkung von Insulin und IGF-1 verantwortlich ist, so weiß man heute, dass auch in der Signalkaskade der Rezeptoren Unterschiede zu finden sind (Gronborg et al., 1993, Najjar et al., 1997).

1.5 Die Signaltransduktion des IGF1R

IGF-1 entfaltet seine Wirkung auf die Zielzelle hauptsächlich über Aktivierung des IGF1R (Denley et al., 2005). Nach der Bildung eines Rezeptortetramers und der damit aktivierten Autophosphorylierung werden die für die Signalkaskade ausschlaggebenden Moleküle an den Rezeptor rekrutiert.

Die intrazelluläre Signalweiterleitung auf den Reiz des IGF-1 hin geschieht, so wie derzeit bekannt, zu einem großen Teil über zwei für alle Rezeptortyrosinkinasen, darunter auch der IR und der *vascular endothelial growth factor* Rezeptor (VEGF-R), wichtige

Signalwege; den Ras-Kinase Signalweg und den Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3-Kinase) Signalweg, beide in Abbildung 1 dargestellt.

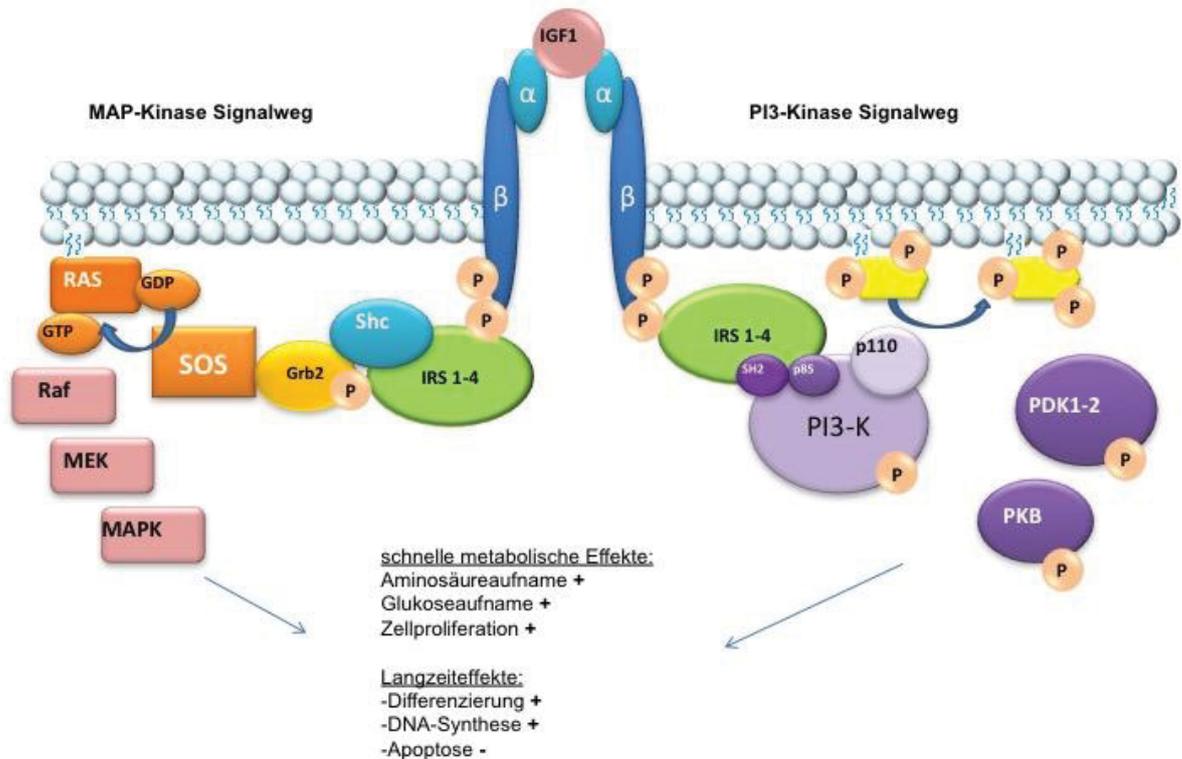


Abbildung 1 Autophosphorylierung und unterschiedliche intrazelluläre Signalkaskaden nach Dimerisierung des Tyrosinrezeptors nach Bindung von IGF-1, modifiziert nach (Le Roith et al., 2001)

Wie in Abbildung 1 nachzuvollziehen, werden zunächst durch die Autophosphorylierung Proteine aus der Familie der Insulinrezeptorsubstrate (IRS 1-4) an die juxtamembranäre Domäne rekrutiert. Da die Mitglieder dieser Proteine unterschiedliche Funktionen in der Signalweiterleitung ausüben, sind bereits in diesem Schritt der Signalweiterleitung Unterschiede zwischen IR und IGF1R zu finden. Es konnte beispielsweise gezeigt werden, dass die Mitglieder der IRS-Familie untereinander nicht in der Lage sind, die Funktionen eines jeweils anderen Proteins der Familie bei dessen Fehlen zu ersetzen (Winnay et al., 2000). Obwohl IRS-4 von Insulin wie auch von IGF-1 zu gleichen Anteilen an die Membran rekrutiert wird, ist das Protein IRS-1 von hauptsächlicher Relevanz für die IGF-1-Signaleitung (Patti et al., 1995, Fantin et al., 1998).

IRS binden über sogenannte pYXXM-Domäne, einer spezifischen Aminosäureregion, das Molekül p85. p85 ist eine Untereinheit der PI3-Kinase. Die PI3-Kinase phosphoryliert nach Translokation zum IGF1R und ihrer Aktivierung, welche ebenfalls durch Phosphorylierung erfolgt, durch ihre katalytische Untereinheit p110 das in der Membran verankerte Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat (PIP2) zu Phosphoinositoltrisphosphat (PIP3) (Backer et al., 1992). Dieses wiederum aktiviert andere intrazelluläre Signalproteine wie die Proteinkinase B (PKB) und die Phosphatidylinositol abhängigen Kinasen 1 und 2 (PDK1 und 2) (Alessi et al., 1997, Chan et al., 1999). Über PKB, synonym auch AKT, wird eine pro-proliferative und antiapoptotische Signalwirkung generiert sowie die Glukoseaufnahme in die Zelle gesteigert.

Ein anderer Weg der Signalweiterleitung nach Autophosphorylierung des Rezeptors führt über eine Bindung der IRS über Shc-bindende Domänen, den Sh2-Domänen, an Proteine der Shc Familie. Diese Shc Proteine fungieren weiter als Bindungspartner von einem Wachstumshormonrezeptor bindenden Protein-2 (*growth factor Receptor binding Protein-2*, Grb2), welches wiederum das Protein *son of sevenless* (SOS) bindet. Dieses SOS-Protein wiederum aktiviert ein kleines, membranständiges G-Protein, die Ras-Kinase. Durch den Austausch von Guanosindiphosphat (GDP) zu Guanosintriphosphat (GTP) an Ras durch das SOS-Protein wird ein Signalweg eingeleitet, der über die Phosphorylierung von *Rapidly growing fibrosarcoma protein* (Raf) zur Aktivierung einer mitogen aktivierten Protein Kinase (MAPK) führt (Dupont and LeRoith, 2001). Dieser Signalweg führt über die ERK-Proteine (*extracellular signal activated kinases*), welche direkt auf eine veränderte Expression der von der Zelle synthetisierten Proteine wirken. Die Zelle wird zur Teilung, Proliferation und Bildung von Extrazellulärmatrrix angeregt und der Zelltod durch Apoptose gehemmt.

Unterbrochen wird der Signalweg, sobald die β -Untereinheit des IGF1R dephosphoryliert wird (Taguchi et al., 2007).

1.6 Die Rolle des IGF-1 in der Angiogenese

Bei Gewebshypoxie wird im Zellkern der hypoxischen Zellen ein Transkriptionsfaktor mit dem Namen Hypoxie-induzierter Transkriptionsfaktor α (HIF-1 α) verstärkt. HIF-1 α verfügt über eine durch Sauerstoff regulierte Untereinheit und führt bei dessen Fehlen zu einer verstärkten Expression von Enzymen der Glykolyse, zum anderen zu

einer vermehrten Expression des parakrin auf die Endothelzellen angrenzender Gefäße wirkenden VEGF (Semenza, 2009). Die Wirkung von VEGF über seinen Rezeptor (VEGF-R) wird analog zu anderen Wachstumshormonrezeptoren, und insbesondere auch analog dem IGF1R, über eine intrinsische Tyrosinkinaseaktivität des Rezeptors vermittelt. Eine bedeutende Rolle in der anschließenden Signalkaskade kommt dabei jenem Signalweg zu, der maßgeblich über das Enzym PI3-K übertragen wird.

Es konnte in einer Studie an Fibrozyten in Zellkultur gezeigt werden, dass IGF-1 die Expression von für VEGF kodierender mRNA steigert. Zusätzlich wurde gezeigt, dass dieser Effekt nicht durch den PI3-K Inhibitor Wortmannin hemmbar ist, sondern über die Blockade der Kinase MEK (Miele et al., 2000). IGF-1 scheint des weiteren einen Effekt auf den über Sauerstoff (O₂) gesteuerten HIF-1 α zu haben, indem er die Expression von HIF-1 α sowohl in humanen Kolonkarzinomzellen als auch in Wildtypzellen mit Überexpression der Proteinkinase ERK steigert (Fukuda et al., 2002, Sutton et al., 2007). Viele Tumoren, darunter Tumoren des Zentralnervensystems, der Lunge, des Bewegungsapparates sowie des Kolon oder des Pankreas zeichnen sich durch eine vermehrte Bildung von IGF-1 oder des IGF1R aus (Khandwala et al., 2000, Tricoli et al., 1986, Bergmann et al., 1995, Burrow et al., 1998, Minuto et al., 1986, Zhang et al., 2010), wobei insbesondere bei Gliomen eine positive Korrelation zwischen Malignität und IGF-1 Expression hergestellt werden konnte und dies auf die vermehrte Angiogenese im Tumorgewebe zurückgeführt wurde (Hirano et al., 1999, Zamykal et al., 2015).

Um die IGF1R Signalkaskade, welche für das Wachstum von Tumoren von Bedeutung ist, zu inhibieren, wurden in verschiedenen Studien erfolgreich IGF1R inhibierende Antikörper genutzt (Kalebic et al., 1994, Liu et al., 1998, Scotlandi et al., 2005, Tanno et al., 2006). In einer dieser Studien wurde der anti-angiogenetische Effekt des IGF1R Antikörpers SCH717454 in Tumor Xenograft Mäusen untersucht. Es konnte in immunhistochemischen Analysen festgestellt werden, dass mit dem AK behandelte Mäuse dünnere Blutgefäße sowie im Vergleich zu nicht behandelten Mäusen weniger Verzweigungen der Gefäße aufwiesen (Wang et al., 2010). Genetisch veränderte Mäuse mit einem Fehlen des Rezeptors für Insulin und IGF-1 im Endothel zeigten in Wundheilungsversuchen an der Haut eine geringer ausgeprägte Angiogenese als Kontrolltiere (Aghdam et al., 2012). Im Hinblick auf die vielfach postulierte Wichtigkeit der Wirkung des IGF1 auf das Endothel und auch, da nach aktuellen wissenschaftlichen Erkenntnissen eine genaue Quantifizierung des alleinigen Effekts von IGF-1 als Kofaktor

auf die Neovaskularisierung bisher nicht möglich ist, ist die Erforschung des IGF1R im Endothel mittels Knockout von großem Interesse.

Die in Abbildung 2 dargestellten Effekte von HIF-1 α auf die Angiogenese konnten zudem in Studien nicht nur bei Tumorwachstum, sondern auch bei Ausdauertraining festgestellt werden (Vogt et al., 2001, Tsai and Wu, 2012).

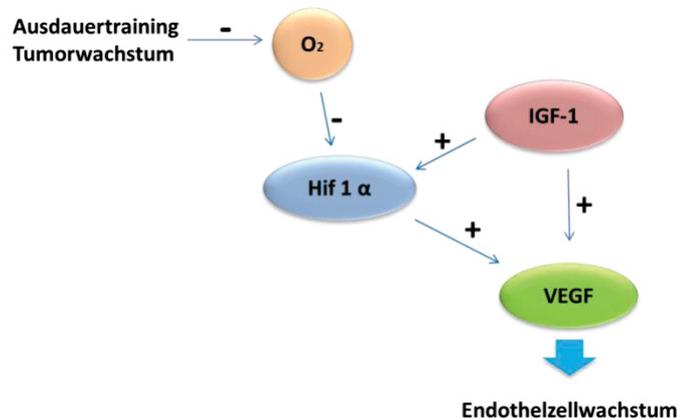


Abbildung 2 Ausdauertraining sowie Tumorzellwachstum führen zu einem Mehrbedarf an Sauerstoff in den entsprechenden Geweben. Der resultierende Sauerstoffmangel führt über die vermehrte Bildung von Hif 1 α zu einer erhöhten Expression von VEGF. Auch IGF-1 hat einen postulierten positiven Effekt auf die Ausbildung von Hif 1 α sowie VEGF.

1.6.1 Die Rolle der Angiogenese unter physiologischer Belastung im Skelettmuskel

GH und IGF-1 spielen in der Entwicklung von Körpergröße und Masse eine bedeutende Rolle (Hyun, 2013). Da die Wirkung von GH sowohl durch das Hormon selbst als auch indirekt über eine Produktion von IGF-1 hervorgerufen wird, ist es oftmals nicht einfach, den alleinigen Effekt von IGF-1 auf den Organismus messbar zu machen. Wie wichtig IGF-1 für die Entwicklung von Körpergewicht und die Organentwicklung ist, konnte in einer Studie gezeigt werden, bei welcher der Effekt von IGF-1 auf den Organismus an IGF-1- KO Mäusen untersucht wurde (Liu and LeRoith, 1999). Die solcherart genetisch veränderten Mäuse zeigten ein um 35% verringertes Körpergewicht gegenüber den Kontrollen, welches zusätzlich auch durch Injektionen von GH nicht erhöht werden konnte (Liu and LeRoith, 1999). Dass für die Entwicklung des Körpergewichts nicht das aus der Leber stammende IGF-1 verantwortlich ist zeigt eine Studie an Mäusen mit einem

induzierbaren KO für das in der Leber gebildete IGF-1, bei welcher gezeigt werden konnte, dass die KO-Mäuse ein normales Körper- und Skelettwachstum in Vergleich zur Kontrollgruppe zeigten (Sjogren et al., 2002b).

Ferner konnte gezeigt werden, dass die Plasmaspiegel von IGF-1 nach Training erhöht sind (Poehlman and Copeland, 1990, Roelen et al., 1997). Dies hat insbesondere auf die Skelettmuskulatur eine herausragende Wirkung, da eine Anpassung durch Wachstum der Muskulatur nach Training über Stimulation mit IGF-1 erfolgt (Grandys et al., 2017). IGF-1 hat anabole Effekte auf die Skelettmuskulatur, was durch eine erhöhte Aufnahme von Aminosäuren und Glukose, eine erhöhte Glykogensynthese und eine erhöhte Proteinsyntheserate sowie eine verminderte Proteolyse gekennzeichnet ist (Woodhouse et al., 2006, Guha et al., 2013). Auch in der Zellkultur wirkt IGF-1 auf Muskelzellen proliferationssteigernd und führt zu einer verstärkten Differenzierung (Florini et al., 1986).

Bei Training kommt es zusätzlich zu den beschriebenen Effekten auf das Wachstum der Skelettmuskulatur auch zu einer vermehrten Kapillarisation dieser. So konnte gezeigt werden, dass unter Training die Kapillarisation im Muskel zunimmt und auch die gemessenen Level von VEGF nach Training erhöht sind (Olenich et al., 2013).

Ob auch IGF-1, welches eine hohe Analogie in der Signalkaskade zu VEGF aufweist, einen proangiogenetischen Effekt im Bereich der trainierten Skelettmuskulatur hat ist zum aktuellen Zeitpunkt noch nicht untersucht.

1.6.2 Die Rolle der Angiogenese unter physiologischer Belastung im Herzmuskel

Bei Training kommt es in Anpassung an einen erhöhten Sauerstoffbedarf der arbeitenden Skelettmuskulatur gepaart mit einem erhöhten Bedarf des Abtransports von Metaboliten im Körper zu einer Zunahme des Herzzeitvolumens (HZV). Das HZV ist das Produkt von Schlagvolumen und Herzfrequenz und ist beim Menschen ungefähr um das Fünffache des Ruhe-HZV steigerbar. Dies entspricht einem Wert von durchschnittlich circa 30 L/min. Bei regelmäßigem körperlichem Training kommt es folglich nicht nur zu einer strukturellen Anpassung der Skelettmuskulatur, sondern auch der Herzmuskulatur. Die Herzmuskulatur ist eine spezielle Form der quergesteiften Muskulatur, welche histologisch durch eine dreidimensionale Verzweigung der Myozyten und meist einzelnen, mittig angeordneten Zellkernen gekennzeichnet ist.

Regelmäßiges körperliches Training führt zu einer Reihe von Anpassungsmechanismen des Herzens. So ist beispielsweise die Ruheherzfrequenz bei Sportlern deutlich niedriger als bei nicht-Trainierten. Es gibt viele Hinweise darauf, dass aufgrund des erhöhten Herzzeitvolumens insbesondere das Myokard des linken Ventrikels, welcher für die Versorgung des großen Kreislaufs den höchsten Druck generieren muss, eine durch Training hervorgerufene benigne kardialen Hypertrophie zeigt (Douglas et al., 1986, Pelliccia et al., 1999, Rawlins et al., 2009). Diese benigne Hypertrophie zeichnet sich laut Studien echokardiographisch durch eine Vergrößerung des Kammervolumens (Douglas et al., 1986, Pelliccia et al., 1999) oder der Myokarddicke (Abernethy et al., 2003) aus, wobei dieser Effekt laut Metaanalysen die Funktion des Herzens nicht eingeschränkt (Pluim et al., 2000, Erickson, 2017). Wenn diese echokardiographischen messbaren Veränderungen ohne pathologische Funktionen des Herzens auftreten, spricht man auch von einem Sporthertz (engl.: *Athlete's Heart*) (George et al., 2012). Hierunter versteht man alle durch Sport hervorgerufenen myokardialen Veränderungen, wobei zudem elektrokardiographische (EKG) Veränderungen ohne kardiovaskuläre Erkrankung bei bis zu 80 % aller Athleten auftreten (Corrado et al., 2010). Allerdings sind die morphologischen Veränderungen, also eben jene durch die Echokardiographie messbaren Veränderungen, aktuelleren Übersichtsartikeln zu Folge nur bei einem geringen Teil der Athleten zu finden, sodass davon ausgegangen wird, dass nicht von einer generellen Reaktion des Myokards in Form eines Sporthertzens ausgegangen werden kann und bei vielen Athleten keine morphologischen Veränderungen festzustellen sind (Maron and Pelliccia, 2006, Au et al., 2019).

Die Durchblutung des Myokards des linken Herzens erfolgt hauptsächlich während der Diastole, da während der Systole eine Durchblutung durch die starke Kontraktion desselben, einhergehend mit einem hohen intramuralen Druck, nicht möglich ist. Durch eine Erhöhung der Herzfrequenz unter Belastung verkürzt sich die Dauer der Diastole und damit auch der Durchblutungszeit des Myokards. Bereits unter physiologischen Ruhebedingungen ist deshalb die Sauerstoffextraktion mit 70-80 % weitgehend erschöpft. Ist kurzfristig eine Steigerung der Durchblutung notwendig, erfolgt eine Tonusregulation der Koronargefäße. Dadurch ist die Durchblutung um bis zu 300-400% steigerbar (sogenannte Koronarreserve).

Zu einer Zunahme der myokardialen Masse kommt es im Rahmen einer physiologischen Hypertrophie beispielsweise nach häufiger sportlicher Betätigung oder im Rahmen einer

pathologischen Hypertrophie bei Erkrankungen wie beispielsweise der koronaren Herzkrankheit oder Herzklappenfehlern. Wegen der geringen koronaren Reserve muss zusätzlich zu der kurzfristig wirksamen funktionellen Adaptation über eine Tonusregulation der Koronargefäße eine dauerhafte strukturelle Anpassung im Herzmuskel vonstattengehen (Laughlin et al., 2012). An trainierten Schweinen konnte 1997 gezeigt werden, dass diese strukturelle Adaptation bereits nach einer Woche Training auftritt und einhergeht mit einer Zunahme der Kapillarisation im Herzmuskel (White et al., 1998). Es konnte in weiteren Studien gezeigt werden, dass eine Neovaskularisierung auch im Herzen über den Expressionsfaktor HIF-1 α induziert wird (Walton et al., 2013, Semenza, 2013). Zum Zeitpunkt dieser Arbeit liegen keine Kenntnisse darüber vor, ob neben der Signaltransduktion über VEGF (Rengo et al., 2013) analog zur Neovaskularisierung in anderen Geweben wie beispielsweise dem Skelettmuskel, ein Einfluss von IGF-1 auf die Kapillarisation des Myokards besteht. Von besonderem Interesse sind die Wechselwirkungen zwischen Koronarendothel, Angiogenese und Myokard im Hinblick darauf, dass eine Unterversorgung des Myokards mit Sauerstoff im Rahmen der koronaren Herzkrankheit und zunehmender Inzidenz dieser mit dem Alter die häufigste Todesursache in Deutschland darstellt. In Deutschland stehen laut Gesundheitsberichterstattung des Bundes in der Todesursachenstatistik die chronische sowie die akute Myokardischämie im Verlauf der Jahre 1998 bis 2015 an erster Stelle.

Es handelt sich bei der koronaren Herzkrankheit um das Korrelat der Artherosklerose in den Koronararterien, einhergehend mit endothelialer Dysfunktion. Die endotheliale Dysfunktion wiederum wird durch Erkrankungen wie Diabetes mellitus, Hypertonie, Homozystinämie, Adipositas und Nikotinabusus ausgelöst. Sie zeichnet sich aus durch einen Verlust der physiologischen Endothelfunktionen, unter anderem der Funktion der Modulation des Gefäßtonus über Stickstoffmonoxid (NO) (Feletou and Vanhoutte, 2006). Normalerweise erfolgt eine schnelle Anpassung der Koronararterien an einen erhöhten Sauerstoffbedarf zu großen Teilen über eine Autoregulation der Gefäße, den Bayliss Effekt, eine dehnungsinduzierte Kontraktion der glatten Muskulatur, und über eine vermehrte Bereitstellung von Prostaglandinen und NO aus dem Endothel.

Im gesunden Endothel erfolgt die Produktion von NO unter anderem über eine Induktion der endothelialen NO-Synthase (eNOS), aktiviert durch eine erhöhte Schubspannung durch das vorbeiströmende Blut an der Gefäßwand. Die Aktivität der eNOS wird

zusätzlich entscheidend über ihre Phosphorylierung geregelt, wobei diese Phosphorylierung über verschiedene Kinasen erfolgen kann. Der redundante Effekt verschiedener Faktoren auf die Koronardurchblutung erlaubt bei Ausfall eines Faktors eine Kompensation über einen anderen (Deer and Heaps, 2013). Diese verschiedenen Regulationsmechanismen sind bei der endothelialen Dysfunktion im individuellen Ausmaß gestört, wobei es durch die bereits physiologisch nahezu ausgeschöpfte Sauerstoffreserve des Herzmuskels im Rahmen der koronaren Herzkrankheit zunächst bei Belastung, später auch in Ruhe zu einer Unterversorgung des Myokards kommt. Hier ist ein möglichst genaues Wissen um die verschiedenen Funktionen des Endothels einschließlich der diese beeinflussenden Hormone von besonderem Interesse, um mögliche neue, spezifische therapeutische Optionen zu finden und in Zukunft nutzen zu können.

1.7 Ziele der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist die Etablierung eines transgenen Mausmodells mit einem Endothelzell- Knock-Out (KO) des IGF1R. Das Fehlen dieses Rezeptors in den Endothelzellen der Tiere ermöglicht es, die Auswirkung von IGF-1 auf das Endothel zu spezifizieren. Da der Gendefekt bereits in der Embryonalperiode der Entwicklung der Mäuse vorhanden ist, kann im Vergleich der transgenen Tiere zu Wildtypmäusen untersucht werden, ob und inwieweit der Wachstumsfaktor IGF-1 eine Auswirkung auf die Kapillarisation im Herz- und/ oder im Skelettmuskel der Maus unter basalen Bedingungen hat.

Zusätzlich soll der Beitrag von IGF-1 an der Angiogenese im quergestreiften Muskel unter physiologischer Belastung definiert werden. Des weiteren stellt sich die Frage, inwieweit eine Veränderung in der Kapillarisation der quergestreiften Muskulatur bei Mäusen mit dem Gendefekt diese funktionell beeinträchtigt. Um dies zu klären, werden Laufstrecke und –geschwindigkeit der Mäuse unter physiologischer Belastung ausgewertet und mit Wildtyp-Tieren unter gleichen Bedingungen verglichen. Die Gesamtheit der durchgeführten Versuche dient der Klärung der Frage, ob und inwieweit die Wirkung von IGF-1 auf das Endothel bei der Angiogenese unter basalen Bedingungen und unter physiologischer Belastung beteiligt ist und welchen Effekt dies auf die quergestreifte Muskulatur hat.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte und Hersteller

Realtime PCR System, StepOne Plus, Applied Biosystems

Zellkulturschrank, Function Line, Heraeus

Sterilbank, antair BSK, Kendro

Thermomixer comfort, Eppendorf

PCR Thermocycler, Mastercycler gradient, Eppendorf

Spektralphotometer, NanoDrop ND-1000, Peqlab

Infrarot-Bildgebungssystem, Odyssey, LI-COR Biosciences

Minizentrifuge, Roth

Tischzentrifuge, Centrifuge 5417R, 5810R, Eppendorf

Tischzentrifuge, ROTH

Zentrifuge ROTOFIX 32, Hettich

Sorvall Superspeed Zentrifuge, RC-5B, Du Pont Instruments

Electrophoresis Power Supply, Fischer Scientific POWER 608

Blotkammer Nassblot, Mini PROTEAN Tetra System, BIO RAD

Blotkammer Nasblot, Fischerbrand

Blotkammer Semidry, biometra

Blotkammer HoerferSE 600 Ruby™, Amersham Biosciences

Power Supply WKL 230 LAUDA

Fluoreszenzmikroskop Zeiss Axiovert 35, AxioCam MRC

Fluoreszenzmikroskop Keyence BZ-9000, BIOREVO

Tischvortex Reax top, Heidolph

Wärmeplatte safety control, IKA RCT basic

MicroAmp® Fast 96-Well Reaction Plate (0,1ml), applied biosystems

TissueRuptor, QIAGEN

Inkubationsschrank Function Line, Heraeus

Inkubationsschrank mit Schüttler, INFORS HT Ecotron

Mikrotom mit Kryostat, LEICA CM1850

Laborschüttler, Edmund Bühler GmbH

Waage, KERN

Spannungsquelle Agarosegel Hoefer Scientific Instruments

LICOR, Odyssey-Scanner

Kapillarelektrophorese, 2100 Bioanalyser, Agilent Technologies

2.1.1 Chemikalien

Pierce™BCA Protein Assay Kit, Prod #23227, Thermo SCIENTIFIC

Laufpuffer 2l: 200ml Tris-Glycerin 10x, 10ml 10% SDS ad 2l dH₂O

Blottingpuffer Semidry: 200ml TrisGlycerin (10fach), 400ml Ethanol, 20ml 10%SDS ad 2l H₂O (1:1 mit TBS)

Rotiphorese Gel 40%, gebrauchsfertige Lösung, ROTH

TEMED 99% p.a. für Gelelektrophorese, ROTH

Insulin Insuman® Rapid 40 I.E./ml

Protease Inhibitor Cocktail Tablets, cOmplete Tablets, Mini, Roche

RNase-Free DNase Set 1500 Kunitz units, QIAGEN GmbH

Tripan Blue Solution, Sigma-Aldrich

Frozen Tissue Medium, KP-CryoCompound, Klinipath

RNA later, Qiagen

RNeasy Mini Kit, Qiagen

TRIzol reagent, Invitrogen

Tissue Freezing Medium ®, Leica Microsystems Nussloch GmbH

Zambonis Fixative: 4%Paraformaldehyd, 15% picric acid in 0,1M Na₃PO₄

Taqman® Gene Expression Assay KIT, Applied Biosystem

Liberase TH aus Liberase research grade Selection Kit, Roche

Benzonase® Nuclease Novagen

DNase Sigma

PBS mit Magnesium und Calcium als Puffer für Liberase nach Datenblatt

Zellkulturmedium: Endothel Cell Growth Medium, Promocell

mit 2,4ml/100ml Endothel Cell growth Supplement, Promocell

und 20% FBS superior, biochrom AG sowie Penicillin/Streptomycin 1ml/100ml

Eindeckmedium ProLongGold antifade with DAPI, Invitrogen

MACS® Cell Separation Kit, Miltenyi Biotec

Anti-Rat IgG MicoBeads, MACS Miltenyi Biotec

2.1.2 Antikörper

Primäre Antikörper: IGF1R Cell Signalling Technologies (#3027), IGF1R Cell Signalling Technologies (#3018), IGF1R Abcam (ab32823)

Ratte anti Maus CD 102 (ICAM2) BD Pharmingen

Kaninchen anti Maus CD31 Abcam

2.1.3 Primer

IGF1R Exon3 5`TTCACCAGTACCATGGGCTCC Vorwärtsprimer, Invitrogen

IGF1R Exon3 5`CTTCAGCTTTGCAGGTGCACG Rückwärtsprimer, Invitrogen

Hprt Applied Biosystems, Nr. Mm00446968_m1

Igf1R Applied Biosystems, Nr. Mm 00802841_m1

2.1.4 Sonstige Materialien

Nitrocellulose Transfer Membran PROTRAN®, Whatman®

2.1.5 Verwendete Software

StepOne™ Software, Real Time PCR Systems, Version 2.2.2

Zellzählung und Zellmessung mit Soft Imaging Solutions, Olympus

Gelauswertung mittels UV Tisch und Computerprogramm QuantityOne 4.5.2, Biorad

GraphPad Prism V4, Graphpad Software Inc.

SigmaPlot V10.0.Inc, Systat Software GmbH

2.2 Versuchstiere

Zum Ausschalten eines definierten Gens in den Körperzellen von Mäusen wurde das sogenannte cre/ loxP-System verwendet, welches zunächst an Zellen, später auch im Tiermodell angewendet wurde (Orban et al., 1992, Sauer and Henderson, 1989). Hierbei wird das Genom der Tiere durch das Enzym *causes recombination* (Cre) an zuvor markierten Stellen geändert (lox-P-Stellen). Das Enzym Cre ist eine Rekombinase, was heißt, dass es in der Lage ist, spezifische DNA-Sequenzen, die loxP-Stellen, zu erkennen und diese unter Ringbildung aus der DNA zu exzidieren. Dies macht man sich zu Nutze,

indem man das Zielgen mit diesen spezifischen DNA-Sequenzen markiert. Die Markierung erfolgt über ein flankieren der zu deletierenden Region mit loxP (*locus of cross-over of P1*) -Regionen. Diese Sequenzen sorgen dafür, dass die Cre ihre Rekombinasefunktion auf die DNA ausübt, was heißt, dass es zwischen diesen Genregionen zu einer Ringbildung und darauffolgender Exzision der dazwischenliegenden Gensequenzen kommt. Bei den von loxP flankierten Gensequenzen handelt es sich um die jeweils auszuschaltende Genregion. Folglich benötigt man zur Ausschaltung eines Gens zwei genetisch veränderte Tiere. Zum einen ein Tier, welches Cre exprimiert, zum anderen ein Tier, bei welchem eine für die Funktion wichtige Region des auszuschaltenden Gens mit den für die Cre als Zielsequenz erkennbaren Aminosäuresequenzen flankiert wurde. Um den KO (*Knock-Out*) in einem Tier nur einer Gewebeart auszulösen, muss gewährleistet sein, dass die Cre in nur diesem Gewebe exprimiert wird. Dies erreicht man dadurch, dass das Ableiten der für die Rekombinase kodierenden DNA von einem Zelltyp-spezifischen Promotor kontrolliert wird.

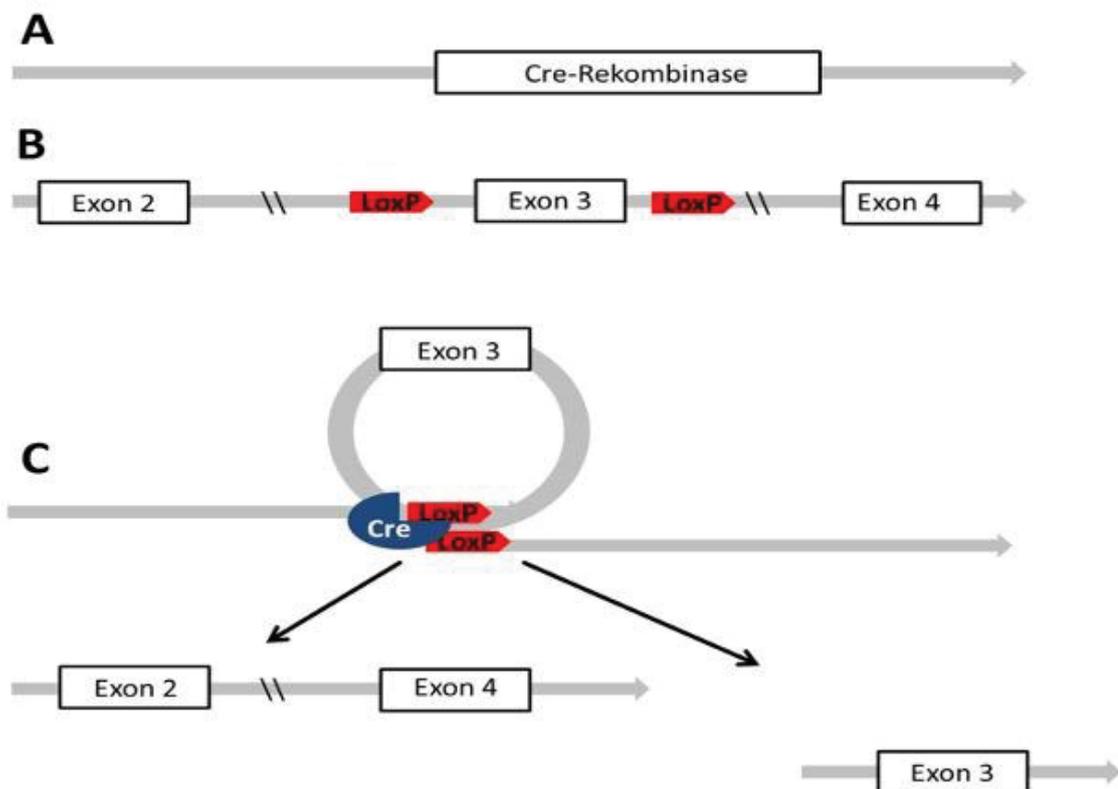


Abbildung 3 Schematische Darstellung der Funktionsweise der Cre-Rekombinase: Expression der Cre-Rekombinase(A) im Endothel in Kombination mit der gefloxt markierten Region des Exon 3 der IGF1R (B) führt nach Anlagerung der LoxP Sites zur Exzision der Genregion (C) und somit in der Folge zu einer fehlenden Expression des IGF1R in diesem Gewebe.

Für die Endothelspezifität der Expression der Cre wurde in dieser Arbeit das *tie2* Gen verwendet, da es ausschließlich im Endothel exprimiert wird (Kisanuki et al., 2001). Das für die Cre-Rekombinase kodierende Genmaterial wurde direkt hinter die Promotorregion des *tie2* eingebaut. Wie in Abbildung 3 schematisch dargestellt ist, wurden die Tiere entsprechend mit ebenfalls genetisch modifizierten Tieren, welche in ihrem Genmaterial die loxP-Regionen um das Zielgen aufwiesen, gekreuzt. Für diese Arbeit wurde als Zielgen das Exon 3 des IGF1R gewählt, da dieses für die intrazellulär gelegene Kinaseeinheit des Rezeptors kodiert und somit für die Funktionalität des Rezeptors essentiell ist (Stachelscheid et al., 2008). Bei den auf diese Weise gezüchteten doppeltransgenen Tieren ist der IGF1R im Endothel nicht funktional exprimiert.

Beide Mauslinien wurden uns freundlicherweise von kooperierenden Arbeitsgruppen zur Verfügung gestellt (Kisanuki et al., 2001, Romero et al., 2010).

Die für die Untersuchungen verwandten Tiere entstammten der 7. Rückkreuzungsgeneration aus dem Stamm C57BL/6. Alle Tiere wurden unter konventionellen gehalten und hatten freien Zugang zu Trinkwasser sowie Standardfutter. Die Mäuse wurden durch Ohrlochnummern gekennzeichnet und 3 Wochen nach der Geburt abgesetzt. Für diese Studie wurden für alle Versuche, in denen nicht in der Beschreibung der Durchführung genauer auf das Geschlecht eingegangen wird, sowohl weibliche als auch männliche Mäuse verwendet. Als Kontrolltiere wurden Geschwistertiere eingesetzt, die nach Testung nur einfach transgen waren. Während der Versuche wurde der Gesundheitsstatus der Tiere kontinuierlich überwacht, alle beteiligten Personen haben zuvor an einem Tierversuchskundekurs teilgenommen. Organentnahmen erfolgten unter der durch das ZETT genehmigten Nummer O16/ 04.

2.3 Methoden

2.3.1 Genotypisierung der Mäuse mittels Schwanzspitzenbiopsie

Für die Bestimmung des Genotyps der Tiere der F2-Generation wurde aus den Schwanzspitzen drei Wochen alter Tiere DNA gewonnen und mittels PCR-Methode analysiert. Hierzu wurde den Mäusen 2-3mm der Schwanzspitze abgeschnitten und zunächst als Vorbereitung zur DNA-Präparation in Proteinase K Puffer über Nacht bei 55°C inkubiert.

Um die wässrigen Bestandteile, welche die DNA enthalten, von der Proteinfraction zu trennen wurde anschließend Phenol/Chloroform im Verhältnis 1:1 hinzugegeben. Durch Zentrifugation konnten nun die Phasen voneinander getrennt werden. Der DNA-haltige wässrigen Phase wurde Isopropanol zugesetzt und diese anschließend 10 Minuten bei 14.000 rpm bei 4°C zentrifugiert.

Der Überstand wurde verworfen und das so erhaltene DNA-Pellet mit 70%igem Ethanol gewaschen. Nach dem Trocknen des Pellets wurde dieses über Nacht in 10mM Tris-Puffer (pH: 7,8) mit 1mM EDTA und 10µg/ml RNase gelöst.

Die DNA-Amplifikation erfolgte anschließend nach Zugabe von Nukleosidtriphosphat und den entsprechenden in Tabelle 1 dargestellten komplementären Primern im PCR-Cycler über 40 Zyklen (jeweils 30 Sekunden bei 94°C, 1 Minute 55°C und 1 Minute 72°C).

Die so amplifizierte DNA wurde mittels Gelelektrophorese über ein 1%-iges Agarosegel nach Zugabe von 0,003% Ethidiumbromid aufgetrennt. Hierbei erfolgt die Auftrennung der DNA in Abhängigkeit von der Größe der DNA-Amplifikate. Die Auftrennungsgeschwindigkeit ist abhängig von der Stärke des über der Membran angelegten Spannungsfeldes sowie der Dichte des Agarosegels. Das hinzugegebene Ethidiumbromid interkaliert mit der DNA und ermöglicht durch seine Fluoreszenz ein sichtbar werden der DNA-Fragmente unter UV-Licht nach dem Auftrennen.

Zielsequenz	Sense-Strang	Antisense-Strang
loxPsite	TTCACCAGTACCATGGGCTCC	TCGTTGTTCTCGGTGCAGGCT
Cre / tie2	ATAACCAGTGAAACAGCATTGC	CGTCCTCCTGCTGGTATAG

Tabelle 1 Darstellung der Nukleotidsequenzen der für die PCR zur Genotypisierung verwendeten Primer.

2.3.2 Wiegen der Mäuse

Tie2IGFRKO Mäuse sowie deren Geschwistertiere als Vergleichsgruppe wurden zu fünf verschiedenen Zeitpunkten gewogen. Das Gewicht mancher Mäuse wurde zu mehreren Zeitpunkten erfasst. Insgesamt wurden erfolgten 100 Messungen zu 3 Messzeitpunkten. Verwendet wurde bei jeder Messung dieselbe Waage.

2.3.3 Präparation der Organe für Proteinanalysen

Die Mäuse wurden mittels Genickbruch getötet. Für Proteinanalysen mittels Western Blot wurden die Tiere auf einem Präparationstisch fixiert, der Brustkorb entlang dem Rippenbogen sowie entlang des Sternums mit der Präparierschere aufgeschnitten und anschließend nach kranial verlagert. Um sowohl Herz als auch Lunge möglichst blutleer präparieren zu können wurde mit einer Spritze über eine Kanüle physiologische Pufferlösung (PBS, 3ml, 4°C) durch die rechte Herzkammer gespült. Hierfür wurden während der Präparation die Nierenarterien durchtrennt, damit das Blut abfließen konnte. Die Organe wurden entnommen und sofort in 4°C kalter physiologischer Kochsalzlösung gewaschen. Anschließend erfolgt die weitere Verarbeitung zur Proteinextraktion.

2.3.4 Proteinextraktion aus Organen

Für die Proteinextraktion wurden die Organe in Rundbodenröhrchen mit 1ml Lysispuffer, welchem Phosphataseinhibitor, Proteaseinhibitor sowie PMSF jeweils 1:100 zugegeben wurde, 1 Minute mit einem Ultra Turrax Gerät homogenisiert. Das Gerät wurde nach jedem Organ gründlich mit Leitungswasser sowie PBS gespült und die Organe die gesamte Zeit auf Eis gekühlt. Nachdem das Homogenat kurz in einer Zentrifuge abzentrifugiert wurde, wurde der Überstand mit einer entsprechend großen Pipette in ein 2 ml Mikroreaktionsgefäß überführt um anschließend 15 Minuten bei 4°C auf höchster Stufe zentrifugiert zu werden. Der Überstand (= Proteinextrakt) wurde anschließend in ein frisches Mikroreaktionsgefäß überführt.

Zur Proteinmengenbestimmung wurde ein BCA-Assay mit einem Protein Assay Kit mit vorgegebenen Standards durchgeführt. Als Vergleich diente eine Messreihe mit Wasser. Die Bestimmung erfolgte in dreifacher Ausführung, berechnet wurde die Proteinmenge für die Weiterverarbeitung mit Hilfe der Mittelwerte der jeweiligen Messungen.

Die Menge der jeweiligen Proben wurde so berechnet, dass eine Endkonzentration von 2 mg Protein pro ml Lösung vorlag. Die Proben wurden jeweils mit 25% 4 x Lämmli-puffer versetzt. Das Gemisch wurde in Mikroreaktionsgefäßen für 5-10 Minuten bei 99°C aufgeköcht und anschließend erfolgte die Auftrennung der Proteine mittels SDS PAGE.

2.3.5 Western Blot – Auftrennung der Proteine

Die aus den Organen gewonnen und mit Probenpuffer versetzten Proteinproben wurden auf SDS-PAGE Gele aufgetragen und in einer Kammer mit Laufpuffer über Nacht durch eine angelegte Stromspannung aufgetrennt. Ähnlich der Auftrennung von DNA wandern hier die Proteine je nach ihrer Größe und Konfiguration zum entgegengesetzten Pol des an das Gel angelegten Spannungsfeldes und die Laufgeschwindigkeit wird über die Höhe der Spannung reguliert (hier: 70 Volt über Nacht). Anschließend wird die Gelmembran aus der Kammer entfernt und so an eine Nitrozellulosemembran angelegt, dass die Proteine aus den Proben sowie ein Proteinmarker zur Größenbestimmung entlang einer daran angelegten Spannung auf die Membran an gleicher Lokalisation übertragen werden. Auf Grund der Größe des darzustellenden Proteins (IGF1R ist über 7,5 kDa groß) wurde hier im Versuch mittels NassBlot geblottet. Hierfür wird das Gel am Minuspol der Blotkammer und die Nitrozellulosemembran am Pluspol der Blotkammer direkt hintereinander platziert und unter Kühlung und Hinzugabe eines *Blotting* Puffer eine Stromstärke von 300 mA erzeugt, sodass die Proteine über Nacht auf die Nitrozellulosemembran übertragen wurden.

2.3.6 Färben der Nitrozellulosemembran mit spezifischem Antikörper –Proteinnachweis

Die Nitrozellulose Membran wird vorsichtig mit einer sauberen Pinzette aus der Blotkammer entfernt und in einem sauberen, lichtgeschützten Gefäß für zwei Stunden in *Blotting* Puffer (1:1 mit TBS) bedeckt auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend wird die Lösung abgegossen und der 1. Antikörper (hier: Anti IGF1R) 1:1000 in 5% BSA in 1xTBS/ Tween für 2h bei 4°C inkubiert. Anschließend wird die Membran 3*5 Minuten mit 1xTBS/ Tween gewaschen und der zweite Antikörper (in 1:1 *Blotting* Puffer und TBS, 1:10 000 verdünnt) hinzugegeben. Hier ist aufgrund der Fluoreszenz darauf zu achten, dass die Membran im Dunkeln inkubiert wird. Die Dauer der Markierung des sekundären Antikörpers betrug in unserem Fall 1 h bei Raumtemperatur. Die so spezifisch durch den ersten Antikörper gebundenen und mittels zweitem Antikörper detektierten Proteine können auf der Membran über einen Fluoreszenzscanner (hier: Odyssey-Scanner) sichtbar gemacht werden und auf Grund des zu Beginn auf das Gel

aufgetragenen Protein Größenstandards anhand der Größe der Proteine und der spezifischen Anfärbung durch die Antikörper sicher identifiziert werden.

2.3.7 Histologie und Immunhistologie

2.3.7.1 Einzelzellen und Zellkultur

Für den Nachweis der Endothelspezifität des Knock Outs wurden Endothelzellen aus der Lunge von transgenen Tieren sowie von Wildtypgeschwistertieren entnommen. Die Präparation erfolgte nach der oben bereits beschriebenen Methode. Als Positivkontrolle dienten Endothelzellen der Linie bend2. Die Zellen wurden auf Kammerobjektträger überführt und zwei Tage mit entsprechendem Medium bei 37°C kultiviert bis lichtmikroskopisch ein dichter Zellrasen zu sehen war. Zur Vorbereitung auf die Färbung wurde das Medium abgezogen und die Zellen mit Zambonis Fixativ 10 Minuten auf dem Boden der Kammern fixiert. Die weitere Verarbeitung erfolgte nach den im Weiteren aufgeführten Schritten mittels immunhistochemischer Färbung.

2.3.7.2 Anfertigung von Gefrierschnitten

Für den Nachweis der Endothelspezifität wurde transgenen Tieren sowie deren Wildtypgeschwistertieren Muskeln entnommen, um Endothel in Gefäßen darstellen zu können. Für die Untersuchung der Kapillardichte an Herz- und Skelettmuskel wurden den Tieren diese Organe ebenfalls mittels sorgfältiger Präparation entnommen und sowohl die Muskelfasern als auch die Kapillaren spezifisch angefärbt.

Nach der Tötung der Tiere mittels Genickbruch und der Entnahme der jeweiligen Organe wie oben beschrieben wurden diese auf flüssigem Stickstoff in wasserlöslichem Einblockmedium (TissueTec®) in Aluminiumschälchen eingefroren. Hierbei wurde die Temperatur durch Isopentan konstant bei -40°C gehalten, um ein zu schnelles Einfrieren zu verhindern und Gewebeschäden durch Gefrierbrand vorzubeugen. Anschließend wurden die derart eingebetteten Organe unter Kühlung im Mikrotom geschnitten und vorsichtig auf vorgekühlte Objektträger aufgebracht.

Geschnitten wurde in einem Winkel von 0° bei -20°C. Der Dicke eines Schnittes lag bei 10µm. Es wurde darauf geachtet, dass das zu untersuchende Gewebe aus der Mitte des Blocks entnommen wurde, sodass ein möglichst großer und zentraler Durchschnitt durch das jeweilige Organ abgebildet wurde.

Eine Lagerung der Schnitte erfolgte für kurze Zeit bei -20°C im Exsikkator. Für die weitere Verarbeitung mittels histologischer und immunhistologischer Färbungen wurden die Objektträger auf Zimmertemperatur gebracht und zum Entzug der entstehenden Feuchtigkeit kurzzeitig unter einem Kaltluft Fön getrocknet und so fixiert, zusätzlich mikroskopisch auf mögliche Schäden hin nativ unter dem Lichtmikroskop kontrolliert. Anschließend wurden die einzelnen Schnitte zur Minimierung der eingesetzten flüssigen Substanzen mit einem Fettstift umrandet und anschließend entsprechend der jeweiligen Fragestellung immunhistochemisch angefärbt.

2.3.7.3 Immunhistochemische Färbungen

Nach Fixierung sowohl der Einzelzellen als auch der Gefrierschnitte auf dem jeweiligen Objektträger wurde zunächst mit *Normalgoat*-serum in Saponin Lösung für eine Stunde inkubiert und so unspezifische Proteinbindungsstellen blockiert. Anschließend wurde der entsprechende primäre Antikörper in NGS/Saponin Lösung auf die Objektträger aufgetragen und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde nach dreimaligem Waschen der Objektträger für jeweils zehn Minuten der entsprechende sekundäre Antikörper in NGS/Saponin-Lösung hinzugegeben und gegen Lichteinfluss abgeschlossen für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Abgießen der Antikörperlösung und abermaligem Waschen mit 3 ml PBS für 10 Minuten bei Raumtemperatur wurde die Flüssigkeit abgezogen und 1 Tropfen Fixierkleber mit DAPI-Kernfärbung je Schnitt oder Kammer aufgetragen und der Objektträger luftleer mit einem Deckglas verschlossen. Anschließend wurden die so angefertigten Objektträger mikroskopiert. Die Fotos wurden innerhalb der ersten beiden Tage nach den Färbungen gemacht, da die Fluoreszenz der Farbstoffe durch Lichteinflüsse über längere Zeit nachlässt.

Durch eine Konjugation der sekundären Antikörper mit Flurescein isothiocyanat (FITC) oder alternativ mit tetramethyl isothiocyanat Rhodamin (TRIC), jeweils fluoreszierende Farbstoffe, lassen sich mit dem primären Antikörper markierte Proteine mittels Fluoreszenzmikroskopie spezifisch darstellen.

Die im Fixiermittel enthaltene Kernfärbung erfolgt mit 4'-6-Diamidino-2'-phenylindol (DAPI), welches mit doppelsträngiger DNA interkaliert und somit eine fluoreszierende Färbung der Zellkerne ermöglicht.

Das Fluoreszenzmikroskop verfügt hierbei über verschiedene Filter, wodurch Licht verschiedener Wellenlängen die Fluorochrome anregt und ein entsprechender Filter Licht

anderer als der angeregten Wellenlängen herausfiltert. Entsprechend wird TRITC bei einer Wellenlänge von 555 nm angeregt und erscheint im sichtbaren Licht rot, FITC wird durch roten Laser einer Wellenlänge von 549nm angeregt und erscheint im sichtbaren Licht grün, wohin gehend DAPI durch Licht der Wellenlänge 350-370 nm angeregt wird und blau fluoresziert.

2.3.8 Präparation und Zellisolation aus Mauslunge

Um den Nachweis erbringen zu können, dass der Knock-Out im Bereich der Endothelzellen vollständig erfolgt ist wurden für diese Arbeit Endothelzellen aus den Lungen der Mäuse isoliert. Die Lunge eignet sich durch ihren auf Gasaustausch spezialisierten Aufbau als Organ mit einer hohen Dichte an Endothel im Verhältnis zum Gesamtgewebe besonders gut für die Isolation von Endothelzellen (Kuhlencordt et al., 2004, Fehrenbach et al., 2009)

Die Mäuse wurden mittels Genickbruch getötet und anschließend auf einem Präparationstisch fixiert. Die Trachea wurde mit einer *Butterfly*-Nadel punktiert, aufgefädelt und mit handelsüblichem Nähgarn umwickelt. Hierüber kann so mit einer Spritze über die in der Trachea liegende Kanüle die Lunge mit 1 ml PBS/ Liberase perfundiert werden. Es ist auf ein Aufblähen der Lunge als Anzeichen dafür, dass die Perfusion funktioniert zu achten. Im Anschluss wurde der linke Ventrikel mit einer Kanüle punktiert, diese entfernt und so ein Defekt hervorgerufen. Über den rechten Ventrikel erfolgte durch Punktion mit einer Nadel die Injektion von 3ml kaltem DMEM zur Spülung. Die Lunge wurde schnellstmöglich entnommen und auf eine Petrischale in 0°C kaltem PBS, welchem zusätzlich Calcium und Magnesium hinzugefügt worden war. Dieses wurde zum Waschen der Lunge von außen einmal gewechselt.

Unter sterilen Bedingungen wurde die Lunge mit einer Rasiermesser Klinge manuell mehrfach zerkleinert und in ein Falconröhrchen überführt. Nach Zugabe von 24 µl Liberase TH, 1ml/ ml Benzonase und 2ml PBS/ Ca/ Mg wurde die so zerkleinerte Lunge über 40 Minuten bei 37°C im Wasserbad schräg gestellt geschüttelt, um das Gewebe von der Liberase andauern zu lassen. Die Benzonase verhindert hier ein Verkleben der Einzelzellen durch austretende DNA-Fäden. Es wurde eine geringe Menge des Zellgemisches für die Zählung in der Zellzählkammer entnommen und eine Kontrolle der Lebendigkeit der Zellen mittels TrypanBlau Färbung vorgenommen.

Das Gewebe-Zellgemisch wurde mit einer 1ml Pipette zur weiteren Mischung mehrfach auf- und ab pipettiert und anschließend über ein Sieb (CellStainer, 100µm Nylon Mesh) in ein weiteres FalconRöhrchen überführt. Nach einmaligem Nachspülen des Siebes mit 5ml PBS/ Ca/ Mg wurde das Röhrchen für 5 Minuten bei 700 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde in 10 ml PBS/Mg/Ca resuspendiert, abermals zentrifugiert und der Überstand abgezogen. Die so als Pellet isolierten Zellen wurden in 2 ml Nährmedium und Zugabe von 20% FCS aufgenommen und auf zuvor mit 0,1% Gelatine bedeckten gekammerten Objektträgern ausgesät.

Das Anwachsen der Zellen auf der Platte wurde täglich Lichtmikroskopisch beobachtet. Nach zwei Tagen wurden die Zellen sowohl für die bereits beschriebenen immunhistochemischen Färbungen als auch für eine weitere Isolation mittels Zellsortierung mit Magnetischen *beads* verwendet.

2.3.9 Endothelzellisolation mit antikörperbehafteten Kugeln

Für diesen Versuch wurden die wie oben beschrieben aus Lungen gewonnenen Zellen von je zwei tie2IGFRKO und zwei WT Mäusen zwei Tage in Zellkultur gehalten. Anschließend erfolgte die Selektion von Endothelzellen mittels magnetischer Kügelchen. Ziel war hierbei die Gewinnung einer möglichst reinen Endothelzellpopulation, um in anschließenden Analysen den Knock-out des IGFR nachweisen zu können.

Das Prinzip der Selektion besteht darin, ein Zellgemisch durch Zugabe von metallischen Kügelchen im Größenbereich von wenigen nm, welche zuvor mit einem spezifischen Antikörper für die Zielzellen konjugiert wurden, über einen Magneten zu trennen.

Ein spezifischer Antikörper gegen Endothelzellen, welcher hier zum Einsatz gekommen ist, ist das Oberflächenantigen CD146 (Schrage et al., 2008).

Die mit CD146 beschichteten Metallkügelchen wurden als gebrauchsfertige Lösung bezogen. Das Protokoll zur Isolation der Endothelzellen wurde nach Angaben des Herstellers befolgt (Miltenyi biotec, MicroBeads® Isolation Kit, CD 146).

Die gewonnenen Zellen der KO-Tiere sowie der WT-Tiere wurden aufgrund der geringen isolierten Menge an Endothelzellen gepoolt und sofort für den Einsatz zur *Realtime* PCR weiterverarbeitet.

Die aus den Mauslungen gewonnen und auf 6-well Platten ausgesäten Zellen wurden zunächst von der Platte gelöst und in Einzelzellsuspension gebracht.

Material und Methoden

Hierfür wurde das Medium abgezogen, der Zellrasen mit 4°C kaltem PBS gewaschen und anschließend die Zellen mit S-EDTA für eine Minute zweimalig gewaschen.

Zum Lösen der Zellen wurde jeweils 0,6 ml Trypsin in jede Vertiefung der Platte hinzugefügt und dieses für 10 Minuten bei 37°C einwirken lassen. Anschließend wurden die Zellen in der Lösung durch auf und ab pipettieren zusätzlich vereinzelt und im Anschluss die enzymatische Aktivität des Trypsins durch Zugabe von jeweils 10ml 4°C kaltem MACS Puffer abgestoppt und die Lösung in ein 15ml Zentrifugenröhrchen überführt.

Die folgenden Schritte wurden bei 4°C durchgeführt und es wurde auf eine zügige Durchführung der einzelnen Schritte geachtet.

Mittels Zentrifugation bei 300g über 10 Minuten wurden die Zellen in den Röhrchen pelletiert und der jeweilige Überstand mit einer Pipette abgezogen. Die Zellpellets wurden in 1ml Pufferlösung resuspendiert und es erfolgte eine orientierende Zellzählung. Nach erneuter Zugabe von 10ml Pufferlösung, Zentrifugation und Pelletierung erfolgte die Resuspension unter Zugabe von 90µl MACS Pufferlösung und 10µl der die CD 146 gekoppelten magnetischen Kügelchen enthaltenden Lösung.

Die Suspension wurde für insgesamt 15 Minuten im Kühlschrank inkubiert, wobei eine Durchmischung durch regelmäßiges händisches Schütteln alle 5 Minuten erreicht wurde. Nach der Inkubationszeit wurden jeweils 2 ml MACS Pufferlösung zum Waschen der Zellen hinzugegeben und erneut bei 4°C und 300 g für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und verworfen. Das Pellet wurde mit 500µl MACS Puffer resuspendiert und auf die zuvor mit MACS Puffer angefeuchteten Säulen zum Trennen der mit metallischen Kügelchen markierten CD 146 positiven Zellen über den Magneten gegeben. Auf den Rest der auf der Säule befindlichen Lösung wurden jeweils dreimalig zusätzlich 500µl der Pufferlösung gegeben um die Röhrchen entsprechend zu spülen und Überstände, wie fehlerhaft haften gebliebene und nicht gebundene Zellen, auszuwaschen. Anschließend wurde 1ml Puffer auf die Säulen gegeben und ein leeres Röhrchen unter jede der Säulen gestellt. Die Säulen wurden aus dem Magneten entfernt und mit dem dafür vorgesehenen Stempel die Pufferlösung zügig durchgedrückt. Durch erneute Zentrifugation wurden die CD 146 positiven Zellen pelletiert und für die nachfolgenden Analysen weiterverwendet.

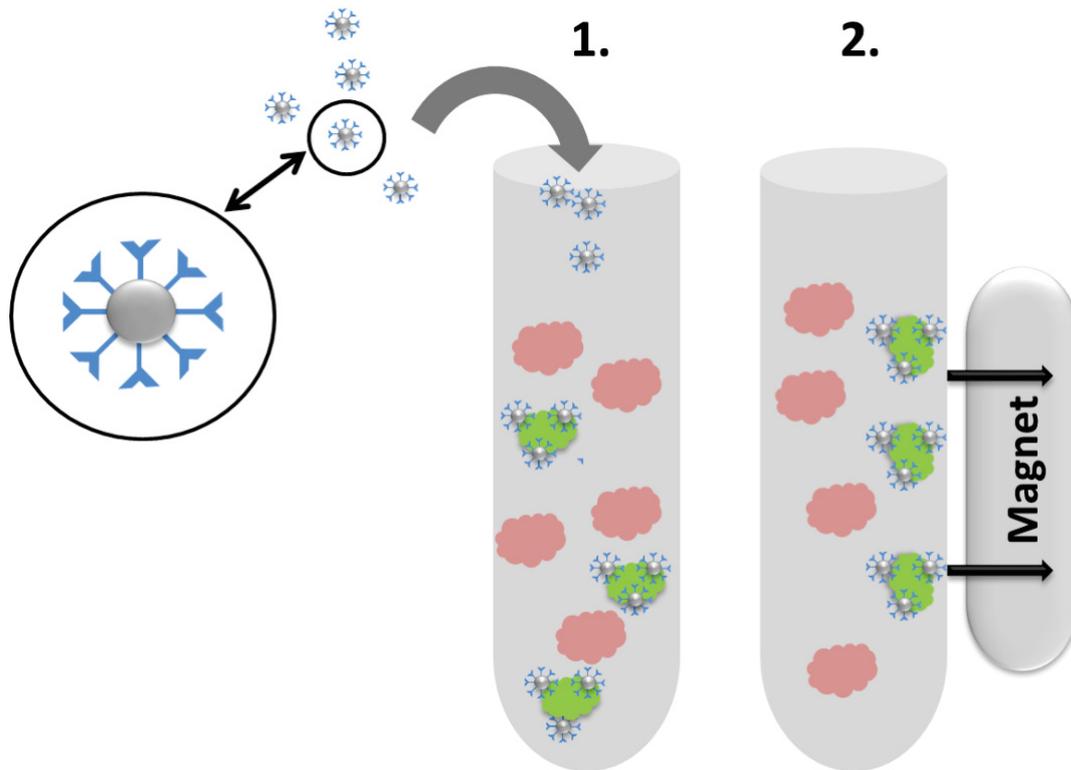


Abbildung 4 zeigt unter 1. die schematische Darstellung der mit Antikörpern gekoppelten Metallkugeln zu einer Zellsuspension, 2. zeigt die über die spezifischen Antikörper magnetisch markierten Zellen, welche sich über einen Magneten von der übrigen Zellsuspension trennen lassen

2.3.10 mRNA Extraktion und Transkription

Aus tie2IGFRKO und WT Geschwistertieren gewonnenes Lungengewebe sowie im Weiteren auch die mittels magnetischen Kügelchen gewonnenen CD 146 positiven Zellen aus dem Lungengewebe der tie2IGFRKO und WT Geschwistertiere wurden wie im Folgenden beschrieben aufgearbeitet und die RNA der Zellen extrahiert und zur weiteren Analyse mittels *realtime* PCR in DNA umgeschrieben.

Hierfür wurde das Gewebe, beziehungsweise die isolierten Zellen, in RNA-Stabilisationsreagenz aufgetaut, dieses nach dem Auftauen abpipettiert und das Gewebe, bzw. die Zellen, in ein Zentrifugationsröhrchen überführt. Es erfolgte dann die Zugabe von jeweils 2ml Trizol pro 150mg Gewebe, bzw. entsprechend 1ml je Zellpellet und Zentrifugationsröhrchen. Anschließend wurden 0,2ml Chloroform pro ml Trizol hinzugegeben. Es erfolgte eine Durchmischung mittels Vortexmischer für 30 Sekunden. Anschließend wurde das Gemisch für 15 Minuten bei 9000 rpm und 6°C zentrifugiert. Der dabei abgetrennte wässrige Überstand wurde zur weiteren Verarbeitung in ein neues Mikroreaktionsgefäß überführt. Es erfolgte die Zugabe von jeweils 1 ml Isopropanol sowie eine erneute gute Durchmischung mittels Vortexmischer. Anschließend erfolgte die Inkubation auf Eis für 30 Minuten.

Die im Gemisch enthaltene RNA wurde bei 12000 rpm und 6°C über 5 Minuten pelletiert. Der Überstand wurde abgenommen und jedes Pellet mit 400 µl Ethanol (80%) gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation mit 12000 rpm bei 6°C über 5 Minuten wurde der Überstand abgenommen, das Pellet getrocknet und anschließend in RNase freiem H₂O auf Eis gelöst. Die gelöste Menge an RNA wurde mittels NanodropTM gemessen und anschließend eine Lösung von 1µg RNA pro µl H₂O errechnet und entsprechend erstellt. Die RNA wurde in einem weiteren Schritt mittels RNeasy Clean up Mini Kit der Firma Qiagen nach Herstellerangaben aufgereinigt. Hierbei wurden im Folgenden 350 µl RLT Puffer sowie 250µl 96%-iges Ethanol je 100 µl Probe hinzugegeben. Nach Durchmischung wurde die Lösung auf die entsprechenden Säulen pipettiert und für eine halbe Minute bei 13000 rpm pelletiert. Die durchgeflossene Lösung wurde aufgefangen und abermals über eine Säule zentrifugiert. Anschließend wurden die Säulchen zweimalig mit 500 µl des im Kit enthaltenen RPE Puffer gewaschen. Es erfolgte ein abschließendes Trocknen der Säulchen sowie eine erneute einminütige Zentrifugation bei 13000 rpm. Die so aufgereinigte RNA wurde in 30 µl RNase freiem H₂O eluiert.

Im Anschluss erfolgte als Vorbereitung auf die Durchführung der *realtime* PCR die reverse Transkription in DNA mittels Reverse Transkriptions Kit. Entsprechend der Herstelleranweisungen wurde je 1 µg RNA in 12 µl H₂O vorgelegt und je 2 µl DNA-*wipeout* Puffer hinzugegeben. Es erfolgte die Inkubation bei 42°C über 2 Minuten und anschließend sofortiges Kühlen auf Eis. Anschließend wurden jeweils 6 µl des Mastermix, bestehend aus RT Puffer, reverser Transkriptase sowie Primer Mix, hinzugegeben. Es erfolgte eine Inkubation bei 42°C über 20 Minuten. Anschließend Abkühlen und Lagerung auf Eis zur sofortigen Weiterverwendung, bzw. Einfrieren bei -80°C der übrigen cDNA enthaltenden Lösung für weitere Analysen.

2.3.11 Quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (qPCR)

Die Quantifikation der gewonnen cDNA erfolgte mittels *realtime* Polymerasekettenreaktion. Mit dieser Methode wird mittels Taqman-Sonden, welche spezifisch für die Sequenz des Zielgens sind und über einen fluoreszierenden Reporterfarbstoff im Bereich des 5' Endes der Nukleotidsonde verfügen sowie im Bereich des 3' Endes über einen die Fluoreszenz unterdrückenden Löscherfarbstoff, den Quencher, die Menge an DNA gemessen. Der Quencher sorgt durch räumliche Nähe zum Reporterfarbstoff dafür, dass dieser keine Photonen emittiert und somit keine Messung durch den PCR-Zyklus erfolgt. Lagert sich die Sonde an den entsprechenden Teil der zu amplifizierenden DNA Zielsequenz an, kommt es durch die Amplifikation der DNA durch die Taq-Polymerase zu einer Abtrennung des Reporterfarbstoffes und dies führt zu einer Trennung von Reporterfarbstoff und Quencher, was wiederum zu einer durch das Gerät messbaren Photonenemission führt.

Zur Durchführung der RT-PCR wurde ein Mastermix erstellt, welcher eine Taq-Polymerase, eine Mischung Desoxynukleosidtriphosphate in einer Endkonzentration von 200 µg jedes Nukleosidtriphosphates, Taq-Polymerasepuffer sowie Primer, welche in RNase freiem Wasser gelöst wurden, enthält. Jeweils 1 µl der die zu amplifizierende Ziel-DNA enthaltenden Probe wurde zu 19 µl des Mastermix hinzugefügt.

Amplifiziert wurde bei 50°C über zwei Minuten, dann bei einer Temperatur von 95°C über 10 Minuten und anschließend jeweils 40-mal bei 95°C über 10 Sekunden mit 60°C für eine Minute. Als Referenz-Gen, welches ubiquitär homogen exprimiert werden muss,

um als solches fungieren zu können, wurde die Hypoxanthine-guanine-phosphoribosyltransferase (HPRT) genutzt.

Eine Auswertung erfolgt mittels durch das Gerät berechneter Werte, dem sogenannten $\Delta\Delta\text{CT}$ -Wert. Dieser Wert beschreibt den Schwellenwert-Zyklus für jedes Produkt, also den Punkt, an welchem das exponentielle Wachstum der Matrize beginnt. Hierüber lässt sich die Menge der gesuchten DNA-Matrize im Vergleich zum Referenzgen bestimmen.

2.3.12 Laufräder und Bedingungen

Um herauszufinden, welchen Effekt der fehlende IGF1R im Endothel unter dauerhafter Belastung aufweist, wurden 20 männliche Tiere gleichen Alters (8 Monate alt) zufällig in Gruppen aufgeteilt und 10 Wochen entweder in einem Käfig mit Laufrad oder in einem Standardkäfig ohne Laufrad gehalten.

Das Prinzip des freiwilligen Laufradlaufens (*voluntary cage running*, VCR) beruht darauf, dass die Maus freiwillig und ohne Antrieb von außen das Rad bewegt. Die Räder haben einen Umfang von 0,72 m und verfügen über ein angeschlossenes Messgerät außen am Käfig, welches die Umdrehungen des Rades misst und mittels eines angeschlossenen Computers jede Umdrehung einer Tageszeit zuordnet.

Um einen möglichst natürlichen, aber standardisierten Tagesrhythmus herbeizuführen, wurden die Lichtverhältnisse künstlich mittels Zeitschaltuhr regelmäßig geändert. Das Licht war von sechs Uhr morgens bis 18 Uhr abends eingeschaltet, die restliche Zeit war es entsprechend für die Tiere dunkel.

Die Mäuse wurden Wasser und Standardfutter *ad libitum* versorgt.

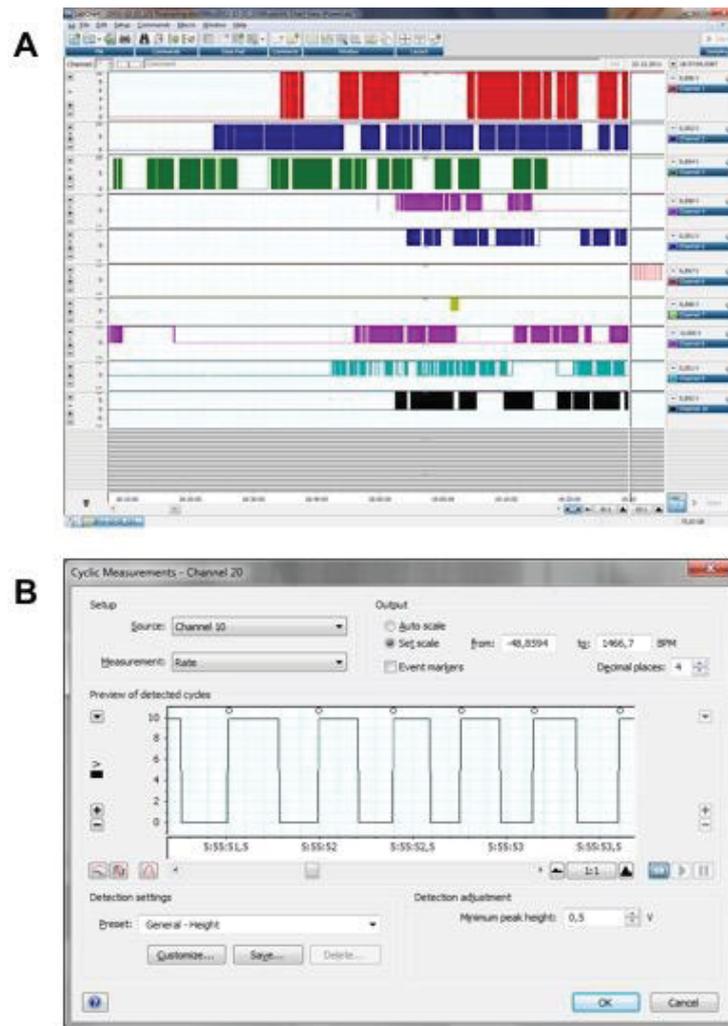


Abbildung 5 Exemplarischer Auszug der Bildschirmanzeige der Aufzeichnungen der Messung der Radbewegung. A zeigt einen Überblick über die verschiedenen Kanäle aller Mäuse, B zeigt die einzelnen Messungen eines Rades. Gezählt wird jeder zweite Zyklus, hier markiert durch einen nicht-gefüllten Punkt über den Ausschlägen.

Um die Geschwindigkeiten und Laufstrecken der Mäuse berechnen zu können, wurde das Programm so eingestellt, dass entsprechende Ergebnisse auf dem Display angezeigt wurden. Wie Abbildung 5 zeigt, wird je Umdrehung eines Laufrades viermal ein von einem an jedem Viertel des Rades angebrachten Magneten ein Signal an das Programm weitergeleitet. Die Einstellung bewirkt ein Zählen jeder zweiten Passage einer Schraube, entsprechend einer halben Laufradumdrehung, also 0,36 m. Zusätzlich zeichnet das Programm die Zeit pro Strecke auf, in Abbildung 5 der Y-Achse entsprechend.

Die Berechnung der Laufstrecke erfolgte pro Tag (von 12h mittags bis zum darauffolgenden Tag um 12h mittags). Die Berechnung der Geschwindigkeit erfolgte entsprechend.

2.4 Statistik

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm Sigma Plot (Systat Software GmbH), die Darstellungen als Graphen mit dem Programm Graphpad prism (Graphpad Software Inc.). Die Signifikanz der Parameter wurde mittels t-test sowie, bei Vergleich von mehr als zwei Gruppen, mittels ANOVA überprüft. Ein p-Wert von $<0,05$ wurde als signifikant betrachtet. Die arithmetischen Mittelwerte wurden mit Standardabweichung angegeben.

3 Ergebnisse

3.1 Nachweis der Inaktivierung des IGF1 Rezeptors in Endothelzellen

3.1.1 Genotypisierung

Nach der Geburt der KO Tiere erfolgte bei den Tieren der F2 Generation eine Schwanzspitzenbiopsie. Die Schwanzspitzen wurden entsprechend der bereits beschriebenen Methoden aufbereitet. Mittels Gelelektrophorese der DNA erfolgte eine Differenzierung der beiden verschiedenen Genotypen. Die Differenzierung über die An- oder Abwesenheit erfolgt über die Bande im Größenbereich der bei 404bp gelegenen Bande der Cre-Rekombinase sowie über die An- oder Abwesenheit der Gensequenz, welche für die loxP Sites um das Exon 3 des IGF1R kodiert erfolgen. Tiere ohne Cre-Rekombinase wurden durchgehend als Kontrolltiere (im Folgenden als Wildtyp, WT genannt) bei den Versuchen eingesetzt. Tiere, welche homozygot auf das Vorhandensein von *loxP Sites* getestet wurden und bei welchen gleichzeitig die Anwesenheit der Cre-Rekombinase festgestellt wurde, gelten als Untersuchungstiere mit endothelspezifischem IGF1R-KO und werden im Folgenden als *tie2IGFRKO (tie-2 IGF-1 Receptor Knock Out)* bezeichnet.

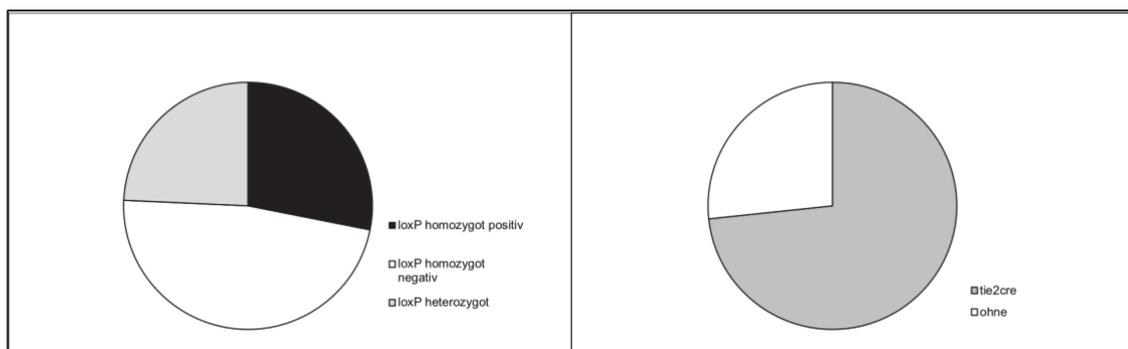


Abbildung 6 Darstellung der genetischen Informationen der *tie2IGFRKO* Tiere. Links ist der Anteil der auf das gefloخته Gen homozygot positiv, negativ oder heterozygot getesteten Tiere am Gesamtanteil aufgetragen; die rechte Graphik zeigt den Anteil der für die *tie2 cre* positiv getesteten Tiere am Gesamtanteil getesteter Tiere. (n=416)

Abbildung 6 zeigt die Daten der insgesamt 416 mittels Gelelektrophorese ausgewerteten Schwanzspitzenbiopsien der Tiere. In Abbildung 6A ist zu sehen, dass 28% der gestesteten Tiere homozygot für die lox P sites sind (fl/fl), 48% sind homozygot negativ und ein Anteil von 24% der Tiere sind in diesem Verfahren heterozygot auf die entsprechende Gensequenz getestet. Abbildung 6B zeigt dasselbe für die genetische Information der Cre-Rekombinase. Hier ist lediglich das Vorhandensein der Gensequenz gegen das Fehlen derselben aufgetragen. Prinzipiell können die Tiere Cre^{+/+} oder Cre^{+/-} sein. Es zeigt sich, dass 73% der Tiere die genetische Information der Cre-Rekombinase besitzen, während sie bei 27% fehlt.

Da die PCR jedoch nur aufzeigt, dass eine Rekombination stattgefunden hat, aber keine Aussage zur Zelltypspezifität machen kann, wurde im Weiteren versucht, die Inaktivierung des IGF1R mittels Immunfluoreszenz näher zu untersuchen.

3.1.2 Immunhistologische Färbungen zur Darstellung des Endothels

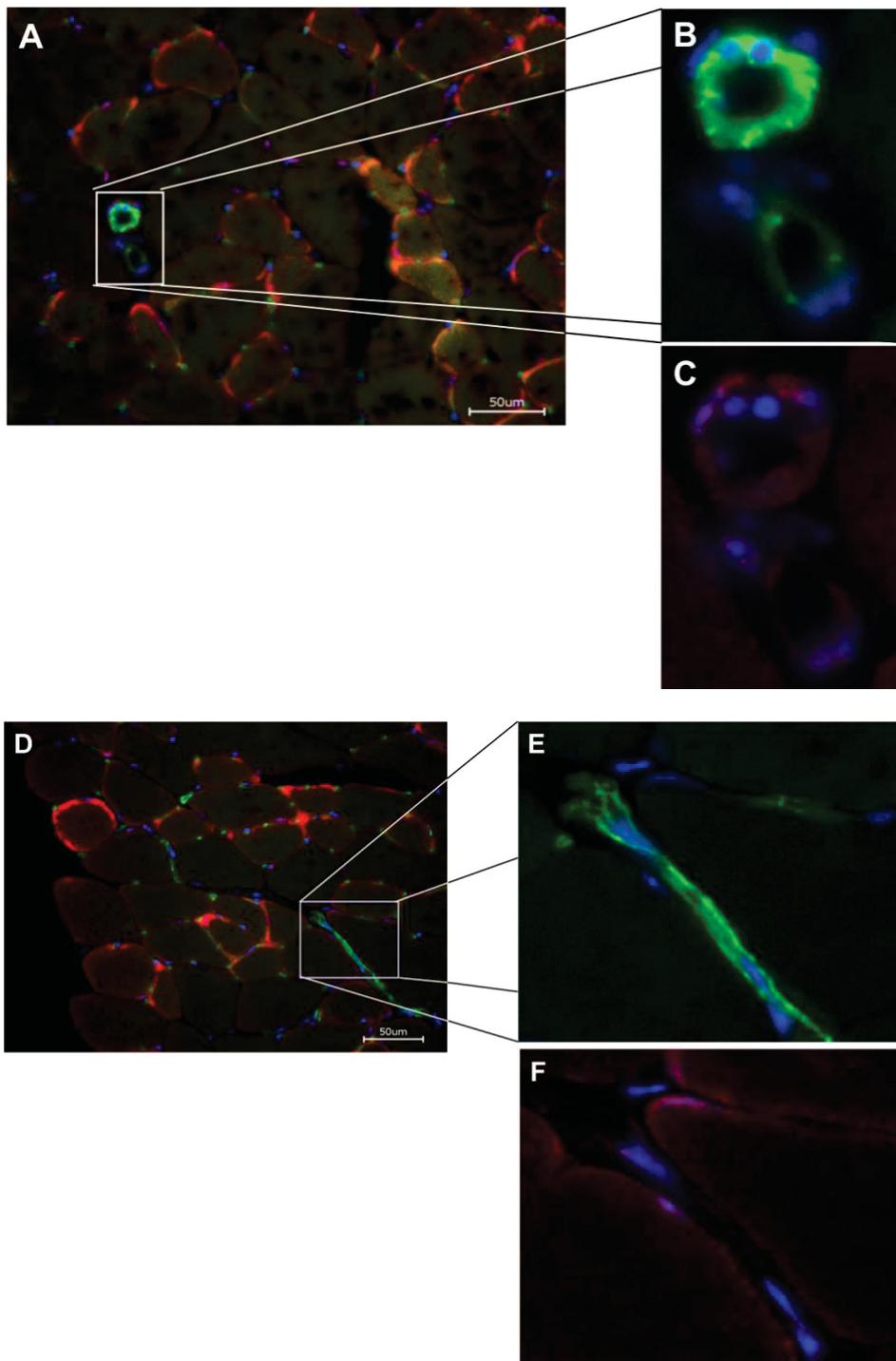


Abbildung 7 Lichtmikroskopische Bilder der immunhistochemischen Färbungen an Muskelschnitten des *M. plantaris*. Rot dargestellt die Fluoreszenz des IGF1R AK, grün die Fluoreszenz des CD31 AK, blau DAPI. A-C WT, D-F tie2IGFRKO, A und D zeigen jeweils den Gesamtausschnitt der gezeigten Muskelpartie mit einer Zusammenschau aller drei Farben, B und E zeigen eine Vergrößerung ohne Darstellung der IGF1R Färbung, C und F zeigen den jeweils gleichen Ausschnitt ohne Darstellung des Endothelzellmarkers. 40-fache Vergrößerung.

Um den Nachweis der Endothelspezifität des Rezeptorknockouts bestätigen zu können, erfolgten Färbungen an Gefrierschnitten der Muskulatur der Mäuse. Diese wurden mit entsprechenden Antikörpern gefärbt und mittels Fluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht. Abbildung 7 zeigt eine Übersicht über einen Skelettmuskelschnitt einer Kontrollmaus. Man erkennt die grün gefärbten vaskulären CD31 positiven Strukturen. Daneben fällt auch eine Rotfärbung der Skelettmuskelfaserumrisse auf, was dem Vorkommen des IGF1R an den Muskelzellen entspricht. Die vergrößerte Darstellung von zwei Kapillaren in Abbildung 7B und 7C zeigt, dass mit den Gefäßen auch eine IGF1R Expression existent ist.

Die vergleichende Analyse in *tie2creIGF1RKO* Mäusen (7D-F) zeigt die vaskulären Elemente in grün und die Färbung des IGF1R auf der Oberfläche der Muskelfasern. Der vergrößerte Ausschnitt einer längs verlaufenden Kapillare zeigt, dass im Gegensatz zu den Kontrolltieren keine IGF1R-Färbung mit den Endothelzellen mehr assoziiert ist.

3.1.3 WesternBlot Analysen ganzer Organe

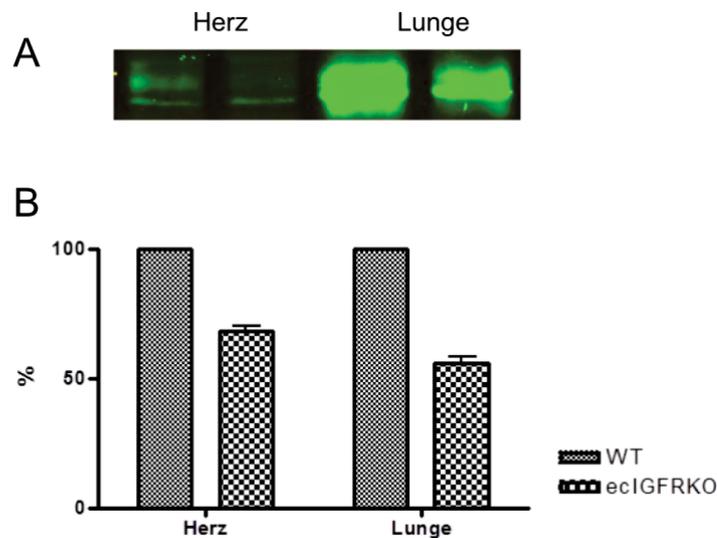


Abbildung 8 Darstellung der Proteinmengenbestimmung mittels Western Blot aus den Organen Herz und Lunge, A: Nachweis des IGF1R und die entsprechend ermittelten Fluoreszenzwerte, die beiden linken Banden stellen die Fluoreszenz der aus dem Herzen gewonnenen Proteine dar, die beiden rechten Banden die der Lunge. Die jeweils linke Bande ist die des WT Tieres. B: gemittelte Proteinmenge des IGF1R, bezogen auf den WT, welcher als 100% angegeben wird; Darstellung arithmetischer Mittelwerte mit Standardabweichung, Analyse mit T-Test (n=9)

Mittels der im Methodenteil beschriebenen Western Blot Analysen der Organe Herz und Lunge wurde überprüft, ob die Inaktivierung des IGF1R Gens einen wesentlichen Effekt

auf die Gesamtmenge des IGF1R im Herzen, beziehungsweise in der Lunge der Tiere hat. Unter Hinzuziehung einer Coomassie-Färbung und Messung der Gesamtproteinmenge kann der Anteil des exprimierten IGF1R-Proteins im Verhältnis ermittelt werden. Wird der Anteil des IGF1R von WT und tie2IGFRKO ins Verhältnis gesetzt, indem die Proteinmenge des WT gleich 100% gesetzt wird, dann zeigt sich eine Verringerung des Anteils des IGF1R im tie2IGFRKO auf 67% im Herzen und auf 55% in der Lunge. Abbildung 8A zeigt exemplarisch das Ergebnis einer entsprechenden Analyse für Herz und Lunge.

Da mit dieser Analyse lediglich eine Verringerung des Rezeptoranteils im Gesamtproteinanteil der Organe, jedoch nicht spezifisch in einem Zelltyp, hier dem Endothel, nachgewiesen werden kann, wurden im Folgenden Endothelzellen isoliert und untersucht.

3.1.4 Endothelzellisolation und Quantifizierung des Anteils von IGF1R im Endothel mittels *realtime* PCR

Es erfolgte die Isolation von zunächst Einzelzellen aus den Organen sowie im Folgenden von Endothelzellen in mehreren Schritten, sowie anschließend die Aufbereitung des gewonnenen Zellmaterials und die Isolation von mRNA für weitere Analysen aus den gewonnenen Zellen.

Mittels *realtime* PCR wurde die aufbereitete mRNA zunächst auf Unterschiede in der Expression des IGF1R im Gesamtorgan Lunge hin untersucht. Dabei ergab sich eine Verringerung der Expression der IGF1R mRNA von 100% im WT auf 57% in der Lunge des tie2IGFRKO Tieres.

Um die Endothelspezifität näher eingrenzen zu können, wurden die über die Gewinnung von Endothelzellen und Kultivierung dieser als Primärkulturen sowie nachfolgender weiterer Aufbereitung mit magnetischen Kügelchen via MACS System Endothelzellen aus den Lungen von insgesamt vier Tieren, dabei je zwei WT und zwei tie2IGFRKO, isoliert. Nachfolgend erfolgte die vergleichende Analyse der mRNA von sowohl den gewonnenen Endothelzellen im Vergleich zwischen Wildtyp und tie2IGFRKO Tieren als auch im Vergleich zu den übrigen, von Endothelzellen depletierten und über dieselbe Methode gewonnen Zellen. Es ergab sich eine Differenz in der gemessenen Expression

der mRNA für den IGF1R in der von Endothelzellen depletierten übrigen Zellen im Vergleich von bereits 63% geringerer Expression des Rezeptors im tie2IGFRKO.

Die entsprechenden Expressionsmessungen, graphisch zu sehen in Abbildung 9, des IGF1R mittels PCR im Vergleich zwischen den aufgereinigten Endothelzellen aus tie2IGFRKO Tieren sowie den aufgereinigten Endothelzellen aus Lungen der Wildtyptiere ergaben einen Unterschied von 93,5%, also von 100% im WT auf lediglich 6,5% im tie2IGFRKO.

Diese Ergebnisse zeigen zum einen, dass durch Isolation von Endothelzellen aus der Lunge sowie die zusätzliche Aufreinigung mittels magnetischer Kügelchen eine sehr gute Aufreinigung der Primärzellen aus der Lunge erfolgt ist, sowie zum anderen, dass der tie2IGFRKO tatsächlich endothelzellspezifisch erfolgt ist.

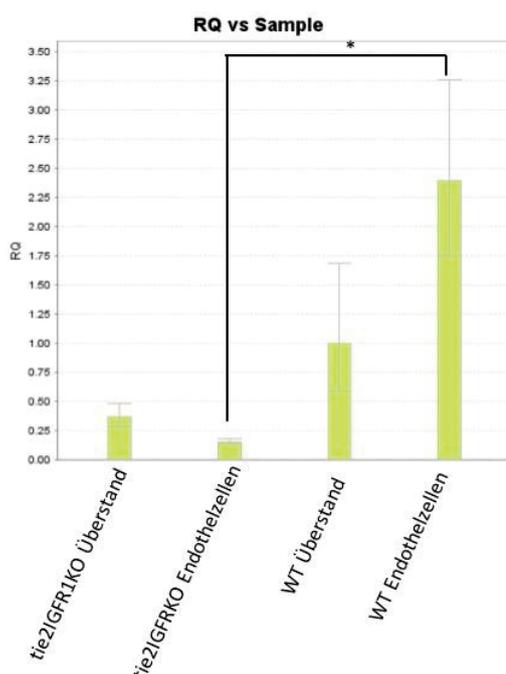
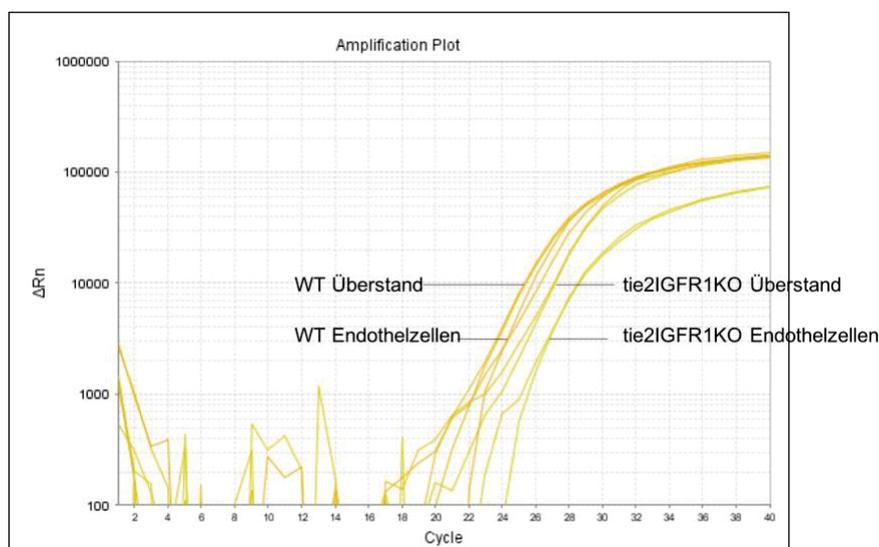


Abbildung 9 qPCR der mittels MACS isolierten Endothelzellen sowie des Überstandes mit Vergleich der Konzentration des IGF1R zwischen WT und tie2CreIGF1R.

Als Überstand wurden die Zellen bezeichnet, die nicht mittels magnetischer *Beads* über die Säulen isoliert wurden (n=2)

3.2 Phänotypisierung der tie2IGFRKO Maus

3.2.1 Gewicht der Mäuse unter basalen Bedingungen im Vergleich

Um einen eventuellen Effekt des tie2IGFRKO auf das Körpergewicht der Tiere feststellen zu können, wurden die Tiere gewogen und das Gewicht mit denen der WT Tiere gleichen Alters verglichen. Wie in Abbildung 10 dargestellt ist, lässt sich kein Unterschied im Gesamtkörpergewicht der Tiere feststellen. Ein signifikanter Unterschied im Gewicht der männlichen Tiere im Alter von sechs Monaten besteht zwar ($41,6 \pm 1,9$ WT vs. $31,57 \pm 2,6$ tie2IGFRKO, $p=0,02$) wird jedoch in Zusammenschau der Ergebnisse und bei einer Gruppengröße in ausschließlich dieser Altersklasse von $n=2$ und $n=3$ bei einer Gesamtzahl der untersuchten Tiere von $n=40$ als nicht relevant gewertet.

Der Unterschied zwischen den jeweiligen Geschlechtern ist jedoch erwartungsgemäß über die Gesamtheit der Altersklassen ab dem ersten Lebensmonat sowohl bei WT als auch bei tie2IGFRKO vorhanden ($21,65 \pm 3,9$ WT weiblich vs. $26,8 \pm 6,7$ WT männlich, $p < 0,001$) ($19,3 \pm 3,6$ KO weiblich vs. $28,8 \pm 4,4$ KO männlich, $p < 0,001$).

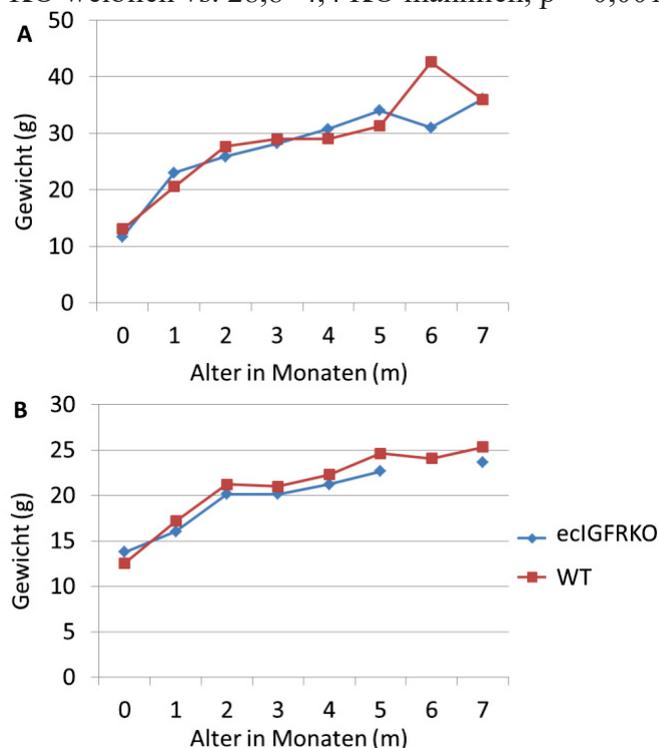


Abbildung 10 Der unter A dargestellte Graph zeigt das Gewicht der männlichen WT und KO Tiere in g im Vergleich, unter B dargestellt das Gewicht der weiblichen Tiere. Basale Bedingungen. (Anzahl der Tiere, $n=40$, Anzahl der Messungen $n=100$)

3.2.2 Gewicht der Tiere mit und ohne Ausdauertraining im Vergleich

Um den vermuteten Effekt des tie2IGFRKO auf die Muskulatur der Tiere im Vergleich zu Wildtyptieren zu untersuchen, erfolgte ein Training von jeweils fünf Tieren mittels freiwilligem Laufradlaufen. Hierfür wurden fünf Wildtyptiere sowie fünf tie2IGFRKO Tiere in einen Käfig mit Laufrädern vereinzelt und umgesetzt, welche durch eine Messeinrichtung mittels Magnetes eine Überwachung der Laufradbewegungen möglich machte. Insgesamt erfolgte eine Beobachtung über einen Zeitraum von 16 Wochen. Zeitgleich wurden je fünf Tiere der beiden Gruppen unter denselben Bedingungen in Käfige ohne Laufrad umgesetzt und vereinzelt, um einen Vergleich unter ansonsten gleichen Bedingungen zu ermöglichen. Zu Beginn und am Ende des sechzehnwöchigen Trainings der Mäuse mittels freiwilligen Laufradlaufens wurden diese gewogen und das Gewicht nach Gruppen sortiert ausgewertet. Wie in Abbildung 11 dargestellt, zeigte sich in der Gruppe der WT Tiere eine signifikante Reduktion des Körpergewichtes von $35,0 \pm 1,9\text{g}$ vor Versuchsbeginn vs. $30,1 \pm 2,7\text{g}$ nach Training ($p=0,02$). Der Effekt des Trainings zeigte sich auch in der Gruppe der tie2IGFRKO Tiere. Hier lag das Gewicht zu Beginn des Trainings bei $34,66 \pm 4,3\text{g}$, wohingegen am Versuchsende das Gewicht der Tiere bei $30,7 \pm 2,8\text{g}$, $P=0,005$ lag.

In der jeweiligen Kontrollgruppe ohne Möglichkeit zum Laufradlaufen blieb das Gewicht über die Zeit konstant ($35,1 \pm 5\text{g}$ WT ohne Training zu Versuchsbeginn vs. $33,6 \pm 3,1\text{g}$ WT ohne Training bei Versuchsende, $p=0,125$ und $34,7 \pm 2\text{g}$ tie2IGFRKO ohne Training zu Versuchsbeginn vs. $33,2 \pm 2,9\text{g}$ tie2IGFRKO ohne Training bei Versuchsende, $p=0,087$). Ein Unterschied des Gesamtkörpergewichtes nach dem Training zwischen WT und tie2IGFRKO bestand nicht ($30,1 \pm 2,7\text{g}$ WT mit Training bei Versuchsende vs. $30,7 \pm 2,8\text{g}$ tie2IGFRKO mit Training bei Versuchsende, $p=0,72$).

Zusammenfassend führte das freiwillige Laufradlaufen somit zu einer signifikanten Gewichtsreduktion aller Tiere, sowohl im WT mit einer Reduktion um 14% als auch im tie2IGFRKO mit einer Gewichtsreduktion um 11%.

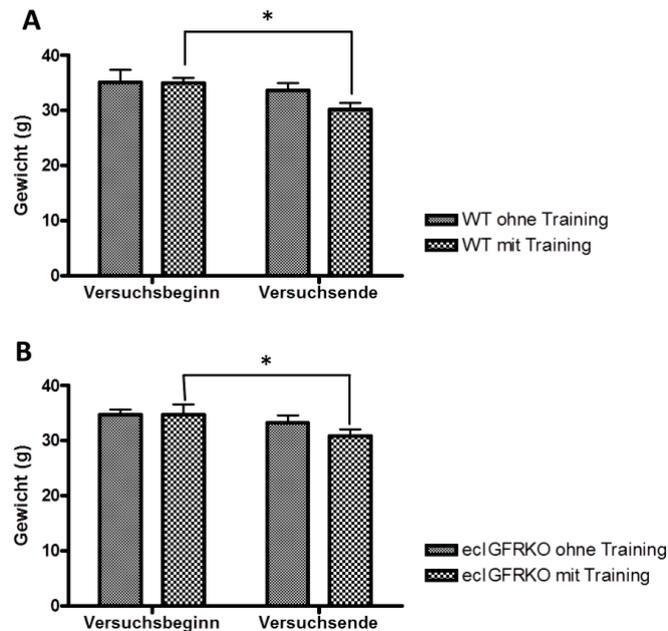


Abbildung 11 dargestellt ist das Gewicht der Wildtypiere (A) ohne und mit Training im Vergleich, B zeigt das Gewicht der tie2IGFRKO Tiere mit und ohne Training im Vergleich. Gemessen wurde zusätzlich jeweils vor und nach freiwilligem Laufradlaufen; Darstellung arithmetischer Mittelwerte mit Standardabweichung, Analyse mit T-Test (n=5)

3.2.3 Herzgewicht, Herzindex und Tibiallänge der Tiere mit und ohne Training im Vergleich

In weiteren Untersuchungen wurde die Bedeutung des endothelialen IGF1R-Signalwegs für die Anpassung des Herzens an Ausdauerbelastung analysiert. Da sich das Körpergewicht der Mäuse durch das Training änderte, wurde zur Normierung des Herzgewichtes die Tibiallänge herangezogen. Wie Abb. 12C zeigt, gab es keinen Unterschied in den Tibiallängen bei den einzelnen Gruppen.

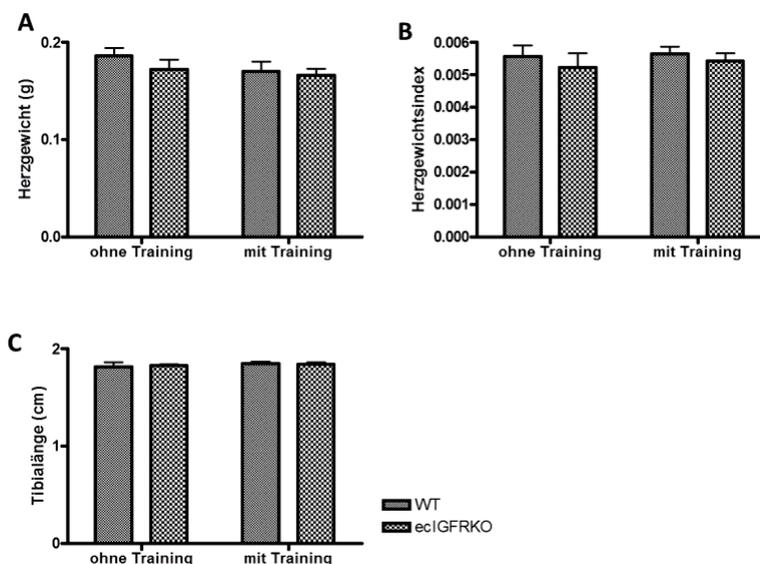


Abbildung 12 A: Herzgewicht in g von WT und KO mit und ohne Training,

B: Herzgewichtsindex mit und ohne Training sowohl der WT Tiere als auch der KO;

C: Tibiallänge der WT und KO Tiere mit und ohne Training in cm

Darstellung arithmetischer Mittelwerte mit Standardabweichung, Analyse mit T-Test

(n=5)

Um einen Effekt des Trainings auf das Herz der Tiere zu untersuchen, erfolgte nach Versuchsende die Analyse der Herzgewichte.

Das in Abbildung 12A dargestellte Herzgewicht der Tiere war sowohl für den genetischen Hintergrund ohne Training ($0,186 \pm 0,01$ g WT vs. $0,172 \pm 0,01$ g tie2IGFRKO, $p=0,3$) als auch mit Training ($0,17 \pm 0,02$ g WT vs. $0,166 \pm 0,01$ g tie2IGFRKO, $p=0,7$) gleich hoch. Zusätzlich ließ sich weder bei den WT Tieren zwischen untrainierten und trainierten Tieren ($0,186 \pm 0,01$ g WT ohne Training vs. $0,17 \pm 0,02$ g WT mit Training, $p=0,2$) noch bei den tie2IGFRKO Tieren ($0,172 \pm 0,01$ g tie2IGFRKO ohne Training vs. $0,166 \pm 0,01$ g tie2IGFRKO mit Training, $p=0,6$) ein Einfluss des Trainings auf das gemessene Herzgewicht feststellen. Es bestand demnach weder ein Einfluss des Lauftrainings noch ein Einfluss des tie2IGFRKO auf das Herzgewicht der Tiere.

Um eine Hypertrophie feststellen oder ausschließen zu können wurde zusätzlich der Herzgewichtsindex der Tiere ermittelt. Dieser stellt eine häufig verwendete Größe zur Evaluation einer Hypertrophie dar (Aksakal et al., 2013, Radovits et al., 2013). Diese ist in Abbildung 12 B dargestellt. Auch für die auf diese Art normierten Herzgewichte ließ sich weder ein Einfluss des Lauftrainings noch des fehlenden IGF1-R auf das Verhältnis zwischen Herzmuskelmasse und Körpermasse feststellen.

3.2.4 Nutzung der Laufräder durch die WT und tie2IGFRKO Tiere

Zusätzlich zu dem Effekt des Lauftrainings auf das Herz und die Skelettmuskulatur erfolgte eine Analyse der durch die Tiere im Laufrad zurückgelegte Strecke sowie die erreichten Geschwindigkeiten. Die Laufgeschwindigkeit und die im Laufrad zurückgelegte Strecke der Tiere wurde über mit einem am Rad angebrachten Magneten gemessen und aufgezeichnet.

So konnte mittels Häufigkeit und Anzahl der Radumdrehungen pro Zeit die Geschwindigkeit und die zurückgelegte Strecke errechnet werden, um mögliche funktionelle Unterschiede zwischen den transgenen Tieren und den Tieren der WT Kontrollgruppe feststellen zu können.

Abbildung 13A und 13B zeigen exemplarisch für Woche 1, 8 und 16 die von den Mäusen zurückgelegte Gesamtstrecke pro Woche in Metern und die mittleren Geschwindigkeiten in dem entsprechenden Zeitraum, wobei die ersten vier Tage des Versuchsbeginns auf

Grund von Unregelmäßigkeiten in der Nutzung der Laufräder, welche durch die fehlende Gewöhnung der Mäuse zu erklären sind, nicht in die Rechnung einbezogen wurden.

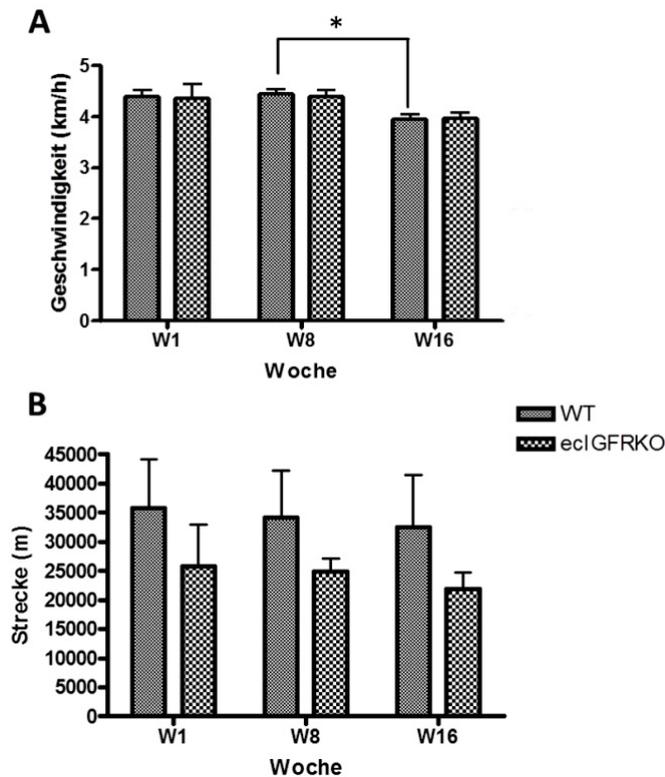


Abbildung 13 Geschwindigkeit und pro Woche zurückgelegte Strecke der WT und tie2IGFRKO Tiere im Vergleich, exemplarisch dargestellt für Woche 1, 8 und 16. A: mittlere Geschwindigkeit der Tiere in den dargestellten Wochen, B: Gesamtlaufstrecke der Tiere in den dargestellten Wochen. Darstellung arithmetischer Mittelwerte mit Standardabweichung, Analyse mit T-Test (n=5)

Ausgewertet wurden die Daten von jeweils einer Woche zu Beginn des Trainings (hier als W1 bezeichnet), einer Woche in der Mitte des Lauftrainings (hier als W8 kenntlich gemacht) und der letzten Woche des Lauftrainings (hier W16). Die Mäuse sind während der beiden erstgemessenen Wochen mit einer mittleren Geschwindigkeit von $4,4 \pm 0,3$ km/h (WT) und $4,3 \pm 0,6$ km/h (tie2IGFRKO) gelaufen, wobei kein statistischer Unterschied zwischen W1 und W8 besteht, in beiden Gruppen aber eine geringere Geschwindigkeit in der sechzehnten Laufwoche gemessen werden konnte ($3,9 \pm 0,2$ km/h WT und $4 \pm 0,2$ km/h tie2IGFRKO).

Statistisch ergaben sich in der Gesamtlaufstrecke pro Woche (35739 ± 18665 m WT W1 vs. 25765 ± 16227 m tie2IGFRKO W1, $p=0,42$ / 341782 ± 18021 m WT W8 vs. 24888 ± 5081 m tie2IGFRKO W8, $p=0,69$ / 32440 ± 20261 m WT W16 vs. 23991 ± 4670 m tie2IGFRKO W16, $p=0,45$) keine Unterschiede. In der graphischen Auftragung der

Daten, in Abbildung 13 B dargestellt, ist allerdings zu sehen, dass die tie2IGFRKO Tiere eine geringere Strecke zurückgelegt haben als die WT Tiere.

Zusammenfassend lässt sich kein signifikanter Unterschied der körperlichen Aktivität, hier gemessen anhand von Laufstrecke und Geschwindigkeit, der WT im Vergleich zu den tie2IGFRKO Tieren bei freiwilligem Laufradlaufen beobachten.

3.2.5 Die Kapillarisation des Myokards nach Training

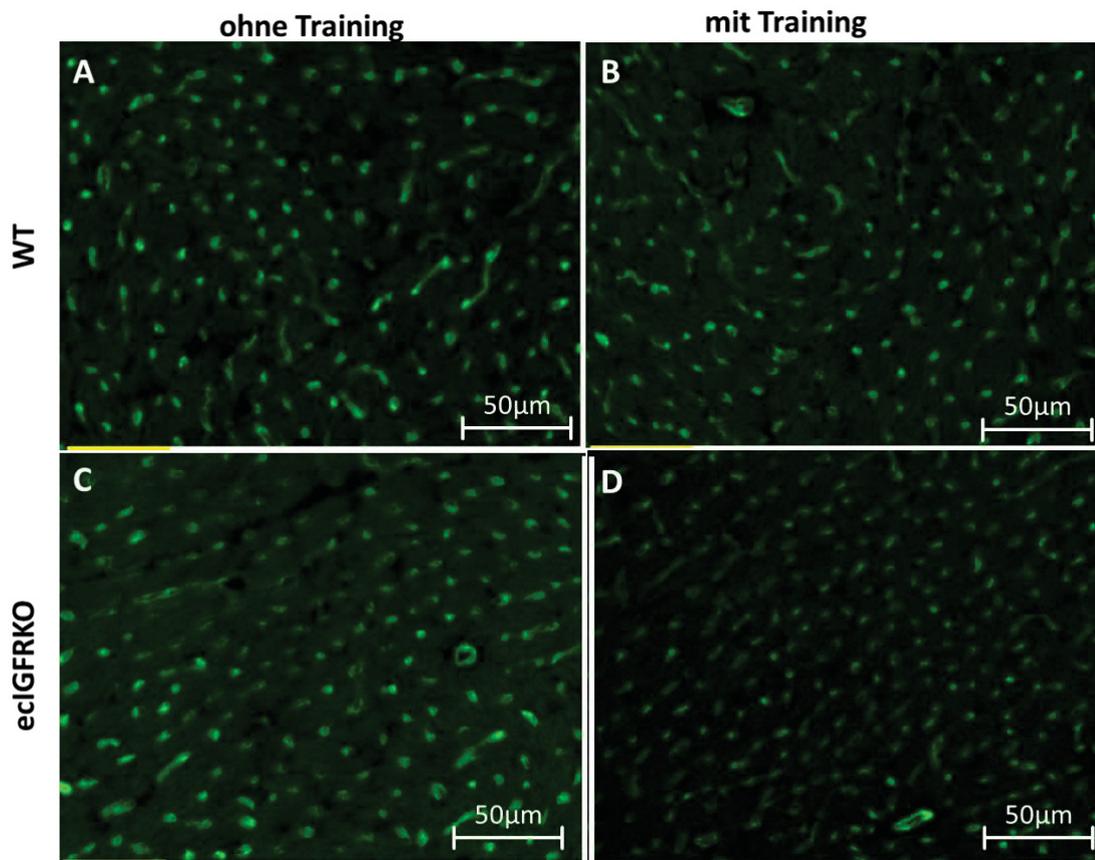


Abbildung 14 Kapillarisation des linken Ventrikels, Immunfluoreszenz mit CD31 AK; A und B zeigen den WT, C und D den tie2IGFRKO; jeweils links ohne Training und rechts nach Training im Vergleich. 40x Vergrößerung.

In weiteren Untersuchungen wurde überprüft, ob das freiwillige Lauftraining einen Einfluss auf die Kapillarisation der Herzmuskulatur hatte.

Dazu wurden die Herzen der mittels freiwilligem Laufradlaufens trainierten Tiere wie im Methodenteil beschrieben entnommen und immunhistologisch nach der dort erläuterten Methode aufgearbeitet und das Endothel mit Antikörpern gegen CD31 dargestellt.

Die Auszählung der Kapillaren erfolgte im Bereich von jeweils vier standardisierten quadratischen Feldern je entnommenem Muskel im Bereich repräsentativer und

möglichst quer geschnittene Muskelfasern. Abbildung 14 zeigt exemplarisch solche Felder mit Kapillaren von WT sowie tie2IGFRKO Tieren nach freiwilligem Laufradlaufen sowie der jeweils sedentären Kontrollgruppen.

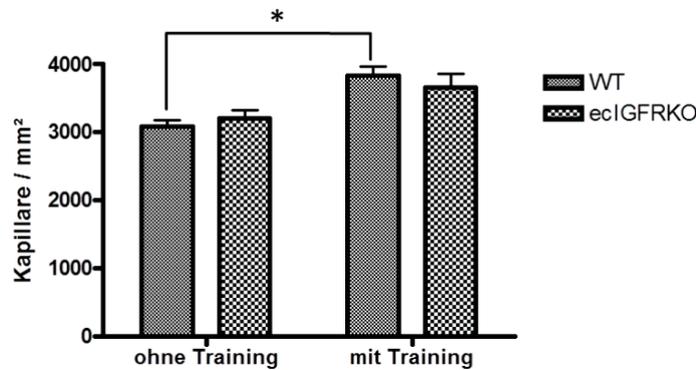


Abbildung 15 Vergleich der Kapillarisation im Myokard von trainierten und untrainierten Mäusen, jeweils WT und tie2IGFRKO Tiere; als signifikant wurde ein p-Wert von unter 0,05 definiert, graphisch dargestellt durch *; Darstellung arithmetischer Mittelwerte mit Standardabweichung, Analyse mit T-Test (n=5)

Das in Abbildung 15 dargestellte Diagramm zeigt, dass zwischen transgenen Tieren und der Kontrollgruppe sowohl ohne Training (3073,6±235,45 Kapillaren/ mm² WT vs. 3197,60±272,22 Kapillaren/ mm² tie2IGFRKO, p=0,463) als auch mit Training (3833,6±286,7 Kapillaren/ mm² WT vs. 3652,0±457,71 Kapillaren/ mm² tie2IGFRKO, p=0,474) kein Unterschied in der Kapillarisation des Myokards besteht.

Vergleicht man innerhalb der Kontrollgruppe der sedentären Tiere mit Tieren mit Lauftraining, so ist eine statistisch signifikante Zunahme der Kapillaranzahl pro mm² in der Gruppe der Tiere mit Training zu erkennen (3073,6±210,59 Kapillaren/ mm² WT ohne Training vs. 3833,6±256,43 Kapillaren/ mm² WT mit Training, p=0,002). Diese Beobachtung ist innerhalb der Gruppe der tie2IGFRKO Tiere als Trend in dieselbe Richtung zu verzeichnen (3197,60±243,48 Kapillaren/ mm² tie2IGFRKO ohne Training vs. 3652,0±409,39 Kapillaren/ mm² tie2IGFRKO mit Training, p=0,093), jedoch nicht statistisch signifikant.

3.2.6 Die Kapillarisation des Skelettmuskels nach Training

Zusätzlich zur Herzmuskulatur wurde die Skelettmuskulatur der Tiere hinsichtlich der Kapillarisation untersucht.

Analog zu den Untersuchungen im Bereich des Myokards wurden jeweils vier gleichgroße Quadrate; einem mm^2 je Tier entsprechend, in Bereichen von quer geschnittener und entsprechend immunhistologisch gefärbter Muskelfaserschnitte untersucht und die Anzahl der Kapillaren pro Feld gezählt.

Abbildung 16 zeigt exemplarisch die Kapillarisation von Ausschnitten aus der Plantarismuskulatur der Tiere, jeweils sedentär sowie nach Lauftraining sowohl von tie2IGFRKO als auch WT.

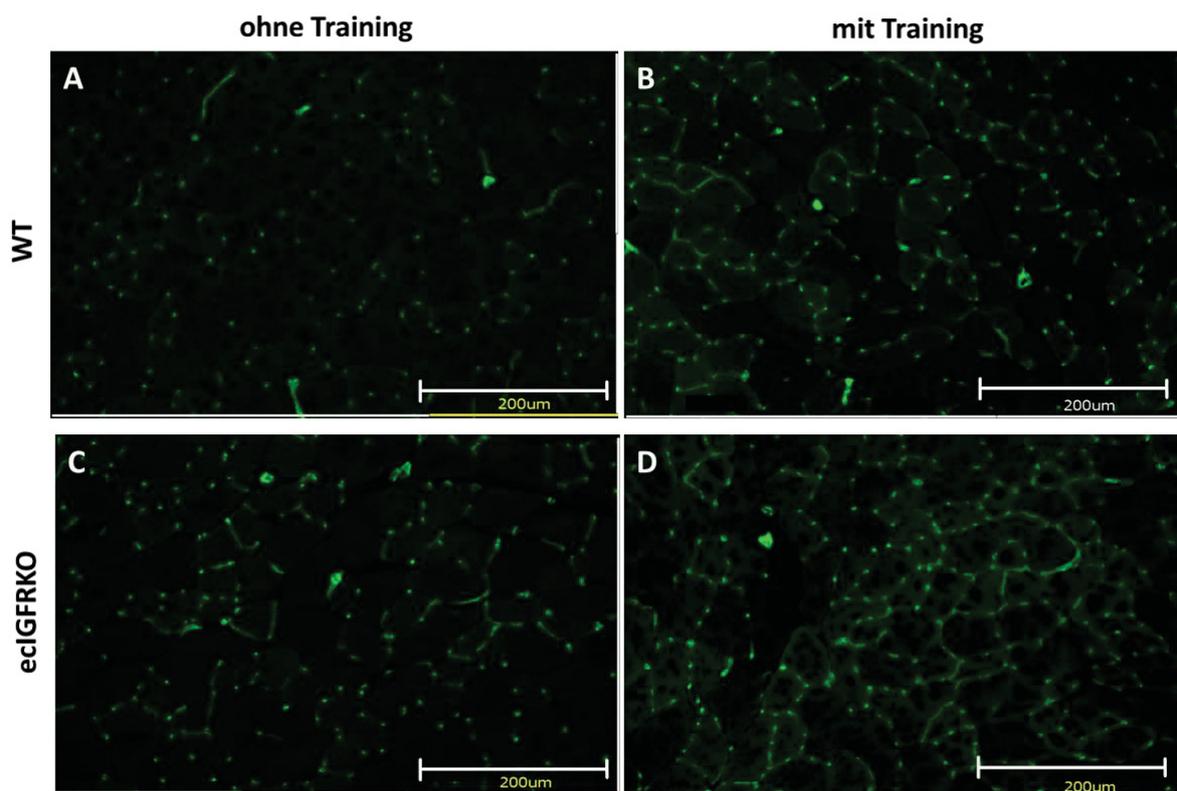


Abbildung 16 Kapillarisation des M. plantaris, Immunfluoreszenz mit CD31 AK; A und B zeigen den WT, C und D den tie2IGFRKO; jeweils links ohne Training und rechts nach Training im Vergleich. 40x Vergrößerung.

Die Abbildungen 16C bis 16D zeigen exemplarisch Ausschnitte von mittels CD 31 gefärbten Muskelfaserschnitten des M. plantaris von ecIGFRKO Mäusen, die Abbildungen 16A und B im Vergleich die von WT Tieren. Zudem jeweils von Tieren nach dem Lauftraining (B und D) sowie von sedentären Tieren (A und C).

Die mit dem Antikörper markierten Endothelzellen markieren hier in Grün die Kapillaren, welche größtenteils quer verlaufend angetroffen sind. Mittels eines computerbasierten Zählprogrammes wurden je Muskel vier Schnitte ausgezählt, zusammen entsprechend einer Fläche von insgesamt 1 mm².

Die Anzahl der Kapillaren pro mm² Skelettmuskulatur betrug in der Gruppe der sedentären WT Tiere 869,2±212,07 Kapillaren/mm² und in der Gruppe der sedentären ecIGFRKO Tiere 886,8±45,15 Kapillaren/mm², entsprechend ergab sich kein Unterschied der verschiedenen Genotypen ohne Training (p=0,783).

Die Anzahl der Kapillaren pro mm² Skelettmuskulatur betrug in der Gruppe der WT Tiere nach Ausdauertraining 1105,2±129,92 Kapillaren/mm² und in der Gruppe der ecIGFRKO Tiere nach Ausdauertraining 1049,2±113,66 Kapillaren/mm², es zeigte sich hier mit p=0,489 ebenfalls kein Unterschied in der Kapillarisation zwischen den beiden Genotypen.

Im Vergleich der unterschiedlichen Genotypen untereinander, also der Effekt nach Ausdauertraining gegenüber den untrainierten Tiere zeigte, dass in der Gruppe der Wildtypiere eine Zunahme der Kapillarisation der Skelettmuskulatur vorhanden ist, diese jedoch einem Trend entspricht, welcher nicht signifikant ist (1105,2±129,92 Kapillaren/mm² WT mit Training vs. 869,2±212,07 Kapillaren/mm² WT ohne Training, p=0,058).

In der Gruppe der ecIGFRKO Tiere zeigte sich eine deutliche Zunahme der Kapillarisation bei Tieren mit Ausdauertraining gegenüber den sedentären Tieren (1049,2±113,66 Kapillaren/mm² ecIGFRKO mit Training vs. 886,8±45,15 Kapillaren/mm² ecIGFRKO ohne Training, p= 0,018)

Zusammenfassend zeigte sich ein Effekt von Ausdauertraining durch eine Zunahme der Kapillaranzahl pro mm² bei beiden Genotypen. Es zeigte sich jedoch kein Effekt des Knockouts auf die Anzahl der Kapillaren in der Skelettmuskulatur der Tiere. Dies traf sowohl auf die basalen Bedingungen bei sedentären Tieren zu als auch bei Tieren, welche dem Reiz eines Ausdauerlauftrainings ausgesetzt waren.

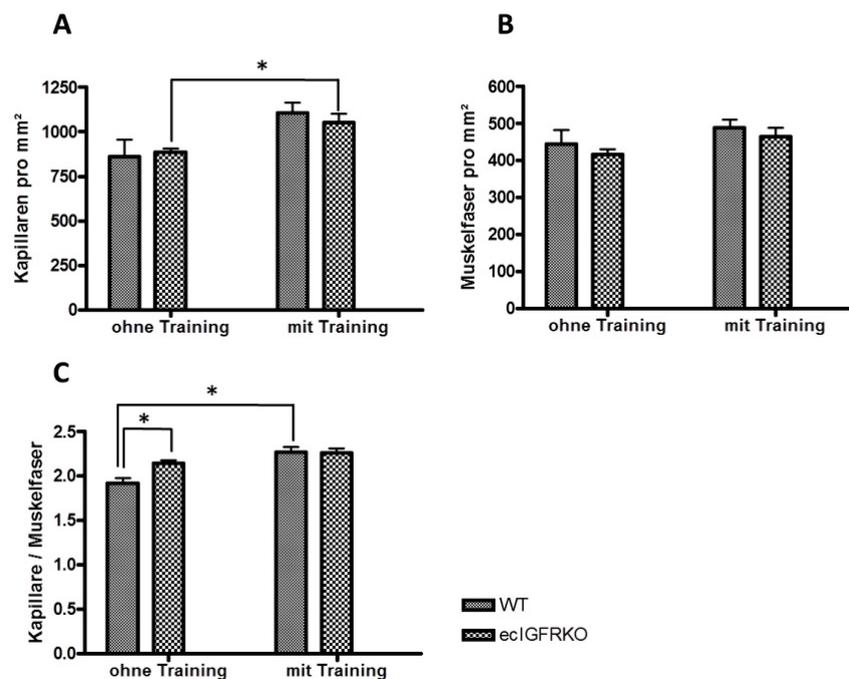


Abbildung 17 A: Graphische Darstellung der Kapillaranzahl pro mm² Muskel, B: Darstellung der Muskelfaseranzahl derselben Areale, C: Darstellung des Kapillar-zu-Faser-Verhältnisses der entsprechenden Areale. $p < 0,05$ durch* markiert; Darstellung arithmetischer Mittelwerte mit Standardabweichung, Analyse mit T-Test ($n=5$)

Neben der Anzahl der Kapillaren in der Skelettmuskulatur erfolgte eine immunhistologische Darstellung der Muskelfasern und analog zur Bestimmung der Kapillaranzahl erfolgte die Auszählung der Muskelfaseranzahl pro mm² wie in Abbildung 17 dargestellt.

Hier zeigte sich kein Unterschied in der Anzahl der Muskelfasern zwischen tie2IGFRKO Tieren und WT Tieren, weder in der Gruppe der Tiere mit Training noch in der Gruppe der sedentären Tiere ohne Training (444,2±83,36 WT ohne Training vs. 415,2±34,16 tie2IGFRKO ohne Training, $p=0,492$ und 487,4±48,54 WT mit Training vs. 464,4±51,72 tie2IGFRKO mit Training, $p=0,489$).

Ebenso konnte weder in der Gruppe der transgenen Tiere noch in der Gruppe der WT Tiere ein durch Training hervorgerufener Effekt auf die Anzahl der Skelettmuskelfasern pro mm² festgestellt werden (444,2±83,36 WT ohne Training vs. 487,4±48,54 WT mit Training, $p=0,346$) sowie (415,2±34,16 tie2IGFRKO ohne Training vs. 464,4±51,72 tie2IGFRKO mit Training, $p=0,114$). Abbildung 17 B zeigt die graphische Darstellung der Muskelfaseranzahl je mm² der einzelnen Gruppen nebeneinander.

Zusammenfassend zeigte also weder ein Ausdauertraining noch der unterschiedliche Genotyp einen Effekt auf die Muskelfaserdichte im Skelettmuskel der Tiere. Auch ein

eventueller Unterschied auf den Effekt des Trainings gemessen an der Muskelfaserdichte durch den Knockout des IGF1R wurde nicht gefunden.

Um einen eventuellen durch den Knockout hervorgerufenen Unterschied oder einen Effekt des Trainings hinsichtlich eines Zusammenhangs der Kapillarisierung und der Anzahl der Muskelfasern detektieren zu können, wurde der Quotient aus der Anzahl der Kapillaren und der Anzahl der Muskelfasern je Tier gebildet. Durch das Auszählen der Kapillaren und Muskelfasern im jeweils selben Abschnitt einer histologischen Färbung war dies möglich. Abbildung 17 C zeigt graphisch aufgetragen das so ermittelte Kapillar-zu-Faser Verhältnis von WT und ecIGFRKO Tieren, sowohl der sedentären Tiere sowie auch der Tiere nach Ausdauertraining.

Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied durch eine Zunahme der Kapillaranzahl in der Gruppe der WT Tiere nach Ausdauertraining gegenüber der WT Tiere unter basalen Bedingungen ($1,91 \pm 0,094$ Kapillaren/Muskelfaser WT ohne Training vs. $2,28 \pm 0,12$ Kapillaren/Muskelfaser WT mit Training, $p=0,008$).

Ein ähnlicher Trend zeigte sich für den Quotienten in der Gruppe der transgenen Tiere nach Ausdauertraining im Vergleich zu der Gruppe der sedentären transgenen Tiere ($2,14 \pm 0,08$ Kapillaren/Muskelfaser ohne Training vs. $2,27 \pm 0,1$ Kapillaren/Muskelfaser mit Training, $p=0,077$).

Zwischen den genetisch unterschiedlichen Gruppen der WT und ecIGFRKO Tiere bestand in den Gruppen der Tiere unter basalen Bedingungen ein statistisch signifikanter Unterschied des Quotienten aus Kapillaren und Muskelfasern ($1,91 \pm 0,094$ WT ohne Training vs. $2,14 \pm 0,08$ tie2IGFRKO ohne Training, $p=0,005$), wohingegen dieser Unterschied zwischen den entsprechenden Gruppen der trainierten Tiere nicht festzustellen war ($2,28 \pm 0,12$ WT mit Training vs. $2,27 \pm 0,1$ tie2IGFRKO mit Training, $p=1,0$).

Zusammenfassend ließ sich somit, wie in Abbildung 17 C dargestellt, ein Effekt des Knockouts auf das Kapillar-zu-Muskelfaserverhältnisses messen, welcher lediglich unter basalen Bedingungen nachweisbar war. Zwischen WT Tieren und ecIGFRKO Tieren nach Ausdauertraining bestand kein Unterschied im Kapillar-zu-Muskelfaser Verhältnis.

3.2.7 Größe der Muskelfasern des Plantarismuskels nach Training

Um einen möglichen Grund für den Unterschied im Kapillar-zu-Faser Verhältnis des Musculus Plantaris zwischen WT und tie2IGFRKO herausfinden zu können, wurde die Größe des Faserquerschnittes vermessen. Abbildung 18 zeigt exemplarische Ausschnitte, in welchen die Fasergrößen der WT und tie2IGFRKO Tieren unter basalen Bedingungen sowie nach Ausdauertraining bestimmt wurden. Es erfolgte die Ausmessung der Querschnitte von 100 Fasern je mm² je Tier.

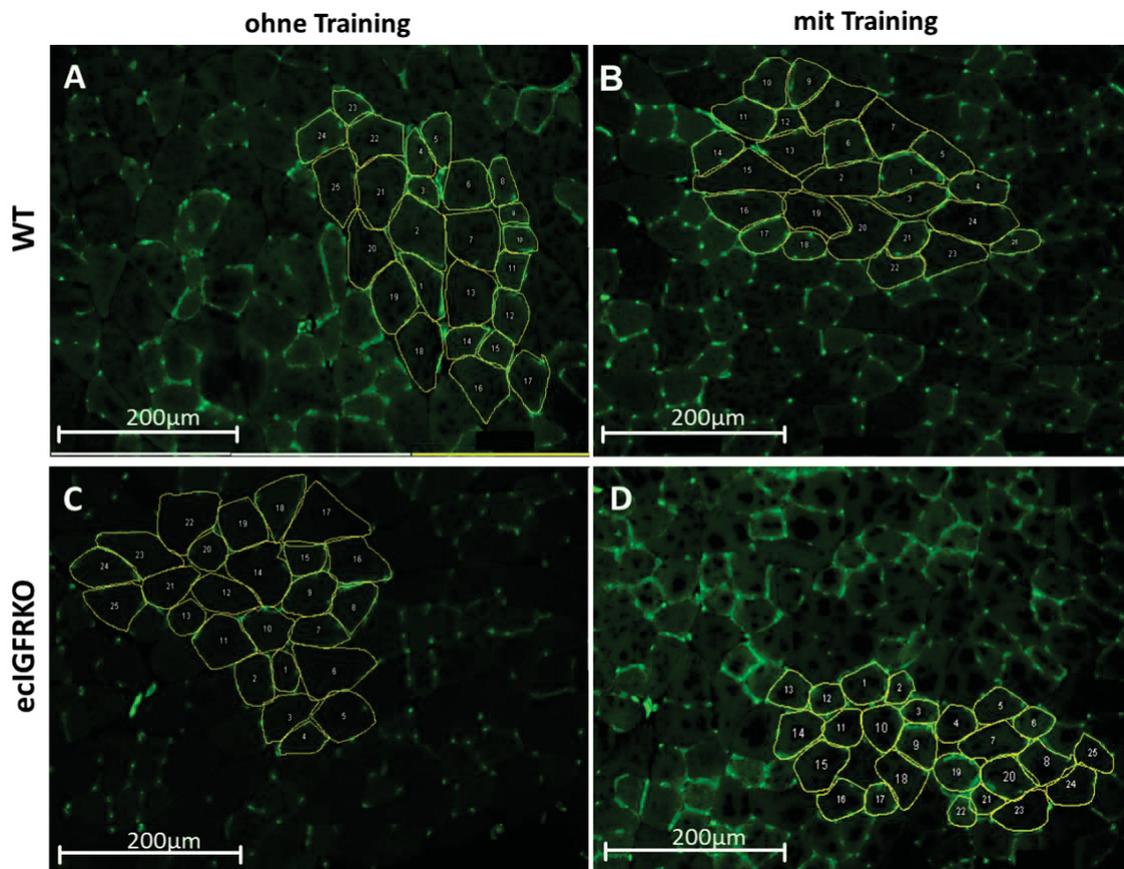


Abbildung 18 Exemplarische Darstellung der Muskelfasern im Querschnitt. A und B zeigen jeweils Ausschnitte eines WT Tieres, C und D eines tie2IGFRKO. Jeweils links abgebildet Tiere ohne Training, rechts mit Training. 40x Vergrößerung.

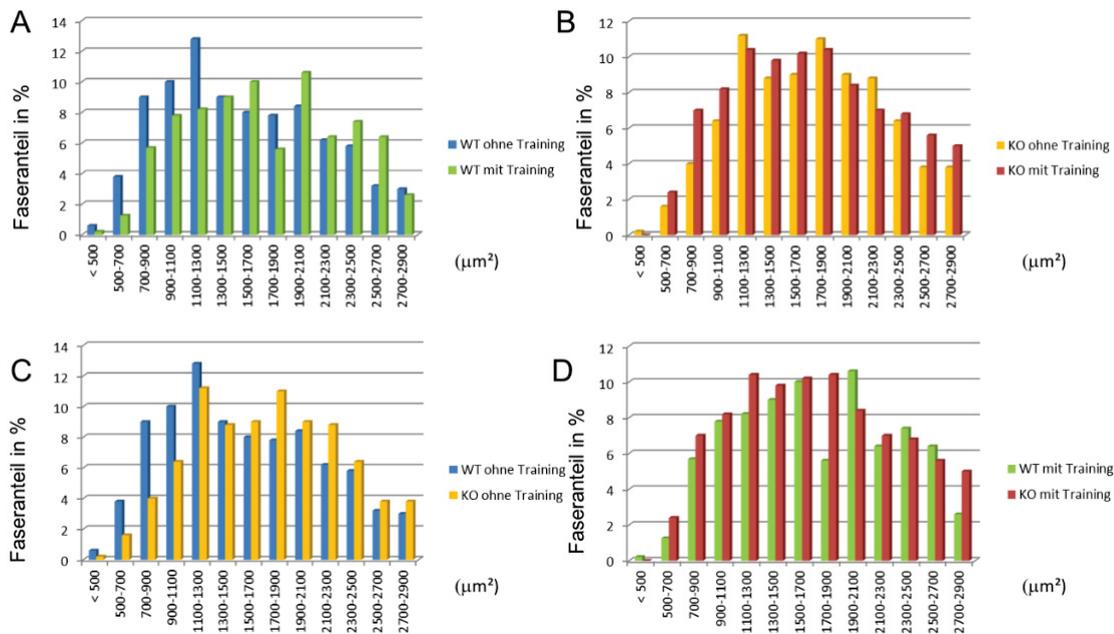


Abbildung 19 Vergleich der Verteilung der Größen der Muskelfasern im Querschnitt, es wurden Querschnitte von 100 Muskelfasern je 1 mm² ausgemessen und die Größe der Fasern in μm² graphisch aufgetragen. Abb. A: Vergleich der Verteilung der Fasergrößen zwischen WT mit und ohne Training, Abb. B: KO Tiere mit und ohne Training; Abb. C: Vergleich untrainierter WT gegenüber untrainierter KO Tiere; Abb. D: Vergleich trainierter KO und WT Tiere; (n=5)

Abbildung 19 zeigt graphisch aufgetragen die Verteilung der Muskelfaserquerschnitte. Es fällt auf, dass die Verteilung der Fasergröße innerhalb der tie2IGFRKO Gruppe homogen ist, also sowohl mit als auch ohne Training eine sehr ähnliche Verteilung der Fasergröße vorliegt. Dem Fasergrößenprofil der tie2IGFRKO Gruppe entspricht in etwa auch das der WT Gruppe, welche das Training mittels freiwilligen Laufradlaufens absolviert hat. Lediglich die Gruppe der WT Tiere ohne Training scheint eine Fasergrößenverteilung hin zu einem größeren Anteil an Fasern im Bereich von 500-1300 μm zu haben. Ebenso ist der Bereich der Verteilungsbreite mit 1150,5 μm deutlich größer als die der anderen Gruppen (zum Vergleich: Verteilungsbreite WT mit Training: 676 μm; tie2IGFRKO ohne Training: 446 μm; tie2IGFRKO mit Training: 618 μm). Der tie2IGFRKO führte den erhobenen Daten nach zu einer Veränderung der Muskelfasergrößen hin zu einer Verteilung, die der von trainierten WT Tieren entspricht und sich durch Training nicht veränderte.

4 Diskussion

4.1 Beeinflussung der Kapillarisierung von Skelett- und Herzmuskulatur unter basalen Bedingungen und unter physiologischer Belastung durch ein Fehlen des IGF1R im Endothel der Maus

Nachdem die ursprünglich angenommene Hypothese, IGF-1 stamme ausschließlich aus der Leber, widerlegt werden konnte, ist es nun insbesondere interessant die para- und autokrine Wirkung von IGF-1 in den verschiedenen Organsystemen nachzuvollziehen (Sjogren et al., 2002b). Insbesondere das kardiovaskuläre System sowie der Einfluss von IGF-1 auf die Endothelzelle stehen hier aufgrund der hohen klinischen Relevanz im Vordergrund der aktuellen Forschung (Muniyappa and Sowers, 2012, Imrie et al., 2012, Pizon et al., 2013, Higashi et al., 2019). Ähnlich dem VEGF-R vermittelt IGF-1 seine Wirkung auf die Zelle über eine intrazelluläre Signalkaskade des IGF1R, bei welcher der Signalweg über das Enzym PI3-K eine bedeutende Rolle spielt. VEGF ist der wichtigste Wachstumsfaktor für die Angiogenese, und obwohl bereits vor einigen Jahren die Existenz des IGF1R im Endothel nachgewiesen werden konnte, ist dessen tatsächlicher Einfluss auf das Endothel oder auch eine weitere Wirkung vermittelt über das Endothel, insbesondere im Gesamtorganismus, noch wenig untersucht. Dies erstaunt insbesondere im Hinblick darauf, dass die Neubildung von Gefäßen sowie deren Erkrankung in Form beispielsweise einer endothelialen Dysfunktion nicht nur in jeder Region des Körpers vorkommen können, sondern zusätzlich bei einer Vielzahl verschiedener Prozesse wie beispielsweise der Tumorangio-genese, der Wund- und Knochenheilung sowie unterschiedlichsten organspezifischen Erkrankungen, beispielsweise der proliferativen Retinopathie, von größter Bedeutung sind. Ein positiver Effekt der IGF1R vermittelten Angiogenese konnte in *in vitro* Versuchen an retinalen Endothelzellen des Schweines nachgewiesen werden (Deissler et al., 2013). Ebenso konnte an Versuchen mit humanen Endothelzellen aus der Umbilikalvene ein positiver Zusammenhang zwischen IGF-1 und einer vermehrten Proliferation der Zellen bei gleichzeitiger Stimulation durch mit Tumorfaktoren versetztes Medium festgestellt werden (Chen et al., 2012). In einem Mausmodell mit einem induzierbaren endothelspezifischen KO des IGF1R konnte eine

weitere Arbeitsgruppe zeigen, dass durch den induzierten KO keine Veränderung der basalen Kapillarisation der Haut hervorgerufen wird, der Defekt jedoch zu einer verminderten Angiogenese in der Wundheilung führt (Aghdam et al., 2012).

Ziel dieser Arbeit war daher die Etablierung eines Mausmodells mit einem konditionalem und für das Endothel spezifischen KO für den IGF1R und die Untersuchung des Effekts von dessen Fehlen auf den Organismus der Maus. Hierbei interessierte aufgrund der bisherigen Datenlage insbesondere eine Untersuchung des Modells im Hinblick auf die Kapillarisation der quergestreiften Muskulatur sowohl des Herzens als auch des Skeletts am adulten Tier unter basalen Bedingungen im Vergleich zu den Effekten unter physiologischer Belastung sowie ein möglicher Effekt auf die Funktion des Herzens. Durch ein Fehlen des Rezeptors bereits in der Embryonalentwicklung der Maus ist es möglich, im Gegenteil zum induzierbaren KO, über den IGF1R hervorgerufene eventuelle Veränderungen im Organismus bereits vor der Geburt der Maus auszulösen um dadurch einen Einfluss des Rezeptors bereits auf die Unterschiede in der Entwicklung des Embryos detektieren zu können. Wesentliche Punkte, die gelungen sind, durch diese Arbeit aufzuzeigen, lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- Ein erfolgreiches Etablieren des KO-Modells der tie2IGFRKO Maus mit dem Nachweis des Vorhandenseins des KO im Endothel sind gelungen.
- Ein Fehlen des IGF1R im Endothel hat keinen Einfluss auf das Erreichen der normalen Länge der Röhrenknochen (hier repräsentiert durch die Tibia) der tie2IGFRKO Mäuse.
- Es kann eine geringere Leistungsfähigkeit der tie2IGFRKO Mäuse im Vergleich zu WT Tieren vermutet werden.
- Die Kapillarisation im Skelettmuskel sowie im Herzmuskel nimmt nach Training mittels freiwilligen Laufradlaufens im WT Tier sowie im tie2IGFRKO Tier zu. Der endotheliale IGF1R hat einen Einfluss auf das Kapillar-zu-Faser Verhältnis in der Skelettmuskulatur unter basalen Bedingungen im adulten Tier, welches durch ein Verschieben der Muskelfasergrößen hin zu dem Profil eines trainierten WT Tieres zustande kommen könnte.

Das Cre-loxP System stellt eine Möglichkeit dar, einen sehr spezifischen KO im Tier zu generieren und ganz gezielt zu untersuchen, ohne dass das jeweilige Genprodukt im Gesamtorganismus deletiert ist und somit Nachkommen eventuell versterben. Für die vorliegende Arbeit wurde mittels Cre-loxP-Modells im Organismus der Maus ein für

Endothelzellen spezifischer KO des IGF1R induziert. Mittels aus Schwanzspitzenbiospie gewonnenen Materials wurden über eine PCR die Tiere der F2 Generation genotypisiert und entsprechend für die Versuche selektiert. Hierbei ist es für die genetische Information der Cre-Rekombinase ausschließlich von Bedeutung, dass das jeweilige Gen exprimiert und das Protein mit Cre-Rekombinase-Aktivität in der Zelle aktiv ist. Es ist dabei unerheblich, ob die Erbinformation homo- oder heterozygot vorliegt, da es lediglich um das Vorhandensein oder nicht-Vorhandensein der Rekombinase geht. Damit die Rekombinase im Endothel die auf der DNA kodierte Information für den IGF1R funktionell inaktivieren kann, müssen sowohl das vom Vater als auch das von der Mutter stammende IGF1R Allel von den loxP-Sites flankiert sein, die Information muss also homozygot vorliegen. Entsprechend liegt der KO nur bei den Tieren vor, bei denen sowohl die Cre-Rekombinase als auch die homozygote Flankierung des IGF1R Genes vorliegt. Betrachtet man die Anteile der entsprechend typisierten Tiere mit dem Cre-Gen, dann entspricht der Cre-positive Anteil von 73% ungefähr einem und drei Viertel der Gesamtheit. Dies deckt sich mit den Werten, die man bei Annahme eines monogenen Erbganges bei voller Penetranz des Genes nach den Mendelschen Regeln in der zweiten Generation erwarten würde, wenn man die heterozygoten Tiere mit den homozygot positiven Tieren addiert. Schaut man sich hingegen die anteilige Verteilung der Vererbung des geflochten Genes an, dann fällt auf, dass der Anteil der Heterozygoten bei lediglich 24% der Gesamtheit liegt, wohingegen der der homozygot negativ getesteten Tiere bei 48% liegt. Erwartet man wiederum einen monogenen Erbgang mit voller Penetranz des Genes, so muss man den vorliegenden Werten entnehmen, dass für das heterogene Vorhandensein des Genes ein Überlebensnachteil besteht, welcher bereits vor der Geburt für ein Absterben der Embryonen verantwortlich ist. Eine weitere Möglichkeit ist die Annahme eines pleiogenen Erbganges, bei welchem das geflochte Gen eine verminderte Penetranz hat.

Dass die Cre-Rekombinase in den Endothelzellen aktiv und damit die Expression des IGF1R verhindert ist, ist für die weiteren Versuche zur Phänotypisierung der Tiere von immenser Bedeutung und wurde deshalb in dieser Arbeit mit verschiedenen Methoden untersucht. Mittels Western Blot Analysen hat eine Untersuchung des Gesamtproteingemisches des Herzens und der Lunge eine verminderte Expression der Proteinmenge des IGF1R in beiden Organen ergeben. Es findet sich eine Verminderung der Proteinexpression im Herzen auf 44% und in der Lunge auf 45%, es liegt also eine

deutlich verminderte Expression des IGF1R im tie2IGFRKO Tier vor. Da die Methode allerdings nicht geeignet ist, die Endothelspezifität des KO nachzuvollziehen, wurde mittels Immunfluoreszenz der IGF1R auf histologischen Schnitten der Muskulatur der Tiere angefärbt und dort entsprechend das Kapillarendothel angeschaut. Hier sieht man eine Verminderung der Fluoreszenz des IGF1R gekoppelten AK im tie2IGFRKO Tier. Auf Grund der hohen Varianz der Bilder und einer nicht unerheblichen und je nach Schnitt sehr unterschiedlichen Hintergrundfluoreszenz, zusätzlich zu einer fehlenden Quantifizierbarkeit der Untersuchungen, wurden außerdem Endothelzellen aus den Lungen der Tiere isoliert und untersucht. Mittels *realtime* PCR Methode konnte der KO weiter beschrieben werden und es stellte sich eine Reduktion der Expression der IGF1R mRNA im Endothel der tie2IGFRKO Mäuse auf lediglich noch 6,5% gegenüber dem WT dar. In der Zusammenschau der Ergebnisse aller Methoden ist festzustellen, dass der tie2IGFRKO in den entsprechend typisierten Tieren endothelspezifisch vorhanden ist. IGF-1 ist ein wichtiger Wachstumsfaktor für den sich entwickelnden Organismus von Säugetieren und nimmt im erwachsenen Organismus eine wichtige Rolle im Metabolismus ein. Besonders eindrucksvoll ist sein Einfluss sowohl auf das Längenwachstum des Skeletts als auch auf das Wachstum der Muskulatur, wie in einem KO-Modell von Mäusen gezeigt werden konnte, deren Organismus kein IGF-1 bilden kann (Liu and LeRoith, 1999) und dessen Folge eine um 35% verringerte Körpermasse ist. Beim Menschen wird die Bedeutsamkeit einer intakten Funktion von IGF-1 insbesondere bei Defekten der GH /IGF-1 Achse anhand von Krankheitsbildern wie beispielsweise der GH-Defizienz oder der Akromegalie im Erwachsenenalter deutlich. Bei dem Krankheitsbild der Akromegalie kommt es durch eine übermäßige Produktion von GH und dadurch auch IGF-1 wegen des bereits erfolgten Epiphysenschlusses klinisch zu einer Vergrößerung und Vergrößerung der akralen Skelettanteile. Entsprechend wird durch ein Fehlen von GH, oder auch intaktem IGF-1 ohne Störung der GH-Sekretion, bei Kindern ein proportionierter Minderwuchs hervorgerufen (Wit et al., 2012). In einem Mausmodell mit konditionalem KO des IGF1R auf Adipozyten fand sich nach der zehnten Lebenswoche eine Gewichts- und Körperlängenzunahme im Vergleich zu Kontrolltieren (Kloting et al., 2008). Der in dieser Arbeit vorliegende, das Endothel betreffende entsprechende tie2IGFRKO führte nicht zu einer Veränderung im basalen Gewicht der Mäuse und auch zu keiner Veränderung hinsichtlich des Längenwachstums der Röhrenknochen, repräsentiert durch die Tibia. Hieraus lässt sich schlussfolgern, dass

analog zu den bisherigen Forschungsergebnissen die Wirkung von IGF-1 auf das Endothel keinen Einfluss auf das Körpergewicht und Skelettwachstum der Tiere hat. Menschen mit einer Störung der GH-Produktion leiden der Literatur zufolge nicht nur an einer Störung des Körperwachstums, sondern außerdem an einer durch die Skelettmuskulatur bedingten verminderten Leistungsfähigkeit. Nach der regelmäßigen Einnahme von rekombinantem GH in einer Placebo-kontrollierten Studie am Menschen, welche an einer im erwachsenen Alter erworbenen GH Defizienz leiden, wurde ein Trend in Richtung auf eine um 7% verbesserte Ausdauerleistung der behandelten Personen gegenüber der Kontrollgruppe beobachtet (Svensson et al., 2003). Auch in anderen Studien konnte eine verbesserte Leistungsfähigkeit, insbesondere im Bereich der Muskelstärke, der Patienten nach GH Therapie festgestellt werden (Cuneo et al., 1991, Johannsson et al., 1997). Da GH in den Zellen sowohl einen eigens durch das Hormon hervorgerufenen Effekt hervorruft als auch die vermehrte Bildung von IGF-1 bewirkt, ist bei einem solchen Studiendesign mit an die IGF-1 Level angepassten Gabe von GH der genaue Mechanismus des Effektes nicht berücksichtigt. Ob eine alleinige IGF-1 Rezeptor Defizienz am Endothel ebenfalls eine Wirkung auf die Leistungsfähigkeit der Skelettmuskulatur hat, scheint bisher nicht untersucht worden zu sein. IGF-1 wird jedoch auf Grund seiner anabolen Wirkung auf die Skelettmuskulatur als Dopingsubstanz eingesetzt, sodass sich in dem vorliegenden tie2IGFRKO-Modell die Frage gestellt hat, inwieweit auf das Endothel wirkendes IGF-1 einen Einfluss auf die Leistungsfähigkeit der Skelettmuskulatur hat (Woodhouse et al., 2006, Brennan et al., 2011, Guha et al., 2013). Das Laufverhalten der in dieser Arbeit untersuchten Tiere zeigt, dass in den ersten acht Wochen WT und tie2IGFRKO Tiere mit einer mittleren Geschwindigkeit von 4,4 km/h (WT) bzw. 4,3 km/h (tie2IGFRKO) im Rad laufen. Allerdings nimmt die Geschwindigkeit der Tiere in dieser Arbeit signifikant um 9% (WT) bzw. 7% (tie2IGFRKO) in Woche sechzehn ab, ohne dass dies auf den genetischen Hintergrund der Tiere zurückzuführen wäre. Die WT Tiere laufen pro Tag im Schnitt 4,9 km weit, was sich mit Ergebnissen anderer Untersuchungen deckt, bei welchen die Mäuse beim freiwilligen Laufradlaufen ca. 5-6 km pro Tag gelaufen sind mit einer mittleren Geschwindigkeit von ca. 3 km/h gleichbleibend mit der Dauer des Trainings (Olenich et al., 2013). Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten tie2IGFRKO Tiere liefen im Mittel in allen drei ausgewerteten Wochen 1,3 km pro Tag weniger, entsprechend 27% der Strecke der WT Tiere. Die Werte erreichten auf Grund der hohen Varianz in den vor

allem durch die WT Tiere gelaufenen Strecken keine statistische Signifikanz, lassen jedoch den Schluss zu, dass die Tiere aufgrund einer verminderten Leistungsfähigkeit weniger ausdauernd gelaufen sein könnten als die entsprechenden Kontrollen.

Bei vermehrtem Training kommt es in Anpassung an die Belastung unter anderem zu einer Zunahme der Kapillarisation in der quergestreiften Muskulatur. Eine hierbei involvierte Neubildung von Kapillaren ist unter physiologischen Bedingungen bei Wachstum für das neu zu bildende Gewebe von Bedeutung und kommt unter pathologischen Bedingungen bei der Wund- oder Knochenheilung sowie der Tumorangio-genese vor. Unter den für die Angiogenese wichtigen pro-angiogenetischen Faktoren befindet sich neben VEGF auch IGF-1, wobei die Evaluation dessen Effektes auf die Angiogenese im Muskel und besonders nach Training im Tiermodell bisher nur unzureichend untersucht wurde. Für diese Arbeit stellt sich deshalb die Frage, ob und inwieweit ein Fehlen des IGF1R im Endothel einen Einfluss auf die Angiogenese im Skelettmuskel und Herzmuskel hat. Um einen zusätzlichen physiologischen Stimulus auf die Angiogenese auszuüben wurden die Tiere einem Training mittels freiwilligen Laufradlaufens unterzogen. Nach sechzehn-wöchigem Training wurde die Kapillarisation der Muskulatur der tie2IGFRKO Tiere sowohl unter basalen Bedingungen als auch nach Belastung mit als Kontrollen dienenden WT Tieren verglichen. Ein Vergleich der Gruppen ohne Training erfolgte, um einen möglicherweise bereits vorbestehenden Unterschied in der Kapillarisation erfassen zu können. Analog zu der in der Literatur beschriebenen Zunahme der Kapillarisation im Skelett- sowie auch im Herzmuskel zeigt auch diese Arbeit eine Zunahme der Kapillarisation in den beiden Muskelentitäten. Diese beträgt im Herzmuskel 25% im WT und 12% im tie2IGFRKO Tier sowie im Skelettmuskel 29% bei den Kontrolltieren und 18% bei den tie2IGFRKO Tieren.

In der hier vorliegenden Arbeit besteht kein statistisch erkennbarer Unterschied in der Zunahme der Kapillarisation zwischen WT Mäusen und tie2IGFRKO. Die Zahlen decken sich mit Ergebnissen aus anderen Arbeitsgruppen, bei denen nach 28 Tagen freiwilligen Laufradlaufens von Mäusen ohne veränderten genetischen Hintergrund eine Zunahme der Kapillaren im Gastrocnemiusmuskel um 22% gesehen wurde (Olenich et al., 2013) und einer signifikanten Zunahme der Kapillarisation im linken Ventrikel von Mäuseherzen nach Training (Bellafiore et al., 2013). Aus den Daten einer dieser Arbeiten geht außerdem hervor, dass die Mäuse zwar bis Tag 7 des Trainings an Körpergewicht

zunehmen, nach einem 28-tägigen Training das Gewicht allerdings um 6-7% reduziert ist (Olenich et al., 2013). Auch diese Beobachtungen konnten in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden, da eine Reduktion des Körpergewichts bei den trainierten Tieren bei WT von 14% und bei tie2IGFRKO von 11% ermittelt werden konnte, wohingegen die nicht trainierten Tiere beider Gruppen keine signifikante Veränderung hinsichtlich des Gewichts festgestellt wurde.

Allerdings kann in der hier vorliegenden Arbeit im Skelettmuskel ein Unterschied in der Anzahl der Kapillaren pro Muskelfaser unter basalen Bedingungen zwischen tie2IGFRKO und WT festgestellt werden, welcher sich durch ein Angleichen der Kapillardichte der WT Tiere nach erfolgtem Training nicht mehr feststellen lässt. Diese Veränderung des Kapillar-zu-Faser Verhältnisses im WT wurde bereits beschrieben (Olenich et al., 2013).

Neu ist die Tatsache, dass dieses Verhältnis durch den tie2IGFRKO bereits unter basalen Bedingungen vorzufinden ist. Die vorliegenden Daten lassen den Schluss zu, dass durch die fehlende Signaltransduktion des IGF1R im Endothel ein Einfluss auf entweder die Kapillardichte oder auch die Muskelfasergröße oder aber auf beide Größen gegeben ist. Zieht man die Ergebnisse der graphisch dargestellten Verteilungsbreite der Muskelfasergröße hinzu, kann man aus den vorliegenden Daten schlussfolgern, dass auf das Endothel wirkender IGF-1 einen Effekt auf die Größe der Muskelfasern und damit auf das Verhältnis von Muskelfaser zu Kapillaren haben könnte. Einschränkend muss hierbei allerdings festgehalten werden, dass eine Gruppengröße von insgesamt fünf Tieren pro Gruppe allerhöchstens als Hinweis dienen kann und es anschließender Untersuchungen größerer Kollektive bedarf, um einen endgültigen Schluss über das Verhalten der Wirkung von IGF-1 über das Endothel auf die Muskelfaserdichte zuzulassen. Eine Arbeit zur Untersuchung einer Maus mit einem KO für die neuronale NO-Synthase (nNOS) kommt bei Untersuchungen der Tiere unter basalen Bedingungen ebenfalls zu dem Ergebnis, dass eine Veränderung des Kapillar-zu-Faser Verhältnisses vorliegt und dieses scheint in derselben Form vorzuliegen wie bei Tieren mit tie2IGFRKO (Baum et al., 2013). Zusammen mit dem Wissen um einen Einfluss des IGF1R auf die Phosphorylierung und damit Aktivierung der endothelialen NO-Synthase (eNOS) könnten sich hier neue Forschungsansätze hinsichtlich der Genese dieser Beobachtungen des Kapillar-zu-Faser Verhältnisses ergeben. Zusätzlich wurde in Versuchen mit spezifisch für die Adipozyten IGF1R defizienten Mäusen eine vermehrte

Expression von IGF-1 mRNA in den Adipozyten beobachtet, was dadurch erklärt wird, dass normalerweise diese jetzt verstärkte Expression durch einen autokrinen negativen Rückkopplungsmechanismus unterdrückt wird (Kloting et al., 2008). Ob auch bei einem tie2IGFRKO dieser fehlende negative Rückkopplungsmechanismus zu einer verstärkten Expression von lokal wirksamen IGF-1 führt und deshalb eine Anpassung der Skelettmuskulatur ähnlich der nach Training beobachteten Anpassung induziert wird ist sicherlich ein spannender Ansatz für weitere Untersuchungen an dem hier etablierten tie2IGFRKO Modell.

Zusammenfassend kann man hinsichtlich der Kapillarisation der Tiere nach den durchgeführten Versuchen festhalten, dass adulte Tiere mit einem tie2IGFRKO ein höheres basales Kapillar-zu Faser- Verhältnis im Plantarismuskel haben als entsprechende Kontrolltiere und dass sie im Gegenteil zu diesen eine fehlende Anpassung des Verhältnisses an dauerhafte physiologische Belastung zeigen. Diese Tatsache ist eventuell auf einen Einfluss von endothelalem IGF-1 auf die Muskelfasern der Skelettmuskulatur zurückzuführen.

5 Literaturverzeichnis

- ABBAS, A., IMRIE, H., VISWAMBHARAN, H., SUKUMAR, P., RAJWANI, A., CUBBON, R. M., GAGE, M., SMITH, J., GALLOWAY, S., YULDESHAVA, N., KAHN, M., XUAN, S., GRANT, P. J., CHANNON, K. M., BEECH, D. J., WHEATCROFT, S. B. & KEARNEY, M. T. 2011. The insulin-like growth factor-1 receptor is a negative regulator of nitric oxide bioavailability and insulin sensitivity in the endothelium. *Diabetes*, 60, 2169-78.
- ABERNETHY, W. B., CHOO, J. K. & HUTTER, A. M., JR. 2003. Echocardiographic characteristics of professional football players. *J Am Coll Cardiol*, 41, 280-4.
- AGHDAM, S. Y., EMING, S. A., WILLENBORG, S., NEUHAUS, B., NIESSEN, C. M., PARTRIDGE, L., KRIEG, T. & BRUNING, J. C. 2012. Vascular endothelial insulin/IGF-1 signaling controls skin wound vascularization. *Biochem Biophys Res Commun*, 421, 197-202.
- AKSAKAL, E., KURT, M., OZTURK, M. E., TANBOGA, I. H., KAYA, A., NACAR, T., SEVIMLI, S. & GURLERTOP, Y. 2013. The effect of incremental endurance exercise training on left ventricular mechanics: a prospective observational deformation imaging study. *Anadolu Kardiyol Derg*, 13, 432-8.
- ALESSI, D. R., JAMES, S. R., DOWNES, C. P., HOLMES, A. B., GAFFNEY, P. R., REESE, C. B. & COHEN, P. 1997. Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha. *Curr Biol*, 7, 261-9.
- AU, J. S., OIKAWA, S. Y., MORTON, R. W., PHILLIPS, S. M., MACDONALD, M. J. & STOHR, E. J. 2019. Unaltered left ventricular mechanics and remodelling after 12 weeks of resistance exercise training - a longitudinal study in men. *Appl Physiol Nutr Metab*, 44, 820-826.
- BACH, L. A., HEADEY, S. J. & NORTON, R. S. 2005. IGF-binding proteins--the pieces are falling into place. *Trends Endocrinol Metab*, 16, 228-34.
- BACK, K., ISLAM, R., JOHANSSON, G. S., CHISALITA, S. I. & ARNQVIST, H. J. 2012. Insulin and IGF1 receptors in human cardiac microvascular endothelial cells: metabolic, mitogenic and anti-inflammatory effects. *J Endocrinol*, 215, 89-96.
- BACKER, J. M., MYERS, M. G., JR., SHOELSON, S. E., CHIN, D. J., SUN, X. J., MIRALPEIX, M., HU, P., MARGOLIS, B., SKOLNIK, E. Y., SCHLESSINGER, J. & ET AL. 1992. Phosphatidylinositol 3'-kinase is activated by association with IRS-1 during insulin stimulation. *EMBO J*, 11, 3469-79.
- BAR, R. S. & BOES, M. 1984. Distinct receptors for IGF-I, IGF-II, and insulin are present on bovine capillary endothelial cells and large vessel endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 124, 203-9.
- BAUM, O., VIEREGGE, M., KOCH, P., GUL, S., HAHN, S., HUBER-ABEL, F. A., PRIES, A. R. & HOPPELER, H. 2013. Phenotype of capillaries in skeletal muscle of nNOS-knockout mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 304, R1175-82.
- BAXTER, R. C. 2000. Insulin-like growth factor (IGF)-binding proteins: interactions with IGFs and intrinsic bioactivities. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 278, E967-76.
- BAXTER, R. C. 2001. Changes in the IGF-IGFBP axis in critical illness. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 15, 421-34.
- BELLAFFIORE, M., BATTAGLIA, G., BIANCO, A., FARINA, F., PALMA, A. & PAOLI, A. 2013. The involvement of MMP-2 and MMP-9 in heart exercise-related angiogenesis. *J Transl Med*, 11, 283.
- BENYOUCEF, S., SURINYA, K. H., HADASCHIK, D. & SIDDLE, K. 2007. Characterization of insulin/IGF hybrid receptors: contributions of the insulin receptor L2 and Fn1 domains and the alternatively spliced exon 11 sequence to ligand binding and receptor activation. *Biochem J*, 403, 603-13.

- BERGMANN, U., FUNATOMI, H., YOKOYAMA, M., BEGER, H. G. & KORC, M. 1995. Insulin-like growth factor I overexpression in human pancreatic cancer: evidence for autocrine and paracrine roles. *Cancer Res*, 55, 2007-11.
- BRENNAN, B. P., KANAYAMA, G., HUDSON, J. I. & POPE, H. G., JR. 2011. Human growth hormone abuse in male weightlifters. *Am J Addict*, 20, 9-13.
- BURROW, S., ANDRULIS, I. L., POLLAK, M. & BELL, R. S. 1998. Expression of insulin-like growth factor receptor, IGF-1, and IGF-2 in primary and metastatic osteosarcoma. *J Surg Oncol*, 69, 21-7.
- CABAIL, M. Z., LI, S., LEMMON, E., BOWEN, M. E., HUBBARD, S. R. & MILLER, W. T. 2015. The insulin and IGF1 receptor kinase domains are functional dimers in the activated state. *Nat Commun*, 6, 6406.
- CAI, W., SAKAGUCHI, M., KLEINRIDDER, A., GONZALEZ-DEL PINO, G., DREYFUSS, J. M., O'NEILL, B. T., RAMIREZ, A. K., PAN, H., WINNAY, J. N., BOUCHER, J., ECK, M. J. & KAHN, C. R. 2017. Domain-dependent effects of insulin and IGF-1 receptors on signalling and gene expression. *Nat Commun*, 8, 14892.
- CHAN, T. O., RITTENHOUSE, S. E. & TSICHLIS, P. N. 1999. AKT/PKB and other D3 phosphoinositide-regulated kinases: kinase activation by phosphoinositide-dependent phosphorylation. *Annu Rev Biochem*, 68, 965-1014.
- CHEN, Y., GOU, X., KE, X., CUI, H. & CHEN, Z. 2012. Human tumor cells induce angiogenesis through positive feedback between CD147 and insulin-like growth factor-I. *PLoS One*, 7, e40965.
- CLEMMONS, D. R. 2007. Modifying IGF1 activity: an approach to treat endocrine disorders, atherosclerosis and cancer. *Nat Rev Drug Discov*, 6, 821-33.
- CLEMMONS, D. R. 2012. Metabolic actions of insulin-like growth factor-I in normal physiology and diabetes. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 41, 425-43, vii-viii.
- CORRADO, D., PELLICCIA, A., HEIDBUCHEL, H., SHARMA, S., LINK, M., BASSO, C., BIFFI, A., BUJA, G., DELISE, P., GUSSAC, I., ANASTASAKIS, A., BORJESSON, M., BJORNSTAD, H. H., CARRE, F., DELIGIANNIS, A., DUGMORE, D., FAGARD, R., HOOGSTEEN, J., MELLWIG, K. P., PANHUYZEN-GOEDKOOP, N., SOLBERG, E., VANHEES, L., DREZNER, J., ESTES, N. A., 3RD, ILICETO, S., MARON, B. J., PEIDRO, R., SCHWARTZ, P. J., STEIN, R., THIENE, G., ZEPELLI, P., MCKENNA, W. J., SECTION OF SPORTS CARDIOLOGY, E. A. O. C. P. & REHABILITATION 2010. Recommendations for interpretation of 12-lead electrocardiogram in the athlete. *Eur Heart J*, 31, 243-59.
- CUNEO, R. C., SALOMON, F., WILES, C. M., HESP, R. & SONKSEN, P. H. 1991. Growth hormone treatment in growth hormone-deficient adults. I. Effects on muscle mass and strength. *J Appl Physiol (1985)*, 70, 688-94.
- DAUGHADAY, W. H., PHILLIPS, L. S. & MUELLER, M. C. 1976. The effects of insulin and growth hormone on the release of somatomedin by the isolated rat liver. *Endocrinology*, 98, 1214-9.
- DE MEYTS, P. & WHITTAKER, J. 2002. Structural biology of insulin and IGF1 receptors: implications for drug design. *Nat Rev Drug Discov*, 1, 769-83.
- DEER, R. R. & HEAPS, C. L. 2013. Exercise training enhances multiple mechanisms of relaxation in coronary arteries from ischemic hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 305, H1321-31.
- DEISSLER, H. L., DEISSLER, H., LANG, G. K. & LANG, G. E. 2013. Ranibizumab efficiently blocks migration but not proliferation induced by growth factor combinations including VEGF in retinal endothelial cells. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 251, 2345-53.
- DELAFONTAINE, P., ANWAR, A., LOU, H. & KU, L. 1996. G-protein coupled and tyrosine kinase receptors: evidence that activation of the insulin-like growth factor

- I receptor is required for thrombin-induced mitogenesis of rat aortic smooth muscle cells. *J Clin Invest*, 97, 139-45.
- DENLEY, A., COSGROVE, L. J., BOOKER, G. W., WALLACE, J. C. & FORBES, B. E. 2005. Molecular interactions of the IGF system. *Cytokine Growth Factor Rev*, 16, 421-39.
- DOUGLAS, P. S., O'TOOLE, M. L., HILLER, W. D. & REICHEK, N. 1986. Left ventricular structure and function by echocardiography in ultraendurance athletes. *Am J Cardiol*, 58, 805-9.
- DUAN, C., REN, H. & GAO, S. 2010. Insulin-like growth factors (IGFs), IGF receptors, and IGF-binding proteins: roles in skeletal muscle growth and differentiation. *Gen Comp Endocrinol*, 167, 344-51.
- DUPONT, J. & LEROITH, D. 2001. Insulin and insulin-like growth factor I receptors: similarities and differences in signal transduction. *Horm Res*, 55 Suppl 2, 22-6.
- ERICKSON, C. C. 2017. Discrimination of the "Athlete's Heart" from real disease by electrocardiogram and echocardiogram. *Cardiol Young*, 27, S80-S88.
- FAJE, A. T. & BARKAN, A. L. 2010. Basal, but not pulsatile, growth hormone secretion determines the ambient circulating levels of insulin-like growth factor-I. *J Clin Endocrinol Metab*, 95, 2486-91.
- FANTIN, V. R., SPARLING, J. D., SLOT, J. W., KELLER, S. R., LIENHARD, G. E. & LAVAN, B. E. 1998. Characterization of insulin receptor substrate 4 in human embryonic kidney 293 cells. *J Biol Chem*, 273, 10726-32.
- FEHRENBACH, M. L., CAO, G., WILLIAMS, J. T., FINKLESTEIN, J. M. & DELISSER, H. M. 2009. Isolation of murine lung endothelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 296, L1096-103.
- FELETOU, M. & VANHOUTTE, P. M. 2006. Endothelial dysfunction: a multifaceted disorder (The Wiggers Award Lecture). *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 291, H985-1002.
- FLAMME, I., BREIER, G. & RISAU, W. 1995. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptor 2 (flk-1) are expressed during vasculogenesis and vascular differentiation in the quail embryo. *Dev Biol*, 169, 699-712.
- FLORINI, J. R., EWTON, D. Z., FALEN, S. L. & VAN WYK, J. J. 1986. Biphasic concentration dependency of stimulation of myoblast differentiation by somatomedins. *Am J Physiol*, 250, C771-8.
- FUKUDA, R., HIROTA, K., FAN, F., JUNG, Y. D., ELLIS, L. M. & SEMENZA, G. L. 2002. Insulin-like growth factor 1 induces hypoxia-inducible factor 1-mediated vascular endothelial growth factor expression, which is dependent on MAP kinase and phosphatidylinositol 3-kinase signaling in colon cancer cells. *J Biol Chem*, 277, 38205-11.
- GEORGE, K., WHYTE, G. P., GREEN, D. J., OXBOROUGH, D., SHAVE, R. E., GAZE, D. & SOMAUROO, J. 2012. The endurance athletes heart: acute stress and chronic adaptation. *Br J Sports Med*, 46 Suppl 1, i29-36.
- GRANDYS, M., MAJERCZAK, J., KUCZEK, P., SZTEFKO, K., DUDA, K. & ZOLADZ, J. A. 2017. Endurance training-induced changes in the GH-IGF-I axis influence maximal muscle strength in previously untrained men. *Growth Horm IGF Res*, 32, 41-48.
- GRONBORG, M., WULFF, B. S., RASMUSSEN, J. S., KJELDTSEN, T. & GAMMELTOFT, S. 1993. Structure-function relationship of the insulin-like growth factor-I receptor tyrosine kinase. *J Biol Chem*, 268, 23435-40.
- GUHA, N., COWAN, D. A., SONKSEN, P. H. & HOLT, R. I. 2013. Insulin-like growth factor-I (IGF-I) misuse in athletes and potential methods for detection. *Anal Bioanal Chem*, 405, 9669-83.
- HASKELL, J. F. & TUCKER, D. C. 1994. Binding of insulin-like growth factors (IGF-I and IGF-II) to the IGF-II/mannose 6-phosphate receptor in fetal rat myocardium. *Endocrinology*, 135, 231-9.

- HIGASHI, Y., GAUTAM, S., DELAFONTAINE, P. & SUKHANOV, S. 2019. IGF-1 and cardiovascular disease. *Growth Horm IGF Res*, 45, 6-16.
- HIRANO, H., LOPES, M. B., LAWS, E. R., JR., ASAKURA, T., GOTO, M., CARPENTER, J. E., KARNS, L. R. & VANDENBERG, S. R. 1999. Insulin-like growth factor-1 content and pattern of expression correlates with histopathologic grade in diffusely infiltrating astrocytomas. *Neuro Oncol*, 1, 109-19.
- HYUN, S. 2013. Body size regulation and insulin-like growth factor signaling. *Cell Mol Life Sci*, 70, 2351-65.
- IMRIE, H., VISWAMBHARAN, H., SUKUMAR, P., ABBAS, A., CUBBON, R. M., YULDASHEVA, N., GAGE, M., SMITH, J., GALLOWAY, S., SKROMNA, A., RASHID, S. T., FUTERS, T. S., XUAN, S., GATENBY, V. K., GRANT, P. J., CHANNON, K. M., BEECH, D. J., WHEATCROFT, S. B. & KEARNEY, M. T. 2012. Novel role of the IGF-1 receptor in endothelial function and repair: studies in endothelium-targeted IGF-1 receptor transgenic mice. *Diabetes*, 61, 2359-68.
- IRANMANESH, A., LIZARRALDE, G. & VELDHOUIS, J. D. 1991. Age and relative adiposity are specific negative determinants of the frequency and amplitude of growth hormone (GH) secretory bursts and the half-life of endogenous GH in healthy men. *J Clin Endocrinol Metab*, 73, 1081-8.
- JACKSON, R., TILOKEE, E. L., LATHAM, N., MOUNT, S., RAFATIAN, G., STRYDHORST, J., YE, B., BOODHWANI, M., CHAN, V., RUEL, M., RUDDY, T. D., SUURONEN, E. J., STEWART, D. J. & DAVIS, D. R. 2015. Paracrine Engineering of Human Cardiac Stem Cells With Insulin-Like Growth Factor 1 Enhances Myocardial Repair. *J Am Heart Assoc*, 4, e002104.
- JOHANSSON, G., GRIMBY, G., SUNNERHAGEN, K. S. & BENGTSSON, B. A. 1997. Two years of growth hormone (GH) treatment increase isometric and isokinetic muscle strength in GH-deficient adults. *J Clin Endocrinol Metab*, 82, 2877-84.
- KALEBIC, T., TSOKOS, M. & HELMAN, L. J. 1994. In vivo treatment with antibody against IGF-1 receptor suppresses growth of human rhabdomyosarcoma and down-regulates p34cdc2. *Cancer Res*, 54, 5531-4.
- KHANDWALA, H. M., MCCUTCHEON, I. E., FLYVBJERG, A. & FRIEND, K. E. 2000. The effects of insulin-like growth factors on tumorigenesis and neoplastic growth. *Endocr Rev*, 21, 215-44.
- KISANUKI, Y. Y., HAMMER, R. E., MIYAZAKI, J., WILLIAMS, S. C., RICHARDSON, J. A. & YANAGISAWA, M. 2001. Tie2-Cre transgenic mice: a new model for endothelial cell-lineage analysis in vivo. *Dev Biol*, 230, 230-42.
- KLOTING, N., KOCH, L., WUNDERLICH, T., KERN, M., RUSCHKE, K., KRONE, W., BRUNING, J. C. & BLUHER, M. 2008. Autocrine IGF-1 action in adipocytes controls systemic IGF-1 concentrations and growth. *Diabetes*, 57, 2074-82.
- KUHLENCORDT, P. J., ROSEL, E., GERSZTEN, R. E., MORALES-RUIZ, M., DOMBKOWSKI, D., ATKINSON, W. J., HAN, F., PREFFER, F., ROSENZWEIG, A., SESSA, W. C., GIMBRONE, M. A., JR., ERTL, G. & HUANG, P. L. 2004. Role of endothelial nitric oxide synthase in endothelial activation: insights from eNOS knockout endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, 286, C1195-202.
- LAUGHLIN, M. H., BOWLES, D. K. & DUNCKER, D. J. 2012. The coronary circulation in exercise training. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 302, H10-23.
- LE ROITH, D., BONDY, C., YAKAR, S., LIU, J. L. & BUTLER, A. 2001. The somatomedin hypothesis: 2001. *Endocr Rev*, 22, 53-74.
- LEE, W. S. & KIM, J. 2018. Insulin-like growth factor-1 signaling in cardiac aging. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 1864, 1931-1938.
- LIU, J. L. & LEROITH, D. 1999. Insulin-like growth factor I is essential for postnatal growth in response to growth hormone. *Endocrinology*, 140, 5178-84.
- LIU, X., TURBYVILLE, T., FRITZ, A. & WHITESELL, L. 1998. Inhibition of insulin-like growth factor I receptor expression in neuroblastoma cells induces the regression of established tumors in mice. *Cancer Res*, 58, 5432-8.

- LIVINGSTONE, C. 2013. Insulin-like growth factor-I (IGF-I) and clinical nutrition. *Clin Sci (Lond)*, 125, 265-80.
- LONG, C. S., HENRICH, C. J. & SIMPSON, P. C. 1991. A growth factor for cardiac myocytes is produced by cardiac nonmyocytes. *Cell Regul*, 2, 1081-95.
- MACIAG, T., CERUNDOLO, J., ILSLEY, S., KELLEY, P. R. & FORAND, R. 1979. An endothelial cell growth factor from bovine hypothalamus: identification and partial characterization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76, 5674-8.
- MARON, B. J. & PELLICCIA, A. 2006. The heart of trained athletes: cardiac remodeling and the risks of sports, including sudden death. *Circulation*, 114, 1633-44.
- MIELE, C., ROCHFORD, J. J., FILIPPA, N., GIORGETTI-PERALDI, S. & VAN OBERGHEN, E. 2000. Insulin and insulin-like growth factor-I induce vascular endothelial growth factor mRNA expression via different signaling pathways. *J Biol Chem*, 275, 21695-702.
- MINUTO, F., DEL MONTE, P., BARRECA, A., FORTINI, P., CARIOLA, G., CATRAMBONE, G. & GIORDANO, G. 1986. Evidence for an increased somatomedin-C/insulin-like growth factor I content in primary human lung tumors. *Cancer Res*, 46, 985-8.
- MUNIYAPPA, R. & SOWERS, J. R. 2012. Endothelial insulin and IGF-1 receptors: when yes means NO. *Diabetes*, 61, 2225-7.
- NAJJAR, S. M., BLAKESLEY, V. A., LI CALZI, S., KATO, H., LEROITH, D. & CHOICE, C. V. 1997. Differential phosphorylation of pp120 by insulin and insulin-like growth factor-1 receptors: role for the C-terminal domain of the beta-subunit. *Biochemistry*, 36, 6827-34.
- OLENICH, S. A., GUTIERREZ-REED, N., AUDET, G. N. & OLFERT, I. M. 2013. Temporal response of positive and negative regulators in response to acute and chronic exercise training in mice. *J Physiol*, 591, 5157-69.
- ORBAN, P. C., CHUI, D. & MARTH, J. D. 1992. Tissue- and site-specific DNA recombination in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89, 6861-5.
- PATTI, M. E., SUN, X. J., BRUENING, J. C., ARAKI, E., LIPES, M. A., WHITE, M. F. & KAHN, C. R. 1995. 4PS/insulin receptor substrate (IRS)-2 is the alternative substrate of the insulin receptor in IRS-1-deficient mice. *J Biol Chem*, 270, 24670-3.
- PELLICCIA, A., CULASSO, F., DI PAOLO, F. M. & MARON, B. J. 1999. Physiologic left ventricular cavity dilatation in elite athletes. *Ann Intern Med*, 130, 23-31.
- PIZON, M., ZIMON, D. S., PACHMANN, U. & PACHMANN, K. 2013. Insulin-like growth factor receptor I (IGF-IR) and vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR-2) are expressed on the circulating epithelial tumor cells of breast cancer patients. *PLoS One*, 8, e56836.
- PLUIM, B. M., ZWINDERMAN, A. H., VAN DER LAARSE, A. & VAN DER WALL, E. E. 2000. The athlete's heart. A meta-analysis of cardiac structure and function. *Circulation*, 101, 336-44.
- POEHLMAN, E. T. & COPELAND, K. C. 1990. Influence of physical activity on insulin-like growth factor-I in healthy younger and older men. *J Clin Endocrinol Metab*, 71, 1468-73.
- POTENTE, M., GERHARDT, H. & CARMELIET, P. 2011. Basic and therapeutic aspects of angiogenesis. *Cell*, 146, 873-87.
- RADOVITS, T., OLAH, A., LUX, A., NEMETH, B. T., HIDI, L., BIRTALAN, E., KELLERMAYER, D., MATYAS, C., SZABO, G. & MERKELY, B. 2013. Rat model of exercise-induced cardiac hypertrophy: hemodynamic characterization using left ventricular pressure-volume analysis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 305, H124-34.
- RAWLINS, J., BHAN, A. & SHARMA, S. 2009. Left ventricular hypertrophy in athletes. *Eur J Echocardiogr*, 10, 350-6.

- REISS, K., CHENG, W., KAJSTURA, J., SONNENBLICK, E. H., MEGGS, L. G. & ANVERSA, P. 1995. Fibroblast proliferation during myocardial development in rats is regulated by IGF-1 receptors. *Am J Physiol*, 269, H943-51.
- REN, J., SAMSON, W. K. & SOWERS, J. R. 1999. Insulin-like growth factor I as a cardiac hormone: physiological and pathophysiological implications in heart disease. *J Mol Cell Cardiol*, 31, 2049-61.
- RENGO, G., CANNAVO, A., LICCARDO, D., ZINCARELLI, C., DE LUCIA, C., PAGANO, G., KOMICI, K., PARISI, V., SCALA, O., AGRESTA, A., RAPACCIUOLO, A., PERRONE FILARDI, P., FERRARA, N., KOCH, W. J., TRIMARCO, B., FEMMINELLA, G. D. & LEOSCO, D. 2013. Vascular endothelial growth factor blockade prevents the beneficial effects of beta-blocker therapy on cardiac function, angiogenesis, and remodeling in heart failure. *Circ Heart Fail*, 6, 1259-67.
- RISAU, W. 1997. Mechanisms of angiogenesis. *Nature*, 386, 671-4.
- ROELEN, C. A., DE VRIES, W. R., KOPPESCHAAR, H. P., VERVOORN, C., THIJSSSEN, J. H. & BLANKENSTEIN, M. A. 1997. Plasma insulin-like growth factor-I and high affinity growth hormone-binding protein levels increase after two weeks of strenuous physical training. *Int J Sports Med*, 18, 238-41.
- ROMERO, C. J., NG, Y., LUQUE, R. M., KINEMAN, R. D., KOCH, L., BRUNING, J. C. & RADOVICK, S. 2010. Targeted deletion of somatotroph insulin-like growth factor-I signaling in a cell-specific knockout mouse model. *Mol Endocrinol*, 24, 1077-89.
- SARFSTEIN, R., MAOR, S., REIZNER, N., ABRAMOVITCH, S. & WERNER, H. 2006. Transcriptional regulation of the insulin-like growth factor-I receptor gene in breast cancer. *Mol Cell Endocrinol*, 252, 241-6.
- SARFSTEIN, R. & WERNER, H. 2013. Minireview: nuclear insulin and insulin-like growth factor-1 receptors: a novel paradigm in signal transduction. *Endocrinology*, 154, 1672-9.
- SAUER, B. & HENDERSON, N. 1989. Cre-stimulated recombination at loxP-containing DNA sequences placed into the mammalian genome. *Nucleic Acids Res*, 17, 147-61.
- SCHRAGE, A., LODDENKEMPER, C., ERBEN, U., LAUER, U., HAUSDORF, G., JUNGBLUT, P. R., JOHNSON, J., KNOLLE, P. A., ZEITZ, M., HAMANN, A. & KLUGEWITZ, K. 2008. Murine CD146 is widely expressed on endothelial cells and is recognized by the monoclonal antibody ME-9F1. *Histochem Cell Biol*, 129, 441-51.
- SCOTLANDI, K., MANARA, M. C., NICOLETTI, G., LOLLINI, P. L., LUKAS, S., BENINI, S., CROCI, S., PERDICHIZZI, S., ZAMBELLI, D., SERRA, M., GARCIA-ECHEVERRIA, C., HOFMANN, F. & PICCI, P. 2005. Antitumor activity of the insulin-like growth factor-I receptor kinase inhibitor NVP-AEW541 in musculoskeletal tumors. *Cancer Res*, 65, 3868-76.
- SEMENZA, G. L. 2009. Involvement of oxygen-sensing pathways in physiologic and pathologic erythropoiesis. *Blood*, 114, 2015-9.
- SEMENZA, G. L. 2013. HIF-1 mediates metabolic responses to intratumoral hypoxia and oncogenic mutations. *J Clin Invest*, 123, 3664-71.
- SJOGREN, K., JANSSON, J. O., ISAKSSON, O. G. & OHLSSON, C. 2002a. A model for tissue-specific inducible insulin-like growth factor-I (IGF-I) inactivation to determine the physiological role of liver-derived IGF-I. *Endocrine*, 19, 249-56.
- SJOGREN, K., JANSSON, J. O., ISAKSSON, O. G. & OHLSSON, C. 2002b. A transgenic model to determine the physiological role of liver-derived insulin-like growth factor I. *Minerva Endocrinol*, 27, 299-311.
- SJOGREN, K., LIU, J. L., BLAD, K., SKRTIC, S., VIDAL, O., WALLENIUS, V., LEROITH, D., TORNELL, J., ISAKSSON, O. G., JANSSON, J. O. & OHLSSON, C. 1999. Liver-derived insulin-like growth factor I (IGF-I) is the principal source of IGF-I in

- blood but is not required for postnatal body growth in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 7088-92.
- SOOS, M. A., FIELD, C. E. & SIDDLE, K. 1993. Purified hybrid insulin/insulin-like growth factor-I receptors bind insulin-like growth factor-I, but not insulin, with high affinity. *Biochem J*, 290 (Pt 2), 419-26.
- STACHELSCHIED, H., IBRAHIM, H., KOCH, L., SCHMITZ, A., TSCHARNTKE, M., WUNDERLICH, F. T., SCOTT, J., MICHELS, C., WICKENHAUSER, C., HAASE, I., BRUNING, J. C. & NIESSEN, C. M. 2008. Epidermal insulin/IGF-1 signalling control interfollicular morphogenesis and proliferative potential through Rac activation. *EMBO J*, 27, 2091-101.
- SURINYA, K. H., MOLINA, L., SOOS, M. A., BRANDT, J., KRISTENSEN, C. & SIDDLE, K. 2002. Role of insulin receptor dimerization domains in ligand binding, cooperativity, and modulation by anti-receptor antibodies. *J Biol Chem*, 277, 16718-25.
- SUTTON, K. M., HAYAT, S., CHAU, N. M., COOK, S., POUYSSEGUR, J., AHMED, A., PERUSINGHE, N., LE FLOCH, R., YANG, J. & ASHCROFT, M. 2007. Selective inhibition of MEK1/2 reveals a differential requirement for ERK1/2 signalling in the regulation of HIF-1 in response to hypoxia and IGF-1. *Oncogene*, 26, 3920-9.
- SVENSSON, J., SUNNERHAGEN, K. S. & JOHANNSSON, G. 2003. Five years of growth hormone replacement therapy in adults: age- and gender-related changes in isometric and isokinetic muscle strength. *J Clin Endocrinol Metab*, 88, 2061-9.
- TAGUCHI, A., WARTSCHOW, L. M. & WHITE, M. F. 2007. Brain IRS2 signaling coordinates life span and nutrient homeostasis. *Science*, 317, 369-72.
- TAHIMIC, C. G., WANG, Y. & BIKLE, D. D. 2013. Anabolic effects of IGF-1 signaling on the skeleton. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 4, 6.
- TANNO, B., MANCINI, C., VITALI, R., MANCUSO, M., MCDOWELL, H. P., DOMINICI, C. & RASCHELLA, G. 2006. Down-regulation of insulin-like growth factor I receptor activity by NVP-AEW541 has an antitumor effect on neuroblastoma cells in vitro and in vivo. *Clin Cancer Res*, 12, 6772-80.
- TRICOLI, J. V., RALL, L. B., KARAKOUSIS, C. P., HERRERA, L., PETRELLI, N. J., BELL, G. I. & SHOWS, T. B. 1986. Enhanced levels of insulin-like growth factor messenger RNA in human colon carcinomas and liposarcomas. *Cancer Res*, 46, 6169-73.
- TSAI, Y. P. & WU, K. J. 2012. Hypoxia-regulated target genes implicated in tumor metastasis. *J Biomed Sci*, 19, 102.
- VOGT, M., PUNTSCHART, A., GEISER, J., ZULEGER, C., BILLETER, R. & HOPPELER, H. 2001. Molecular adaptations in human skeletal muscle to endurance training under simulated hypoxic conditions. *J Appl Physiol (1985)*, 91, 173-82.
- WALTON, C. B., ECKER, J., ANDERSON, C. D., OUTTEN, J. T., ALLISON, R. Z. & SHOHET, R. V. 2013. Cardiac angiogenesis directed by stable Hypoxia Inducible Factor-1. *Vasc Cell*, 5, 15.
- WANG, J., NIU, W., NIKIFOROV, Y., NAITO, S., CHERNAUSEK, S., WITTE, D., LEROITH, D., STRAUCH, A. & FAGIN, J. A. 1997. Targeted overexpression of IGF-I evokes distinct patterns of organ remodeling in smooth muscle cell tissue beds of transgenic mice. *J Clin Invest*, 100, 1425-39.
- WANG, Y., LIPARI, P., WANG, X., HAILEY, J., LIANG, L., RAMOS, R., LIU, M., PACHTER, J. A., BISHOP, W. R. & WANG, Y. 2010. A fully human insulin-like growth factor-I receptor antibody SCH 717454 (Robatumumab) has antitumor activity as a single agent and in combination with cytotoxics in pediatric tumor xenografts. *Mol Cancer Ther*, 9, 410-8.

- WHITE, F. C., BLOOR, C. M., MCKIRNAN, M. D. & CARROLL, S. M. 1998. Exercise training in swine promotes growth of arteriolar bed and capillary angiogenesis in heart. *J Appl Physiol* (1985), 85, 1160-8.
- WINNAY, J. N., BRUNING, J. C., BURKS, D. J. & KAHN, C. R. 2000. Gab-1-mediated IGF-1 signaling in IRS-1-deficient 3T3 fibroblasts. *J Biol Chem*, 275, 10545-50.
- WIT, J. M., OOSTDIJK, W. & LOSEKOOT, M. 2012. Spectrum of insulin-like growth factor deficiency. *Endocr Dev*, 23, 30-41.
- WOODHOUSE, L. J., MUKHERJEE, A., SHALET, S. M. & EZZAT, S. 2006. The influence of growth hormone status on physical impairments, functional limitations, and health-related quality of life in adults. *Endocr Rev*, 27, 287-317.
- ZADIK, Z., CHALEW, S. A., MCCARTER, R. J., JR., MEISTAS, M. & KOWARSKI, A. A. 1985. The influence of age on the 24-hour integrated concentration of growth hormone in normal individuals. *J Clin Endocrinol Metab*, 60, 513-6.
- ZAMYKAL, M., MARTENS, T., MATSCHKE, J., GUNTHER, H. S., KATHAGEN, A., SCHULTE, A., PETERS, R., WESTPHAL, M. & LAMSZUS, K. 2015. Inhibition of intracerebral glioblastoma growth by targeting the insulin-like growth factor 1 receptor involves different context-dependent mechanisms. *Neuro Oncol*, 17, 1076-85.
- ZHANG, M., HU, Z., HUANG, J., SHU, Y., DAI, J., JIN, G., TANG, R., DONG, J., CHEN, Y., XU, L., HUANG, X. & SHEN, H. 2010. A 3'-untranslated region polymorphism in IGF1 predicts survival of non-small cell lung cancer in a Chinese population. *Clin Cancer Res*, 16, 1236-44.