

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie  
Abteilung Medizinische Zellbiologie  
Direktor: Prof. Dr. sc. hum. R. Kinscherf  
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

**Einfluss des Wachstums-Differenzierungs-Faktors-15  
(GDF-15) auf die Gen- und Proteinexpression des  
Musculus gastrocnemius bei hypercholesterinämischen  
(knockout) Mäusen**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der  
gesamten Humanmedizin  
dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt von

Moritz Wagner aus Siegen

Marburg, 2017

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

am: 16.02.2017.

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. H. Schäfer

Referent: Prof. Dr. R. Kinscherf

1. Korreferent: Prof. Dr. J. Schäfer

**für meine Eltern und Katharina**

**„Habe Mut, dich deines eigenen Verstandes zu bedienen!“ (Kant, 1784)**

---

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>8</b>
<b>1 EINLEITUNG .....</b>	<b>12</b>
1.1 Skelettmuskulatur.....	12
1.1.1 Aufbau der Skelettmuskulatur.....	12
1.1.2 Fasertypen der Skelettmuskulatur .....	13
1.1.3 Entwicklung der Skelettmuskulatur .....	14
1.1.4 Signalkaskade in der Skelettmuskulatur.....	15
1.2 Lipoproteine.....	17
1.2.1 Lipidstoffwechsel.....	19
1.2.2 Apolipoprotein A.....	21
1.2.3 Apolipoprotein E.....	21
1.3 Transforming Growth Factor $\beta$ (TGF- $\beta$ )-Superfamilie .....	24
1.3.1 Wachstums-Differentierungs-Faktor-15 (GDF-15).....	28
1.4 Inflammation und Angiogenese .....	32
1.4.1 Interleukine, Interferone, Tumor-Nekrose-Faktoren und Wachstumsfaktoren .....	32
1.4.2 Chemokine, VEGFA und Notch1.....	34
1.4.3 Myeloidzellrezeptoren, Komplementfaktoren und Metalloproteinaseinhibitoren.....	35
1.5 Apoptose, Atrophie und ACh-Rezeptoren .....	37
1.5.1 Caspase-3, Bax, Bcl2, MuRF1, Fbxo32 und Chrn1 .....	37
1.6 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit .....	38
<b>2 MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>40</b>
2.1 Geräte, Verbrauchsmaterial, Chemikalien, Primer, Fertigsysteme, Software und Internetdienste ....	40
2.1.1 Geräte.....	40
2.1.2 Verbrauchsmaterial .....	41
2.1.3 Chemikalien .....	41
2.1.4 Primer.....	42
2.1.5 Fertigsysteme .....	43
2.1.6 Software und Internetdienste.....	44
2.2 Tiere.....	45
2.2.1 Generierung.....	45
2.2.2 Gruppen.....	45
2.2.3 Fütterung .....	46
2.2.4 Gewicht und Blutentnahme.....	46
2.2.5 Gewinnung und Präparation des Gewebes .....	46

---

2.3	Genexpression.....	47
2.3.1	Gewebegewinnung.....	47
2.3.2	RNA-Aufbereitung mit peqGold TriFast™.....	47
2.3.3	NanoDrop® 2000c UV/Vis-Spektralphotometer.....	48
2.3.4	Bioanalyzer.....	49
2.3.5	DNase-Verdau.....	49
2.3.6	Synthese von cDNA aus mRNA.....	50
2.3.7	Quantitative Real-Time RT-PCR (qRT-PCR).....	51
2.3.8	Validierung der qRT-PCR.....	52
2.4	Normalisierung von Expressionsdaten.....	53
2.5	Proteinexpression.....	53
2.5.1	Proteinaufbereitung.....	54
2.5.2	Proteinkonzentrationsbestimmung.....	55
2.5.3	Erstellen von Gruppen-Proteinpools.....	57
2.5.4	Proteome Profiler™ Antibody Array.....	58
2.6	Auswertung.....	61
2.6.1	Quantitative Real-Time RT-PCR (qRT-PCR).....	61
2.6.2	Proteome Profiler™ Antibody Array.....	62
2.6.3	Statistische Auswertung.....	62
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>63</b>
3.1	Gewicht, Serum-Cholesterin- und -Triglyzeridspiegel.....	63
3.1.1	Gewicht.....	63
3.1.2	Serum-Cholesterinspiegel.....	65
3.1.3	Serum-Triglyzeridspiegel.....	67
3.2	Quantitative Real-Time RT-PCR (qRT-PCR).....	69
3.2.1	Inflammation.....	69
3.2.2	Apoptose.....	72
3.2.3	Angiogenese.....	76
3.2.4	Atrophie und ACh-Rezeptoren.....	79
3.3	Proteome Profiler™ Antibody Array.....	83
3.3.1	Interleukine.....	83
3.3.2	Interferone und Tumor-Nekrose-Faktoren.....	101
3.3.3	Wachstumsfaktoren.....	104
3.3.4	Chemokine.....	108
3.3.5	Myeloidzellrezeptoren, Komplementfaktoren, Metalloproteinaseinhibitoren.....	121
<b>4</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>125</b>

---

4.1	Gewicht, Serum-Cholesterin- und -Triglyzeridspiegel .....	126
4.1.1	Gewicht .....	126
4.1.2	Serum-Cholesterinspiegel .....	127
4.1.3	Serum-Triglyzeridspiegel .....	128
4.2	Quantitative Real-Time RT-PCR (qRT-PCR) und Proteome Profiler™ Antibody Array .....	129
4.2.1	Inflammation und Angiogenese .....	129
4.2.2	Apoptose, Atrophie und ACh-Rezeptoren.....	138
4.3	Limitationen und Ausblick.....	141
4.4	Zusammenfassung.....	142
4.5	Summary.....	144
<b>5</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>146</b>
<b>6</b>	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>160</b>
<b>7</b>	<b>TABELLENVERZEICHNIS .....</b>	<b>162</b>
<b>8</b>	<b>TABELLARISCHER ANHANG .....</b>	<b>164</b>
8.1	Gewicht, Serum-Cholesterin- und -Triglyzeridspiegel .....	164
8.1.1	Tiergruppen .....	164
8.1.2	Gewicht .....	164
8.1.3	Serum-Cholesterinspiegel .....	165
8.1.4	Serum-Triglyzeridspiegel .....	166
8.2	Quantitative Real-Time RT-PCR (qRT-PCR) und Proteome Profiler™ Antibody Array .....	167
8.2.1	Tiergruppen .....	167
8.2.2	Quantitative Real-Time RT-PCR (qRT-PCR).....	167
8.2.3	Proteome Profiler™ Antibody Array.....	172
<b>9</b>	<b>POSTERPRÄSENTATIONEN UND ABSTRACTS .....</b>	<b>180</b>
<b>10</b>	<b>VERZEICHNIS DER AKADEMISCHEN LEHRER .....</b>	<b>181</b>
<b>11</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>182</b>

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ABCA1 *ATP-binding cassette transporter, subfamily A, member 1*

AChR *Acetylcholinrezeptor*

ACS *Akutes Koronarsyndrom*

AMH *Anti-Müllerian Hormone*

AP *Angina pectoris*

Apaf *Apoptotischer Protease-Aktivierungsfaktor*

APC *Adenomatous polyposis coli*

Apo *Apolipoproteine*

AS *Aminosäure*

Bax *Bcl2-associated X protein*

BCA *Bicinchoninsäure*

Bcl *B-cell leukemia/lymphoma*

bHLH *Basic helix-loop-helix*

BMI *Body-Maß-Index*

BMP *Bone Morphogenetic Protein*

bp *Basenpaare*

BSA *Bovine serum albumin (Rinderserumalbumin)*

C5/C5a *Komplementfaktor C5/C5a*

Casp *Caspase*

CCL *CC-Chemokinligand*

CCR *CC-Chemokinrezeptor*

cDNA *Complementary DNA*

CETP *Cholesterinester-Transferprotein*

CHF *Cholesterinreiches Futter*

Chrn *Cholinergic receptor, nicotinic*

CRP *C-reaktives Protein*

Ct *Threshold cycle (Zyklusschwellenwert)*



CTGF *Connective tissue growth factor*

CXCL *CXC-Chemokinligand*

CXCR *CXC-Chemokinrezeptor*

DNA *Desoxyribonukleinsäure*

dsDNA *Doppelsträngige DNA*

Dsh *Dishevelled*

EDTA *Ethylendiamintetraessigsäure*

EGF *Epidermaler Wachstumsfaktor*

ELISA *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*

ER *Endoplasmatisches Retikulum*

ERK *Extracellular signal-regulated kinase*

EZM *Extrazellulärmatrix*

Fbxo32 *F-box protein 32*

FGF *Fibroblast growth factor*

Fzd *Frizzled*

GDF-15 *Growth Differentiation Factor 15 (Wachstums-Differenzierungs-Faktor-15)*

GDNF *Glial cell line-derived neurotropic factor*

GPO-PAP *Glycerol-3-phosphate oxidase-peroxidase*

GSK *Glykogensynthasekinase*

HbA1c *Glykiertes Hämoglobin A*

HDL *High Density Lipoprotein*

HRP *Horseradish peroxidase (Meerrettichperoxidase)*

HSPG *Heparansulfat-Proteoglykan*

IBF *Interfakultäre Biomedizinische Forschungseinrichtung*

ICUAW *Intensive care unit acquired weakness*

IDL *Intermediate Density Lipoprotein*

IFBP *Intestinal fatty acid-binding protein*

IFN *Interferon*

IGF *Insulin-like growth factor*

IKK- $\beta$  *Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit beta*

JNK *Jun n-terminal Kinase*

kbp *Kilobasenpaare*

kDa *Kilodalton*

KHK *Koronare Herzerkrankung*

LAP *Latency associated peptide*

LCAT *Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase*

LDL *Low Density Lipoprotein*

LIF *Leukemia inhibitory factor*

LLC *Large latent complex*

LPL *Lipoproteinlipase*

LPS *Lipopolysaccharide*

Lrp *Low density lipoprotein related receptor*

LRP *LDL receptor related protein*

LTBP *Latent TGF- $\beta$ -binding protein*

MAPK *Mitogen-activated protein kinase*

MEF *Myocyte enhancer factor*

MHC *Myosin heavy chain*

MI *Myokardinfarkt*

MIC-1 *Macrophage inhibitory cytokine-1*

miRNA *MicroRNA*

Mm. *Musculi*

MMP *Metalloproteinase*

MRF *Myogenic regulatory factor*

mRNA *Messenger RNA*

MuRF *Muscle-specific ring finger protein*

Myf *Myogenic factor*

MyoD1 *Myogenic differentiation 1*

Myog *Myogenin*

NAG-1 *non-steroidal anti-inflammatory drug-activated gene-1*

Notch *Notch homolog, translocation-associated (Drosophila)*

NPC1L1 *Niemann-Pick C1-like protein 1*

oxLDL *Oxidiertes LDL*

pAVK *Periphere arterielle Verschlusskrankheit*

Pax *Paired box*

PCB *Planar cell polarity*

PDF *Prostata differentiation factor*

PI3K *Phosphatidylinositol 3-Kinase*

PLAB *Placental bone morphogenetic protein*

PNS *Peripheres Nervensystem*

PTGF- $\beta$  *Placental TGF- $\beta$*

qRT-PCR *Quantitative Real-Time Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion*

RIN *RNA-Integritätsnummer*

RNA *Ribonukleinsäure*

SARA *The SMAD anchor for receptor activation*

SLC *Small latent complex*

SMAD *Receptor-regulated small and mad = mother against Decapentaplegic*

SR *Sarkoplasmatisches Retikulum*

SR-B1 *Scavenger-Rezeptor B1*

TG *Triglyzerid*

TGF- $\beta$  *Transforming Growth Factor  $\beta$*

TGF- $\beta$ R *TGF- $\beta$ -Rezeptor*

TIMP *Tissue inhibitor of metalloproteinase*

TREM *Triggering receptor expressed on myeloid cells*

VEGF *Vascular endothelial growth factor*

VLDL *Very Low Density Lipoprotein*

ZNS *Zentrales Nervensystem*

## **1 EINLEITUNG**

### **1.1 Skelettmuskulatur**

Muskelfasern, die aus der Verbindung von Myoblasten entstanden sind, formen die Skelettmuskulatur. Neben dem Bewegungsapparat ist die Skelettmuskulatur auch in Gesicht, Zunge, Speiseröhre, Kehlkopf und Pharynx zu finden.

#### **1.1.1 Aufbau der Skelettmuskulatur**

Die Skelettmuskulatur gehört zusammen mit der Herzmuskulatur zur quergestreiften Muskulatur und ist zur Kontraktion sowie Relaxation fähig. Sie ist aus einer Vielzahl gebündelter Muskelfasern zusammengesetzt. Die Zellkerne der Muskelfasern liegen dabei direkt randständig unter der Plasmamembran, die als Sarkolemm bezeichnet wird. Im Zytoplasma der Muskelzelle (Sarkoplasma) finden sich hauptsächlich Myofibrillen, Mitochondrien und das sarkoplasmatische Retikulum (SR), ein modifiziertes endoplasmatisches Retikulum (ER). Das SR ist für die Speicherung und Freisetzung von Calcium verantwortlich, das für die Kontraktion des Skelettmuskels benötigt wird. Nach Beendigung des Kontraktionsvorgangs wird Calcium wieder aktiv in das SR aufgenommen (Schneider, 1994; Clark et al., 2002).

Die Skelettmuskulatur ist von einer Faszie mit straffem Bindegewebe und dem sich darunter befindlichen Epimysium mit lockerem Bindegewebe umgeben. Das Perimysium teilt den Muskel in grobe Sekundärbündel und feine Primärbündel. Das Bindegewebe innerhalb des Primärbündels wird als Endomysium bezeichnet. Da die Zellkerne der Muskelfasern nicht mehr teilungsfähig sind, stammen zusätzliche Kerne von teilungsfähigen Satellitenzellen (Lüllmann-Rauch and Asan, 2015).

Die Kontraktion des Skelettmuskels wird durch Sarkomere ermöglicht, die ca. 2-3  $\mu\text{m}$  lang und 1-2  $\mu\text{m}$  dick sind. Sie sind miteinander zu Myofibrillen verknüpft, die aneinandergelagert schließlich eine Muskelfaser ergeben (Squire, 1997). Das Sarkomer ist dabei gleichzeitig auch die basale kontraktile Einheit des Skelettmuskels, hauptsächlich bestehend aus Aktin- und Myosinfilamenten sowie Titin und Nebulin (Squire, 1997; Clark et al., 2002).

Die charakteristische und periodische Querstreifung der Skelettmuskulatur beruht auf der unterschiedlichen Anordnung von Aktin und Myosin (Squire, 1997). Im Polarisationsmikroskop ergeben sich die aufleuchtende (anisotrope) A-Bande und die nicht aufleuchtende (isotrope) I-Bande. Eine Z-Bande kann ebenfalls sichtbar werden, die die I-Bande teilt. In der A-Bande sind dabei die Myosinfilamente, in der I-Bande die Aktinfilamente lokalisiert (Clark et al., 2002). An

den Z-Scheiben, die die Sarkomere seitlich begrenzen, sind die Proteine Titin und Nebulin verankert sowie die Aktinfilamente über das Protein  $\alpha$ -Actinin miteinander verknüpft (Clark et al., 2002). Die Verankerung der Myosinfilamente erfolgt in der M-Bande. Die Proteine der M-Bande und Titin sorgen dafür, dass die Myosinfilamente in der Mitte des Sarkomers stabilisiert werden (Lüllmann-Rauch and Asan, 2015) (s. Abb. 1). Die Verkürzung der Sarkomere beim Kontraktionsvorgang des Muskels ist durch das Gleiten der Aktin- und Myosinfilamente bedingt (Huxley and Hanson, 1954; Huxley and Niedergerke, 1954).

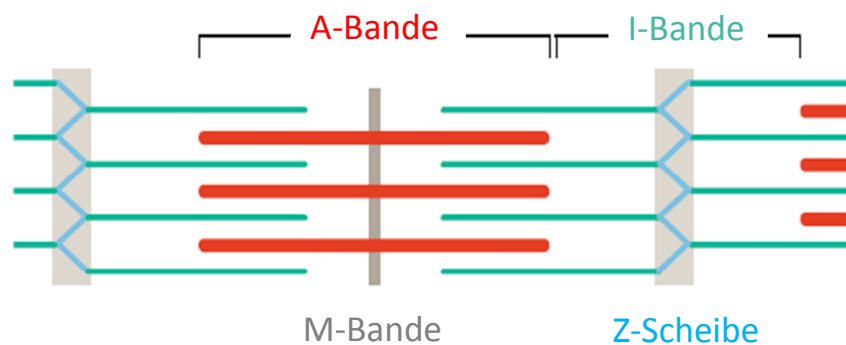


Abb. 1: Schematische Darstellung eines Sarkomers mit Anordnung der Myofilamente im Ruhezustand. Aktinfilamente (grün), Myosinfilamente (rot),  $\alpha$ -Actinin (blau). Modifiziert nach Lüllmann-Rauch and Asan (2015).

### 1.1.2 Fasertypen der Skelettmuskulatur

Der Durchmesser der Muskelfasern variiert zwischen 10 und 100  $\mu\text{m}$  (Hopkins, 2006). Die dünnen Typ-1-Fasern sind mitochondrienreich, oxidativ arbeitend sowie ermüdungsresistent und deshalb für Dauerleistungen ausgelegt. Die dicken Typ-2b-Fasern sind mitochondrienarm, glykolytisch arbeitend sowie rasch ermüdbar (Lüllmann-Rauch and Asan, 2015). Muskeln, die mehr Typ-1-Fasern enthalten, haben wegen des höheren Myoglobin-Anteils eine ausgeprägte rötliche Färbung (Hopkins, 2006). Typ-2a-Fasern verfügen im Unterschied zu Typ-2b-Fasern über mehr Mitochondrien und sind langsamer ermüdbar (Lüllmann-Rauch and Asan, 2015) (s. Tab. 1).

Die Muskelfasern können darüber hinaus anhand ihrer Myosin-Isoformen, den „Myosin heavy chains“ (MHCs), unterschieden werden: Typ-1-Fasern exprimieren MHC 1, Typ-2-Fasern MHC 2 (Pette and Staron, 2000).

Tab. 1: Physikalische, kontraktile und metabolische Unterschiede der Skelettmuskulatur. Modifiziert nach Hopkins (2006).

	<b>Typ-1-Faser</b>	<b>Typ-2a-Faser</b>	<b>Typ-2b-Faser</b>
Durchmesser	klein	mittel	groß
Kontraktion	früh	mittel	spät
Glykolytische Aktivität	gering	mittel	hoch
Oxidative Aktivität	hoch	hoch	niedrig
Kapillarisation	reichlich	mittel	spärlich
Myoglobin	hoch	mittel	niedrig

### 1.1.3 Entwicklung der Skelettmuskulatur

Die Myogenese der humanen Skelettmuskulatur in der Embryonalphase besteht aus mehreren wichtigen Abschnitten: Zunächst proliferieren und differenzieren myogene Vorläuferzellen (Myoblasten), die in Dermomyotomen und Myotomen lokalisiert sind. Myoblasten differenzieren sich und fusionieren anschließend zu Myotuben. Schließlich bilden Myotuben die adulten Skelettmuskelfasern aus (Horak et al., 2016).

Die myogenen Vorläuferzellen stammen aus dem paraxialen Mesoderm. Im Rahmen der weiteren Entwicklung werden parallel des Neuralrohrs aus den mesenchymalen Zellen des Mesoderms epitheliale Strukturen gebildet, die als Somiten bezeichnet werden (Christ and Ordahl, 1995). Innerhalb der Somiten lassen sich wiederum das Sklerotom und das Dermomyotom unterscheiden (Hawke and Garry, 2001; Endo, 2015). Aus dem Sklerotom geht das Skletett, aus dem Dermomyotom die Dermis, das subkutanes Gewebe und die Skelettmuskulatur hervor (Christ and Ordahl, 1995; Endo, 2015).

An der Skelettmuskelentwicklung sind eine Vielzahl von Genen beteiligt, die das korrekte Muskelwachstum, die Morphologie sowie die Kontraktilität beeinflussen und Proliferation, Differenzierung, Interaktion, Migration und Tod der Muskelzellen steuern können (Horak et al., 2016). Die zugrundeliegenden Prozesse werden überwiegend von „myogenic regulatory factors“ (MRFs) der „basic-helix-loop-helix“ (bHLH)-Transkriptionsfaktorfamilie reguliert. MRFs aktivieren die muskelspezifische Genexpression, indem sie an Kontrollelemente in der DNA, als E-Box bezeichnet, oder in der Promoterregion von Zielgenen binden (Olson, 1990). Zu den MRFs gehören MyoD1 („myogenic differentiation 1“), Myf5 („myogenic factor 5“), Myog

(„myogenin/myogenic factor 4“) und Myf6 („myogenic factor 6“) (Brand-Saberi, 2005; Horak et al., 2016). Weitere wichtige Transkriptionsfaktoren sind darüber hinaus Pax 3 („paired box 3“) und Pax 7 („paired box 7“) (Goulding et al., 1991; Brand-Saberi, 2005; Kassar-Duchossoy et al., 2005; Relaix et al., 2005). Während MyoD1 und Myf5 in der Myogenese schon früh aktiv sind und zur Proliferation und Differenzierung von Myoblasten in Myotuben führen, ist Myog an der Differenzierung von Myoblasten zu Myotuben beteiligt (Ito et al., 2012; Horak et al., 2016). Des Weiteren kontrolliert Pax 3 MyoD1 und wirkt synergistisch mit Myf5 (Brand-Saberi, 2005). Eine weitere wichtige Gruppe in der Regulation der Muskelentwicklung sind die „myocyte enhancer factors“ (MEFs) (Brand-Saberi, 2005). Diese Faktoren werden sowohl in sich entwickelnden Herzmuskelzellen als auch in Skelettmuskel- und glatten Muskelzellen exprimiert (Naya and Olson, 1999).

#### **1.1.4 Signalkaskade in der Skelettmuskulatur**

In der Entwicklung und Veränderung der Skelettmuskulatur wird eine Vielzahl verschiedener Signalwege aktiviert. Ein wichtiger Bestandteil ist dabei die Wnt-Signalkaskade, die bei der Skelettmuskelentwicklung während der Embryogenese, der muskulären Stammzellerneuerung und der Differenzierung der Muskelzellen bei Erwachsenen eine entscheidende Rolle spielt (von Maltzahn et al., 2012).

Wnt-Proteine bilden eine große Familie von Glykoproteinen, die von 19 verschiedenen Genen bei Menschen und Mäusen kodiert werden (Rudnicki and Williams, 2015). Grundsätzlich wird zwischen einer spezifischen kanonischen und einer unspezifischen nicht-kanonischen Aktivierung des Wnt-Signalwegs unterschieden (von Maltzahn et al., 2012). Wnt Proteine binden dabei an einen Rezeptorkomplex aus Frizzled (Fzd)-Rezeptoren, die in der Plasmamembran der Zielzellen lokalisiert sind (Sethi and Vidal-Puig, 2010; Clevers and Nusse, 2012) und dem „low density lipoprotein related receptor 5/6“ (Lrp5/6) (Rudnicki and Williams, 2015). Dieser Rezeptorkomplex interagiert mit dem zytoplasmatischen Protein Dishevelled (Dsh) und G-Proteinen, die hemmend auf Fzd einwirken (Katoh, 2007).

Beim kanonischen Signalweg ist das Protein  $\beta$ -Catenin entscheidend beteiligt. Es ist mit einem Komplex aus Axin- sowie Adenomatous-polyposis-coli (APC)-Proteinen und der Serin-Threonin-Kinase Glykogensynthasekinase 3 (GSK-3) verbunden (von Maltzahn et al., 2012). GSK-3 phosphoryliert und degradiert  $\beta$ -Catenin in Abwesenheit des Wnts am Rezeptorkomplex, sodass es der Ubiquitin-abhängigen Proteolyse zugeführt wird (Rudnicki and Williams, 2015). Bindet Wnt, wird die GSK-3-vermittelte Phosphorylierung von  $\beta$ -Catenin gestoppt, sodass die  $\beta$ -Catenin-Spiegel im Zytoplasma ansteigen können. Im Zellkern kommt es

anschließend  $\beta$ -Catenin-vermittelt zu einer Aktivierung der Transkription von Zielgenen (Rudnicki and Williams, 2015) (s. Abb. 2).

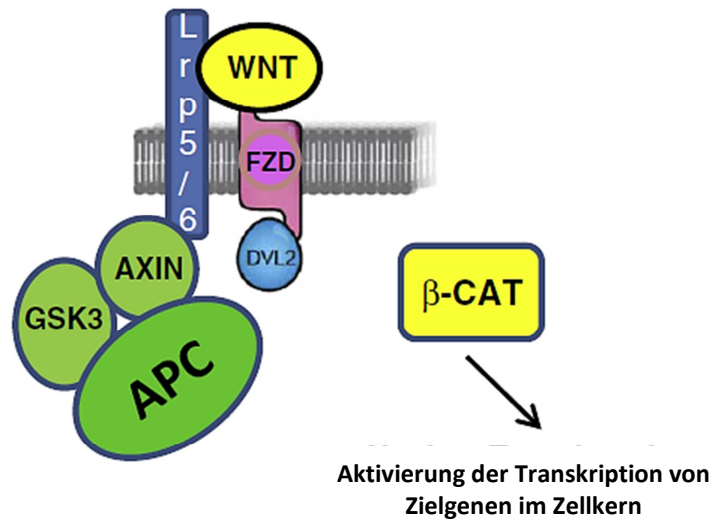


Abb. 2: Kanonischer Wnt-Signalweg. Wnt bindet an den Rezeptorkomplex aus Frizzled (FZD) und „low density lipoprotein related receptor 5/6“ (Lrp5/6). „Dishevelled segment polarity protein 2“ (DVL2) wirkt hemmend auf FZD. An Lrp5/6 bindet Axin zusammen mit Adenomatous-polyposis-coli (APC)-Proteinen und der Serin-Threonin-Kinase Glykogensynthasekinase 3 (GSK-3). Die GSK-3-vermittelte Phosphorylierung und Degradierung von  $\beta$ -Catenin ( $\beta$ -CAT) wird gestoppt, sodass  $\beta$ -Catenin im Zellkern die Transkription von Zielgenen aktivieren kann. Modifiziert nach Rudnicki and Williams (2015).

Der nicht-kanonische Wnt-Signalweg unterscheidet sich dahingehend, dass er unabhängig von  $\beta$ -Catenin funktioniert. Hierzu zählen die Wnt-abhängige Aktivierung der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) und die „planar cell polarity“ (PCB)-Kaskade (von Maltzahn et al., 2012).

Ein wichtiger Faktor, der die Skelettmuskelproliferation und Differenzierung von Myoblasten beeinflusst, ist IGF-1 („Insulin-like growth factor 1“) (Londhe and Guttridge, 2015). IGF-1 kann zur Hypertrophie des Skelettmuskels beitragen, indem es den nicht-kanonischen Wnt-Signalweg über die PI3K aktiviert (Bodine et al., 2001b; Rommel et al., 2001). Auch Fibroblasten-Wachstumsfaktoren („fibroblast growth factors“; FGFs) sind an der Skelettmuskelentwicklung entscheidend beteiligt. Fehlt die Signalkaskade über den FGF1-Rezeptor, nimmt die Skelettmuskelmasse ab (Flanagan-Steet et al., 2000). Während der Entstehung von Muskelatrophien sind zahlreiche Transkriptionswege aktiviert, die den Proteinumsatz und -abbau erhöhen (Haddad et al., 2003; Lecker et al., 2004). Dazu gehört auch das Ubiquitin-Proteasom-Komplex-System mit den E3-Ubiquitinligasegenen MuRF1 („muscle specific ring finger protein 1“) und Atrogin-1/MAFbx (F-Box Substrat-Adapter-Protein 32;



Fbxo32), deren Expression in zahlreichen Modellen der Skelettmuskelatrophie erhöht ist (Bodine et al., 2001a; Gomes et al., 2001; Dehoux et al., 2003; Li et al., 2004).

## 1.2 Lipoproteine

Lipoproteine sind für den Transport von Cholesterinestern und Triglyzeriden (TGs) im Blut zum Zielgewebe und den Abtransport von Lipiden zurück zur Leber verantwortlich. Der Aufbau aller Lipoproteine ist dabei ähnlich: eine hydrophile Membran aus Phospholipiden, Cholesterin sowie Apolipoproteinen (Apo) umgibt die zu transportierenden TGs und Cholesterinester (s. Abb. 3).

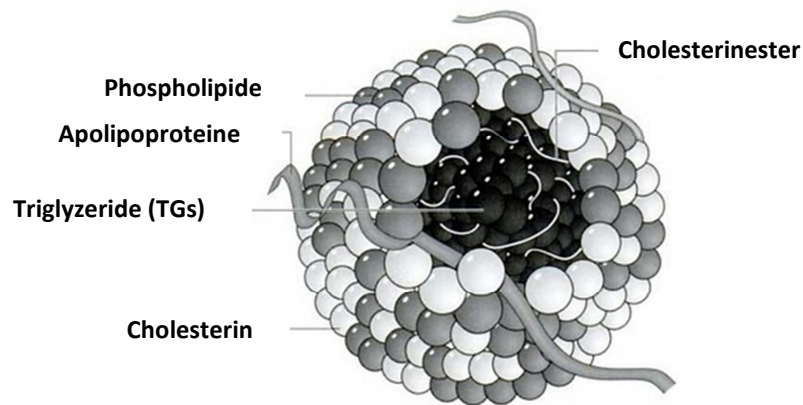


Abb. 3: Aufbau eines Lipoproteins. Phospholipide, Cholesterin und Apolipoproteine umgeben die zu transportierenden Triglyzeride (TGs) und Cholesterinester. Modifiziert nach Schwandt et al. (2007).

Eine Differenzierung der Lipoproteine kann anhand der Apolipoproteine, Größe, Dichte, dem Synthesort und ihrer Funktion in fünf Gruppen vorgenommen werden (Schumaker and Adams, 1969; Alaupovic et al., 1972). Die Größe der Lipoproteine nimmt dabei mit abnehmender Dichte zu (Gursky, 2015) (s. Tab. 2).

Tab. 2: Klassifikation der Lipoproteine. Lipoprotein, Syntheseort, Apolipoprotein, Größe (nm) und Dichte (g/ml).  
 Modifiziert nach Olson (1998), Schwandt et al. (2007) und Jain et al. (2007).

<b>Lipoprotein</b>	<b>Syntheseort</b>	<b>Apolipoprotein</b>	<b>Größe (nm)</b>	<b>Dichte (g/ml)</b>
Chylomikronen	Darm	A (-I, -II, -IV), B48, C (-I, -II, -III), E	100-1000	<1,006
Very Low Density Lipoproteine (VLDL)	Leber	B100, C (-I, -II, -III), E	30-70	≤1,006
Intermediate Density Lipoproteine (IDL)	aus VLDL	B100, C (-I, -II, -III), E	28-32	<1,019
Low Density Lipoproteine (LDL)	aus VLDL, IDL	B100	21-25	1,019-1,063
High Density Lipoproteine (HDL)	Leber, Darm	A (-I, -II, -IV), C (-I, -II, -III), D, E	5-12	1,063-1,210

Die fünf Apolipoprotein-Gruppen unterscheiden sich ferner in ihrer Zusammensetzung. Sie enthalten unterschiedliche Anteile an Proteinen, Phospholipiden, freiem Cholesterin, Cholesterinestern und TGs (s. Tab. 3).

Tab. 3: Zusammensetzung der Apolipoproteine. Proteine (P), Phospholipide (PL), freies Cholesterin (fC), Cholesterinester (CE) und Triglyzeride (TGs). Modifiziert nach Schwandt et al. (2007).

<b>Lipoprotein</b>	<b>P (%)</b>	<b>PL (%)</b>	<b>fC (%)</b>	<b>CE (%)</b>	<b>TGs (%)</b>
Chylomikronen	2	5	1	2	90
Very Low Density Lipoproteine (VLDL)	10	16	7	13	54
Intermediate Density Lipoproteine (IDL)	17	20	9	34	20
Low Density Lipoproteine (LDL)	23	21	11	41	4
High Density Lipoproteine (HDL)	56	23	3	15	3

### 1.2.1 Lipidstoffwechsel

Grundsätzlich lassen sich innerhalb des Lipidstoffwechsels drei Stoffwechselwege unterscheiden: der exogene und endogene Weg sowie der Cholesterin-Rücktransport.

#### 1.2.1.1 Exogener Stoffwechselweg der Lipide

Triglyzeride werden durch die Magen- und Pankreaslipase gespalten und mittels Gallensäuren zu Mizellen emulgiert. Die von den TGs abgespaltenen freien Fettsäuren werden anschließend durch Enterozyten aufgenommen und dort im Zytoplasma an das „intestinal fatty acid-binding protein“ (IFBP) gebunden transportiert. Die Resynthese der TGs erfolgt dabei vorwiegend im glatten ER (Corella and Ordovas, 2005).

Das über die Nahrung aufgenommene Cholesterin wird in nicht-veresterter Form resorbiert. Cholesterinester werden zuvor durch die Cholesterinesterase hydrolysiert. Für die Aufnahme des Cholesterins in die Enterozyten ist das „Niemann-Pick C1-like protein 1“ (NPC1L1) als Cholesterinrezeptor verantwortlich (Schwandt et al., 2007). Im Zytoplasma der Enterozyten transportiert IFBP das Cholesterin zum glatten ER, wo eine Wiederveresterung stattfindet. TGs und Cholesterinester werden schließlich zusammen mit Cholesterin, Phospholipiden und Apolipoproteinen (ApoB48, ApoA) zu Chylomikronen verpackt. Die Abgabe der

Chylomikronen erfolgt dann über den Golgi-Apparat der Enterozyten in das Lymphsystem (Cartwright et al., 2000). Nachdem die Chylomikronen über den Ductus thoracicus in den venösen Kreislauf gelangt sind, erfolgt hier eine Übertragung der ApoE und ApoC-II von High Density Lipoproteinen (HDLs) auf die Chylomikronen. ApoC-II ist Kofaktor und Aktivator der endothelialen Lipoproteinlipase (LPL), die die TGs der Chylomikronen in freie Fettsäuren und  $\beta$ -Monoglyceride spaltet, die schließlich vom Gewebe aufgenommen werden können (Goldberg et al., 1990; Huff et al., 1990; Schwandt et al., 2007). An das HDL werden im weiteren Verlauf nicht benötigtes ApoC, ApoA und Phospholipide abgegeben. Es verbleiben Chylomikronen-Remnants, die reich an ApoE und Cholesterinestern sind. Die Aufnahme und Elimination der Remnants erfolgt dann über die Interaktion von ApoE mit dem hepatischen Low-Density-Lipoprotein-Rezeptor (LDL-Rezeptor) (Gotto, 1990; Cooper, 1997; Olson, 1998).

### **1.2.1.2 Endogener Stoffwechselweg der Lipide**

TGs und Cholesterin können auch von der Leber im glatten ER synthetisiert werden. Nach Bindung mit ApoC-II und ApoB100 aus dem rauen ER werden sie zusammen mit Phospholipiden als Very Low Density Lipoproteine (VLDLs) über den Golgi-Apparat in das Blut sezerniert (Cartwright et al., 2000). Hier nehmen sie von HDL ApoE und weiteres ApoC-II auf. Das ApoC-II hemmt dabei zum einen die vorzeitige Aufnahme der VLDLs in die Leber und wirkt zum anderen als Kofaktor und Aktivator der LPL, die den Großteil der TGs spaltet. An HDL werden schließlich überschüssiges ApoC und freies Cholesterin abgegeben. Es verbleiben VLDL-Remnants, die reich an ApoE und Cholesterinestern sind (Schwandt et al., 2007). VLDL-Remnants werden nun entweder direkt von der Leber aufgenommen und abgebaut oder über den Zwischenschritt des Intermediate Density Lipoproteins (IDL) in LDL umgewandelt. Bei der Umwandlung von VLDL-Remnants zu LDL geht ApoE verloren und weitere Cholesterinester werden von HDL aufgenommen. Die Aufnahme und Entfernung von IDL und LDL erfolgt in der Leber über die Interaktion von ApoB100 mit LDL-Rezeptoren (Goldstein and Brown, 1977). LDL kann jedoch auch leberunabhängig vom Gewebe aufgenommen werden und dient dann als Membranbaustein sowie zur Synthese von Steroidhormonen und Vitamin D (Schwandt et al., 2007). Bei Erhöhungen des LDL-Levels im Blut können subendotheliale Ablagerungen in arteriellen Gefäßen entstehen. Durch die anschließende Phagozytose von modifiziertem LDL durch Makrophagen und Ausschüttung pro-inflammatorischer Zytokine wird die Entstehung arteriosklerotischer Läsionen gefördert (Kramsch and Hollander, 1973; Ross, 1981; Frostegard et al., 1990). Die LDL-Plasmaspiegel und ApoB gehören u.a. zu den Hauptrisikofaktoren für die Entstehung und Progression arteriosklerotischer Läsionen (Castelli et al., 1992; Nesto, 2005; Hegele, 2009; Krauss, 2010).

### **1.2.1.3 Cholesterin-Rücktransport**

Periphere Zellen können überschüssiges freies Cholesterin über die Bindung des „ATP-binding cassette transporter, subfamily A, member 1“ (ABCA1) an HDL abgeben (Navab et al., 2011). Dort wird es über die durch ApoA-I aktivierte Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase (LCAT) verestert und mittels Cholesterinester-Transferprotein (CETP) gegen TGs und Phospholipide in ApoB-haltigen Lipoproteinen (u.a. VLDL, LDL) ausgetauscht. Das HDL kann jedoch die Cholesterinester auch direkt über den Scavenger-Rezeptor B1 (SR-B1), der insbesondere in Leber und Nebenniere exprimiert wird, an das Gewebe abgeben (Schwandt et al., 2007). Auf diese Weise wird überschüssiges Cholesterin aus der Blutzirkulation entfernt. HDL-Plasmaspiegel und ApoA korrelieren dabei invers mit dem kardiovaskulären Risiko (Castelli et al., 1992; Navab et al., 2011; Rader and Hovingh, 2014).

### **1.2.2 Apolipoprotein A**

Apolipoprotein A wird unterteilt in die Untergruppen A-I, A-II, A-IV und A-V (Schwandt et al., 2007). ApoA-I mit einer Masse von 29 kDa ist Hauptstrukturprotein von HDL und in geringerem Maße auch in Chylomikronen zu finden (Jain et al., 2007). Es wird in Leber sowie Darm synthetisiert (Mahley et al., 1984) und aktiviert als Kofaktor die LCAT (Olson, 1998). Die Plasmakonzentration von ApoA-I beträgt 100-150 mg/dl (Assmann, 1982). ApoA-II ist mit einer Masse von 17,4 kDa kleiner als ApoA-I und kommt ebenfalls hauptsächlich in HDL, aber auch in Chylomikronen vor (Jain et al., 2007). Es wird vorwiegend in der Leber gebildet (Mahley et al., 1984), fördert die Aktivität der hepatischen Lipase (Jain et al., 2007) und hat eine Plasmakonzentration von 30-40 mg/dl (Assmann, 1982). ApoA-IV mit einer Masse von 46 kDa ist Bestandteil von HDL und Chylomikronen (Jain et al., 2007). Es wird in Leber und Darm synthetisiert und hat in humanem Serum eine Konzentration von 15 mg/dl (Mahley et al., 1984). Ähnlich wie ApoA-I aktiviert ApoA-IV die LCAT (Schwandt et al., 2007). ApoA-V mit einer Masse von 39 kDa wird in der Leber synthetisiert (Schwandt et al., 2007). Es fördert und erleichtert die Hydrolyse der TGs durch die LPL (Forte et al., 2016). Im Plasma kommt es in einer Konzentration von 0,01-0,02 mg/dl vor (Schwandt et al., 2007).

### **1.2.3 Apolipoprotein E**

Apolipoprotein E (ApoE) mit einem Molekulargewicht von 34 kDa ist als Bestandteil von Lipoproteinen für den Transport von Cholesterin und Triglyzeriden zwischen verschiedenen Zellen und Geweben im Körper verantwortlich (Huang and Mahley, 2014; Riedel et al., 2016).

Es kommt in Chylomikronen, Chylomikronen-Remnants, VLDLs, HDLs sowie IDLs vor und spielt eine zentrale Rolle bei der Entfernung dieser Lipoproteine aus dem Plasma, indem es als Ligand an spezifische Oberflächenrezeptoren von Zellen, insbesondere den LDL-Rezeptor, bindet (Mahley et al., 1999; Mahley and Huang, 1999; Huang and Mahley, 2014). ApoE wird von verschiedenen Geweben sowie zahlreichen Zelltypen synthetisiert und sezerniert. Es ist reichlich in interstitieller Flüssigkeit, Lymphe und Plasma zu finden. Die ApoE-Synthese konnte auch in zentralem Nervensystem (ZNS), peripherem Nervensystem (PNS), Niere und Nebenniere, Hoden, Haut, Milz, Fettgewebe und Makrophagen nachgewiesen werden (Huang and Mahley, 2014). Der größte Anteil an der ApoE-Synthese wird jedoch der Leber zugeschrieben (Blue et al., 1983).

### **1.2.3.1 Genetik und Struktur von ApoE**

Das ApoE-Gen ist 3,6 kbp lang und auf Chromosom 19 lokalisiert. Es kodiert für das 299 Aminosäuren (AS) lange ApoE-Protein. Im Menschen bestehen mit ApoE2, ApoE3 und ApoE4 drei Isoformen des ApoEs. Sie unterscheiden sich durch den Wechsel der AS Cystein (Cys) und Arginin (Arg) an Position 112 und 158: ApoE2 (Cys-112, Cys-158), ApoE3 (Cys-112, Arg-158), ApoE4 (Arg-112, Arg-158) (Hatters et al., 2006; Huang and Mahley, 2014; Riedel et al., 2016). Während aus der Substitution von Cystein an Position 158 in ApoE2 eine Hypercholesterinämie resultiert, bedingt der Austausch von Cystein mit Arginin an Position 112 in ApoE4 einen Anstieg des Plasma-Cholesterins und LDLs, das den Träger für kardiovaskuläre und neurodegenerative Erkrankungen (z.B. Morbus Alzheimer) prädisponiert (Mahley et al., 2009). Ein Zusammenhang zwischen kindlicher Adipositas und ApoE4 wurde ebenfalls beschrieben (Ellis et al., 2011). ApoE3 ist mit über 60 % die in der Normalbevölkerung am weitesten verbreitete Isoform des ApoEs und wird daher als die normale Form des ApoEs angesehen (Assmann, 1982; Huang and Mahley, 2014). Die Affinität der Isoformen zum LDL-Rezeptor ist unterschiedlich. Während ApoE2 eine niedrige Affinität aufweist, zeigen ApoE3 und ApoE4 jeweils eine hohe Bindungsfähigkeit (Hatters et al., 2006; Huang and Mahley, 2014). Des Weiteren binden ApoE2 und ApoE3 vorwiegend an HDL und ApoE4 an VLDL und LDL (Hatters et al., 2006; Huang and Mahley, 2014).

Das ApoE-Protein hat eine N-terminale (AS 1-191) rezeptorbindende und eine C-terminale (AS 225-299) hydrophobe lipidbindende Region. Die N-terminale Region enthält die zwei polymorphen Positionen 112 und 158, anhand derer die drei Isoformen unterschieden werden können (Riedel et al., 2016). Die N-terminale Domäne besteht aus vier  $\alpha$ -Helices mit hydrophilen und hydrophoben Anteilen (s. Abb. 4).

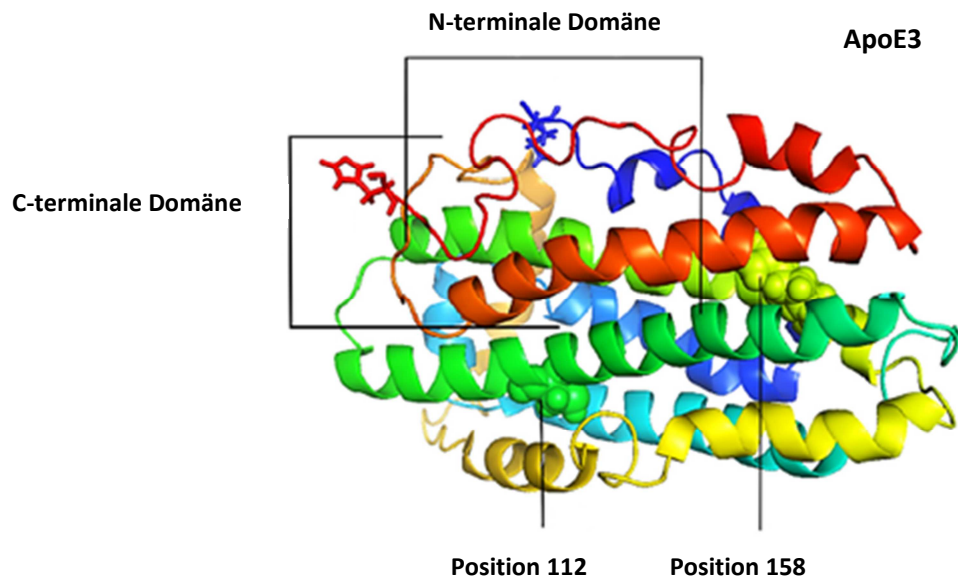


Abb. 4: Struktur von ApoE3. Dargestellt sind die C-terminale Domäne als lipidbindende Region und die N-terminale Domäne als Rezeptorbindungsmotiv, die gleichzeitig die zwei polymorphen Positionen 112 und 158 enthält, die die drei Isoformen voneinander unterscheiden. Modifiziert nach Riedel et al. (2016).

Die Interaktion mit dem LDL-Rezeptor wird dabei durch einen hohen Anteil an den AS Arginin, Lysin und Histidin (AS 136-150) verbessert (Weisgraber, 1994; Huang and Mahley, 2014). An der Bindung und Aufnahme von ApoE sind außerdem an der Zelloberfläche gelegene Heparansulfat-Proteoglykane (HSPG) beteiligt, die das ApoE entweder direkt aufnehmen oder es zu dem „LDL receptor related protein“ (LRP) und anderen Lipoprotein-Rezeptoren transferieren können (Huang and Mahley, 2014).

### 1.2.3.2 ApoE und Arteriosklerose

Für ApoE konnte eine potente anti-atherogene Wirkung gezeigt werden (Greenow et al., 2005). Eine geringe ApoE-Expression ist dabei mit einem pro-atherogenen Lipoproteinprofil und Arteriosklerose assoziiert (Ghiselli et al., 1981; Schaefer et al., 1986). Bei Mäusen führt ApoE-Knockout zu einer Hypercholesterinämie im Vergleich zu Wildtyp-Tieren (Zhang et al., 1992). Während die Expression von ApoE in normalen Gefäßen fehlt, ist sie stark in arteriosklerotischen Plaques gesteigert (Greenow et al., 2005). Es wird davon ausgegangen, dass ApoE dabei von Makrophagen lokal sezerniert wird (Rosenfeld et al., 1993) und anti-atherogene Effekte hat (Greenow et al., 2005). Es konnte jedoch auch gezeigt werden, dass ApoE2 und ApoE4 die Anzahl atherogener Lipoproteine erhöhen und die Entstehung von Arteriosklerose

beschleunigen (Mahley and Rall, 2000; Mahley et al., 2009). Verantwortlich dafür sind die strukturellen Unterschiede der ApoE-Isoformen. Die herabgesetzte Funktionsfähigkeit der rezeptorbindenden Region des ApoE2 führt zu erhöhten Triglyzerid- sowie Cholesterinspiegeln und einer Typ-III-Hyperlipoproteinämie, da eine verzögerte Entfernung aus der Blutzirkulation stattfindet (Utermann et al., 1977; Mahley et al., 1999; Mahley and Rall, 2000). Der mit ApoE4 verbundene Anstieg von Cholesterin, LDL und ApoB spiegelt den Einfluss von Arg-112 wider (Mahley, 1988; Weisgraber, 1994; Mahley and Rall, 2000). Arg-112 verändert dabei die ApoE4-Lipidbindungsregion, sodass statt phospholipidreichen HDLs bevorzugt triglyzeridreiche VLDLs gebunden werden (Mahley et al., 2009).

### **1.3 Transforming Growth Factor $\beta$ (TGF- $\beta$ )-Superfamilie**

Die Mitglieder der Transforming Growth Factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ )-Superfamilie sind als Signalproteine an der Regulation der Wundheilung, Angiogenese, Zellhomöostase und zellulären Entwicklung, wie z.B. Differenzierung, Proliferation, Apoptose (Blobe et al., 2000; Patterson and Padgett, 2000; ten Dijke et al., 2002; Kubiczkova et al., 2012), sowohl im embryonalen als auch adulten Gewebe (Massagué, 2000) beteiligt. Darüber hinaus hat TGF- $\beta$  die Funktion eines Tumorsuppressors und -promotors (Kubiczkova et al., 2012).

Zu den Mitgliedern der TGF- $\beta$ -Superfamilie, die beim Menschen mehr als 40 Proteine umfasst, gehören TGF- $\beta$ , Activin/Inhibin, Nodal, Myostatin, „Bone Morphogenetic Proteins“ (BMPs), „Growth Differentiation Factors“ (GDFs), „anti-Müllerian Hormones“ (AMHs), „Leukemia inhibitory factors“ (LIFs) und „Glial cell line-derived neurotropic factors“ (GDNFs) (Chen et al., 2006; Kubiczkova et al., 2012) (s. Tab. 4).



Tab. 4: Übersicht über die TGF- $\beta$ -Untergruppen. Modifiziert nach Massagué (1998) und Dombrowski (2010).

<b>TGF-<math>\beta</math></b>	<b>BMP</b>	<b>GDF</b>	<b>Activin/Inhibin</b>
TGF- $\beta$ 1, 2, 3, 4, 5	BMP2, 4, 5, 6, 10	GDF-1, -3, -9	Activin-A, -B, -AB, -C, -E
	BMP3/Osteogenin	GDF-11/BMP11	Inhibin-A, -B, -C
	BMP3b/GDF-10	GDF-7/BMP12	
	BMP7/OP-1	GDF-6/BMP13	
	BMP8a/OP-2	GDF-5/BMP14	
	BMP8b/OP-3	GDF-9b/BMP15	
	BMP16/Nodal	GDF-8/Myostatin	
		<b>GDF-15/MIC-1</b>	

Alle Mitglieder der TGF- $\beta$ -Superfamilie sind dimere Polypeptide und verfügen in ihrer Proteinsekundärstruktur über einen Cysteinknoten. Die Cysteinseitenketten sind dabei über Disulfidbrücken miteinander verbunden (Massagué, 1998; Shi and Massagué, 2003) (s. Abb. 5).

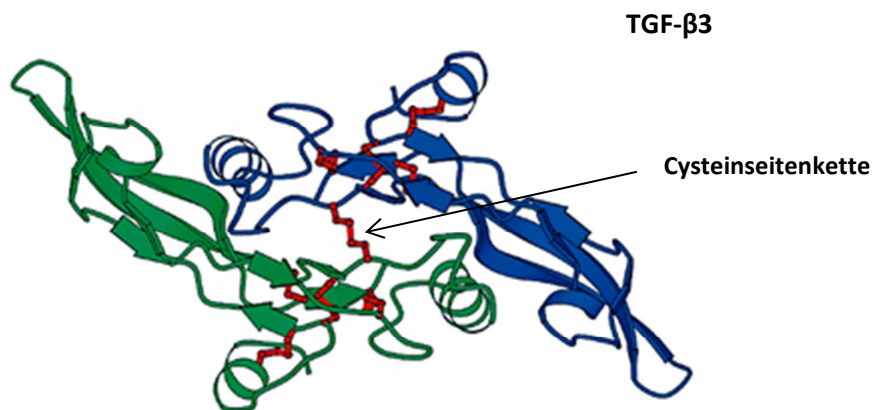


Abb. 5: Struktur eines TGF- $\beta$ 3-Homodimers als repräsentatives Mitglied der TGF- $\beta$ -Superfamilie: Mit grün und blau sind die beiden Monomere markiert, mit rot sind die Cysteinseitenketten dargestellt. Modifiziert nach Shi and Massagué (2003).

TGF- $\beta$  wird als Prä-Pro-Protein (pro-TGF- $\beta$ ) mit großen N-terminalen Fragmenten („latency associated peptide“; LAP) synthetisiert. LAP ist für die korrekte Faltung und Dimerisierung der C-terminalen Wachstumsfaktordomäne verantwortlich. Der Komplex aus Pro-Protein und LAP wird als „small latent complex“ (SLC) bezeichnet. Nach Faltung und Dimerisierung wird TGF-

$\beta$  im Golgi-Apparat mithilfe Furin-ähnlicher Enzyme von dem Pro-Peptid abgespalten. Es bleibt jedoch weiterhin über non-kovalente Bindungen verknüpft („large latent complex“; LLC). Die meisten Zellen entlassen TGF- $\beta$  dann als LLC in Verbindung mit dem „latent TGF- $\beta$ -binding protein“ (LTBP), einem 120-140 kDa großen Glykoprotein, in die Extrazellulärmatrix (EZM). Das LTBP ist dafür verantwortlich, dass das TGF- $\beta$  sein Ziel in der EZM erreicht. Die Aktivierung von TGF- $\beta$  erfolgt durch die Freisetzung des LLC von der EZM durch Proteasen und die Abspaltung des LTBP (Kubiczkova et al., 2012) (s. Abb. 6).

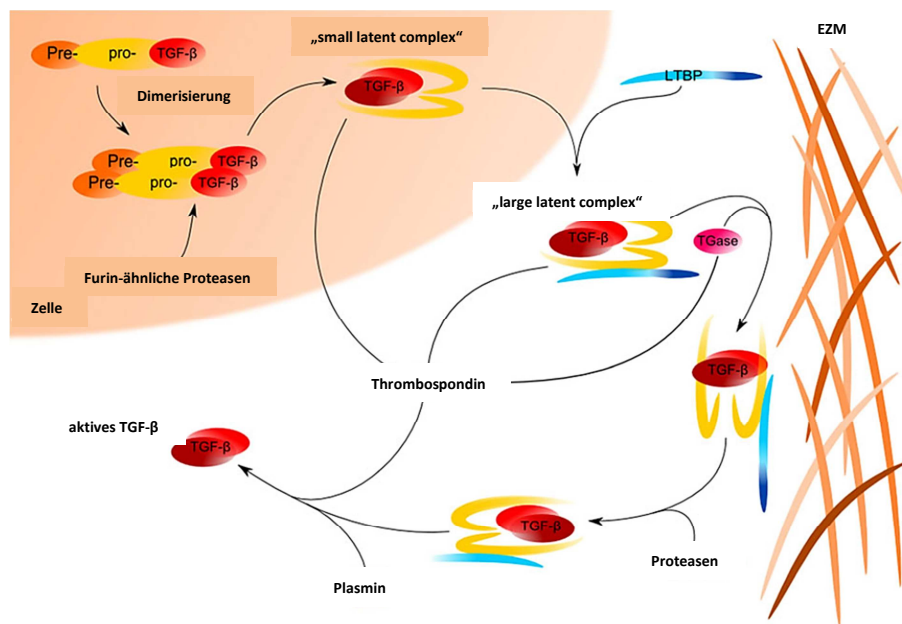


Abb. 6: Synthese und Aktivierung von TGF- $\beta$ . TGF- $\beta$ s werden als inaktive Vorstufen synthetisiert, die eine Prä-Region (Signal-Peptid) und Pro-Region (N-terminales Peptid, „latency associated peptide“, LAP) beinhalten. Die Prozessierung beginnt mit der Spaltung des Signalpeptids von der Prä-Pro-TGF- $\beta$ -Form. Nach Dimerisierung werden die TGF- $\beta$ s mithilfe von Proteasen (z.B. Furin) in C-terminale reife Peptide und N-terminale LAPs getrennt. TGF- $\beta$ s bilden mit LAPs einen „small latent complex“ (SLC), der gebunden an ein „latent TGF- $\beta$ -binding protein“ (LTBP) als „large latent complex“ (LLC) zur Extrazellulärmatrix (EZM) gelangt. Die Aktivierung von TGF- $\beta$  erfolgt durch die Freisetzung des LLC von der EZM durch Proteasen und die Abspaltung des LTBP durch z.B. Plasmin oder Thrombospondin. Modifiziert nach Kubiczkova et al. (2012).

Die meisten Zellen exprimieren drei verschiedene TGF- $\beta$ -Rezeptoren: TGF- $\beta$ -Rezeptor I (TGF- $\beta$ RI), II (TGF- $\beta$ RII) und III (TGF- $\beta$ RIII) (Kubiczkova et al., 2012). Durch die Bindung von zwei aktiven TGF- $\beta$ -Molekülen an den TGF- $\beta$ -Rezeptor III (TGF- $\beta$ RIII) formen sich TGF- $\beta$ -Homodimere, die dann zunächst an den TGF- $\beta$ RII binden. TGF- $\beta$ RII aktiviert durch Phosphorylierung den TGF- $\beta$ RI (Massagué, 1998). TGF- $\beta$ RI und TGF- $\beta$ RII beinhalten intrazelluläre Serin-Threonin-Kinase-Proteine, die über Phosphorylierung und Aktivierung von

SMAD-Transkriptionsfaktoren („receptor-regulated small and mad = mother against Decapentaplegic“) das TGF- $\beta$ -Signal in das Zellinnere weiterleiten (Blobe et al., 2000). Die Rezeptor-SMAD-Proteine (R-SMAD) SMAD2 und SMAD3 binden mithilfe von SARA („the SMAD anchor for receptor activation“) an TGF- $\beta$ RI und werden dort phosphoryliert. Zusammen mit Co-SMAD4 gelangt der SMAD-Komplex zum Zellkern und führt dort über die Co-Aktivatoren p300 und CBP zu einer Aktivierung der Transkription verschiedener Zielgene (s. Abb. 7). Eine Hemmung des TGF- $\beta$ -Signals wird über Bindung von Ski und SnoN, Mitglieder der Ski-Familie, an R-SMADS und SMAD4 hervorgerufen (Patterson and Padgett, 2000; ten Dijke et al., 2002; Shi and Massagué, 2003). Neben R-SMADS und Co-SMADS existieren die inhibitorische SMAD-Proteine (I-SMAD) SMAD6 und SMAD7, die die TGF $\beta$ -Signalweiterleitung verhindern, indem sie die Phosphorylierung der Co-SMADs hemmen (Massagué and Chen, 2000; Shi and Massagué, 2003; Clarke and Liu, 2008; Macias et al., 2015).

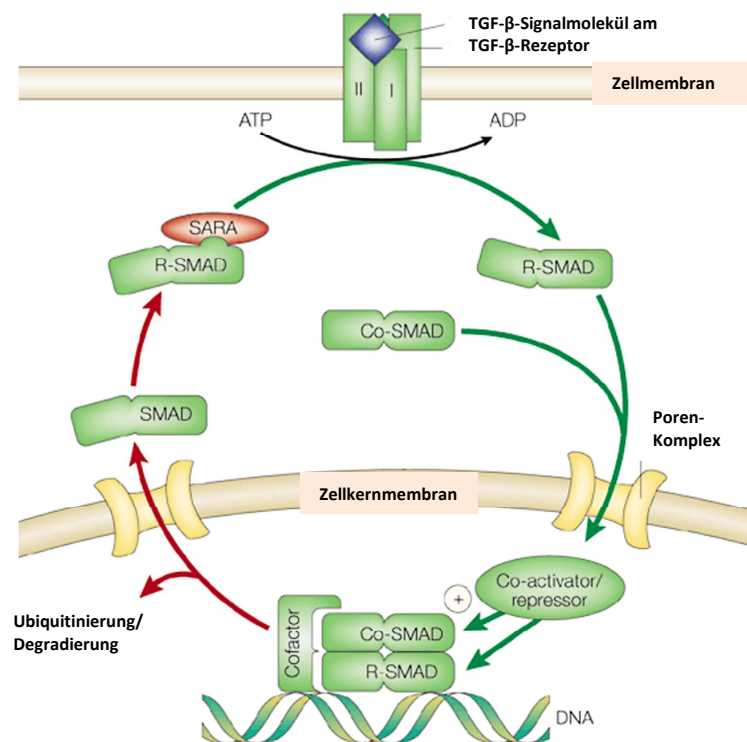


Abb. 7: Signaltransduktion von TGF- $\beta$  über SMAD. TGF- $\beta$  bindet an TGF- $\beta$ RII, der den TGF- $\beta$ RI aktiviert. R-SMAD bindet mithilfe von SARA an TGF- $\beta$ RI und wird phosphoryliert. Mit Co-SMAD gelangt R-SMAD in den Zellkern und fördert dort mit Co-Aktivatoren (p300 und CBP) die Transkription von Zielgenen. Modifiziert nach Massagué (2000).

Die TGF- $\beta$ -Signalkaskade kann darüber hinaus SMAD-unabhängig über die Aktivierung verschiedener MAP-Kinase-Wege („mitogen-activated protein kinase“), wie z.B. ERK1/ERK2 („extracellular signal-regulated kinase 1/2“), JNK („Jun n-terminal Kinase“), p38-Kinase und PI3K, erfolgen (Kubiczkova et al., 2012).

### **1.3.1 Wachstums-Differenzierungs-Faktor-15 (GDF-15)**

Wachstums-Differenzierungs-Faktor-15 („Growth Differentiation Factor 15“; GDF-15) wurde von Bootcov et al. erstmals im Jahr 1997 als „macrophage inhibitory cytokine-1“ (MIC-1) beschrieben, da es nach Exposition von Makrophagen mit IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  und M-CSF exprimiert wurde und deren weitere Aktivierung hemmen konnte (Bootcov et al., 1997). In der Literatur wird GDF-15 (Böttner et al., 1999a) auch als PDF („prostate differentiation factor“) (Paralkar et al., 1998), PLAB („placental bone morphogenetic protein“) (Hromas et al., 1997), PTGF- $\beta$  („placental TGF- $\beta$ “) (Lawton et al., 1997), NAG-1 („non-steroidal anti-inflammatory drug-activated gene-1“) (Baek et al., 2002) und PL74 (Li et al., 2005) beschrieben. Eine eindeutige Zuordnung von GDF-15 zu einer bereits bestehenden Gruppe der TGF- $\beta$ -Superfamilie ist nicht möglich (Bootcov et al., 1997; Böttner et al., 1999b; Fairlie et al., 1999; Strelau et al., 2000a).

#### **1.3.1.1 Genetik und Struktur von GDF-15**

GDF-15 besteht aus 2746 bp mit zwei Exons sowie einem Intron (Böttner et al., 1999b) und ist beim Menschen auf Chromosom 19 lokalisiert. Die Synthese erfolgt wie bei den anderen TGF- $\beta$ -Mitgliedern als 62 kDa großes Vorläuferprotein. GDF-15 verfügt über ein Signalpeptid (16 AS), eine Pro-Region (167 AS), eine RXXR-Sequenz (Restriktionsschnittstelle) und das reife Protein („mature protein“; 112 AS) (Unsicker et al., 2013) (s. Abb. 8). Als Proform mit einer Größe von 40 kDa dimerisiert GDF-15 nach Abspaltung der RXXR-Sequenz im rauen ER und wird dann an den Golgi-Apparat weitergeleitet. Nachdem Furin-ähnliche Proteasen das Propeptid vom reifen Peptid abgespalten haben, wird GDF-15 schließlich als 25 kDa großes Protein in die EZM freigesetzt (Bootcov et al., 1997; Fairlie et al., 1999; Bauskin et al., 2000). Zu erwähnen ist, dass für die Faltung und Sezernierung von GDF-15 das Propeptid nicht benötigt wird (Fairlie et al., 2001).

Ein spezifischer TGF- $\beta$ -Rezeptor von GDF-15 konnte bislang nicht identifiziert werden. Eine GDF-15 induzierte Aktivierung der TGF- $\beta$ -Signalkaskade über SMAD-Proteine wird jedoch angenommen (Johnen et al., 2007; Unsicker et al., 2013). Darüber hinaus konnten Whitson et al.

zeigen, dass das pro-angiogenetische Protein „connective tissue growth factor“ (CTGF/CCN2) als Bindungspartner von GDF-15 agiert (Whitson et al., 2013).

Das reife GDF-15 unterliegt einem Polymorphismus auf dem zweiten Exon, das einen Austausch von Histidin (H) zu Aspartat (D) an Position 6 zur Folge hat (Brown et al., 2002a). Dieser H6D-Polymorphismus kann eine Funktionsänderung des Proteins hervorrufen und ist z.B. mit einem verringerten Risiko für das Erkranken an einem Prostata-Karzinom verbunden (Lindmark et al., 2004; Hayes et al., 2006).

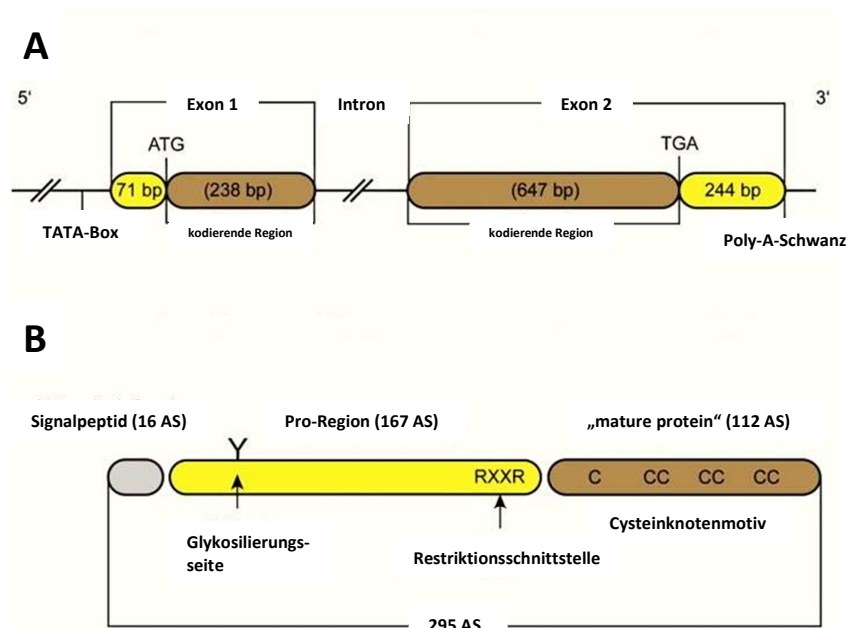


Abb. 8: Genaufbau (A) und Proteinstruktur (B) von GDF-15. Modifiziert nach Unsicker et al. (2013).

### 1.3.1.2 Expression und Funktion von GDF-15

Eine deutliche mRNA-Expression von GDF-15 wurde zunächst in Prostata, Darmschleimhaut, Niere, Lunge, Makrophagen, exokrinen Drüsen und dem Plexus choroideus von Ratten beschrieben (Böttner et al., 1999b). Hohe Protein- und mRNA-Expressionen wurden darüber hinaus in humanem Plazenta-, Haut- und Knorpelgewebe gefunden (Paralkar et al., 1998). Es wird angenommen, dass GDF-15 durch die Expression in einer Vielzahl von verschiedenen Geweben allgemeine und grundlegende zelluläre Funktionen hat (Unsicker et al., 2013).

GDF-15 ist ein stressinduziert sezerniertes Zytokin, das von Makrophagen, Gefäßmuskelzellen, Kardiomyozyten, Adipozyten und Endothelzellen als Antwort auf Gewebsschädigung, Sauerstoffmangel und pro-inflammatorische Zytokine freigesetzt werden kann (Schlittenhardt et

al., 2004; Bauskin et al., 2005; Bermúdez et al., 2008; Ding et al., 2009; Adela and Banerjee, 2015).

Eine erhöhte Expression von GDF-15 wurde bei verschiedenen malignen Erkrankungen, wie z.B. Brust-, Kolon-, Pankreas-, Prostata- und hepatozellulärem Karzinom, gefunden (Si et al., 2011; Adela and Banerjee, 2015). Die hohe GDF-15-Expression im Tumorgewebe korreliert dabei mit einem Anstieg der Serum-GDF-15-Spiegel, weshalb GDF-15-Messungen für die Diagnose, Behandlung und Prognose des Karzinoms von Bedeutung sein könnten (Bootcov et al., 1997; Brown et al., 2003; Liu et al., 2003; Lerner et al., 2015). Es konnte gezeigt werden, dass erhöhte Serum-GDF-15-Spiegel mit dem histopathologischen Malignitätsgrad und der Zellproliferation sowie fortschreitender Metastasierung assoziiert sind (Unsicker et al., 2013).

Im Rahmen von Tumorerkrankungen sind Anorexie und Gewichtsverlust einer der Hauptfaktoren für Morbidität und Mortalität. Es wird vermutet, dass die Tumorkachexie durch Zytokine vermittelt wird (Johnen et al., 2007), die direkt auf die Skelettmuskulatur einwirken (Tsai et al., 2016). Ein direkter Zusammenhang zwischen GDF-15 und tumorassoziiertem Gewichtsverlust wurde bei Patienten mit fortgeschrittenem Prostatakarzinom beschrieben (Johnen et al., 2007). Lerner et al. konnten darüber hinaus zeigen, dass GDF-15 und andere inflammatorische Marker (z.B. IL-6, IL8) bei tumorerkrankten Patienten erhöht sind und dabei mit Gewichtsverlust, Abnahme des Body-Maß-Indexes (BMI) und schlechterem Überleben assoziiert sind (Lerner et al., 2015).

Strelau et al. beschrieben, dass GDF-15 sowohl im ZNS als auch PNS exprimiert und insbesondere von Zellen des Plexus choroideus in den Liquor cerebrospinalis sezerniert wird (Strelau et al., 2000b). Nach ischämischem Hirninfarkt scheint die Induktion der GDF-15-Expression in Neuronen und Mikrogliazellen die Regeneration zu fördern und neuroprotektiven Charakter zu haben (Schindowski et al., 2011).

GDF-15, freigesetzt von Makrophagen und weißem Fettgewebe, fungiert als Regulator des Stoffwechsels, da es als Adipokin wirkt (Ding et al., 2009). Macia et al. fanden heraus, dass GDF-15 die Nahrungsaufnahme, das Körpergewicht sowie die Fettleibigkeit reduziert und gleichzeitig die Glukosetoleranz verbessert (Macia et al., 2012). Bei adipösen und an Typ-2-Diabetes-erkrankten Frauen korreliert der Serum-GDF-15-Spiegel mit BMI, Körperfett, Triglyzeriden, Glukose, glykiertem Hämoglobin A (HbA1c) und C-reaktivem Protein (CRP) (Ding et al., 2009; Dostálová et al., 2009).

GDF-15 wird darüber hinaus auch mit auf der Intensivstation erworbener Muskelschwäche („intensive care unit acquired weakness“, ICUAW) assoziiert. Hier könnte GDF-15 über die Hemmung der Expression muskulärer microRNAs (miRNAs), kurze nicht-kodierende

Genabschnitte, das Ablauen der TGF- $\beta$ -Signalkaskade verstärken und damit die Muskelatrophie fördern (Bloch et al., 2015).

Erhöhte GDF-15-Werte wurden darüber hinaus bei Thalassämien in humanem Serum (Tanno et al., 2010), bei der rheumatoiden Arthritis in humaner Synovia und Serum (Brown et al., 2007), bei der Hepatitis C in Hepatozyten und humanem Serum (Si et al., 2011) und bei der pulmonal-arteriellen Hypertonie in humanem Lungengewebe und Serum (Nickel et al., 2011) nachgewiesen.

### **1.3.1.3 GDF-15 bei kardiovaskulären Erkrankungen**

Zu den kardiovaskulären Erkrankungen zählen Arteriosklerose, Hypertonie, Herzhypertrophie bzw. -insuffizienz, Myokardinfarkt (MI), Koronare Herzerkrankung (KHK), periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK) und Schlaganfall (Adela and Banerjee, 2015).

Die Rolle von GDF-15 in Entzündungsprozessen konnte im Rahmen verschiedener Studien schon früh gezeigt werden. Es wurde hier deutlich, dass GDF-15 von Makrophagen sezerniert wird und autokrin deren weitere Aktivierung hemmt (Bootcov et al., 1997; Fairlie et al., 1999). Der anti-inflammatorische Effekt im Rahmen von Herzinfarkten und Arteriosklerose wurde unter Verwendung verschiedener Tiermodelle deutlich (Breit et al., 2011; Kempf et al., 2011). GDF-15 reguliert die IL-6-vermittelte Entzündungsantwort bei Gefäßschädigungen (Bonaterra et al., 2012) und hat einen hemmenden Einfluss auf die Angiogenese (Whitson et al., 2013). Erhöhte Werte von GDF-15 wurden mit einer Aktivierung des Endothels und Gefäßentzündung assoziiert, die auf diese Weise zur Entstehung und Progression der Arteriosklerose beitragen können (Eggers et al., 2012). Dass GDF-15 mit kardiovaskulärem Risiko verbunden ist, wurde erstmals von Brown et al. beschrieben (Brown et al., 2002b). Auch Dominguez-Rodriguez et al. zeigten, dass erhöhte GDF-15-Werte mit einem höheren Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse assoziiert sind (Dominguez-Rodriguez et al., 2016).

Die Protein- und mRNA-Expression von GDF-15 ist in humanen arteriosklerotischen Gefäßwänden hochreguliert und dort in Makrophagen lokalisiert (Schlittenhardt et al., 2004; Schlittenhardt et al., 2005). In diesem Zusammenhang konnte auch gezeigt werden, dass durch die Stimulation von humanen Makrophagen mit pro-atherogenen Substanzen (z.B. oxidiertes LDL, TNF- $\alpha$ , Wasserstoffperoxid) die Expression von GDF-15 induziert werden kann. Es wird vermutet, dass GDF-15 zur Regulation der Inflammation und Apoptose aktivierter Makrophagen beiträgt. Eine erhöhte Expression von GDF-15 ist dabei über die Apoptoseregulierung vermutlich an der Entwicklung und dem Progress arteriosklerotischer Plaques beteiligt (Schlittenhardt et al., 2004). Bei GDF-15-Defizienz wird die Entstehung der

Arteriosklerose abgeschwächt, bestehende arteriosklerotische Plaques durch Hemmung der CCR2- (CC-Chemokinrezeptor 2) induzierten Chemotaxis von Makrophagen stabilisiert (de Jager et al., 2011) und die Plaquegröße verkleinert (Bonaterra et al., 2012).

Die GDF-15-Expression von Kardiomyozyten ist unter physiologischen Bedingungen nur sehr gering oder gar nicht ausgeprägt (Fairlie et al., 1999; Schober et al., 2001; Xu et al., 2006), steigt jedoch als Antwort auf Drucküberlastung, Herzinsuffizienz, Ischämie, Reperfusion und Arteriosklerose an (Kempf et al., 2006). Ein Maximum der Protein- und mRNA-Expression von GDF-15 in ischämischem Myokardgewebe von Ratten wurde 24 Stunden nach Reperfusion gefunden (Zhang et al., 2016). Hohe Werte von GDF-15 bei Patienten mit einem akuten Myokardinfarkt korrelieren dabei mit einem Anstieg von inflammatorischen Markern (Wollert, 2007; Wollert et al., 2007a; Wollert et al., 2007b; Bonaca et al., 2011; Wollert and Kempf, 2012). Kempf et al. konnten zeigen, dass bei Mäusen das Fehlen von GDF-15 zu einer Zunahme der Infarktgröße und Apoptose führt (Kempf et al., 2006).

GDF-15 wird daher als neuer Biomarker für kardiovaskulären Stress angesehen und ist mit Herzinsuffizienz sowie kardialem Remodeling (z.B. linksventrikuläre Hypertrophie und reduzierte Ejektionsfraktion) assoziiert (Andersson et al., 2016; Meijers et al., 2016). Im Rahmen der Herzinsuffizienz ist GDF-15 bei Patienten unabhängig von der Ejektionsfraktion erhöht (Chan et al., 2016) und dient bei reduzierter Ejektionsfraktion als unabhängiger Prädiktor der Mortalität (Kempf et al., 2007). Chan et al. vermuten, dass neben hämodynamischem Stress und myokardialer Nekrose der entzündliche Stress durch GDF-15 eine wichtige Rolle bei der Entstehung und Progression der Herzinsuffizienz spielt (Chan et al., 2016).

Bei Patienten mit Hypertonie wurden erhöhte Serum-GDF-15-Spiegel gefunden, die mit der Dicke der Hinterwand des linken Ventrikels, des interventrikulären Septums, der linksventrikulären Größe und dem Serum-Noradrenalinspiegel positiv korrelierten (Xu et al., 2014).

## **1.4 Inflammation und Angiogenese**

### **1.4.1 Interleukine, Interferone, Tumor-Nekrose-Faktoren und Wachstumsfaktoren**

Zytokine der Interleukin-, Interferon-, Tumor-Nekrose-Faktor- und Wachstumsfaktorfamilie haben neben pro-inflammatorischen (z.B. IL-1 $\alpha$ , -1 $\beta$ , -3, -6, -7, -12p70, -16, -17, -23, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , G-, GM- und M-CSF), anti-inflammatorischen (z.B. IL-1ra, -4, -10, -13, -27) und Wachstumsfaktor-Eigenschaften (z.B. IL-3, -5, G-, GM- und M-CSF) zahlreiche weitere Funktionen.



IL-1 $\beta$  und IL-6 werden von der Skelettmuskulatur gebildet, als Antwort auf Bewegung freigesetzt (Peake et al., 2015) und sind bei einem Abbau von Muskelmasse erhöht (Costamagna et al., 2015). Während IL-6-defiziente Mäuse eine schwere muskuläre Atrophie zeigen (Londhe and Guttridge, 2015), ist bei Überexpression von IL-6 auch der pro-myogene Faktor IGF-1 in Leber und Muskelgewebe erniedrigt (Ahmed et al., 2007). Pedersen klassifizierte IL-6 als Mitglied der Myokine (Pedersen, 2013). Den Begriff hatten zuvor bereits Haugen et al. in Verbindung mit IL-7 geprägt (Haugen et al., 2010). Zahlreiche andere Interleukine sind bei muskulären Dysfunktionen oder Schädigungen erhöht: Während IL-12 an der Regeneration der Skelettmuskulatur nach Schädigung (Costamagna et al., 2015) beteiligt ist, konnten eine erhöhte IL-17-mRNA-Expression in Muskelbiopsien von Patienten mit Muskeldystrophie Typ Duchenne (Londhe and Guttridge, 2015) und erhöhte Serum-IL-23-Spiegel im Rahmen von z.B. Polymyositis und Dermatomyositis (Lu et al., 2015) nachgewiesen werden. Es konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass die Homöostase und Reparatur der Skelettmuskulatur von IFN- $\gamma$  beeinflusst wird und der Verlust von Muskelmasse mit einem Anstieg der IFN- $\gamma$ -Synthese einhergeht (Costamagna et al., 2015; Londhe and Guttridge, 2015). Des Weiteren verhindert TNF- $\alpha$  im dystrophen Muskel die Regeneration durch Hemmung von Notch1 (Londhe and Guttridge, 2015) und fördert gleichzeitig die Expression des muskulären Atrophiemarkers Fbxo32 (Llovera et al., 1998). Zwischen der Expression und Wirkung von Wachstumsfaktoren und den pro-inflammatorischen Zytokinen TNF und IL-1 sowie von G-CSF und GM-CSF zur IL-17/IL-23-Achse konnte eine enge Verbindung beschrieben werden (Hamilton, 2008). G-CSF spielt dabei für die Entwicklung und Regeneration der Skelettmuskulatur eine zentrale Rolle (Hara et al., 2011). Für das anti-inflammatorische IL-4, das die Synthese pro-inflammatorischer Zytokine (z.B. IL-1 $\alpha$ , -1 $\beta$ , -6, TNF- $\alpha$ ) inhibiert und das Zellwachstum sowie die Zelldifferenzierung reguliert, ist ebenfalls ein Einfluss auf das Muskelwachstum und die -regeneration beschrieben worden (Paul, 1991; Mijatovic et al., 1997; Kelly-Welch et al., 2003; Akdis et al., 2011; Pedersen, 2013; Londhe and Guttridge, 2015). In diesem Zusammenhang ist auch IL-10 zu nennen, das die pro-inflammatorische Zytokinsynthese (z.B. IL-6, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ), die Synthese von CSF (GM-, G-, M-CSF) und Chemokinen (CC- und CXC-Familie) inhibiert (Wang et al., 1995). IL-10 wird von Muskelzellen sezerniert und hat dort regenerativen Charakter (Londhe and Guttridge, 2015).

Pedersen beschreibt, dass die Skelettmuskulatur als sekretorisches und endokrines Organ von großer und bislang unterschätzter Bedeutung ist (Pedersen, 2013). Bei Bewegung im aeroben Bereich konnte er einen systemischen Anstieg von IL-6, IL-1ra und IL-10 zeigen. Das Expressionsmuster wurde bei septischen Zuständen lediglich durch den zusätzlichen Anstieg von TNF- $\alpha$  verändert (Pedersen, 2013).

Pro-atherogene Effekte konnten z.B. für IL-1 $\beta$  und IL-6 (Bonaterra et al., 2012), IL-12 (Ait-Oufella et al., 2011), IL-17 (Ait-Oufella et al., 2011; Taleb et al., 2015) und IL-23 (Abbas et al., 2015) nachgewiesen werden. Ait-Oufella et al. beschreiben darüber hinaus, dass in arteriosklerotischen Plaques hohe IFN- $\gamma$ -Spiegel zu finden sind (Ait-Oufella et al., 2011). IFN- $\gamma$  wirkt sich dabei auf die Cholesterinansammlung in Makrophagen und die Schaumzellbildung sowie auf die Bildung und Ruptur von arteriosklerotischen Plaques aus (Voloshyna et al., 2014). Des Weiteren hat TNF- $\alpha$  sowohl pro-atherogene als auch pro-koagulatorische Eigenschaften und spielt eine Schlüsselrolle in der Pathogenese der Arteriosklerose (Ait-Oufella et al., 2011). M-CSF kann von Epithel- und glatten Muskelzellen in arteriosklerotischen Plaques gebildet werden, hat sich darüber hinaus als einer der stärksten Risikofaktoren für ein negatives Outcome bei Patienten mit stabiler Angina pectoris (AP) herausgestellt und ist bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom (ACS) erhöht (Saitoh et al., 2000; Ait-Oufella et al., 2011).

Anti-atherogene Effekte werden IL-10 (Ait-Oufella et al., 2011; Han and Boisvert, 2015) und IL-5 (Ait-Oufella et al., 2011) zugeordnet. Hirase et al. konnten außerdem zeigen, dass das Fehlen von IL-27 die Bildung von Arteriosklerose in arteriellen Gefäßwänden von Mäusen beschleunigt (Hirase et al., 2013), was eine anti-atherogene Wirkung von IL-27 nahelegt. Bei IL-4 wird derzeit noch über mögliche pro- oder anti-atherogene Effekte kontrovers diskutiert (Ait-Oufella et al., 2011).

#### **1.4.2 Chemokine, VEGFA und Notch1**

Chemokine gehören zur Familie der Zytokine und wurden wegen ihrer chemotaxischen Fähigkeit, Leukozyten in das Entzündungsgebiet zu rekrutieren, erstmals beschrieben. Die etwa 50 bekannten Chemokine lassen sich anhand der Anordnung der ersten beiden N-terminalen Cysteinreste in vier Gruppen unterteilen: CC-, CXC-, CX3C- und C-Motiv Chemokine. Während bei den CC-Chemokinen die Cysteine direkt nebeneinander angeordnet sind, sind sie bei den CXC-Chemokinen durch eine beliebige Aminosäure voneinander getrennt. In der Gruppe der CX3C-Chemokine sind zwischen den Cysteinresten drei Aminosäuren zu finden und bei C-Chemokinen ist nur ein Cysteinrest vorhanden. Des Weiteren kann die CXC-Chemokinfamilie anhand des ELR-Motivs, einer N-terminalen Sequenz aus den Aminosäuren Glu-Leu-Arg vor dem ersten Cystein, unterschieden werden. ELR-positive (ELR<sup>+</sup>) Chemokine (CXCL1, 2, 3, 5, 6, 7, 8) haben pro-angiogenetische Funktionen und werden den ELR-negativen (ELR<sup>-</sup>) Chemokinen (CXCL4, 9, 10, 11, 12, 14) mit anti-angiogenetischen Eigenschaften gegenübergestellt. Darüber hinaus wird CCL2 als weiteres pro-angiogenetisches Chemokin klassifiziert. Viele Chemokine werden bei Entzündungen ausgeschüttet und haben pro-

inflammatorische Funktionen (z.B. CCL1, 2, 3, 4, 5, 12, CXCL1, 2, 9, 10) oder wirken sich auf die Zellhomöostase (z.B. CXCL12, 13) aus (Allen et al., 2007; Mehrad et al., 2007; Zlotnik and Yoshie, 2012; Bachelierie et al., 2014). Chemokine einer Familie können meist an mehrere Chemokinrezeptoren binden und umgekehrt sind die meisten Chemokinrezeptoren in der Lage mit mehreren Chemokinliganden einer Familie zu interagieren. Derzeit werden in der Literatur elf verschiedene CC-Rezeptoren (CCR1-11), sieben verschiedene CXC-Rezeptoren (CXCR1-7), ein CX3C-Rezeptor und ein C-Rezeptor beschrieben (Bachelierie et al., 2014).

Verschiedene Effekte der Chemokine auf die Skelettmuskulatur sind beschrieben worden. So steigt die Genexpression von CCL2 in Skelettmuskelzellen (Peake et al., 2015) und die CXCL1-Spiegel in der Muskulatur (Pedersen, 2013) infolge Bewegung an. In der Pathogenese der Arteriosklerose, der assoziierten koronaren Herzerkrankung (KHK) und bei Malignomen spielen Chemokine eine zentrale Rolle. Sie steuern die Infiltration von Monozyten sowie die Ansammlung von Makrophagen in arteriosklerotischen Plaques (Hartmann et al., 2015) und sind Mediator der Neovaskularisation (Keeley et al., 2008).

VEGFA gehört zur Familie der VEGF-Wachstumsfaktoren, die eine große Bedeutung für die Neoangiogenese und das Tumorwachstum haben. Sie wirken anti-apoptotisch und fördern das Endothelzellenwachstum (Choy et al., 2001; Zachary, 2001). Insgesamt existieren fünf verschiedene Isoformen VEGFA, VEGFB, VEGFC, VEGFD und VEGFE (Neufeld et al., 1999; Petrova et al., 1999; Zachary, 2001).

Vier Notch-Proteine (Notch1 bis 4), die als membranständige transmembranöse Rezeptoren fungieren, sind bei Säugetieren bekannt (Del Amo et al., 1992; Weinmaster et al., 1992; Lardelli et al., 1994). Die eigentlichen Bindungsstellen sind die epidermalen Wachstumsfaktor-Sequenzen (EGF) als große extrazelluläre Domäne (Fehon et al., 1990). In der Entwicklung von Blutgefäßen haben Notch-Proteine eine entscheidende Bedeutung (Krebs et al., 2004). So hängt die frühe Entscheidung, ob ein Gefäß sich arteriell oder venös differenziert, eng mit Notch zusammen (Lawson et al., 2001). Zusätzlich konnte eine Beteiligung von Notch im Rahmen der Tumor-Angiogenese gezeigt werden (Li and Harris, 2005). Die Regeneration im dystrophen Muskel wird durch TNF- $\alpha$ -induzierte Notch1-Hemmung verhindert (Londhe and Guttridge, 2015).

### **1.4.3 Myeloidzellrezeptoren, Komplementfaktoren und Metalloproteinaseninhibitoren**

„Triggering receptor expressed on myeloid cells 1“ (TREM-1) gehört zur TREM-Familie und ist ein Immunrezeptor, der sowohl auf neutrophilen Granulozyten als auch auf Monozyten/Makrophagen exprimiert wird und die angeborene Immunantwort verstärkt. TREM-

1 verstärkt auch die Expression verschiedener pro-inflammatorischer Zytokine, Chemokine, Metalloproteinasen sowie Wachstumsfaktoren (z.B. CCL2, CCL3, CCL7, IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , GM-CSF) und hemmt das anti-inflammatorische Zytokin IL-10. Erhöhte Plasmaspiegel von löslichem TREM-1 konnten bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt (MI) gefunden werden (Lemarié et al., 2015b). Des Weiteren ist TREM-1 an der Einleitung der Zytokinantwort bei Sepsispatienten beteiligt (Bouchon et al., 2001) und kann als Biomarker in der Diagnosefindung der Sepsis eingesetzt werden (Lemarié et al., 2015a).

C5/C5a ist Bestandteil des Komplementsystems und hat zahlreiche immunmodulierende Funktionen, wie z.B. Opsonierung, Zerstörung von mikrobiellen Bestandteilen und Mastzelldegranulation (Patzelt et al., 2015). Es konnte gezeigt werden, dass Komplementfaktoren in hohem Maße in arteriosklerotischen Plaques zu finden sind (Speidl et al., 2011) und bei Patienten mit hohem kardiovaskulären Risiko erhöhte C5a-Konzentrationen vorliegen (Speidl et al., 2005). Wezel et al. beschreiben darüber hinaus eine zentrale Rolle von C5a bei der Ruptur von arteriosklerotischen Plaques (Wezel et al., 2014). Der pro- oder anti-atherogene Effekt von Komplementfaktoren ist jedoch noch nicht eindeutig geklärt und derzeit Gegenstand aktueller Forschung (Patzelt et al., 2015).

„Tissue inhibitor of metalloproteinase 1“ (TIMP-1) hemmt die Funktion von Metalloproteinasen (MMPs), die für den Abbau der Extrazellulärmatrix (EZM) verantwortlich sind. MMPs und TIMPs werden u.a. von Makrophagen und glatten Muskelzellen in arteriosklerotischen Läsionen synthetisiert und freigesetzt (Beaudeau et al., 2003). Studien konnten zeigen, dass Arteriosklerose mit Veränderungen der EZM einhergeht und dass das Gleichgewicht zwischen MMPs und TIMPs für das Fortschreiten und die Plaquestabilität arteriosklerotischer Läsionen eine wichtige Rolle spielt (Peeters et al., 2011; Guo et al., 2015). Di Gregoli et al. beschreiben, dass TIMP-2 eine protektive Rolle in der Pathogenese der Arteriosklerose spielt (Di Gregoli et al., 2016). Bei ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen mit 30-wöchiger cholesterinreicher Fütterung und TIMP-1-Defizienz konnte zudem von Silence et al. eine geringere arteriosklerotische Plauegröße in der thorakalen Aorta im Vergleich zu gleichgefütterten Wildtyp-Tieren gezeigt werden (Silence et al., 2002). Sie vermuteten, dass, resultierend aus der TIMP-1-Defizienz, die verbesserte MMP-Aktivität zur geringeren Plauegröße beitragen könnte (Silence et al., 2002). In einer ähnlichen Studie von Lemaître et al. wurde hingegen bei TIMP-1-defizienten ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen (TIMP-1<sup>-0</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>) mit 10-wöchiger fettreicher Fütterung von keiner Veränderung der Plauegröße, jedoch einer höheren Plaueupturrate in der proximalen Aorta, im Vergleich zu gleichgefütterten Kontroll-Tieren berichtet (Lemaître et al., 2003). Die verstärkte Mediadegeneration könnte daher auf die durch TIMP-1-Defizienz bedingte erhöhte MMP-Aktivität zurückzuführen sein (Lemaître et al., 2003). Vice versa konnte bei

hypercholesterinämischen ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen mit 11-wöchiger fettreicher Fütterung und humaner TIMP-1- bzw. TIMP-2-Überexpression gezeigt werden, dass TIMP-2 die Entstehung atherosklerotischer Plaques und deren Instabilität im Vergleich zu gleichgefütterten ApoE<sup>-/-</sup>-Tieren hemmen kann (Johnson et al., 2006).

## **1.5 Apoptose, Atrophie und ACh-Rezeptoren**

### **1.5.1 Caspase-3, Bax, Bcl2, MuRF1, Fbxo32 und Chrna1**

Caspase-3 (Casp3) gehört zur Familie der Cystein-Proteasen, die Zielproteine spezifisch am C-terminalen Ende von Aspartat spalten können. Sie liegen als inaktive Proenzyme vor und verfügen über die Aminosäuren Cystein und Histidin in ihrem aktiven Zentrum (Thornberry and Lazebnik, 1998; Grütter, 2000). Basierend auf ihren pro-apoptotischen Funktionen können Caspasen in zwei Gruppen eingeteilt werden: Initiator- und Effektorcaspasen. Zur ersten Gruppe gehören Caspase-2, -8, -9, -10 und zur zweiten Gruppe Caspase-3, -6, -7. Die Einleitung der Apoptose erfolgt entweder über Todesrezeptoren (extrinsischer Weg) oder sie wird mitochondrial vermittelt (intrinsischer Weg) (Ghobrial et al., 2005; Ghavami et al., 2009). „Bcl2-associated X protein“ (Bax) gehört zur Familie der Bcl2-Proteine und wirkt über den mitochondrialen (intrinsischen) Weg pro-apoptotisch. Es bindet an die mitochondriale Membran und führt anschließend zur Freisetzung von Cytochrom C aus der inneren Mitochondrienmembran. Cytochrom C wiederum bindet zusammen mit dATP (Desoxyadenosintriphosphat) an Apaf-1 (apoptotischer Protease-Aktivierungsfaktor-1) und aktiviert nun die Caspase-9. Caspase-9 aktiviert die Caspase-3, wodurch die proteolytische Kaskade schließlich in Gang gesetzt wird (Ghobrial et al., 2005; Ghavami et al., 2009). „B-cell leukemia/lymphoma 2“ (Bcl2) gehört zur Gruppe der Bcl2-Proteine und wirkt über den mitochondrialen (intrinsischen) Weg anti-apoptotisch. Es verhindert die Freisetzung von Cytochrom C aus der inneren Mitochondrienmembran durch die Bindung und Inaktivierung von Bax (Ghobrial et al., 2005; Ghavami et al., 2009).

MuRF1 („muscle specific ring finger protein 1“) und das F-Box Substrat-Adapter-Protein Atrogin-1/MAFbx (Fbxo32) gehören zur Klasse der Atrogine. MuRF-Proteine bestehen aus drei strukturell sehr ähnlichen muskelspezifischen RING-Finger-Proteinen (MuRF1, 2, 3). MuRF und Fbxo32 haben dabei die Funktion von E3-Ubiquitinligasen und steuern über die Ubiquitinierung von Proteinen gezielt deren Abbau im Muskel. MuRF- und Fbxo32-Proteine spielen als Teil des Ubiquitin Proteasom Systems (UPS) eine entscheidende Rolle bei der Entstehung von Muskelatrophie und Kachexie im Rahmen von z.B. Diabetes mellitus, Tumorerkrankungen und Niereninsuffizienz. Es konnte gezeigt werden, dass die MuRF1- und

Fbxo32-Genexpression bei Muskelatrophie stark erhöht ist und beide Proteine für die Entstehung der Atrophie von entscheidender Bedeutung sind (Bodine et al., 2001a; Gomes et al., 2001; Clarke et al., 2007; Labeit et al., 2010; Foletta et al., 2011; Gumucio and Mendias, 2013; Bodine and Baehr, 2014; Costamagna et al., 2015; Londhe and Guttridge, 2015). Die Aktivierung von Fbxo32 geht dabei dem Verlust der Muskelmasse voraus (Sukari et al., 2016). Es konnte außerdem festgestellt werden, dass Fbxo32 als Biomarker für Kachexie eingesetzt werden kann, da es spezifisch in atrophischer Muskulatur aktiviert ist (Tisdale, 2005). Des Weiteren wird die Expression von Fbxo32 durch das pro-inflammatorische Zytokin TNF- $\alpha$  gefördert (Llovera et al., 1998).

Acetylcholin kann an zwei unterschiedliche Rezeptorklassen binden. Man unterscheidet nikotinerge (nAChR) von muskarinergen Acetylcholinrezeptoren (mAChR). Die nikotineren AChR werden wiederum in den muskulären und neuronalen Typ unterteilt. Der adulte muskuläre AChR ist ein Pentamer und besteht aus den Untereinheiten  $\alpha 1$ ,  $\beta 1$ ,  $\delta$  und  $\epsilon$ , die von den Genen *Chrna1*, *Chrn1*, *Chrnd* und *Chrne* kodiert werden. Eine große Bedeutung haben *Chrn*-Gene in Zusammenhang mit myasthenen Syndromen (Cruz et al., 2014a, 2014b). Von Johansson et al. konnte bei *LDLr<sup>-/-</sup>*-Mäusen mit nikotinergem Acetylcholinrezeptor-Knockout ( $\alpha 7$ nAChR) und 8-wöchiger 1,25%iger cholesterinhaltiger Fütterung histologisch vermehrt arteriosklerotische Plaques der Aortenwurzel im Vergleich zu gleichgefütterten *LDLr<sup>-/-</sup>*-Tieren gezeigt werden (Johansson et al., 2014). Das cholinerge Signal über nAChR scheint somit den Krankheitsprozess der Arteriosklerose in der Aorta zu beeinflussen (Johansson et al., 2014). In einer ähnlichen Studie von Kooijman et al. mithilfe des gleichen Mausmodells und 7-wöchiger 0,25%iger cholesterinhaltiger Fütterung konnte das Ergebnis hingegen nicht bestätigt werden (Kooijman et al., 2015).

## 1.6 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit soll der Einfluss von GDF-15 bei Hypercholesterinämie auf die Gen- und Proteinexpression im *M. gastrocnemius* in einem Mausmodell für experimentelle Arteriosklerose (*ApoE<sup>-/-</sup>*) untersucht werden.

Nach Kreuzung von *GDF-15<sup>-/-</sup>*- und *ApoE<sup>-/-</sup>*-Mäusen standen folgende Genotypen zur Verfügung: *GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>* (Wildtyp), *GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>*, *GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>* und *GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>*. Im Alter von zehn Wochen wurden die Tiere mit einem standardisierten cholesterinreichen Futter (CHF) über einen Zeitraum von 12 und 20 Wochen gefüttert. Anschließend wurde der *M. gastrocnemius* entnommen und RNA sowie Proteine isoliert.

Die mRNA-Expression von relevanten Genen für Inflammation, Apoptose, Angiogenese, Atrophie und nikotinerge Acetylcholin-Rezeptoren (AChR) wurde mithilfe quantitativer Real-Time RT-PCR (qRT-PCR) untersucht. Auf Proteinebene wurden im Skelettmuskel u.a. pro-/anti-inflammatorische Zytokine, Wachstumsfaktoren und pro-/anti-angiogenetische Chemokine mittels „Proteome Profiler™ Mouse Cytokine Array Kit“-System quantifiziert. Die Ergebnisse sollen auch im Zusammenhang mit dem Gewicht sowie den Serum-Cholesterin- und -Triglyzeridspiegeln der Mäuse betrachtet werden.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Geräte, Verbrauchsmaterial, Chemikalien, Primer, Fertigsysteme, Software und Internetdienste

#### 2.1.1 Geräte

In der folgenden Tabelle werden die in dieser Arbeit verwendeten Geräte alphabetisch mit den dazugehörigen Herstellerangaben aufgeführt.

Tab. 5: Verwendete Geräte und Herstellerangaben.

<b>Geräte</b>	<b>Hersteller</b>
Bioanalyzer 2100	Agilent Technologies Inc., Santa Clara, USA
Biofuge Fresco	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Brutschrank B 5042	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Bunsenbrenner FIREBOY plus	Integra Biosciences GmbH, Fernwald
Chip Priming Station	Agilent Technologies Inc., Santa Clara, USA
Magnetrührer IKAMAG <sup>®</sup> RET-GS	IKA <sup>®</sup> -Werke GmbH & Co. KG, Staufen
MJ-Research PTC-200 Thermocycler	Global Medical Instrumentation Inc., Ramsey, USA
NanoDrop <sup>®</sup> 2000C UV/Vis-Spektralphotometer	Thermo Scientific, Schwerte
ELISA-Reader Sunrise	Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim
Plattformschüttler Promax 1020	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach
Fusion SL-4	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Thermoshaker PHMT-PSC-15	Grant Instruments Ltd., Cambridge, UK
Thermocycler Mx3005P QPCR System	Agilent Technologies Inc., Santa Clara, USA
UV Sterilizing PCR Workstation	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Vortexer MS 3	IKA <sup>®</sup> -Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Zentrifuge Perfect Spin P	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Zentrifuge Pico 17	Heraeus Holding GmbH, Hanau
VF2 Rüttler	Janke&Kunkel IKA Labortechnik, Staufen



### 2.1.2 Verbrauchsmaterial

In der folgenden Tabelle werden die in dieser Arbeit verwendeten Verbrauchsmaterialien alphabetisch mit den dazugehörigen Herstellerangaben aufgeführt.

Tab. 6: Verwendete Verbrauchsmaterialien und Herstellerangaben.

<b>Material</b>	<b>Hersteller</b>
96-Well-Platte	Agilent Technologies Inc., Santa Clara, USA
Pierce™ 96-Well-Platte	Thermo Scientific, Schwerte
Verschlussstreifen für 96-Well-Platte	Agilent Technologies Inc., Santa Clara, USA

### 2.1.3 Chemikalien

In der folgenden Tabelle werden die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien alphabetisch mit den dazugehörigen Herstellerangaben aufgeführt.

Tab. 7: Verwendete Chemikalien und Herstellerangaben.

<b>Reagenzien/ Substanzen</b>	<b>Hersteller</b>
Aceton	Merck KGaA, Darmstadt
Aqua ad iniectabilia	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Chloroform	Merck KGaA, Darmstadt
dNTP-Mix (100 mM)	Agilent Technologies Inc., Santa Clara, USA
Dulbecco's Phosphat-Buffered Saline (DPBS) without Ca <sup>2+</sup> and Mg <sup>2+</sup>	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Ethanol 10 %	AppliChem GmbH, Darmstadt
Ethanol 70 %	AppliChem GmbH, Darmstadt
Ethanol 75 %	AppliChem GmbH, Darmstadt
Ethanol 95 %	AppliChem GmbH, Darmstadt
Ethanol 100 %	AppliChem GmbH, Darmstadt
Flüssigstickstoff	Linde AG, München
Guanidinhydrochlorid 0,3 M	USB Corp., Ohio, USA
H <sub>2</sub> O u.p. (Ultrapur®)	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Isopropanol	AppliChem GmbH, Darmstadt
Natriumcitrat 0,1 M	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS) 1 %	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Oligo(dT) <sub>18</sub> Primer (0,5 µg/µl)	Thermo Scientific, Schwerte

peqGold TriFast™	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
RiboLock® RNase Inhibitor	Thermo Scientific, Schwerte
RNase AWAY®	Molecular Bio Products, San Diego, USA
Tissue-TEK®	Sakura, Tokio, Japan
Triton™ X-100	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA

#### 2.1.4 Primer

In der folgenden Tabelle werden die in dieser Arbeit verwendeten Primer alphabetisch aufgeführt. Die Primer wurden von der Firma Qiagen GmbH (Hilden, Deutschland) bezogen.

Tab. 8: Verwendete Primer, Symbol, Amplikonlänge (bp) und Katalognummer.

<b>Primer</b>	<b>Symbol</b>	<b>Amplikonlänge (bp)</b>	<b>Katalognummer</b>
Actin, beta	Actb	77	QT01136772
B-cell leukemia/lymphoma 2	Bcl2	104	QT02392292
Bcl2-associated X protein	Bax	78	QT00102536
Caspase-3	Casp3	150	QT01164779
Cholinergic receptor, nicotinic, alpha polypeptide 1 (muscle)	Chrna1	94	QT00109942
F-box protein 32	Fbxo32	103	QT00158543
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Gapdh	144	QT01658692
Interleukin 1β	IL-1β	150	QT01048355
Interleukin 6	IL-6	128	QT00098875
Notch homolog 1, translocation-associated (Drosophila)	Notch1	102	QT00156982
Ribosomal protein L32	Rpl32	88	QT01752387
Ribosomal protein, large, P0	Rplp0	125	QT00249375
Tripartite motif-containing 63/Muscle-specific ring finger protein 1	Trim63/ MuRF1	106	QT00291991
Vascular endothelial growth factor A	VEGFA	117	QT00160769

### 2.1.5 Fertigsysteme

In der folgenden Tabelle werden die in dieser Arbeit verwendeten Fertigsysteme (Kits) alphabetisch mit den dazugehörigen Herstellerangaben aufgeführt.

Tab. 9: Verwendete Fertigsysteme (Kits), Inhalt und Herstellerangaben.

<b>Kit</b>	<b>Inhalt</b>	<b>Hersteller</b>
AffinityScript Multiple Temperature cDNA Synthesis Kit	AffinityScript Multiple Temperature Reverse Transcriptase 10x AffinityScript RT Puffer 100 mM DTT	Agilent Technologies Inc., Santa Clara, USA
Brilliant III Ultra-Fast SYBR <sup>®</sup> Green QPCR Master Mix Kit	2x Brilliant III Ultra-Fast SYBR <sup>®</sup> Green QPCR Master Mix ROX Reference Dye (1mM)	Agilent Technologies Inc., Santa Clara, USA
DNase I Kit	DNase I, RNase-frei 10x Reaktionspuffer (100 mM Tris, 25 mM MgCl <sub>2</sub> , 1 mM CaCl <sub>2</sub> , pH 7,5) EDTA (50 mM)	Thermo Scientific, Schwerte
Pierce <sup>™</sup> BCA Protein Assay Kit	Albumin-Standard 2 mg/ml (Rinderserumalbumin (BSA), Natriumchlorid 0,9 %, Natriumazid) Working Reagent A (Natriumcarbonat, Natriumbicarbonat, Bicinchoninsäure und Natriumtartrat in Natriumhydroxid (0,1 M)) Working Reagent B (Kupfersulfat 4 %)	Thermo Scientific, Schwerte
Proteome Profiler <sup>™</sup> Antibody Array (Mouse Cytokine Array) Kit	Membranen Mouse Cytokine Array Panel A Array Buffer 4 Array Buffer 6 25x Wash Buffer Concentrate Detection Antibody Cocktail, Mouse Cytokine Array Panel A Streptavidin-HRP Chemi Reagent 1 Chemi Reagent 2 Auffangschale	R&D Systems, Minneapolis, USA

RNA 6000 Nano Kit	Transparente Folie Agilent RNA 6000 Nano Chips Elektronenreiniger-Chips Agilent RNA 6000 Ladder RNA Nano Dye Konzentrat Agilent RNA 6000 Nano Marker Agilent RNA 6000 Nano Gel Matrix	Agilent Technologies Inc., Santa Clara, USA
-------------------	---	--

### 2.1.6 Software und Internetdienste

In der folgenden Tabelle wird die in dieser Arbeit verwendete Software alphabetisch mit den dazugehörigen Herstellerangaben aufgeführt.

Tab. 10: Verwendete Software und Herstellerangaben.

<b>Software</b>	<b>Hersteller</b>
Citavi 5.2.0.8	Swiss Academic Software GmbH, Wädenswil, Schweiz
ELISA-Software Magellan	Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim
Fusion-Capt 16.09B	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
ImageJ	National Institutes of Health, Bethesda, USA
Microsoft Excel 2010	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Microsoft Word 2010	Microsoft Corporation, Redmond, USA
MxPro QPCR Software	Agilent Technologies Inc., Santa Clara, USA
NormFinder	Molecular Diagnostic Laboratory, Dept. of Molecular Medicine, Aarhus University Hospital, Skejby, Denmark
Sigma Plot 12.0	Systat Software GmbH, Erkrath, Deutschland

## 2.2 Tiere

Die verwendeten Mäuse entstammen der C57BL/6-Serie. Die Züchtung erfolgte in der Interfakultären Biomedizinischen Forschungseinrichtung (IBF) der Universität Heidelberg. Bei den Tieren wurde das GDF-15-Gen ( $GDF-15^{-/-}/ApoE^{+/+}$ ), das ApoE-Gen ( $GDF-15^{+/+}/ApoE^{-/-}$ ) oder beide Gene ( $GDF-15^{-/-}/ApoE^{-/-}$ ) ausgeschaltet. Als Kontrolle dienen Mäuse des Wildtyps ( $GDF-15^{+/+}/ApoE^{+/+}$ ). Die Genehmigung des Tierversuchsantrags erfolgte durch das Regierungspräsidium in Karlsruhe (Aktenzeichen: 35-9185.81/G-99/06).

### 2.2.1 Generierung

Mithilfe eines LacZknockin-Konstrukts wurden GDF-15-defiziente Tiere generiert und anschließend mit ApoE-Knockout-Mäusen gekreuzt (Strelau et al., 2009) (s. Abb. 9).

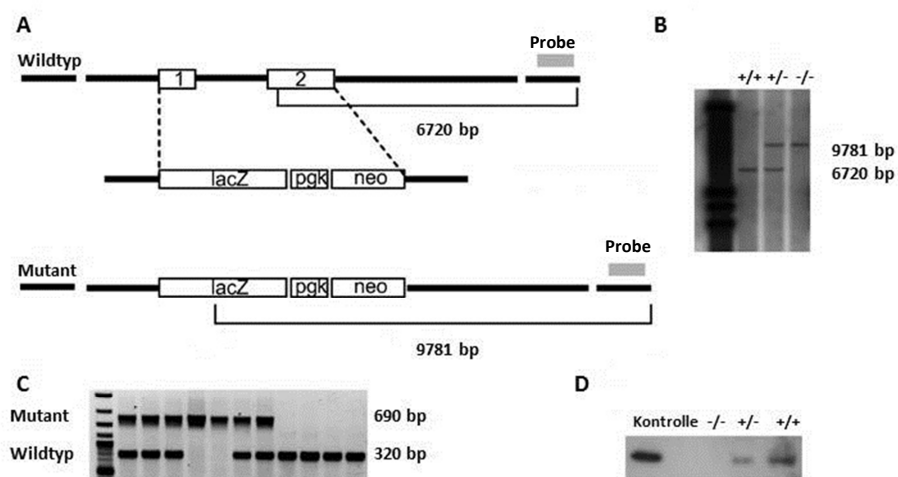


Abb. 9: Generierung GDF-15-defizienter Mäuse unter Anwendung des LacZknockin-Konstrukts. **A**, Struktur des GDF-15-Gens und Strategie zur Deletion. **B**, **C**, Southern Blot und PCR-Analyse. Es werden heterozygote, GDF-15-defiziente und Wildtyp-Genotypen gezeigt. **D**, Western-Blot-Analyse des Nierengewebes aller Genotypen. Unter Verwendung eines Peptidantikörpers gegen GDF-15 wurde das Fehlen von GDF-15 in den Knockout-Tieren belegt. Modifiziert nach Strelau et al. (2009).

### 2.2.2 Gruppen

Die Entstehung und Progression arteriosklerotischer Läsionen wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten im Alter von 21 und 29 Wochen untersucht. Ab einem Alter von neun Wochen wurden die Mäuse dazu für einen Zeitraum von 12 bzw. 20 Wochen mit einem

cholesterinreichen Futter (CHF; Western Diet) gefüttert. Die eingesetzten Tiergruppen sind im Anhang aufgeführt (s. Tab. 15, Tab. 16, Tab. 26 und Tab. 27).

### **2.2.3 Fütterung**

Das cholesterinreiche Futter (TD.88137, Harlan Teklad, Madison, USA) enthält 17,3 % Protein, 48,5 % Kohlenhydrate und 21,2 % Fett (0,2 % Cholesterin).

### **2.2.4 Gewicht und Blutentnahme**

Das Gewicht der Mäuse wurde vor Gabe des CHFs nach neun Wochen und zum Zeitpunkt 12 bzw. 20 Wochen CHF bestimmt. Blutproben wurden vor Gabe des CHF nach neun Wochen und nach 12 bzw. 20 Wochen CHF entnommen. Dazu wurde der linke Ventrikel der Tiere mit einer Kanüle punktiert. Die Serum-Cholesterin- und -Triglyzeridspiegel konnten nach Abzentrifugation der zellulären Bestandteile bestimmt werden. Die Höhe des Gesamtcholesterins wurde dabei mit der „enzymatic-endpoint“-Methode (Randox Laboratories, Crumlin, United Kingdom) und die der Triglyzeride mit der GPO-PAP-Methode („glycerol-3-phosphate oxidase-peroxidase“; Randox Laboratories, Crumlin, United Kingdom) bestimmt. Die Rohdaten über Körpergewicht und Blutlipide wurden von der Arbeitsgruppe Kinscherf im Institut für Anatomie und Zellbiologie der Universität Heidelberg erhoben.

### **2.2.5 Gewinnung und Präparation des Gewebes**

Nach einer Fütterungszeit von 12 bzw. 20 Wochen mit CHF wurden die Tiere mittels Isofluran (Forene®; Fa. Abbot, Schweiz) anästhesiert. Anschließend erfolgte eine Eröffnung des Sternums, Kanülierung des linken Ventrikels mit Ankleben eines Katheters und Inzision des rechten Vorhofs. Bis zum Erreichen der Blutleere wurde eine auf 39 °C erwärmte Kochsalzlösung über den vorhandenen Katheter verabreicht. Die Mm. gastrocnemii wurden präpariert, in Tissue-TEK® eingebettet und in flüssigstickstoffgekühltem Isopentan bei -120 °C schockgefroren (kryofixiert). Anschließend erfolgte bis zur weiteren Verwendung die Lagerung bei -80 °C.

## 2.3 Genexpression

Die Expression eines zu bestimmenden Gens lässt sich mit der quantitativen Real-Time Reversen-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) messen.

Zu Beginn wurde die Ribonukleinsäure (RNA) aus den vorhandenen Muskelproben der verschiedenen Tiere gewonnen und anschließend in cDNA („complementary DNA“) umgeschrieben. Der nächste Schritt beinhaltete die Durchführung der quantitativen Real-Time Reversen-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR), die die gewünschten DNA-Sequenzen des zu untersuchenden Zielgens vervielfältigt. Die Menge der entstandenen DNA wurde anschließend mithilfe eines Fluoreszenzfarbstoffs quantitativ bestimmt.

### 2.3.1 Gewebegewinnung

Die gefrorenen Muskelproben wurden von Tissue-TEK<sup>®</sup> befreit und anschließend mit zuvor autoklavierten Mörsern und Stößeln, die in Flüssigstickstoff gekühlt wurden, zerkleinert. Das Gewebe wurde dann in ein steriles Cup gegeben.

### 2.3.2 RNA-Aufbereitung mit peqGold TriFast™

Das verwendete peqGold TriFast™ besteht zu gleichen Teilen aus Phenol und Guanidinisothiocyanat in einer einphasigen Lösung. Nach Hinzugabe von Chloroform lassen sich nach Zentrifugation drei Phasen separieren: Während die obere, flüssige Phase RNA enthält, befindet sich die DNA in der Inter- sowie organischen Phase und die Proteine nur in der organischen Phase (Chomczynski and Sacchi, 2006). Die RNA wurde anschließend entnommen und bei -80 °C gelagert. Die Proteine und DNA wurden ebenfalls zur weiteren Verwendung tiefgefroren.

#### Durchführung

##### 1. Homogenisierung

- a) Gewebe mit 1 ml peqGOLD TriFast™ aufnehmen
- b) in ein RNase freies Cup überführen
- c) 5fache Spritzenpassage mittels Tuberkulinspritze

## 2. Phasentrennung

- a) Stehen lassen bei Raumtemperatur 5 min
- b) Zugabe von 200 µl Chloroform und vortexen 15 sec
- c) Stehen lassen bei Raumtemperatur 5 min
- d) Zentrifugation bei 12000 x g und 4 °C 10 min
- e) Abnehmen der oberen Phase und Überführen in neues Cup
- f) Einfrieren der Inter- und organischen Phase zur weiteren Verwendung
- g) Wiederholung der Schritte b)-e)

## 3. RNA-Präzipitation

- a) Zugabe von 500 µl Isopropanol und vortexen 15 sec
- b) Bei 4 °C stehen lassen 15 min
- c) Zentrifugation bei 12000 x g und 4 °C 30 min

## 4. Waschen der RNA

- a) Abpipettieren des Isopropanolüberstands
- b) Pellet mit 500 µl Ethanol 70% waschen und vortexen
- c) Zentrifugation bei 12000 x g und 4 °C 5 min

## 5. Lösen der RNA

- a) Überstand abpipettieren
- b) Pellet lufttrocknen 30 min
- c) Pellet in 20 µl H<sub>2</sub>O u.p./RNasin (100 µl/1 µl-40 U) aufnehmen
- d) RNA-Inkubation bei 60 °C 10 min

Lagern der RNA bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung.

### 2.3.3 NanoDrop® 2000c UV/Vis-Spektralphotometer

Die Konzentration und Qualität der RNA jeder Muskelprobe wurde mittels NanoDrop®-2000c-Spektralphotometer (Thermo Scientific) bestimmt. Die Qualität der RNA konnte dabei anhand des Extinktionskoeffizienten  $A_{280/260}$  ermittelt werden. Liegt der Wert zwischen 1,8 und 2, gilt



die Lösung als rein (Desjardins and Conklin, 2010). Pro Probe konnten zwischen 0,1 und 2,2  $\mu\text{g}$  RNA/ $\mu\text{l}$  bei einem Extinktionskoeffizienten zwischen 1,8 und 2 gewonnen werden.

### 2.3.4 Bioanalytiker

Die Messung der RNA-Integrität erfolgte mithilfe des RNA-6000-Nano-Kits (Agilent Technologies) und dem Bioanalytiker 2001 (Agilent Technologies). Hierbei handelt es sich um eine Mikro-Kapillarelektrophorese, mit deren Hilfe bereits kleine Mengen an RNA detektiert werden können. Sowohl die Qualität als auch die Quantität der RNA können bestimmt werden. Die RNA-Integritätsnummer (RIN) spiegelt dabei die Unversehrtheit der RNA wider. Der Qualität wird eine Zahl auf der Skala von 1 bis 10 zugeordnet. 1 bedeutet, dass die RNA vollständig degradiert ist, während 10 die vollständig intakte RNA repräsentiert (Fleige and Pfaffl, 2006; Schroeder et al., 2006). Die RNA wird ausgehend von ihrem Molekulargewicht aufgetrennt (5S-, 18S-, 28S-Untereinheit) und als digitales Elektropherogramm dargestellt (s. Abb. 10). Bei den zu untersuchenden Proben ließ sich die RIN nicht immer bestimmen.

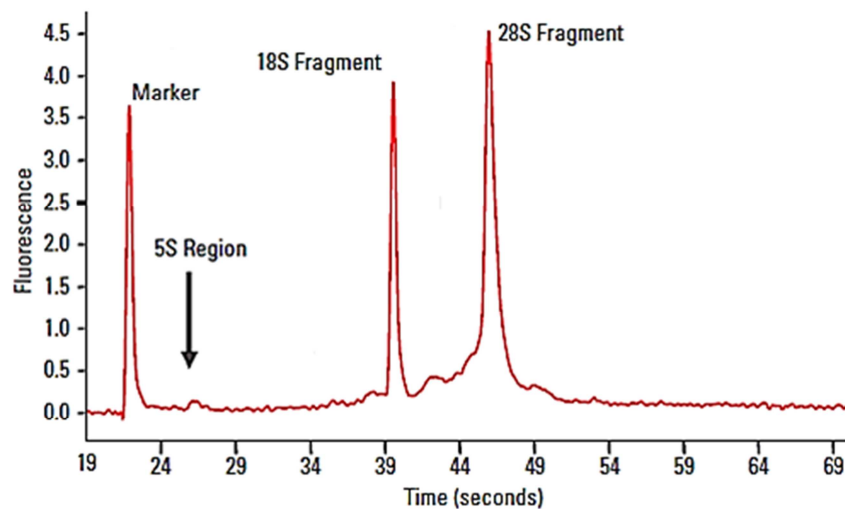


Abb. 10: Exemplarische Darstellung eines Elektropherogramms. Es können RNA-Konzentration, 28S-/18S-Verhältnis und das RNA-Integritätsmaß (RIN) bestimmt werden. Modifiziert nach Mueller et al. (2004).

### 2.3.5 DNase-Verdau

Möglicherweise vorhandene genomische DNA-Verunreinigungen wurden in den einzelnen RNA-Lösungen der Proben abgebaut. Verwendet wurde das DNase I Kit (Thermo Scientific).

Die Reaktion wurde mit EDTA gestoppt und die DNase I bei 65 °C inaktiviert. Zur Anwendung kam der MJ Research PTC-200 Thermocycler (Global Medical Instrumentation).

Durchführung:

1. Langsames Auftauen der Proben
2. 1 µg RNA jeder Probe mit H<sub>2</sub>O u.p. auf 7,5 µl auffüllen
3. Zugabe von 1 µl 10x Reaktionspuffer (100 mM Tris, 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7,5)
4. Zugabe von 1,5 µl DNase I (1 U/µl)
5. Inkubation bei 37 °C 30 min
6. Zugabe von 1 µl (EDTA 50 mM) zum Stoppen der Reaktion
7. Inaktivieren der DNase bei 65 °C 10 min

Die Proben wurden anschließend zur sofortigen Weiterverwendung auf Eis gelagert.

### 2.3.6 Synthese von cDNA aus mRNA

Die Umsetzung der aus den Muskeln gewonnenen mRNA in cDNA erfolgte mittels der Reversen-Transkriptase-Reaktion. Verwendet wurde dabei das „AffinityScript-Multiple-Temperature-cDNA-Synthesis-Kit“-System (Agilent Technologies). Die Reaktion wurde im Thermocycler MJ Research PTC-200 (Global Medical Instrumentation) durchgeführt.

Durchführung:

1. Langsames Auftauen der Proben auf Eis
2. Zugabe von 1 µl Oligo(dT)<sub>18</sub>-Primer (100 µM, 0,5 µM/µl) zur RNA-Lösung
3. Auffüllen mit H<sub>2</sub>O u.p. auf 13,7 µl
4. Inkubation der Proben bei 65 °C 5 min
5. Abkühlen bei Raumtemperatur 10 min
6. Zugabe von:
  - a) 2 µl 10x „AffinityScript RT“-Puffer
  - b) 2 µl DTT (100 mM)

- c) 0,8 µl dNTP-Mix (100 mM)
  - d) 1 µl „AffinityScript Multiple Temperature Reverse Transcriptase“
  - e) 0,5 µl RiboLock<sup>®</sup> RNase-Inhibitor (40 U/µl)
7. Inkubation des Gesamtansatzes (20 µl) bei 42 °C 60 min
8. Inaktivierung der Reversen Transkriptase bei 70 °C 15 min

Die Proben wurden zur sofortigen Weiterverwendung auf Eis gelagert.

### 2.3.7 Quantitative Real-Time RT-PCR (qRT-PCR)

Die Vervielfältigung der DNA kann bei der quantitativen Real-Time RT-PCR mitverfolgt werden. Benutzt wurde das „Brilliant-III-Ultra-Fast-SYBR<sup>®</sup>-Green-QPCR-Master-Mix-Kit“-System (Agilent Technologies). Die Replikation gewünschter DNA-Sequenzen erfolgte dabei mittels Taq-Polymerase. Sichtbar gemacht wurde die neu synthetisierte DNA mithilfe von SYBR<sup>®</sup> Green I, einem fluoreszierenden Farbstoff, der mit der DNA interkaliert. Als Schwellenzyklus (threshold cycle; Ct; Zyklusschwellenwert) wird der Punkt bezeichnet, ab dem die Fluoreszenz signifikant die des Hintergrunds übersteigt und detektiert werden kann. Die benötigten Zyklen zeigen sich dabei umgekehrt proportional zu der zu Beginn der Reaktion vorhandenen DNA-Kopien (Higuchi et al., 1993). Der Nachteil des Fluoreszenzfarbstoffs besteht darin, dass er auch unspezifisch an doppelsträngige DNA (dsDNA) binden kann. Die Reaktion wurde im Thermocycler Mx3005P QPCR System (Agilent Technologies) durchgeführt (s. Tab. 11) und mit der Software MxPro QPCR (Agilent Technologies) ausgewertet.

#### Vorbereitungen:

1. Verdünnen der cDNA-Lösungen mit H<sub>2</sub>O u.p. auf 1:20
2. Verdünnen der Proben der Standardkurve mit H<sub>2</sub>O u.p. auf 1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320. Ein Mix aus den cDNAs der verwendeten Proben wurde als Vorlage genutzt.
3. Zugabe von 6 µl „ROX Reference Dye“ (1:100 verdünnt mit H<sub>2</sub>O u.p.) zum „Brilliant-III-Ultra-Fast-SYBR<sup>®</sup>-Green-QPCR Master Mix“
4. Ansetzen der PCR-Lösung:
  - 7,5 µl des angesetzten 2x „Brilliant III Ultra-Fast SYBR<sup>®</sup> Green QPCR Master Mix“ (Taq-DNA-Polymerase, dNTPs, Mg<sup>2+</sup>, Puffer, SYBR<sup>®</sup> Green I)

- 1 µl H<sub>2</sub>O u.p.
- 1,5 µl des jeweiligen Primers

Verwendung von 10 µl dieser Lösung pro Well.

Durchführung

1. Pipettieren von je 5 µl cDNA der Proben und des Standards in Doppelbestimmung in 96-Well-Platte
2. Pipettieren von 5 µl H<sub>2</sub>O u.p. als Negativkontrolle in ein freies Well
3. Pipettieren von je 10 µl der „SYBR<sup>®</sup>-Green-QPCR“-Lösung in jedes verwendete Well
4. Verschluss der Platte mit Verschlussstreifen
5. Zentrifugation der Platte bei 1000 x g 2 min
6. Start der Reaktion

Tab. 11: Amplifizierungsprogramm der quantitativen Real-Time RT-PCR (qRT-PCR) im Thermocycler Mx3005P QPCR System (Agilent Technologies). Darstellung der Reaktion, Temperatur (°C), Zeit (sec) und Zyklen-Anzahl.

Reaktion	Temperatur (°C)	Zeit (sec)	Zyklen-Anzahl
Initiale Denaturierung	95	180	1
Denaturierung	95	10	40
Primerbindung (Annealing)/ Elongation	60	20	
Schmelzkurvenanalyse	95	60	1
	55	30	} 20 min 1
	bis	...	
	95	30	

**2.3.8 Validierung der qRT-PCR**

Die Schmelzkurvenanalyse wird am Ende der PCR durchgeführt. Sie ermöglicht die Überprüfung der korrekten Amplifikation der PCR-Produkte. Hierbei wird die Temperatur schrittweise von 55 °C auf 95 °C erhöht. Die DNA-Doppelstränge werden erneut aufgetrennt und der zuvor gebundene Farbstoff freigesetzt. Die Fluoreszenz nimmt in der Folge ab. Die Schmelzpunkte von unspezifischen PCR-Produkten unterscheiden sich von den spezifischen

Amplifikationsprodukten durch die niedrigere Schmelztemperatur und können auf diese Weise differenziert werden.

Einige Stichproben wurden abschließend zur Kontrolle der Amplifikation auf ein 2%iges Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt.

#### **2.4 Normalisierung von Expressionsdaten**

Eine Normalisierung der Expression des zu untersuchenden Gens unter Verwendung eines zuvor ermittelten Referenzgens gleicht mögliche Unterschiede in der Qualität und Quantität der RNA der verschiedenen Proben aus. Es sollten Gene verwendet werden, die unabhängig von Einflussfaktoren wie Alter, Fütterung, Behandlung und Gewebetyp gleichmäßig exprimiert werden (Thellin et al., 1999). In den letzten Jahren wurde festgestellt, dass die Expression der Referenzgene je nach Gewebe stark variieren kann und deshalb das Referenzgen individuell bestimmt werden sollte (Stern-Straeter et al., 2009). Es existieren verschiedene Methoden zur Normalisierung der erhobenen Daten (Huggett et al., 2005). Die häufigste Anwendung ist die Normalisierung über Referenzgene. Die mögliche Variation bei der Aufbereitung der Proben findet sich dabei sowohl beim Ziel- als auch beim Referenzgen wider.

Auf ihre Stabilität wurden vier Referenzgene getestet:  $\beta$ -Aktin (ACTB), Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), „ribosomal protein L32“ (RPL32) und „ribosomal protein, large, P0“ (RPLP0).

Die Auswertung erfolgte mit der NormFinder-Software (Aarhus University Hospital), mit deren Hilfe die Varianz der Genexpression errechnet und eine Rangfolge der getesteten Referenzgene dargestellt werden kann (Andersen et al., 2004).

#### **2.5 Proteinexpression**

Die Menge verschiedener Zytokine und Chemokine in einer Probe lässt sich mithilfe des „Proteome Profiler™ Antibody Array Kit“-Systems (R&D Systems) messen.

Zu Beginn wurden die Proteine aus den Proben der verschiedenen Tiere gewonnen. Anschließend wurde die Proteinmenge der einzelnen Proben bestimmt und ein Pool von Proteinen der jeweiligen Gruppe gebildet. Der nächste Schritt beinhaltete die Durchführung des Proteome Profiler™ Antibody Arrays.

### 2.5.1 Proteinaufbereitung

Die wässrige Phase, die die RNA enthält, wurde bereits verwendet. Die in den Proben und der jeweiligen organischen Phase vorhandenen Proteine wurden von der DNA getrennt. Die Proteinlösungen wurden anschließend zur weiteren Verwendung bei -20 °C tiefgefroren. Die DNA wurde ebenfalls aufgehoben und bei 4 °C gelagert.

#### Durchführung:

##### 1. DNA-Präzipitation

- a) Zugabe von 0,3 ml Ethanol 100 % pro eingesetztem ml TriFast™
- b) Mischen und Inkubation bei Raumtemperatur 3 min
- c) Zentrifugation bei 2000 x g und 4 °C 15 min

##### 2. Waschen der DNA

- a) Phenol/Ethanol-Überstand entfernen und bei 4 °C lagern
- b) Waschen des DNA-Pellets mit 1 ml Natriumcitrat (0,1 M) in Ethanol 10 %
- c) Inkubation bei Raumtemperatur 30 min
- d) Zentrifugation bei 2000 x g und 4 °C 5 min
- e) Wiederholen der Schritte b)-d)
- f) Zugabe von 2 ml Ethanol 75 %
- g) Lagern der Proben bei 4 °C

##### 3. Protein-Präzipitation

- a) Zugabe von Aceton zum Phenol/Ethanol-Überstand (Aceton:Phenol/Ethanol-Überstand-Verhältnis 3:1)
- b) Inkubation bei Raumtemperatur 10 min
- c) Zentrifugation bei 12000 x g und 4 °C 10 min

##### 4. Waschen der Proteine

- a) Überstand entfernen
- b) Waschen des Protein-Pellets mit 2 ml Guanidinhydrochlorid (0,3 M) in Ethanol 95 %
- c) Inkubation bei Raumtemperatur 20 min

- d) Zentrifugation bei 7500 x g und 4 °C 5 min
- e) Zweimaliges Wiederholen der Schritte b)-d)
- f) Vortexen des Protein-Pellets in 2 ml Ethanol 100 %
- g) Inkubation bei Raumtemperatur 20 min
- h) Zentrifugation bei 7500 x g und 4 °C 5 min

#### 5. Lösen der Proteine

- a) Ethanol vollständig entfernen
- b) Trocknen des Protein-Pellets im leichten Vakuum 10 min
- c) SDS 1 % zugeben und lösen
- d) Inkubation bei 50 °C 5 min
- e) Zentrifugation bei 10000 x g und 4 °C 10 min
- f) Proteinüberstand in neues Cup überführen

### 2.5.2 Proteinkonzentrationsbestimmung

Zur Konzentrationsbestimmung der Proteine der einzelnen Proben wurde das „Pierce™ BCA Protein Assay Kit“-System (Thermo Scientific) verwendet. Der Test beruht auf dem Prinzip, dass Bicinchoninsäure (2,2'-Bichinolin-4,4'-dicarbonsäure; „bicinchoninic acid“; BCA) als Komplexbildner für Kupfer fungiert. Es laufen zwei Reaktionen hintereinander ab: Im alkalischen Bereichen bilden Proteine einen Komplex, wenn  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen vorhanden sind. Anschließend wird  $\text{Cu}^{2+}$  zu  $\text{Cu}^+$  reduziert. Das einfach geladene  $\text{Cu}^+$  führt nach Verbindung mit zwei Molekülen BCA zu einem violetten Farbumschlag (Smith et al., 1985). Die Absorption ist bei 562 nm messbar.

- 1. Proteine + Kupfer ( $\text{Cu}^{2+}$ ) →  $\text{Cu}^+$ -Komplex
- 2.  $\text{Cu}^+$ -Komplex + BCA → violetter BCA-  $\text{Cu}^+$ -Komplex

Der Proteingehalt der Proben wird in Bezug auf einen Rinderserumalbumin-Standard („bovine serum albumin“; BSA) berechnet. Der Nachweisbereich an Protein liegt bei Verwendung dieser Methode zwischen 125 und 2000  $\mu\text{g/ml}$ .

Durchführung:

1. Ansetzen der BSA-Protein-Standards (Proteingehalt zwischen 0 und 2000 µg/ml)
2. Ansetzen des „Working Reagent“ (WR): 1 Teil Reagenz A und 1/50 Teil Reagenz B
  - a) WR A: Natriumcarbonat, Natriumbicarbonat, Bicinchoninsäure und Natriumtartrat in Natriumhydroxid (0,1 M)
  - b) WR B: Kupfersulfat 4 %
3. Pipettieren von BSA-Protein-Standard, Proben (2fache Bestimmung) und Triton™ X-100 (Leerwert) je 10 µl in eine 96-Well-Mikrotiterplatte
4. Zugabe von 200 µl WR
5. Kurzes vortexen der Mikrotiterplatte
6. Inkubation bei 37 °C 30 min
7. Stehen lassen bei Raumtemperatur 5 min
8. Messung der Extinktion bei 562 nm

Anhand einer Kalibrierungskurve konnten anschließend die gemessenen Extinktionswerte in die Proteinmenge umgerechnet werden. Dazu wurde durch die Werte der Kalibrierkurve eine Ausgleichsgerade gelegt, die den Nullpunkt schneidet. Die Gleichung dieser Ausgleichsfunktion diente schließlich dazu, aus den gemittelten Extinktionswerten der jeweiligen Probe die Proteinmenge zu errechnen (s. Abb. 11). Die Mittelwerte der Extinktion der Leerwerte von Triton™ X-100 wurden zuvor von den Proben abgezogen.



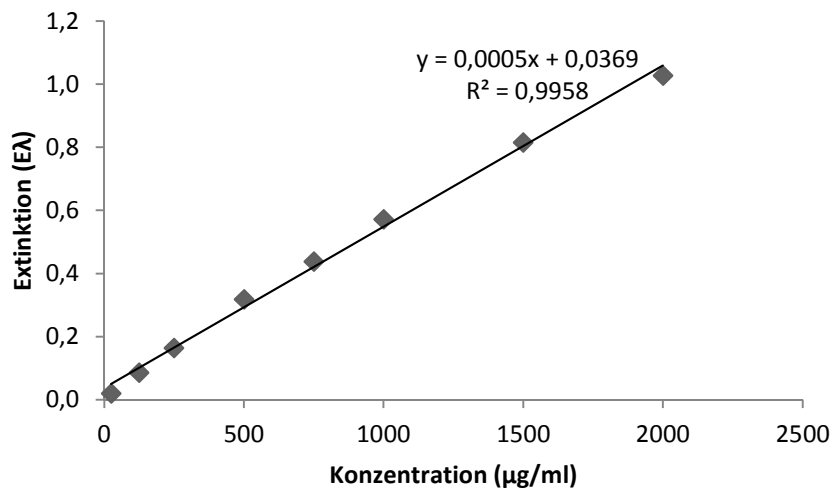


Abb. 11: Beispiel einer Kalibrierungskurve zur Proteinkonzentrationsbestimmung. Dargestellt sind Ausgleichsgerade und Ausgleichsfunktion zur Berechnung der Proteinmenge der Proben mittels gemessener Extinktion bei 562 nm. Konzentration (µg/ml), Extinktion (Eλ).

Die Messung und Auswertung erfolgte mittels ELISA („Enzyme-linked Immunosorbent Assay“)-Reader (Tecan Deutschland) und der ELISA-Software Magellan (Tecan Deutschland).

### 2.5.3 Erstellen von Gruppen-Proteinpools

Protein-Pools der verschiedenen Tiergruppen wurden gebildet. Dazu wurden jeweils gleiche Mengen an Protein pro Tier der jeweiligen Gruppe und Fütterungsdauer verwendet (s. Tab. 12). Die gepoolten Tiergruppen wurden anschließend auf ein einheitliches Volumen mit PBS/Triton™ X-100 1% aufgefüllt. Anschließend wurde erneut eine Bestimmung der Proteinkonzentration mithilfe des „Pierce™ BCA Protein Assay Kit“-Systems (Thermo Scientific) durchgeführt.

Tab. 12: Gruppen-Proteinpools. Darstellung der Tiergruppen, Fütterungsdauer (Wochen), Anzahl der Tiere (n=), der verwendeten Proteinmenge pro Tier ( $\mu\text{g}$ ) und Gesamtproteinmenge pro Gruppe ( $\mu\text{g}$ ).

Fütterung (Wochen)	Gruppe	Anzahl Tiere (n=)	Proteinmenge/Tier ( $\mu\text{g}$ )	Proteinmenge/ Gruppe ( $\mu\text{g}$ )
12	GDF-15 <sup>+/+</sup> /ApoE <sup>+/+</sup>	4	55	220
	GDF-15 <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>+/+</sup>	5	44	220
	GDF-15 <sup>+/+</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>	4	55	220
	GDF-15 <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>	6	36,7	220
20	GDF-15 <sup>+/+</sup> /ApoE <sup>+/+</sup>	5	60	300
	GDF-15 <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>+/+</sup>	4	75	300
	GDF-15 <sup>+/+</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>	5	60	300
	GDF-15 <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>	5	60	300

#### 2.5.4 Proteome Profiler™ Antibody Array

Zur parallelen Messung 40 verschiedener Zytokine und Chemokine in einer Probe (s. Tab. 13) wurde das „Proteome Profiler™ Antibody Array Kit“-System (R&D Systems) verwendet (s. Abb. 12). Es handelt sich um einen membranbasierten Sandwich-Immunoassay. Zu den gepoolten Gruppen wurde ein biotinyliertes Antikörpergemisch zur Detektion zugegeben. Das Gemisch wurde anschließend auf einer mit duplizierten Erstantikörpern beschichteten Nitrozellulose-Membran inkubiert. Die Bindung der in der Probe vorhandenen Zytokine und Chemokine erfolgt über den biotinylierten Detektionsantikörper und den membrangebundenen Erstantikörper. Zur Detektion dient schließlich das Signal eines chemolumineszenten Reagenz, dass mittels Fusion SL-4-Kamerasystem (Peqlab Biotechnologie) aufgenommen wurde. Der chemolumineszente Stoff ist dabei Substrat der Meerrettichperoxidase („horseradish peroxidase“; HRP). Die Meerrettichperoxidase ist wiederum an Streptavidin gebunden, das stark an biotinylierte Antikörper bindet. Das erzeugte Signal ist proportional zur gebundenen Menge an Protein. Die Expositionszeit betrug zehn Minuten. Der Hersteller empfiehlt, zwischen 100-300  $\mu\text{g}$  Protein pro Membran zu verwenden.

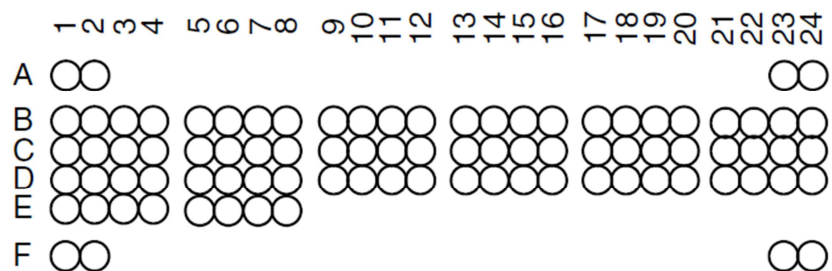


Abb. 12: Schematische Darstellung einer Proteome-Profiler™-Antibody-Array-Kit-Membran (R&D Systems). Jeder Punkt entspricht einem Zytokin oder Chemokin, das in Duplikaten angeordnet ist. A1/2, A23/24 sowie F1/2 stellen Positiv- und F23/24 Negativkontrollen dar.

Tab. 13: Übersicht über die getesteten Zytokine, Chemokine und Positiv-/Negativkontrollen.

<b>Koordinate</b>	<b>Rezeptor</b>	<b>Koordinate</b>	<b>Rezeptor</b>
A1, A2	Positivkontrolle	C17, C18	IL-16
A23, A24	Positivkontrolle	C 19, C20	IL-17
B1, B2	CXCL13 (BLC)	C21, C22	IL-23
B3, B4	C5/C5a	C23, C24	IL-27
B5, B6	G-CSF	D1, D2	CXCL10 (IP-10)
B7, B8	GM-CSF	D3, D4	CXCL11 (I-TAC)
B9, B10	CCL1 (I-309)	D5, D6	CXCL1 (KC)
B11, B12	CCL11 (Eotaxin)	D7, D8	M-CSF
B13, B14	sICAM-1	D9, D10	CCL2 (JE; MCP-1)
B15, B16	IFN- $\gamma$	D11, D12	CCL12 (MCP-5)
B17, B18	IL-1 $\alpha$	D13, D14	CXCL9 (MIG)
B19, B20	IL-1 $\beta$	D15, D16	CCL3 (MIP-1 $\alpha$ )
B21, B22	IL-1ra	D17, D18	CCL4 (MIP-1 $\beta$ )
B23, B24	IL-2	D19, D20	CCL5 (MIP-2)
C1, C2	IL-3	D21, D22	CCL5 (RANTES)
C3, C4	IL-4	D23, D24	CXCL12 (SDF-1)
C5, C6	IL-5	E1, E2	CCL17 (TARC)
C7, C8	IL-6	E3, E3	TIMP-1
C9, C10	IL-7	E5, E6	TNF- $\alpha$
C11, C12	IL-10	E7, E8	TREM-1
C13, C14	IL-13	F1, F2	Positivkontrolle
C15, C16	IL-12p70	F23, F24	Negativkontrolle

Vorbereitung:

1. „Mouse Cytokine Array Panel A Detection Antibody Cocktail“ in 100 µl destilliertem Wasser lösen
2. 40 ml „Wash Buffer“ in 960 ml destilliertes Wasser geben

Durchführung:

1. Substanzen auf Raumtemperatur bringen, die Proben auf Eis auftauen
2. Pipettieren von 2 ml „Array Buffer 6“ in jede Kammer der Auffangschale
3. Zugabe der Membranen in die entsprechende Kammer
4. Inkubieren auf dem Schüttler bei Raumtemperatur 60 min
5. Zugabe von 0,5 ml „Array Buffer 4“ zu den Proben
6. Auffüllen der Proben mit „Array Buffer 6“ auf 1,5 ml
7. Zugabe von 15 µl „Mouse Cytokine Array Panel A Detection Antibody Cocktail“
8. Inkubieren bei Raumtemperatur 60 min
9. Entfernen des „Array Buffer 6“ aus den Kammern der Auffangschale
10. Zugabe der vorbereiteten Protein-Pools auf die Membranen
11. Inkubation auf dem Schüttler über Nacht bei 4 °C
12. Entnahme der Membranen aus Auffangschale
13. Waschen der Membranen auf dem Schüttler in separaten 10 min  
Schalen mit 20 ml „Wash Buffer“
14. 2faches Wiederholen von Schritt 13.
15. Kammern der Auffangschale mit destilliertem Wasser waschen
16. Verdünnen von Streptavidin-HRP-Antikörper in „Array Buffer 6“ (Verdünnung 1:2000)
17. Zugabe von 2 ml in jede Kammer der Auffangschale
18. Zugabe der Membranen in Auffangschale
19. Inkubation auf dem Schüttler bei Raumtemperatur 30 min
20. Wiederholen von Schritt 12.-14.

21. „Chemi Reagent 1“- mit „Chemi Reagent 2“-Lösung mischen
22. 1 ml „Chemi Reagent“-Mix auf jede Membran geben
23. Membranen mit Kunststofffolie bedecken
24. Inkubation bei Raumtemperatur 1 min
25. Entfernen der Kunststofffolie und des „Chemi Reagent“-Mix
26. Membranen mit Frischhaltefolie bedecken
27. Fotografie mittels Fusion SL-4

## 2.6 Auswertung

### 2.6.1 Quantitative Real-Time RT-PCR (qRT-PCR)

Die Ergebnisse der quantitativen Real-Time RT-PCR (qRT-PCR) wurden durch Verwendung der Standardkurvenmethode quantifiziert. Aus der Verdünnungsreihe des cDNA-Mixes aus allen zu untersuchenden Proben wurde eine Standardkurve erstellt. Mittels linearer Regressionsanalyse konnte dann die cDNA-Konzentration der einzelnen Proben berechnet werden.

Mithilfe der NormFinder-Software (Aarhus University Hospital) wurde die Varianz der Genexpression bei den getesteten Housekeeping-Genen berechnet. Als besonders stabil stellte sich hierbei  $\beta$ -Aktin (ACTB) heraus (s. Tab. 14). Deshalb wurden die Ergebnisse der getesteten Gene auf das konstitutiv exprimierte  $\beta$ -Aktin normalisiert. Die mRNA-Genexpression der Wildtyp-Mäuse (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>; 12 bzw. 20 Wochen CHF) im M. gastrocnemius wurde auf den Wert 1 gesetzt und die Mittelwerte der Ergebnisse anschließend relativ dazu berechnet.

Tab. 14: Darstellung der getesteten Housekeeping-Gene und deren Varianz mithilfe der NormFinder-Software (Aarhus University Hospital).

<b>Gen</b>	<b>Varianz</b>
ACTB	0,044
RPLP0	0,080
RPLP32	0,083
GAPDH	0,201

### **2.6.2 Proteome Profiler™ Antibody Array**

Die Auswertung des Proteome Profiler™ Antibody Arrays (R&D Systems) erfolgte durch die gemessenen und gemittelten Signalstärken der in Duplikaten angeordneten Zytokine und Chemokine. Da das erzeugte Signal zu dem in der Probe befindlichem Antigen proportional ist, kann ein relativer Vergleich der Zytokine und Chemokine untereinander erfolgen. Zur Auswertung wurde das Programm ImageJ (National Institutes of Health) verwendet. Das Bild wurde zunächst invertiert und einer Hintergrundkorrektur unterzogen („Process: Subtract Background: Rolling ball radius: 100 pixels“). Des Weiteren wurde unter dem Reiter „Analyze: Set Measurements“ die Felder „Area“, „Standard Deviation“, „Minimal & maximal gray value“, „Integrated density“, „Mean gray value“ und „Median“ ausgewählt. Anschließend erfolgte die Messung, indem um jedes Signal ein gleich großer Kreis gezogen wurde. Die Mittelwerte der „Integrated density“ wurden zunächst aus den Duplikaten gebildet. Die Proteinexpression der Wildtyp-Mäuse (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>; 12 bzw. 20 Wochen CHF) im M. gastrocnemius wurde auf den Wert 1 gesetzt und die Mittelwerte der Ergebnisse anschließend relativ dazu berechnet.

### **2.6.3 Statistische Auswertung**

Die statistische Signifikanz der Ergebnisse der quantitativen Real-Time RT-PCR (qRT-PCR) wurde mit Sigma Plot 12.0 (Systat Software) berechnet. Es wurden der t-Test bei normalverteilten Grundgesamtheiten und bei fehlender Normalverteilung als Rangsummentest der U-Test von Mann und Whitney verwendet. Die Normalverteilung wurde mithilfe des Shapiro-Wilk-Tests untersucht. P-Werte von  $\leq 0,05$  wurden als signifikant gewertet. Die grafische Darstellung der Ergebnisse erfolgte mit Microsoft Excel 2010 (Microsoft Corporation).

### 3 ERGEBNISSE

#### 3.1 Gewicht, Serum-Cholesterin- und -Triglyzeridspiegel

Die Rohdaten des Gewichts, der Serum-Cholesterin- und -Triglyzeridspiegel wurden durch die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Kinscherf im Institut für Anatomie und Zellbiologie der Universität Heidelberg erhoben.

##### 3.1.1 Gewicht

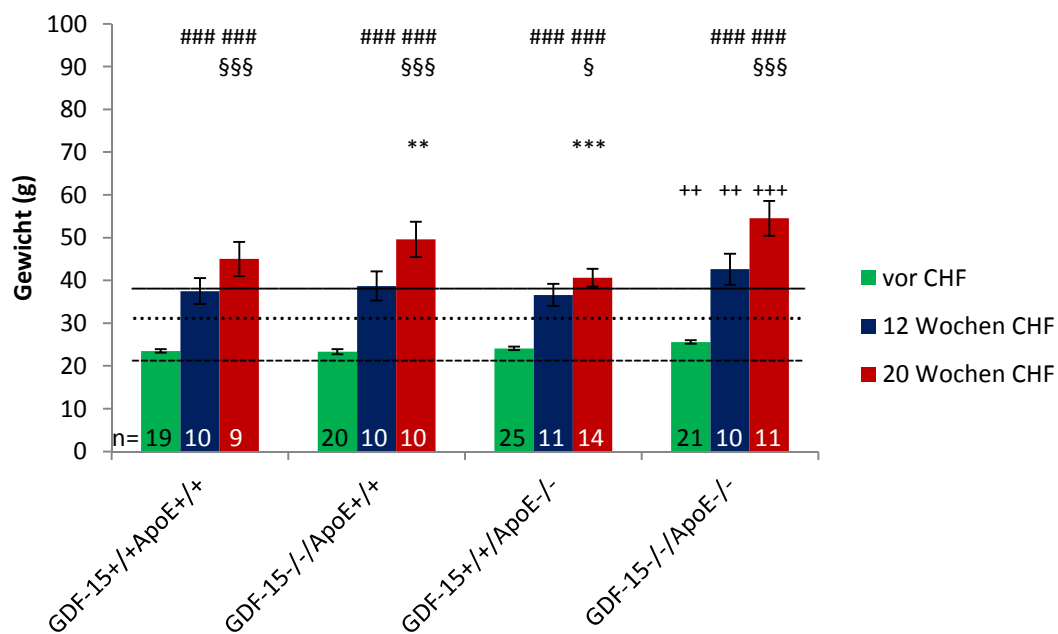


Abb. 13: Tiergewichte (g) der 4 Gruppen vor Gabe des CHFs (Alter der Tiere: 9 Wochen) und nach 12 bzw. 20 Wochen CHF. Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwerts; \*\* $p \leq 0,01$ , \*\*\* $p \leq 0,001$  vs. Wildtyp (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>); ++ $p \leq 0,01$ , +++ $p \leq 0,001$  vs. GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>; ### $p \leq 0,001$  12 bzw. 20 Wochen CHF vs. 9. Woche (vor CHF); § $p \leq 0,05$ , \$\$\$ $p \leq 0,001$  20 Wochen CHF vs. 12 Wochen CHF; -----: Normalgewicht 9. Woche; ..... Normalgewicht 21. Woche; \_\_\_\_: Normalgewicht 29. Woche (aus: [www.criver.com](http://www.criver.com)). In Anlehnung an Kubo (2013).

##### GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup> vs. Wildtyp (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>):

Vor Gabe des CHFs (Alter der Tiere: 9 Wochen) und nach 12 Wochen CHF unterschied sich das Gewicht zwischen GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>- und Wildtyp-Mäusen (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) nicht. Nach 20 Wochen CHF war das Gewicht der GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>-Tiere 10 % ( $p \leq 0,01$ ) höher als bei Wildtyp-Mäusen (s. Abb. 13) (Kubo, 2013).

**GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> vs. Wildtyp (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>):**

Vor Gabe des CHFs (Alter der Tiere: 9 Wochen) und nach 12 Wochen CHF unterschied sich das Gewicht zwischen GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>- und Wildtyp-Mäusen (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) nicht. Nach 20 Wochen CHF war das Gewicht der GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>-Tiere 10 % (p≤0,001) niedriger als bei Wildtyp-Mäusen (s. Abb. 13) (Kubo, 2013).

**Doppelknockout (GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>) vs. GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>:**

Das Gewicht der GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse war vor Gabe des CHFs (Alter der Tiere: 9 Wochen) 6 % (p≤0,01), nach 12 Wochen CHF 16 % (p≤0,01) bzw. nach 20 Wochen CHF 34 % (p≤0,001) höher als bei GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Tieren (s. Abb. 13) (Kubo, 2013).

**Vor Gabe des CHFs (Alter der Tiere: 9 Wochen), 12 und 20 Wochen CHF:**

Die Wildtyp-Mäuse (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) hatten nach 12 Wochen ein 60 % (p≤0,001) und nach 20 Wochen CHF ein 91 % (p≤0,001) höheres Gewicht als vor Gabe des CHFs (Alter der Tiere: 9 Wochen). Nach 20 Wochen CHF war das Gewicht der Wildtyp-Mäuse 20 % (p≤0,001) höher als nach 12 Wochen CHF (s. Abb. 13) (Kubo, 2013).

Bei GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>-Mäusen war das Gewicht nach 12 Wochen CHF 66 % (p≤0,001) und nach 20 Wochen CHF 113 % (p≤0,001) höher als vor Gabe des CHFs (Alter der Tiere: 9 Wochen). Nach 20 Wochen CHF war das Gewicht der GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>-Mäuse 28 % (p≤0,001) höher als nach 12 Wochen CHF (s. Abb. 13) (Kubo, 2013).

Bei GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen war das Gewicht nach 12 Wochen CHF 52 % (p≤0,001) und nach 20 Wochen 68 % (p≤0,001) höher als vor Gabe des CHFs (Alter der Tiere: 9 Wochen). Das Gewicht der GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse war nach 20 Wochen CHF 11 % (p≤0,05) höher als nach 12 Wochen CHF (s. Abb. 13) (Kubo, 2013).

Das Gewicht der GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse war nach 12 Wochen CHF 66 % (p≤0,001) und nach 20 Wochen CHF 113 % (p≤0,001) höher als vor Gabe des CHFs (Alter der Tiere: 9 Wochen). Nach 20 Wochen CHF war das Gewicht der GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse 28 % (p≤0,001) höher als nach 12 Wochen CHF (s. Abb. 13) (Kubo, 2013).



### 3.1.2 Serum-Cholesterinspiegel

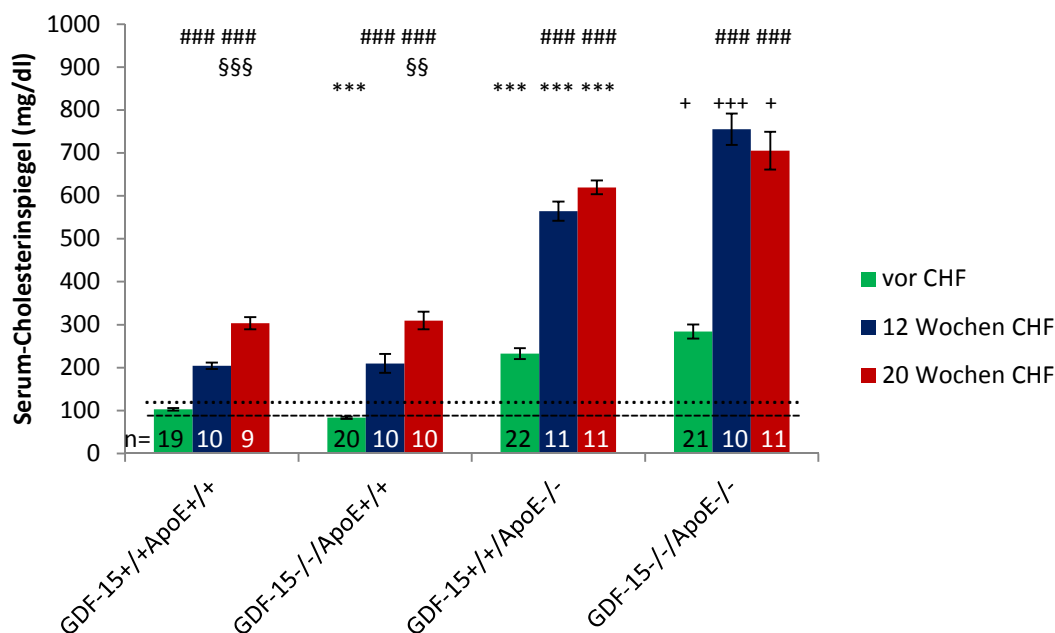


Abb. 14: Serum-Cholesterinspiegel (mg/dl) der 4 Gruppen vor Gabe des CHFs (Alter der Tiere: 9 Wochen) und nach 12 bzw. 20 Wochen CHF. Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwerts; \*\*\* $p \leq 0,001$  vs. Wildtyp (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>); + $p \leq 0,05$ , +++ $p \leq 0,001$  vs. GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>; ### $p \leq 0,001$  12 bzw. 20 Wochen CHF vs. 9. Woche (vor CHF); §§ $p \leq 0,01$ , §§§ $p \leq 0,001$  20 Wochen CHF vs. 12 Wochen CHF; -----: Normalwert Serum-Cholesterinspiegel 9. Woche; .....: Normalwert Serum-Cholesterinspiegel 21. Woche; (aus: [www.criver.com](http://www.criver.com)). In Anlehnung an Kubo (2013).

#### GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup> vs. Wildtyp (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>):

Vor Gabe des CHFs (Alter der Tiere: 9 Wochen) war der Serum-Cholesterinspiegel zwischen GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>- und Wildtyp-Mäusen (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) 19 % ( $p \leq 0,001$ ) niedriger. Nach 12 und 20 Wochen CHF war kein Unterschied zwischen den Serum-Cholesterinspiegeln der GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>- und Wildtyp-Mäuse feststellbar (s. Abb. 14) (Kubo, 2013).

#### GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> vs. Wildtyp (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>):

Der Serum-Cholesterinspiegel der GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse war vor Gabe des CHFs (Alter der Tiere: 9 Wochen) 126 % ( $p \leq 0,001$ ), nach 12 Wochen CHF 177 % ( $p \leq 0,001$ ) bzw. nach 20 Wochen CHF 104 % ( $p \leq 0,001$ ) höher als bei Wildtyp-Mäusen (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) (s. Abb. 14) (Kubo, 2013).

**Doppelknockout (GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>) vs. GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>:**

Vor Gabe des CHFs (Alter der Tiere: 9 Wochen) waren die Serum-Cholesterinspiegel bei GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen 22 % ( $p \leq 0,05$ ), nach 12 Wochen CHF 34 % ( $p \leq 0,001$ ) bzw. nach 20 Wochen CHF 14 % ( $p \leq 0,05$ ) höher als bei GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Tieren (s. Abb. 14) (Kubo, 2013).

**Vor Gabe des CHFs (Alter der Tiere: 9 Wochen), 12 und 20 Wochen CHF:**

Die Wildtyp-Mäuse (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) hatten nach 12 Wochen CHF einen 98 % ( $p \leq 0,001$ ) und nach 20 Wochen CHF einen 195 % ( $p \leq 0,001$ ) höheren Serum-Cholesterinspiegel als vor Gabe des CHFs (Alter der Tiere: 9 Wochen). Nach 20 Wochen CHF war der Serum-Cholesterinspiegel der Wildtyp-Mäuse 49 % ( $p \leq 0,001$ ) höher als nach 12 Wochen CHF (s. Abb. 14) (Kubo, 2013).

Bei GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>-Mäusen war der Serum-Cholesterinspiegel nach 12 Wochen CHF 152 % ( $p \leq 0,001$ ) und nach 20 Wochen CHF 271 % ( $p \leq 0,001$ ) höher als vor Gabe des CHFs (Alter der Tiere: 9 Wochen). Nach 20 Wochen CHF war der Serum-Cholesterinspiegel der GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>-Mäuse 48 % ( $p \leq 0,01$ ) höher als nach 12 Wochen CHF (s. Abb. 14) (Kubo, 2013).

Bei GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen lag der Serum-Cholesterinspiegel nach 12 Wochen CHF 143 % ( $p \leq 0,001$ ) und nach 20 Wochen 166 % ( $p \leq 0,001$ ) höher als vor Gabe des CHFs (Alter der Tiere: 9 Wochen). Der Serum-Cholesterinspiegel der GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse war zwischen 12 und 20 Wochen CHF ähnlich (s. Abb. 14) (Kubo, 2013).

Der Serum-Cholesterinspiegel der GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse war nach 12 Wochen CHF 166 % ( $p \leq 0,001$ ) und nach 20 Wochen CHF 148% ( $p \leq 0,001$ ) höher als vor Gabe des CHFs (Alter der Tiere: 9 Wochen). Die Serum-Cholesterinspiegel der GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse waren zwischen 12 und 20 Wochen CHF ähnlich (s. Abb. 14) (Kubo, 2013).

### 3.1.3 Serum-Triglyzeridspiegel

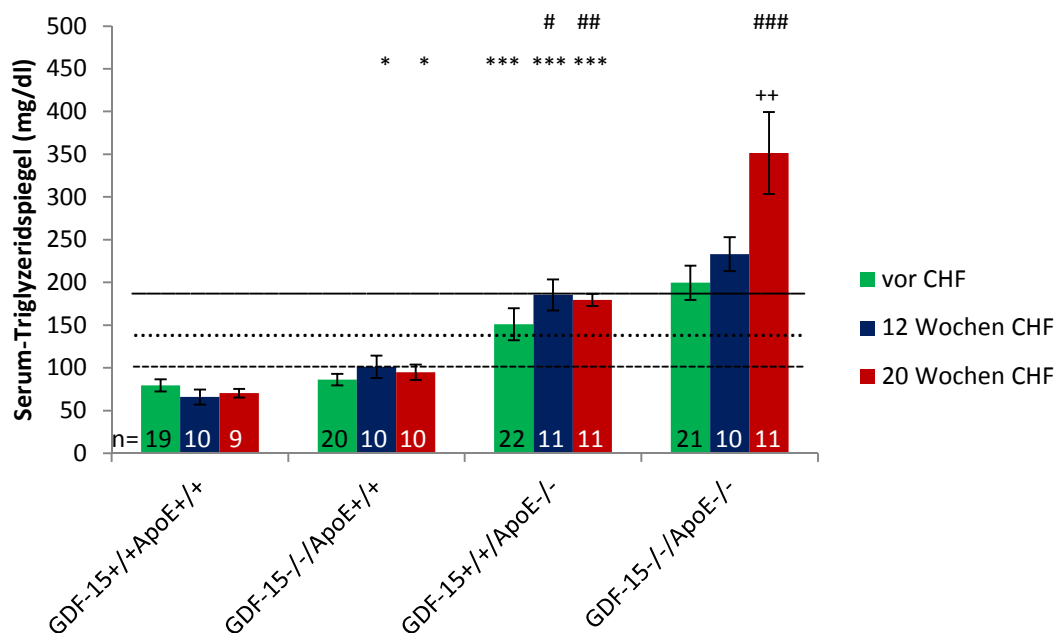


Abb. 15: Serum-Triglyzeridspiegel (mg/dl) der 4 Gruppen vor Gabe des CHFs (Alter der Tiere: 9 Wochen) und nach 12 bzw. 20 Wochen CHF. Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwerts; \* $p \leq 0,05$ , \*\*\* $p \leq 0,001$  vs. Wildtyp (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>); ++ $p \leq 0,01$  vs. GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>; # $p \leq 0,05$ , ## $p \leq 0,01$ , ### $p \leq 0,001$  12 bzw. 20 Wochen CHF vs. 9. Woche (vor CHF); -----: Normalwert Serum-Triglyzeride 9. Woche; .....: Normalwert Serum-Triglyzeridspiegel 21. Woche; \_\_\_\_\_: Normalwert Serum-Triglyzeridspiegel 29. Woche; (aus: [www.criver.com](http://www.criver.com)). In Anlehnung an Kubo (2013).

#### GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup> vs. Wildtyp (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>):

Vor Gabe des CHFs (Alter der Tiere: 9 Wochen) waren die Serum-Triglyzeridspiegel bei GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>- und Wildtyp-Mäusen (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) ähnlich. Nach 12 Wochen CHF waren sie 54 % ( $p \leq 0,05$ ) bzw. nach 20 Wochen CHF 35 % ( $p \leq 0,05$ ) höher als bei Wildtyp-Mäusen (s. Abb. 15) (Kubo, 2013).

#### GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> vs. Wildtyp (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>):

Der Serum-Triglyzeridspiegel der GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse war vor Gabe des CHFs (Alter der Tiere: 9 Wochen) 90 % ( $p \leq 0,001$ ), nach 12 Wochen CHF 181 % ( $p \leq 0,001$ ) bzw. nach 20 Wochen CHF 155 % ( $p \leq 0,001$ ) höher als bei Wildtyp-Mäusen (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) (s. Abb. 15) (Kubo, 2013).

**Doppelknockout (GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>) vs. GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>:**

Vor Gabe des CHFs (Alter der Tiere: 9 Wochen) und nach 12 Wochen CHF war der Serum-Triglyzeridspiegel bei GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>- und GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen ähnlich. Nach 20 Wochen CHF war der Serum-Triglyzeridspiegel bei den GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Tieren 95 % ( $p \leq 0,01$ ) höher als bei GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen (s. Abb. 15) (Kubo, 2013).

**Vor Gabe des CHFs (Alter der Tiere: 9 Wochen), 12 und 20 Wochen CHF:**

Die Wildtyp-Mäuse (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) hatten vor Gabe des CHFs (Alter der Tiere: 9 Wochen) und nach 12 Wochen bzw. 20 Wochen CHF ähnliche Serum-Triglyzeridspiegel. Die Serum-Triglyzeridspiegel der Wildtyp-Mäuse waren zwischen 12 und 20 Wochen CHF ebenfalls ähnlich (s. Abb. 15) (Kubo, 2013).

Bei GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>-Mäusen zeigten sich ähnliche Serum-Triglyzeridspiegel vor Gabe des CHFs (Alter der Tiere: 9 Wochen) und nach 12 bzw. 20 Wochen CHF. Die Serum-Triglyzeridspiegel der GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>-Mäusen waren zwischen 12 und 20 Wochen CHF ebenfalls ähnlich (s. Abb. 15) (Kubo, 2013).

Bei GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen lag der Serum-Triglyzeridspiegel nach 12 Wochen CHF 23 % ( $p \leq 0,05$ ) und nach 20 Wochen 19 % ( $p \leq 0,01$ ) höher als vor Gabe des CHFs (Alter der Tiere: 9 Wochen). Die Serum-Triglyzeridspiegel der GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse waren zwischen 12 und 20 Wochen CHF ähnlich (s. Abb. 15) (Kubo, 2013).

Die Serum-Triglyzeridspiegel der GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse waren vor Gabe des CHFs (Alter der Tiere: 9 Wochen) und nach 12 Wochen CHF ähnlich. Nach 20 Wochen CHF stiegen sie um 76 % ( $p \leq 0,001$ ) an. Die Serum-Triglyzeridspiegel der GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse waren zwischen 12 und 20 Wochen CHF ebenfalls ähnlich (s. Abb. 15) (Kubo, 2013).

## 3.2 Quantitative Real-Time RT-PCR (qRT-PCR)

### 3.2.1 Inflammation

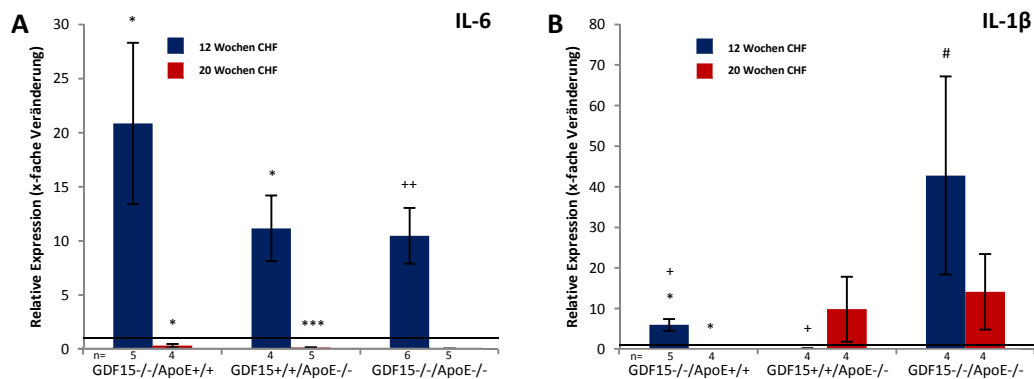


Abb. 16: Quantitative Real-Time RT-PCR (qRT-PCR) der Interleukin 6 (IL-6)- und Interleukin 1β (IL-1β)-Genexpression im M. gastrocnemius nach 12 bzw. 20 Wochen CHF: **A** Interleukin 6 (IL-6) **B** Interleukin 1β (IL-1β). Relative Expression (x-fache Veränderung) im Vergleich zum Wildtyp (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) 12 Wochen CHF (n=4) bzw. 20 Wochen CHF (n=5); mRNA-Genexpressionswert Wildtyp 12 bzw. 20 Wochen CHF auf 1 gesetzt; Mittelwert ± Standardfehler des Mittelwerts; Normalisierung der Ergebnisse auf das Referenzgen β-Aktin (ACTB); \*p≤0,05, \*\*\*p≤0,005 vs. Wildtyp (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>); #p≤0,05 vs. GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>; +p≤0,05, ++p≤0,01 12 Wochen CHF vs. 20 Wochen CHF.

#### 3.2.1.1 Interleukin 6 (IL-6)

##### GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup> vs. Wildtyp (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>):

Bei GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>-Mäusen war die IL-6-Genexpression im M. gastrocnemius nach 12 Wochen CHF 21fach (p≤0,05) höher und nach 20 Wochen CHF 69 % (p≤0,05) niedriger als bei Wildtyp-Mäusen (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) (Wagner et al., 2016) (s. Abb. 16 und Tab. 28).

##### GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> vs. Wildtyp (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>):

Die IL-6-Genexpression im M. gastrocnemius von GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen war nach 12 Wochen CHF 11fach (p≤0,05) höher und nach 20 Wochen CHF 89 % (p≤0,005) niedriger als bei Wildtyp-Mäusen (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) (s. Abb. 16 und Tab. 28).

**Doppelknockout (GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>) vs. GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>:**

Die IL-6-mRNA-Expression im M. gastrocnemius von GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen war nach 12 Wochen CHF 6 % und nach 20 Wochen CHF 89 % niedriger als bei GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen (s. Abb. 16 und Tab. 28).

**12 Wochen CHF vs. 20 Wochen CHF:**

Die IL-6-mRNA-Expression im M. gastrocnemius von Wildtyp-Mäusen war nach 20 Wochen CHF 49fach ( $p \leq 0,05$ ) höher als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 28).

In der Gruppe der GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>-Mäuse war die IL-6-Genexpression im M. gastrocnemius nach 20 Wochen CHF 25 % geringer als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 28).

Bei GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen war die Genexpression von IL-6 im M. gastrocnemius nach 20 Wochen CHF 49 % niedriger als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 28).

Die IL-6-mRNA-Expression im M. gastrocnemius der GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse war nach 20 Wochen CHF 94 % niedriger ( $p \leq 0,01$ ) als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 28).

**3.2.1.2 Interleukin 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )****GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup> vs. Wildtyp (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>):**

Bei GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>-Mäusen war die IL-1 $\beta$ -Genexpression im M. gastrocnemius nach 12 Wochen CHF 6fach ( $p \leq 0,05$ ) höher und nach 20 Wochen CHF 98 % ( $p \leq 0,05$ ) niedriger als bei Wildtyp-Mäusen (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) (Wagner et al., 2016) (s. Abb. 16 und Tab. 29).

**GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> vs. Wildtyp (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>):**

Die IL-1 $\beta$ -Genexpression im M. gastrocnemius von GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen war nach 12 Wochen CHF 86 % niedriger und nach 20 Wochen CHF 10fach höher als bei Wildtyp-Mäusen (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) (Wagner et al., 2014) (s. Abb. 16 und Tab. 29).

**Doppelknockout (GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>) vs. GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>:**

Die IL-1 $\beta$ -mRNA-Expression im M. gastrocnemius von GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen war nach 12 Wochen CHF 301fach ( $p \leq 0,05$ ) und nach 20 Wochen CHF 1,4fach höher als bei GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen (s. Abb. 16 und Tab. 29).

### **12 Wochen CHF vs. 20 Wochen CHF:**

Die IL-1 $\beta$ -mRNA-Expression im M. gastrocnemius von Wildtyp-Mäusen (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) war nach 20 Wochen CHF 5fach höher als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 29).

In der Gruppe der GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>-Mäuse war die mRNA-Expression von IL-1 $\beta$  im M. gastrocnemius nach 20 Wochen CHF 98 % ( $p \leq 0,05$ ) geringer als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 29).

Bei GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen war die Genexpression von IL-1 $\beta$  im M. gastrocnemius nach 20 Wochen CHF 383fach ( $p \leq 0,05$ ) höher als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 29).

Die IL-1 $\beta$ -mRNA-Expression im M. gastrocnemius der GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse war nach 20 Wochen CHF 1,8fach höher als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 29).

### 3.2.2 Apoptose

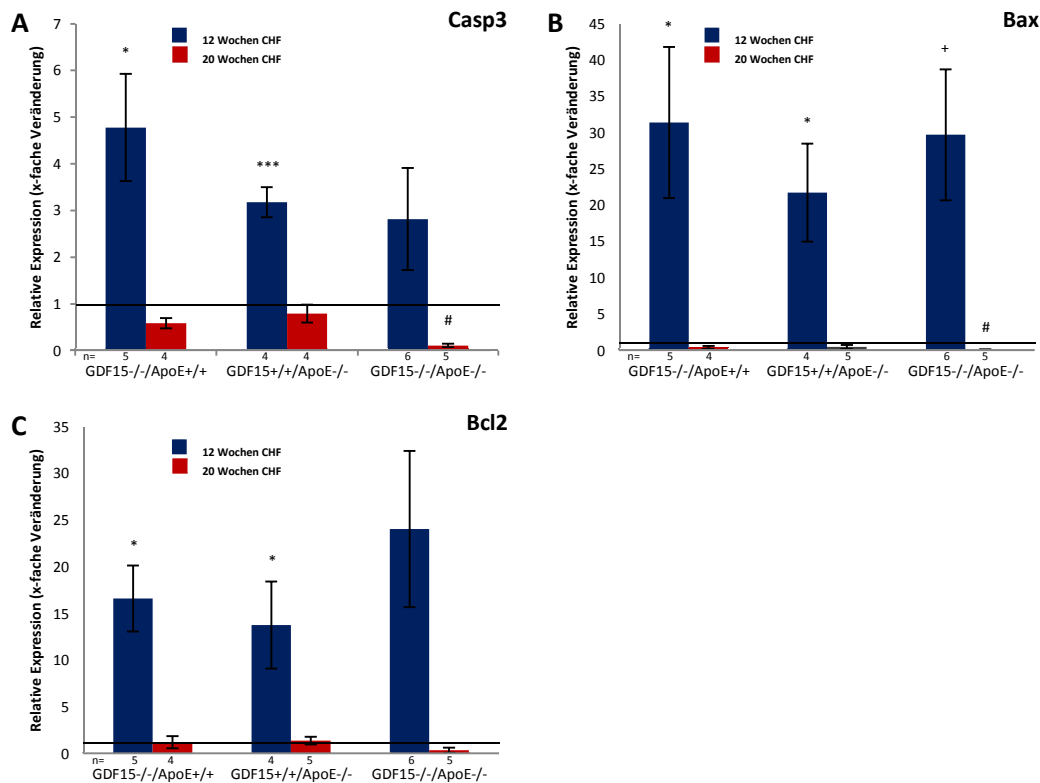


Abb. 17: Quantitative Real-Time RT-PCR (qRT-PCR) der Caspase-3 (Casp3)-, Bcl-associated X protein (Bax)- und B-cell leukemia/lymphoma 2 (Bcl2)-Genexpression im M. gastrocnemius nach 12 bzw. 20 Wochen CHF: **A** Caspase-3 (Casp3) **B** Bcl-associated X protein (Bax) **C** B-cell leukemia/lymphoma 2 (Bcl2). Relative Expression (x-fache Veränderung) im Vergleich zum Wildtyp (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) 12 Wochen CHF (n=4) bzw. 20 Wochen CHF (n=3-5); mRNA-Genexpressionswert Wildtyp 12 bzw. 20 Wochen CHF auf 1 gesetzt; Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwerts; Normalisierung der Ergebnisse auf das Referenzgen  $\beta$ -Aktin (ACTB); \* $p \leq 0,05$ , \*\*\* $p \leq 0,005$  vs. Wildtyp (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>); # $\leq 0,05$  vs. GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>, + $p \leq 0,05$  12 Wochen CHF vs. 20 Wochen CHF.

#### 3.2.2.1 Caspase-3 (Casp3)

##### GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup> vs. Wildtyp (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>):

Bei GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>-Mäusen war die Casp3-Genexpression im M. gastrocnemius nach 12 Wochen CHF 4,8fach ( $p \leq 0,05$ ) höher (Wagner et al., 2014) und nach 20 Wochen CHF 41 % niedriger als bei Wildtyp-Mäusen (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) (s. Abb. 17 und Tab. 30).



**GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> vs. Wildtyp (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>):**

Die Casp3-Genexpression im M. gastrocnemius von GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen war nach 12 Wochen CHF 3,2fach ( $p \leq 0,005$ ) höher (Wagner et al., 2014) und nach 20 Wochen CHF 21 % niedriger als bei Wildtyp-Mäusen (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) (s. Abb. 17 und Tab. 30).

**Doppelknockout (GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>) vs. GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>:**

Die Caspase-3-mRNA-Expression im M. gastrocnemius von GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen war nach 12 Wochen CHF 11 % und nach 20 Wochen CHF 86 % ( $p \leq 0,05$ ) niedriger als bei GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen (s. Abb. 17 und Tab. 30).

**12 Wochen CHF vs. 20 Wochen CHF:**

Die Casp3-mRNA-Expression im M. gastrocnemius von Wildtyp-Mäusen (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) war nach 20 Wochen CHF 5fach höher als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 30).

In der Gruppe der GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>-Mäuse war die mRNA-Expression von Casp3 im M. gastrocnemius nach 20 Wochen CHF 39 % geringer als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 30).

Bei GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen war die Genexpression von Casp3 im M. gastrocnemius nach 20 Wochen CHF 1,2fach höher als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 30).

Die Casp3-mRNA-Expression im M. gastrocnemius der GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse war nach 20 Wochen CHF 81 % niedriger als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 30).

**3.2.2.2 Bcl2-associated X protein (Bax)****GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup> vs. Wildtyp (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>):**

Bei GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>-Mäusen war die Bax-Genexpression im M. gastrocnemius nach 12 Wochen CHF 31,4fach ( $p \leq 0,05$ ) höher (Wagner et al., 2016) und nach 20 Wochen CHF 55 % niedriger als bei Wildtyp-Mäusen (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) (s. Abb. 17 und Tab. 31).

**GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> vs. Wildtyp (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>):**

Die Bax-Genexpression im M. gastrocnemius von GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen war nach 12 Wochen CHF 21,7fach ( $p \leq 0,05$ ) höher und nach 20 Wochen CHF 50 % niedriger als bei Wildtyp-Mäusen (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) (s. Abb. 17 und Tab. 31).

**Doppelknockout (GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>) vs. GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>:**

Die Bax-mRNA-Expression im M. gastrocnemius von GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen war nach 12 Wochen CHF 1,4fach höher und nach 20 Wochen CHF 86 % ( $p \leq 0,05$ ) niedriger als bei GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen (Wagner et al., 2016) (s. Abb. 17 und Tab. 31).

**12 Wochen CHF vs. 20 Wochen CHF:**

Die Bax-mRNA-Expression im M. gastrocnemius von Wildtyp-Mäusen (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) war nach 20 Wochen CHF 46fach ( $p \leq 0,05$ ) höher als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 31).

In der Gruppe der GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>-Mäuse war die mRNA-Expression von Bax im M. gastrocnemius nach 20 Wochen CHF 34 % geringer als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 31).

Bei GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen war die Genexpression von Bax im M. gastrocnemius nach 20 Wochen CHF 1,1fach höher als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 31).

Die Bax-mRNA-Expression im M. gastrocnemius der GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse war nach 20 Wochen CHF 89 % ( $p \leq 0,05$ ) niedriger als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 31).

**3.2.2.3 B-cell leukemia/lymphoma 2 (Bcl2)****GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup> vs. Wildtyp (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>):**

Bei GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>-Mäusen war die Bcl2-Genexpression im M. gastrocnemius nach 12 Wochen CHF 16,6fach ( $p \leq 0,05$ ) und nach 20 Wochen CHF 1,2fach höher als bei Wildtyp-Mäusen (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) (s. Abb. 17 und Tab. 32).

**GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> vs. Wildtyp (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>):**

Die Expression von Bcl2 im M. gastrocnemius von GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen war nach 12 Wochen CHF 13,8fach ( $p \leq 0,05$ ) und nach 20 Wochen CHF 1,4fach höher als bei Wildtyp-Mäusen (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) (s. Abb. 17 und Tab. 32).

**Doppelknockout (GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>) vs. GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>:**

Die Bcl2-mRNA-Expression im M. gastrocnemius von GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen war nach 12 Wochen CHF 1,7fach höher und nach 20 Wochen CHF 74 % niedriger als bei GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen (s. Abb. 17 und Tab. 32).

**12 Wochen CHF vs. 20 Wochen CHF:**

Die Bcl2-mRNA-Expression im M. gastrocnemius von Wildtyp-Mäusen (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) war nach 20 Wochen CHF 17,4fach ( $p \leq 0,05$ ) höher als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 32).

In der Gruppe der GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>-Mäuse war die mRNA-Expression von Bcl2 im M. gastrocnemius nach 20 Wochen CHF 1,3fach höher als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 32).

Bei GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen war die Genexpression von Bcl2 im M. gastrocnemius nach 20 Wochen CHF 1,7fach höher als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 32).

Die Bcl2-mRNA-Expression im M. gastrocnemius der GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse war nach 20 Wochen CHF 74 % niedriger als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 32).

### 3.2.3 Angiogenese

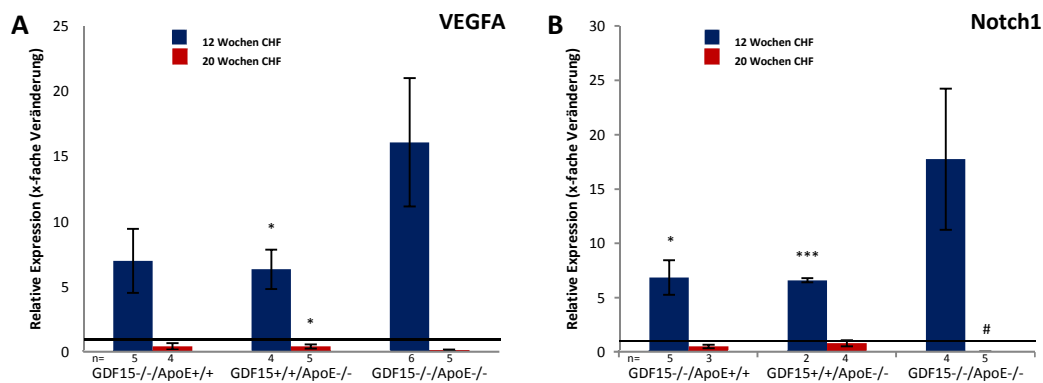


Abb. 18: Quantitative Real-Time RT-PCR (qRT-PCR) der Vascular endothelial growth factor (VEGFA)- und Notch homolog 1, translocation-associated (Drosophila) (Notch1)-Genexpression im M. gastrocnemius nach 12 bzw. 20 Wochen CHF: **A** Vascular endothelial growth factor A (VEGFA) **B** Notch homolog 1, translocation-associated (Drosophila) (Notch1). Relative Expression (x-fache Veränderung) im Vergleich zum Wildtyp (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) 12 Wochen CHF (n=4) bzw. 20 Wochen CHF (n=3-5); mRNA-Genexpressionswert Wildtyp 12 bzw. 20 Wochen CHF auf 1 gesetzt; Normalisierung der Ergebnisse auf das Referenzgen  $\beta$ -Aktin (ACTB); \*p $\leq$ 0,05, \*\*\*p $\leq$ 0,005 vs. Wildtyp (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>); # $\leq$ 0,05 vs. GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>.

#### 3.2.3.1 Vascular endothelial growth factor A (VEGFA)

##### GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup> vs. Wildtyp (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>):

Bei GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>-Mäusen war die VEGFA-Genexpression im M. gastrocnemius nach 12 Wochen CHF 7fach höher und nach 20 Wochen CHF 56 % niedriger als bei Wildtyp-Mäusen (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) (s. Abb. 18 und Tab. 33).

##### GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> vs. Wildtyp (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>):

Die VEGFA-Genexpression im M. gastrocnemius von GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen war nach 12 Wochen CHF 6,3fach (p $\leq$ 0,05) höher und nach 20 Wochen CHF 56 % (p $\leq$ 0,05) niedriger als bei Wildtyp-Mäusen (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) (s. Abb. 18 und Tab. 33).

##### Doppelknockout (GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>) vs. GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>:

Die VEGFA-mRNA-Expression im M. gastrocnemius von GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen war nach 12 Wochen CHF 2,5fach höher und nach 20 Wochen CHF 72 % niedriger als bei GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen (s. Abb. 18 und Tab. 33).

**12 Wochen CHF vs. 20 Wochen CHF:**

Die VEGFA-mRNA-Expression im M. gastrocnemius von Wildtyp-Mäusen (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) war nach 20 Wochen CHF 25,3fach ( $p \leq 0,005$ ) höher als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 33).

In der Gruppe der GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>-Mäuse war die mRNA-Expression von VEGFA im M. gastrocnemius nach 20 Wochen CHF 1,6fach höher als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 33).

Bei GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen war die Genexpression von VEGFA im M. gastrocnemius nach 20 Wochen CHF 1,8fach höher als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 33).

Die VEGFA-mRNA-Expression im M. gastrocnemius der GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse war nach 20 Wochen CHF 80 % niedriger als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 33).

**3.2.3.2 Notch homolog 1, translocation-associated (Drosophila) (Notch1)****GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup> vs. Wildtyp (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>):**

Bei GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>-Mäusen war die Notch1-Genexpression im M. gastrocnemius nach 12 Wochen CHF 6,9fach ( $p \leq 0,05$ ) höher und nach 20 Wochen CHF 47 % niedriger als bei Wildtyp-Mäusen (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) (s. Abb. 18 und Tab. 34).

**GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> vs. Wildtyp (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>):**

Die Notch1-Genexpression im M. gastrocnemius von GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen war nach 12 Wochen CHF 6,6fach ( $p \leq 0,005$ ) höher und nach 20 Wochen CHF 18 % niedriger als bei Wildtyp-Mäusen (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) (s. Abb. 18 und Tab. 34).

**Doppelknockout (GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>) vs. GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>:**

Die Notch1-mRNA-Expression im M. gastrocnemius von GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen war nach 12 Wochen CHF 2,7fach höher und nach 20 Wochen CHF 97 % ( $p \leq 0,05$ ) niedriger als bei GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen (Wagner et al., 2016) (s. Abb. 18 und Tab. 34).

**12 Wochen CHF vs. 20 Wochen CHF:**

Die Notch1-mRNA-Expression im M. gastrocnemius von Wildtyp-Mäusen (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) war nach 20 Wochen CHF 17,5fach höher als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 34).

In der Gruppe der GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>-Mäuse war die mRNA-Expression von Notch1 im M. gastrocnemius nach 20 Wochen CHF 1,3fach höher als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 34).

Bei GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen war die Genexpression von Notch1 im M. gastrocnemius nach 20 Wochen CHF 2,2fach höher als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 34).

Die Notch1-mRNA-Expression im M. gastrocnemius der GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse war nach 20 Wochen CHF 97 % niedriger als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 34).

### 3.2.4 Atrophie und ACh-Rezeptoren

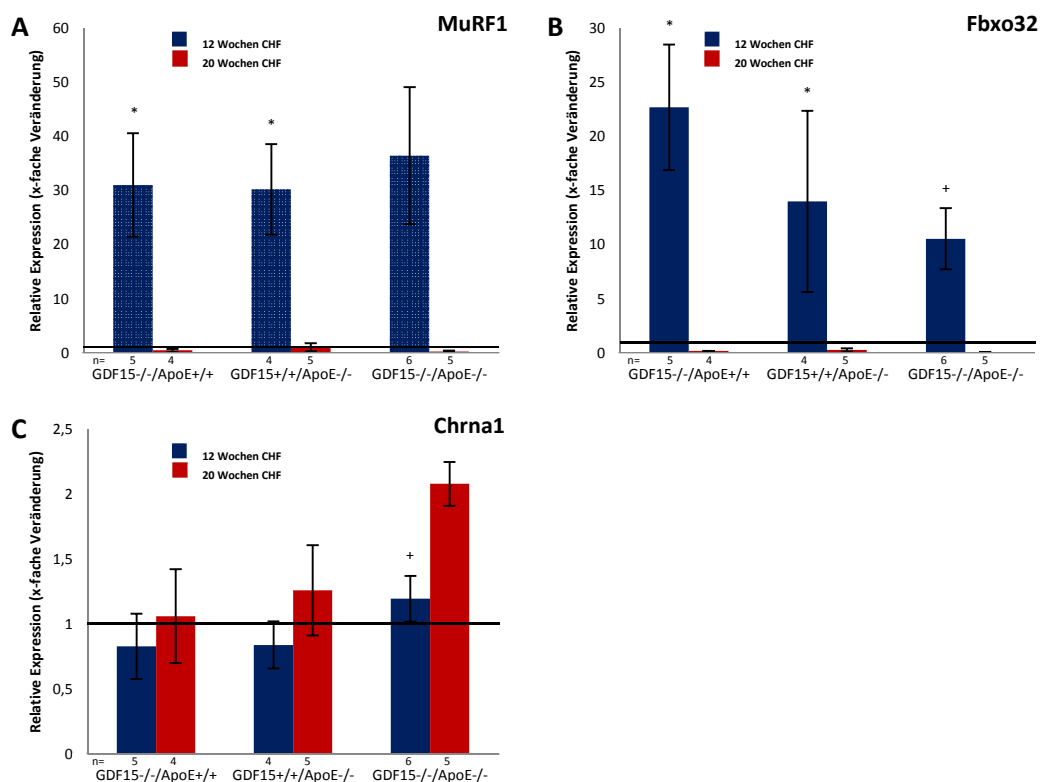


Abb. 19: Quantitative Real-Time RT-PCR (qRT-PCR) der Muscle-specific ring finger protein 1 (MuRF1)-, F-box protein 32 (Fbxo32)- und Cholinergic receptor, nicotinic, alpha polypeptide 1 (muscle) (Chrna1)-Genexpression im M. gastrocnemius nach 12 bzw. 20 Wochen CHF: **A** Muscle-specific ring finger protein 1 (MuRF1) **B** F-box protein 32 (Fbxo32) **C** Cholinergic receptor, nicotinic, alpha polypeptide 1 (muscle) (Chrna1). Relative Expression (x-fache Veränderung) im Vergleich zum Wildtyp (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) 12 Wochen CHF (n=4) bzw. 20 Wochen CHF (n=5); mRNA-Genexpressionswert Wildtyp 12 bzw. 20 Wochen CHF auf 1 gesetzt; Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwerts; Normalisierung der Ergebnisse auf das Referenzgen  $\beta$ -Aktin (ACTB); \* $p \leq 0,05$  vs. Wildtyp (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>); + $p \leq 0,05$  12 Wochen CHF vs. 20 Wochen CHF.

#### 3.2.4.1 Muscle-specific ring finger protein 1 (MuRF1)

##### GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup> vs. Wildtyp (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>):

Bei GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>-Mäusen war die MuRF1-Genexpression im M. gastrocnemius nach 12 Wochen CHF 31fach ( $p \leq 0,05$ ) höher und nach 20 Wochen CHF 52 % niedriger als bei Wildtyp-Mäusen (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) (s. Abb. 19 und Tab. 35).

**GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> vs. Wildtyp (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>):**

Die MuRF1-Genexpression im M. gastrocnemius von GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen war nach 12 Wochen CHF 30,2fach ( $p \leq 0,05$ ) und nach 20 Wochen CHF 1,1fach höher als bei Wildtyp-Mäusen (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) (s. Abb. 19 und Tab. 35).

**Doppelknockout (GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>) vs. GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>:**

Die MuRF1-mRNA-Expression im M. gastrocnemius von GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen war nach 12 Wochen CHF 1,2fach höher und nach 20 Wochen CHF 76 % niedriger als bei GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen (s. Abb. 19 und Tab. 35).

**12 Wochen CHF vs. 20 Wochen CHF:**

Die MuRF1-mRNA-Expression im M. gastrocnemius von Wildtyp-Mäusen (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) war nach 20 Wochen CHF 106,1fach ( $p \leq 0,05$ ) höher als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 35).

In der Gruppe der GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>-Mäuse war die mRNA-Expression von MuRF1 im M. gastrocnemius nach 20 Wochen CHF 1,6fach höher als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 35).

Bei GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen war die Genexpression von MuRF1 im M. gastrocnemius nach 20 Wochen CHF 3,7fach höher als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 35).

Die MuRF1-mRNA-Expression im M. gastrocnemius der GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse war nach 20 Wochen CHF 25 % niedriger als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 35).

**3.2.4.2 F-box protein 32 (Fbxo32)****GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup> vs. Wildtyp (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>):**

Bei GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>-Mäusen war die Fbxo32-Genexpression im M. gastrocnemius nach 12 Wochen CHF 22,7fach ( $p \leq 0,05$ ) höher (Wagner et al., 2016) und nach 20 Wochen CHF 82 % niedriger als bei Wildtyp-Mäusen (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) (s. Abb. 19 und Tab. 36).



**GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> vs. Wildtyp (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>):**

Die Fbxo32-Genexpression im M. gastrocnemius von GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen war nach 12 Wochen CHF 14fach ( $p \leq 0,05$ ) höher und nach 20 Wochen CHF 72 % niedriger als bei Wildtyp-Mäusen (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) (s. Abb. 19 und Tab. 36).

**Doppelknockout (GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>) vs. GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>:**

Die Fbxo32-mRNA-Expression im M. gastrocnemius von GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen war nach 12 Wochen CHF 25 % und nach 20 Wochen CHF 85 % niedriger als bei GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen (s. Abb. 19 und Tab. 36).

**12 Wochen CHF vs. 20 Wochen CHF:**

Die Fbxo32-mRNA-Expression im M. gastrocnemius von Wildtyp-Mäusen (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) war nach 20 Wochen CHF 55,4fach ( $p \leq 0,05$ ) höher als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 36).

In der Gruppe der GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>-Mäuse war die mRNA-Expression von Fbxo32 im M. gastrocnemius nach 20 Wochen CHF 56 % niedriger als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 36).

Bei GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen war die Genexpression von Fbxo32 im M. gastrocnemius nach 20 Wochen CHF 1,1fach höher als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 36).

Die Fbxo32-mRNA-Expression im M. gastrocnemius der GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse war nach 20 Wochen CHF 78 % ( $p \leq 0,05$ ) niedriger als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 36).

**3.2.4.3 Cholinergic receptor, nicotinic, alpha polypeptide 1 (muscle) (Chrna1)****GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup> vs. Wildtyp (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>):**

Bei GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>-Mäusen war die Chrna1-Genexpression im M. gastrocnemius nach 12 Wochen CHF 17 % niedriger und nach 20 Wochen CHF 1,1fach höher als bei Wildtyp-Mäusen (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) (s. Abb. 19 und Tab. 37).

**GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> vs. Wildtyp (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>):**

Die Chrna1-Genexpression im M. gastrocnemius von GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen war nach 12 Wochen CHF 16 % niedriger und nach 20 Wochen CHF 1,3fach höher als bei Wildtyp-Mäusen (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) (s. Abb. 19 und Tab. 37).

**Doppelknockout (GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>) vs. GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>:**

Die Chrna1-mRNA-Expression im M. gastrocnemius von GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen war nach 12 Wochen CHF 1,4fach und nach 20 Wochen 1,6fach höher als bei GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen (s. Abb. 19 und Tab. 37).

**12 Wochen CHF vs. 20 Wochen CHF:**

Die Chrna1-mRNA-Expression im M. gastrocnemius von Wildtyp-Mäusen (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) war nach 20 Wochen CHF 5% niedriger als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 37).

In der Gruppe der GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>-Mäuse war die mRNA-Expression von Chrna1 im M. gastrocnemius nach 20 Wochen CHF 1,2fach höher als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 37).

Bei GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen war die Genexpression von Chrna1 im M. gastrocnemius nach 20 Wochen CHF 1,4fach höher als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 37).

Die Chrna1-mRNA-Expression im M. gastrocnemius der GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse war nach 20 Wochen CHF 1,6fach höher ( $p \leq 0,05$ ) als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 37).

### 3.3 Proteome Profiler™ Antibody Array

Dargestellt sind die Expressionswerte von Zytokinen, deren Pixeldichte in der GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Gruppe nach 20 Wochen CHF mindestens 3fach höher war als die der Wildtyp-Mäuse 20 Wochen CHF (Cut-off-Wert  $\geq 3$ ).

#### 3.3.1 Interleukine

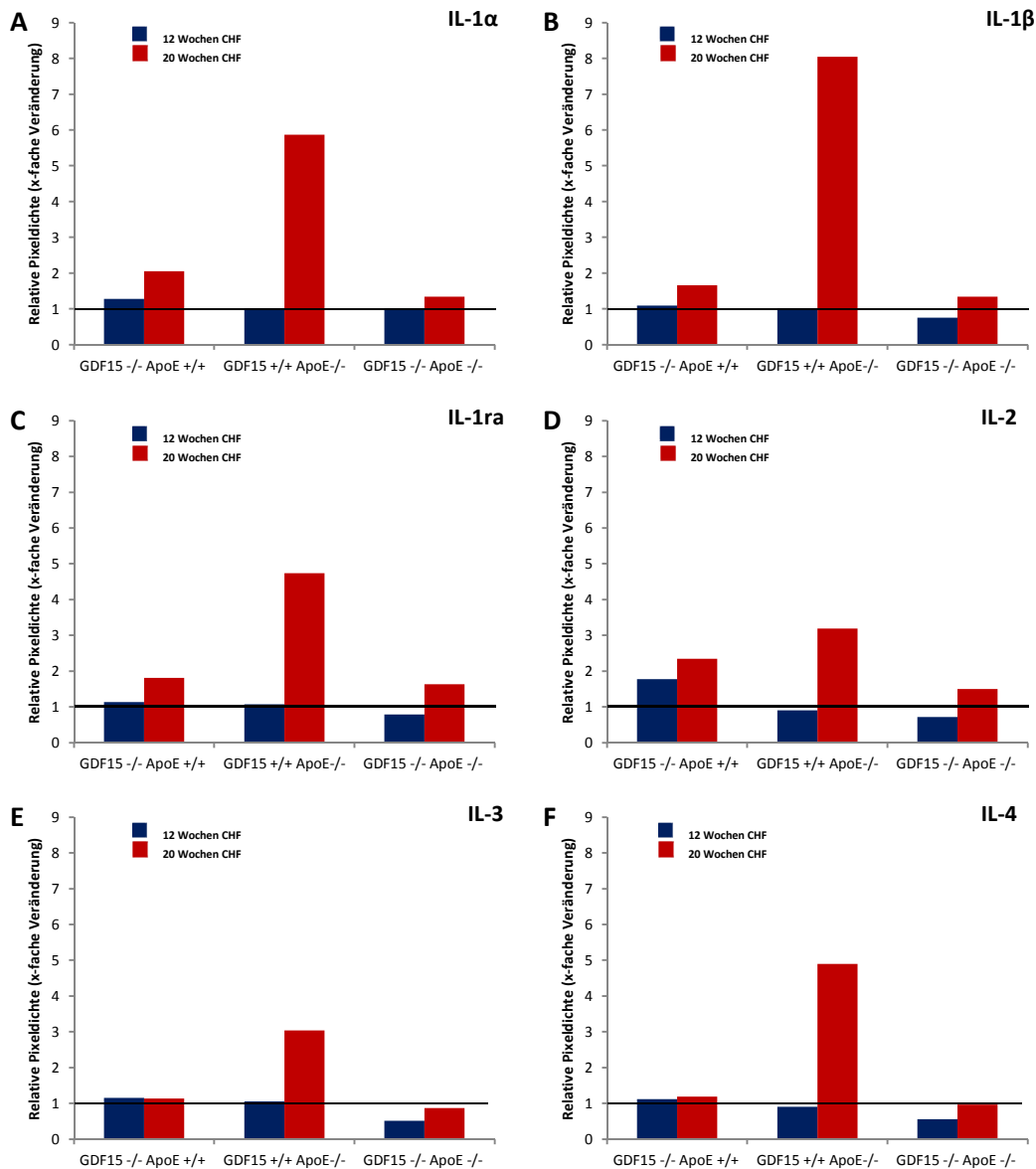


Abb. 20: Proteome Profiler™ Antibody Array (Mouse Cytokine Array) der Interleukin-Proteinexpression im M. gastrocnemius nach 12 bzw. 20 Wochen CHF. M. gastrocnemius von 12 Wochen CHF gefütterten GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup> (n=5), GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> (n=4), GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> (n=6) Mäusen und 20 Wochen CHF gefütterten GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup> (n=4), GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> (n=5), GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> (n=5) Mäusen. **A** Interleukin 1 $\alpha$  **B** Interleukin 1 $\beta$  **C** Interleukin 1ra **D** Interleukin 2 (IL-2) **E** Interleukin 3 (IL-3) **F** Interleukin 4 (IL-4). Relative

Pixelldichte (x-fache Veränderung) im Vergleich zum Wildtyp ( $GDF15^{+/+}/ApoE^{+/+}$ ) 12 Wochen CHF (n=4) bzw. 20 Wochen CHF (n=5); Proteinexpressionswert Wildtyp 12 bzw. 20 Wochen CHF auf 1 gesetzt.

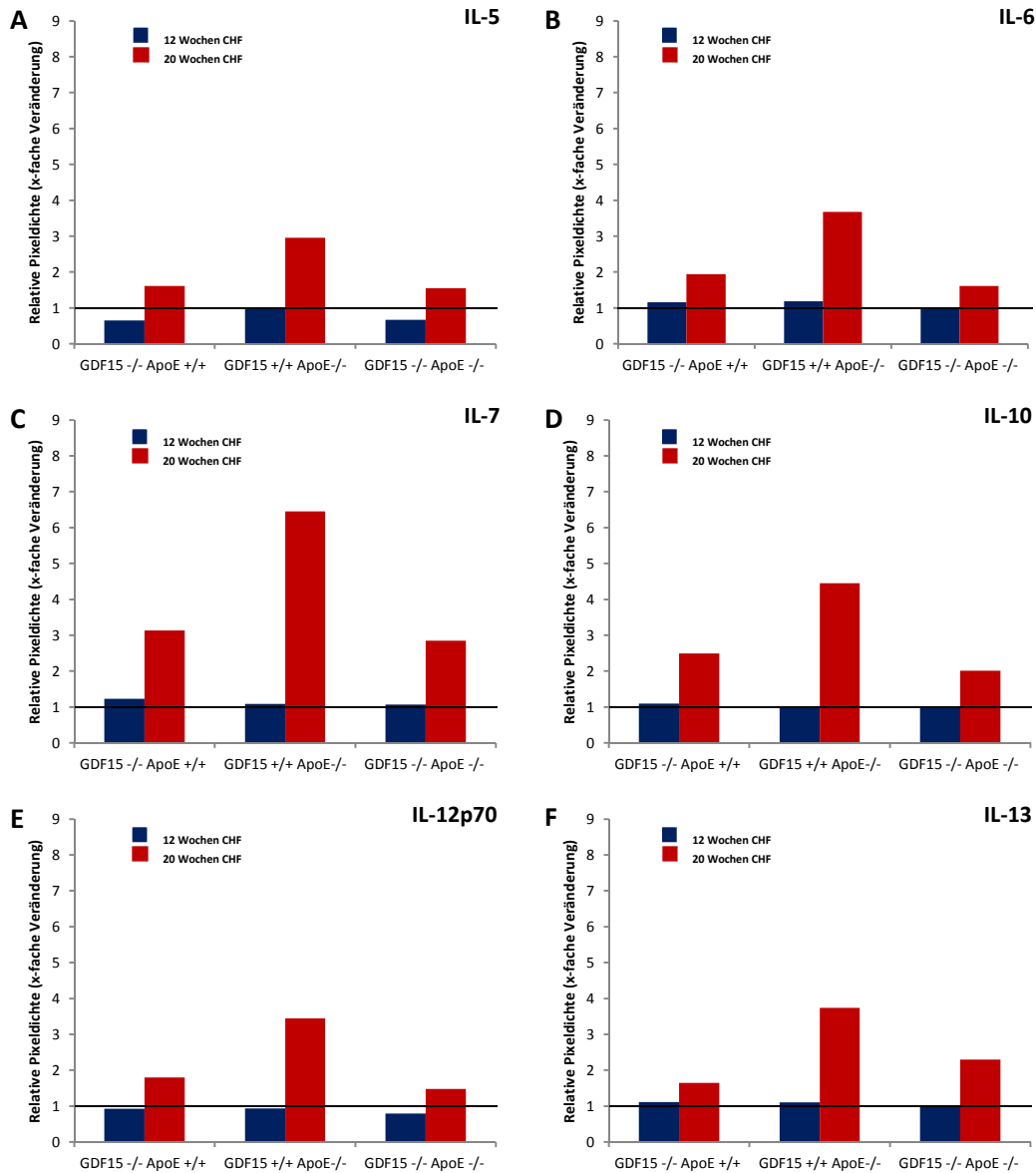


Abb. 21: Proteome Profiler™ Antibody Array (Mouse Cytokine Array) der Interleukin-Proteinexpression im M. gastrocnemius nach 12 bzw. 20 Wochen CHF. M. gastrocnemius von 12 Wochen CHF gefütterten  $GDF15^{-/-}/ApoE^{+/+}$  (n=5),  $GDF15^{+/+}/ApoE^{-/-}$  (n=4),  $GDF15^{-/-}/ApoE^{-/-}$  (n=6) Mäusen und 20 Wochen CHF gefütterten  $GDF15^{-/-}/ApoE^{+/+}$  (n=4),  $GDF15^{+/+}/ApoE^{-/-}$  (n=5),  $GDF15^{-/-}/ApoE^{-/-}$  (n=5) Mäusen. **A** Interleukin 5 (IL-5) **B** Interleukin 6 (IL-6) **C** Interleukin 7 (IL-7) **D** Interleukin 10 (IL-10) **E** Interleukin 12p70 (IL-12p70) **F** Interleukin 13 (IL-13). Relative Pixelldichte (x-fache Veränderung) im Vergleich zum Wildtyp ( $GDF15^{+/+}/ApoE^{+/+}$ ) 12 Wochen CHF (n=4) bzw. 20 Wochen CHF (n=5); Proteinexpressionswert Wildtyp 12 bzw. 20 Wochen CHF auf 1 gesetzt.

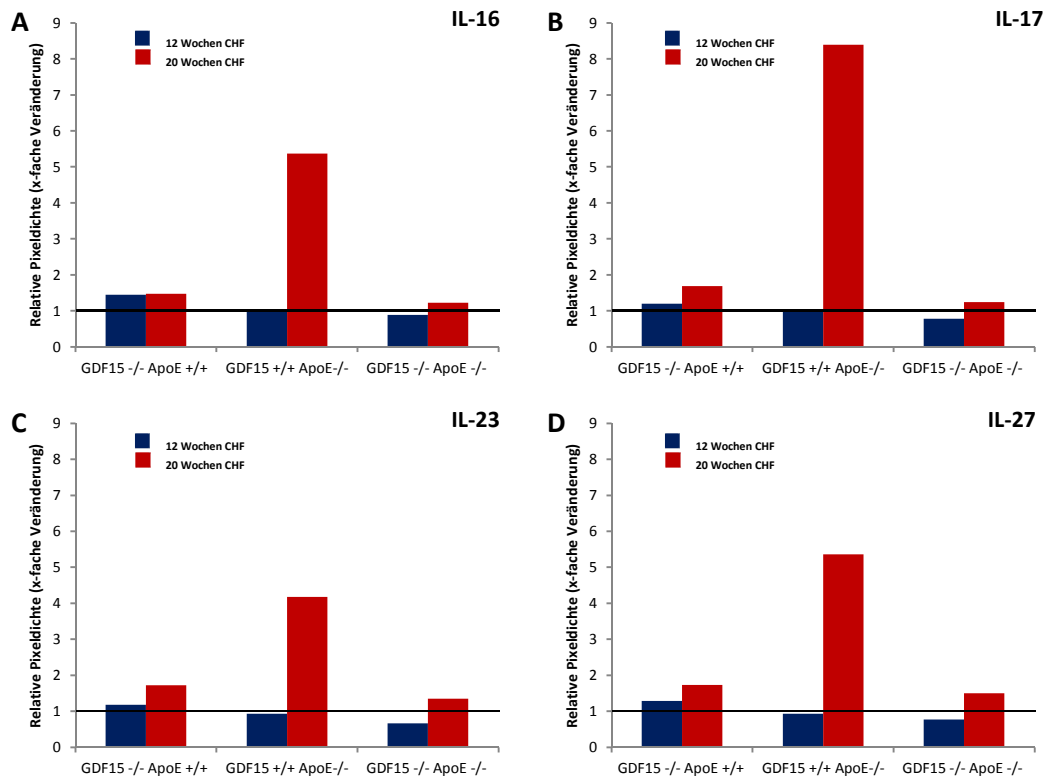


Abb. 22: Proteome Profiler™ Antibody Array (Mouse Cytokine Array) der Interleukin-Proteinexpression im M. gastrocnemius nach 12 bzw. 20 Wochen CHF. M. gastrocnemius von 12 Wochen CHF gefütterten GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup> (n=5), GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> (n=4), GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> (n=6) Mäusen und 20 Wochen CHF gefütterten GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup> (n=4), GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> (n=5), GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> (n=5) Mäusen. **A** Interleukin 16 (IL-16) **B** Interleukin 17 (IL-17) **C** Interleukin 23 (IL-23) **D** Interleukin 27 (IL-27). Relative Pixeldichte (x-fache Veränderung) im Vergleich zum Wildtyp (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) 12 Wochen CHF (n=4) bzw. 20 Wochen CHF (n=5); Proteinexpressionswert Wildtyp 12 bzw. 20 Wochen CHF auf 1 gesetzt.

### 3.3.1.1 IL-1 $\alpha$

#### GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup> vs. Wildtyp (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>):

Bei GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>-Mäusen war die IL-1 $\alpha$ -Proteinexpression im M. gastrocnemius nach 12 Wochen CHF 1,3fach und nach 20 Wochen CHF 2fach höher als bei Wildtyp-Mäusen (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) (s. Abb. 20 und Tab. 38).

#### GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> vs. Wildtyp (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>):

Nach 12 Wochen CHF unterschied sich die IL-1 $\alpha$ -Proteinexpression im M. gastrocnemius zwischen GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>- und Wildtyp-Mäusen (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) nicht. Nach 20

Wochen CHF war die Proteinexpression von IL-1 $\alpha$  im M. gastrocnemius 5,9fach höher als bei Wildtyp-Mäusen (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) (Wagner et al., 2014) (s. Abb. 20 und Tab. 38).

**Doppelknockout (GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>) vs. GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>:**

Nach 12 Wochen CHF unterschied sich die IL-1 $\alpha$ -Proteinexpression im M. gastrocnemius zwischen GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>- und GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen nicht. Nach 20 Wochen CHF war die Proteinexpression von IL-1 $\alpha$  im M. gastrocnemius 77 % niedriger als bei GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen (s. Abb. 20 und Tab. 38).

**12 Wochen CHF vs. 20 Wochen CHF:**

Die IL-1 $\alpha$ -Proteinexpression im M. gastrocnemius von Wildtyp-Mäusen (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) war nach 20 Wochen CHF 1,3fach höher als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 38).

In der Gruppe der GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>-Mäuse war die Proteinexpression von IL-1 $\alpha$  im M. gastrocnemius nach 20 Wochen CHF 2,1fach höher als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 38).

Bei GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen war die Proteinexpression von IL-1 $\alpha$  im M. gastrocnemius nach 20 Wochen CHF 7,7fach höher als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 38).

Die IL-1 $\alpha$ -Proteinexpression im M. gastrocnemius der GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse war nach 20 Wochen CHF 1,8fach höher als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 38).

**3.3.1.2 IL-1 $\beta$**

**GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup> vs. Wildtyp (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>):**

Bei GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>-Mäusen war die IL-1 $\beta$ -Proteinexpression im M. gastrocnemius nach 12 Wochen CHF 1,1fach und nach 20 Wochen CHF 1,7fach höher als bei Wildtyp-Mäusen (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) (s. Abb. 20 und Tab. 38).

**GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> vs. Wildtyp (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>):**

Nach 12 Wochen CHF unterschied sich die IL-1 $\beta$ -Proteinexpression im M. gastrocnemius zwischen GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> und Wildtyp-Mäusen (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) nicht. Nach 20 Wochen CHF war die Proteinexpression von IL-1 $\beta$  im M. gastrocnemius 8fach höher als bei Wildtyp-Mäusen (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) (Wagner et al., 2014) (s. Abb. 20 und Tab. 38).

**Doppelknockout (GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>) vs. GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>:**

Die IL-1 $\beta$ -Proteinexpression im M. gastrocnemius von GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen war nach 12 Wochen CHF 26 % und nach 20 Wochen CHF 83 % niedriger als bei GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen (s. Abb. 20 und Tab. 38).

**12 Wochen CHF vs. 20 Wochen CHF:**

Die IL-1 $\beta$ -Proteinexpression im M. gastrocnemius von Wildtyp-Mäusen (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) war nach 20 Wochen CHF 13 % niedriger als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 38).

In der Gruppe der GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>-Mäuse war die Proteinexpression von IL-1 $\beta$  im M. gastrocnemius nach 20 Wochen CHF 1,3fach höher als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 38).

Bei GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen war die Proteinexpression von IL-1 $\beta$  im M. gastrocnemius nach 20 Wochen CHF 6,9fach höher als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 38).

Die IL-1 $\beta$ -Proteinexpression im M. gastrocnemius der GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse war nach 20 Wochen CHF 1,5fach höher als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 38).

**3.3.1.3 IL-1ra****GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup> vs. Wildtyp (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>):**

Bei GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>-Mäusen war die IL-1ra-Proteinexpression im M. gastrocnemius nach 12 Wochen CHF 1,1fach und nach 20 Wochen CHF 1,8fach höher als bei Wildtyp-Mäusen (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) (s. Abb. 20 und Tab. 38).

**GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> vs. Wildtyp (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>):**

Die Proteinexpression von IL-1ra im M. gastrocnemius von GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen war nach 12 Wochen CHF 1,1fach und nach 20 Wochen CHF 4,7fach höher als bei Wildtyp-Mäusen (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) (s. Abb. 20 und Tab. 38).

**Doppelknockout (GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>) vs. GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>:**

Die IL-1ra-Proteinexpression im M. gastrocnemius von GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen war nach 12 Wochen CHF 27 % und nach 20 Wochen CHF 66 % niedriger als bei GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen (s. Abb. 20 und Tab. 38).

**12 Wochen CHF vs. 20 Wochen CHF:**

Die IL-1ra-Proteinexpression im M. gastrocnemius von Wildtyp-Mäusen (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) war nach 20 Wochen CHF 39 % niedriger als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 38).

In der Gruppe der GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>-Mäuse war die Proteinexpression von IL-1ra im M. gastrocnemius nach 20 Wochen CHF 2 % niedriger als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 38).

Bei GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen war die Proteinexpression von IL-1ra im M. gastrocnemius nach 20 Wochen CHF 2,7fach höher als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 38).

Die IL-1ra-Proteinexpression im M. gastrocnemius der GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse war nach 20 Wochen CHF 1,3fach höher als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 38).

**3.3.1.4 IL-2**

**GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup> vs. Wildtyp (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>):**

Bei GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>-Mäusen war die IL-2-Proteinexpression im M. gastrocnemius nach 12 Wochen CHF 1,8fach und nach 20 Wochen CHF 2,3fach höher als bei Wildtyp-Mäusen (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) (s. Abb. 20 und Tab. 38).

**GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> vs. Wildtyp (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>):**

Die Proteinexpression von IL-2 im M. gastrocnemius von GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen war nach 12 Wochen CHF 10 % niedriger und nach 20 Wochen CHF 3,2fach höher als bei Wildtyp-Mäusen (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) (s. Abb. 20 und Tab. 38).



**Doppelknockout (GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>) vs. GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>:**

Die IL-2-Proteinexpression im M. gastrocnemius von GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen war nach 12 Wochen CHF 20 % und nach 20 Wochen CHF 53 % niedriger als bei GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen (s. Abb. 20 und Tab. 38).

**12 Wochen CHF vs. 20 Wochen CHF:**

Die IL-2-Proteinexpression im M. gastrocnemius von Wildtyp-Mäusen (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) war nach 20 Wochen CHF 57 % niedriger als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 38).

In der Gruppe der GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>-Mäuse war die Proteinexpression von IL-2 im M. gastrocnemius nach 20 Wochen CHF 43 % niedriger als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 38).

Bei GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen war die Proteinexpression von IL-2 im M. gastrocnemius nach 20 Wochen CHF 1,5fach höher als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 38).

Die IL-2-Proteinexpression im M. gastrocnemius der GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse war nach 20 Wochen CHF 10 % niedriger als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 38).

**3.3.1.5 IL-3****GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup> vs. Wildtyp (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>):**

Bei GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>-Mäusen war die IL-3-Proteinexpression im M. gastrocnemius nach 12 Wochen CHF 1,2fach und nach 20 Wochen CHF 1,1fach höher als bei Wildtyp-Mäusen (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) (s. Abb. 20 und Tab. 38).

**GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> vs. Wildtyp (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>):**

Die Proteinexpression von IL-3 im M. gastrocnemius von GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen war nach 12 Wochen CHF 1,1fach und nach 20 Wochen CHF 3fach höher als bei Wildtyp-Mäusen (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) (s. Abb. 20 und Tab. 38).

**Doppelknockout (GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>) vs. GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>:**

Die IL-3-Proteinexpression im M. gastrocnemius von GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen war nach 12 Wochen CHF 51 % und nach 20 Wochen CHF 71 % niedriger als bei GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen (s. Abb. 20 und Tab. 38).

**12 Wochen CHF vs. 20 Wochen CHF:**

Die IL-3-Proteinexpression im M. gastrocnemius von Wildtyp-Mäusen (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) war nach 20 Wochen CHF 1,2fach höher als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 38).

In der Gruppe der GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>-Mäuse war die Proteinexpression von IL-3 im M. gastrocnemius nach 20 Wochen CHF 1,2fach höher als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 38).

Bei GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen war die Proteinexpression von IL-3 im M. gastrocnemius nach 20 Wochen CHF 3,6fach höher als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 38).

Die IL-3-Proteinexpression im M. gastrocnemius der GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse war nach 20 Wochen CHF 2,1fach höher als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 38).

**3.3.1.6 IL-4****GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup> vs. Wildtyp (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>):**

Bei GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>-Mäusen war die IL-4-Proteinexpression im M. gastrocnemius nach 12 Wochen CHF 1,1fach und nach 20 Wochen CHF 1,2fach höher als bei Wildtyp-Mäusen (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) (s. Abb. 20 und Tab. 38).

**GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> vs. Wildtyp (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>):**

Die Proteinexpression von IL-4 im M. gastrocnemius von GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen war nach 12 Wochen CHF 10 % niedriger und nach 20 Wochen CHF 4,9fach höher als bei Wildtyp-Mäusen (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) (s. Abb. 20 und Tab. 38).

**Doppelknockout (GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>) vs. GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>:**

Die IL-4-Proteinexpression im M. gastrocnemius von GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen war nach 12 Wochen CHF 38 % und nach 20 Wochen CHF 80 % niedriger als bei GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen (s. Abb. 20 und Tab. 38).

**12 Wochen CHF vs. 20 Wochen CHF:**

Die IL-4-Proteinexpression im M. gastrocnemius von Wildtyp-Mäusen (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) war nach 20 Wochen CHF 1,5fach höher als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 38).

In der Gruppe der GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>-Mäuse war die Proteinexpression von IL-4 im M. gastrocnemius nach 20 Wochen CHF 1,5fach höher als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 38).

Bei GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen war die Proteinexpression von IL-4 im M. gastrocnemius nach 20 Wochen CHF 8fach höher als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 38).

Die IL-4-Proteinexpression im M. gastrocnemius der GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse war nach 20 Wochen CHF 2,5fach höher als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 38).

### 3.3.1.7 IL-5

#### **GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup> vs. Wildtyp (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>):**

Bei GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>-Mäusen war die IL-5-Proteinexpression im M. gastrocnemius nach 12 Wochen CHF 35 % niedriger und nach 20 Wochen CHF 1,6fach höher als bei Wildtyp-Mäusen (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) (s. Abb. 21 und Tab. 38).

#### **GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> vs. Wildtyp (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>):**

Nach 12 Wochen CHF unterschied sich die IL-5-Proteinexpression im M. gastrocnemius zwischen GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>- und Wildtyp-Mäusen (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) nicht. Nach 20 Wochen CHF war die Proteinexpression von IL-5 im M. gastrocnemius 3fach höher als bei Wildtyp-Mäusen (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) (s. Abb. 21 und Tab. 38).

#### **Doppelknockout (GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>) vs. GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>:**

Die IL-5-Proteinexpression im M. gastrocnemius von GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen war nach 12 Wochen CHF 33 % und nach 20 Wochen CHF 48 % niedriger als bei GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen (s. Abb. 21 und Tab. 38).

#### **12 Wochen CHF vs. 20 Wochen CHF:**

Die IL-5-Proteinexpression im M. gastrocnemius von Wildtyp-Mäusen (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) war nach 20 Wochen CHF 1,1fach höher als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 38).

In der Gruppe der GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>-Mäuse war die Proteinexpression von IL-5 im M. gastrocnemius nach 20 Wochen CHF 2,7fach höher als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 38).

Bei GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen war die Proteinexpression von IL-5 im M. gastrocnemius nach 20 Wochen CHF 3,2fach höher als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 38).

Die IL-5-Proteinexpression im M. gastrocnemius der GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse war nach 20 Wochen CHF 2,5fach höher als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 38).

### 3.3.1.8 IL-6

#### **GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup> vs. Wildtyp (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>):**

Bei GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>-Mäusen war die IL-6-Proteinexpression im M. gastrocnemius nach 12 Wochen CHF 1,2fach und nach 20 Wochen CHF 1,9fach höher als bei Wildtyp-Mäusen (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) (s. Abb. 21 und Tab. 38).

#### **GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> vs. Wildtyp (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>):**

Die Proteinexpression von IL-6 im M. gastrocnemius von GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen war nach 12 Wochen CHF 1,2fach und nach 20 Wochen CHF 3,7fach höher als bei Wildtyp-Mäusen (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) (Wagner et al., 2014) (s. Abb. 21 und Tab. 38).

#### **Doppelknockout (GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>) vs. GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>:**

Die IL-6-Proteinexpression im M. gastrocnemius von GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen war nach 12 Wochen CHF 14 % und nach 20 Wochen CHF 56 % niedriger als bei GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen (s. Abb. 21 und Tab. 38).

#### **12 Wochen CHF vs. 20 Wochen CHF:**

Die IL-6-Proteinexpression im M. gastrocnemius von Wildtyp-Mäusen (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) war nach 20 Wochen CHF 1,3fach höher als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 38).

In der Gruppe der GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>-Mäuse war die Proteinexpression von IL-6 im M. gastrocnemius nach 20 Wochen CHF 2,1fach höher als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 38).

Bei GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen war die Proteinexpression von IL-6 im M. gastrocnemius nach 20 Wochen CHF 4fach höher als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 38).

Die IL-6-Proteinexpression im M. gastrocnemius der GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse war nach 20 Wochen CHF 2fach höher als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 38).

### 3.3.1.9 IL-7

#### **GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup> vs. Wildtyp (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>):**

Bei GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>-Mäusen war die IL-7-Proteinexpression im M. gastrocnemius nach 12 Wochen CHF 1,2fach und nach 20 Wochen CHF 3,1fach höher als bei Wildtyp-Mäusen (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) (s. Abb. 21 und Tab. 38).

#### **GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> vs. Wildtyp (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>):**

Die Proteinexpression von IL-7 im M. gastrocnemius von GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen war nach 12 Wochen CHF 1,1fach und nach 20 Wochen CHF 6,4fach höher als bei Wildtyp-Mäusen (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) (s. Abb. 21 und Tab. 38).

#### **Doppelknockout (GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>) vs. GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>:**

Die IL-7-Proteinexpression im M. gastrocnemius von GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen war nach 12 Wochen CHF 2 % und nach 20 Wochen CHF 56 % niedriger als bei GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen (s. Abb. 21 und Tab. 38).

#### **12 Wochen CHF vs. 20 Wochen CHF:**

Die IL-7-Proteinexpression im M. gastrocnemius von Wildtyp-Mäusen (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) war nach 20 Wochen CHF 1,2fach höher als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 38).

In der Gruppe der GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>-Mäuse war die Proteinexpression von IL-7 im M. gastrocnemius nach 20 Wochen CHF 3fach höher als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 38).

Bei GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen war die Proteinexpression von IL-7 im M. gastrocnemius nach 20 Wochen CHF 7fach höher als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 38).

Die IL-7-Proteinexpression im M. gastrocnemius der GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse war nach 20 Wochen CHF 3,2fach höher als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 38).

### 3.3.1.10 IL-10

#### **GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup> vs. Wildtyp (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>):**

Bei GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>-Mäusen war die IL-10-Proteinexpression im M. gastrocnemius nach 12 Wochen CHF 1,1fach und nach 20 Wochen CHF 2,5fach höher als bei Wildtyp-Mäusen (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) (s. Abb. 21 und Tab. 38).

#### **GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> vs. Wildtyp (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>):**

Die Proteinexpression von IL-10 im M. gastrocnemius von GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen war nach 12 Wochen CHF 3 % niedriger und nach 20 Wochen CHF 4,4fach höher als bei Wildtyp-Mäusen (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) (s. Abb. 21 und Tab. 38).

#### **Doppelknockout (GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>) vs. GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>:**

Nach 12 Wochen CHF unterschied sich die IL-10-Proteinexpression im M. gastrocnemius zwischen GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>- und GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen nicht. Nach 20 Wochen CHF war die Proteinexpression von IL-10 im M. gastrocnemius 55 % niedriger als bei GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen (s. Abb. 21 und Tab. 38).

#### **12 Wochen CHF vs. 20 Wochen CHF:**

Die IL-10-Proteinexpression im M. gastrocnemius von Wildtyp-Mäusen (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) war nach 20 Wochen CHF 6 % niedriger als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 38).

In der Gruppe der GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>-Mäuse war die Proteinexpression von IL-10 im M. gastrocnemius nach 20 Wochen CHF 2,1fach höher als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 38).

Bei GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen war die Proteinexpression von IL-10 im M. gastrocnemius nach 20 Wochen CHF 4,3fach höher als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 38).

Die IL-10-Proteinexpression im M. gastrocnemius der GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse war nach 20 Wochen CHF 1,9fach höher als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 38).

### 3.3.1.11 IL-12p70

#### **GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup> vs. Wildtyp (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>):**

Bei GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>-Mäusen war die IL-12p70-Proteinexpression im M. gastrocnemius nach 12 Wochen CHF 8 % niedriger und nach 20 Wochen CHF 1,8fach höher als bei Wildtyp-Mäusen (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) (s. Abb. 21 und Tab. 38).

#### **GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> vs. Wildtyp (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>):**

Die Proteinexpression von IL-12p70 im M. gastrocnemius von GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen war nach 12 Wochen CHF 7 % niedriger und nach 20 Wochen CHF 3,4fach höher als bei Wildtyp-Mäusen (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) (s. Abb. 21 und Tab. 38).

#### **Doppelknockout (GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>) vs. GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>:**

Die IL-12p70-Proteinexpression im M. gastrocnemius von GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen war nach 12 Wochen CHF 15 % und nach 20 Wochen CHF 57 % niedriger als bei GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen (s. Abb. 21 und Tab. 38).

#### **12 Wochen CHF vs. 20 Wochen CHF:**

Die IL-12p70-Proteinexpression im M. gastrocnemius von Wildtyp-Mäusen (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) war nach 20 Wochen CHF 13 % niedriger als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 38).

In der Gruppe der GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>-Mäuse war die Proteinexpression von IL-12p70 im M. gastrocnemius nach 20 Wochen CHF 1,7fach höher als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 38).

Bei GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen war die Proteinexpression von IL-12p70 im M. gastrocnemius nach 20 Wochen CHF 3,2fach höher als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 38).

Die IL-12p70-Proteinexpression im M. gastrocnemius der GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse war nach 20 Wochen CHF 1,6fach höher als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 38).

### 3.3.1.12 IL-13

#### **GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup> vs. Wildtyp (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>):**

Bei GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>-Mäusen war die IL-13-Proteinexpression im M. gastrocnemius nach 12 Wochen CHF 1,1fach und nach 20 Wochen CHF 1,6fach höher als bei Wildtyp-Mäusen (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) (s. Abb. 21 und Tab. 38).

#### **GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> vs. Wildtyp (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>):**

Nach 12 Wochen CHF unterschied sich die IL-13-Proteinexpression im M. gastrocnemius zwischen GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> und Wildtyp-Mäusen (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) nicht. Nach 20 Wochen CHF war die Proteinexpression von IL-13 im M. gastrocnemius 5,4fach höher als bei Wildtyp-Mäusen (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) (s. Abb. 21 und Tab. 38).

#### **Doppelknockout (GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>) vs. GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>:**

Die IL-13-Proteinexpression im M. gastrocnemius von GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen war nach 12 Wochen CHF 9 % und nach 20 Wochen CHF 39 % niedriger als bei GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen (s. Abb. 21 und Tab. 38).

#### **12 Wochen CHF vs. 20 Wochen CHF:**

Die IL-13-Proteinexpression im M. gastrocnemius von Wildtyp-Mäusen (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) war nach 20 Wochen CHF 1,2fach höher als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 38).

In der Gruppe der GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>-Mäuse war die Proteinexpression von IL-13 im M. gastrocnemius nach 20 Wochen CHF 1,8fach höher als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 38).

Bei GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen war die Proteinexpression von IL-13 im M. gastrocnemius nach 20 Wochen CHF 4,2fach höher als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 38).

Die IL-13-Proteinexpression im M. gastrocnemius der GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse war nach 20 Wochen CHF 2,8fach höher als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 38).



### 3.3.1.13 IL-16

#### **GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup> vs. Wildtyp (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>):**

Bei GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>-Mäusen war die IL-16-Proteinexpression im M. gastrocnemius nach 12 Wochen CHF 1,4fach und nach 20 Wochen CHF 1,5fach höher als bei Wildtyp-Mäusen (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) (s. Abb. 22 und Tab. 38).

#### **GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> vs. Wildtyp (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>):**

Nach 12 Wochen CHF unterschied sich die IL-16-Proteinexpression im M. gastrocnemius zwischen GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> und Wildtyp-Mäusen (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) nicht. Nach 20 Wochen CHF war die Proteinexpression von IL-16 im M. gastrocnemius 5,4fach höher als bei Wildtyp-Mäusen (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) (s. Abb. 22 und Tab. 38).

#### **Doppelknockout (GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>) vs. GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>:**

Die IL-16-Proteinexpression im M. gastrocnemius von GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen war nach 12 Wochen CHF 12 % und nach 20 Wochen CHF 77 % niedriger als bei GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen (s. Abb. 22 und Tab. 38).

#### **12 Wochen CHF vs. 20 Wochen CHF:**

Die IL-16-Proteinexpression im M. gastrocnemius von Wildtyp-Mäusen (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) war nach 20 Wochen CHF 44 % niedriger als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 38).

In der Gruppe der GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>-Mäuse war die Proteinexpression von IL-16 im M. gastrocnemius nach 20 Wochen CHF 43 % niedriger als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 38).

Bei GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen war die Proteinexpression von IL-16 im M. gastrocnemius nach 20 Wochen CHF 3fach höher als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 38).

Die IL-16-Proteinexpression im M. gastrocnemius der GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse war nach 20 Wochen CHF 23 % niedriger als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 38).

### 3.3.1.14 IL-17

#### **GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup> vs. Wildtyp (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>):**

Bei GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>-Mäusen war die IL-17-Proteinexpression im M. gastrocnemius nach 12 Wochen CHF 1,2fach und nach 20 Wochen CHF 1,7fach höher als bei Wildtyp-Mäusen (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) (s. Abb. 22 und Tab. 38).

#### **GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> vs. Wildtyp (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>):**

Die Proteinexpression von IL-17 im M. gastrocnemius von GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen war nach 12 Wochen CHF 2 % niedriger und nach 20 Wochen CHF 8,4fach höher als bei Wildtyp-Mäusen (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) (Wagner et al., 2014) (s. Abb. 22 und Tab. 38).

#### **Doppelknockout (GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>) vs. GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>:**

Die IL-17-Proteinexpression im M. gastrocnemius von GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen war nach 12 Wochen CHF 20 % und nach 20 Wochen CHF 85 % niedriger als bei GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen (s. Abb. 22 und Tab. 38).

#### **12 Wochen CHF vs. 20 Wochen CHF:**

Die IL-17-Proteinexpression im M. gastrocnemius von Wildtyp-Mäusen (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) war nach 20 Wochen CHF 1,1fach höher als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 38).

In der Gruppe der GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>-Mäuse war die Proteinexpression von IL-17 im M. gastrocnemius nach 20 Wochen CHF 1,5fach höher als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 38).

Bei GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen war die Proteinexpression von IL-17 im M. gastrocnemius nach 20 Wochen CHF 9,1fach höher als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 38).

Die IL-17-Proteinexpression im M. gastrocnemius der GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse war nach 20 Wochen CHF 1,7fach höher als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 38).

### 3.3.1.15 IL-23

#### **GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup> vs. Wildtyp (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>):**

Bei GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>-Mäusen war die IL-23-Proteinexpression im M. gastrocnemius nach 12 Wochen CHF 1,2fach und nach 20 Wochen CHF 1,7fach höher als bei Wildtyp-Mäusen (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) (s. Abb. 22 und Tab. 38).

#### **GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> vs. Wildtyp (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>):**

Die Proteinexpression von IL-23 im M. gastrocnemius von GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen war nach 12 Wochen CHF 7 % niedriger und nach 20 Wochen CHF 4,2fach höher als bei Wildtyp-Mäusen (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) (s. Abb. 22 und Tab. 38).

#### **Doppelknockout (GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>) vs. GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>:**

Die IL-23-Proteinexpression im M. gastrocnemius von GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen war nach 12 Wochen CHF 29 % und nach 20 Wochen CHF 68 % niedriger als bei GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen (s. Abb. 22 und Tab. 38).

#### **12 Wochen CHF vs. 20 Wochen CHF:**

Die IL-23-Proteinexpression im M. gastrocnemius von Wildtyp-Mäusen (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) war nach 20 Wochen CHF 14 % niedriger als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 38).

In der Gruppe der GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>-Mäuse war die Proteinexpression von IL-23 im M. gastrocnemius nach 20 Wochen CHF 1,3fach höher als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 38).

Bei GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen war die Proteinexpression von IL-23 im M. gastrocnemius nach 20 Wochen CHF 3,9fach höher als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 38).

Die IL-23-Proteinexpression im M. gastrocnemius der GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse war nach 20 Wochen CHF 1,7fach höher als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 38).

**3.3.1.16 IL-27****GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup> vs. Wildtyp (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>):**

Bei GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>-Mäusen war die IL-27-Proteinexpression im M. gastrocnemius nach 12 Wochen CHF 1,3fach und nach 20 Wochen CHF 1,7fach höher als bei Wildtyp-Mäusen (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) (s. Abb. 22 und Tab. 38).

**GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> vs. Wildtyp (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>):**

Die Proteinexpression von IL-27 im M. gastrocnemius von GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen war nach 12 Wochen CHF 7 % niedriger und nach 20 Wochen CHF 5,4fach höher als bei Wildtyp-Mäusen (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) (s. Abb. 22 und Tab. 38).

**Doppelknockout (GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>) vs. GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>:**

Die IL-27-Proteinexpression im M. gastrocnemius von GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen war nach 17 Wochen CHF 11 % und nach 20 Wochen CHF 72 % niedriger als bei GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen (s. Abb. 22 und Tab. 38).

**12 Wochen CHF vs. 20 Wochen CHF:**

Die IL-27-Proteinexpression im M. gastrocnemius von Wildtyp-Mäusen (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) war nach 20 Wochen CHF 13 % niedriger als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 38).

In der Gruppe der GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>-Mäuse war die Proteinexpression von IL-27 im M. gastrocnemius nach 20 Wochen CHF 1,2fach höher als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 38).

Bei GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen war die Proteinexpression von IL-27 im M. gastrocnemius nach 20 Wochen CHF 5fach höher als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 38).

Die IL-27-Proteinexpression im M. gastrocnemius der GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse war nach 20 Wochen CHF 1,7fach höher als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 38).

### 3.3.2 Interferone und Tumor-Nekrose-Faktoren

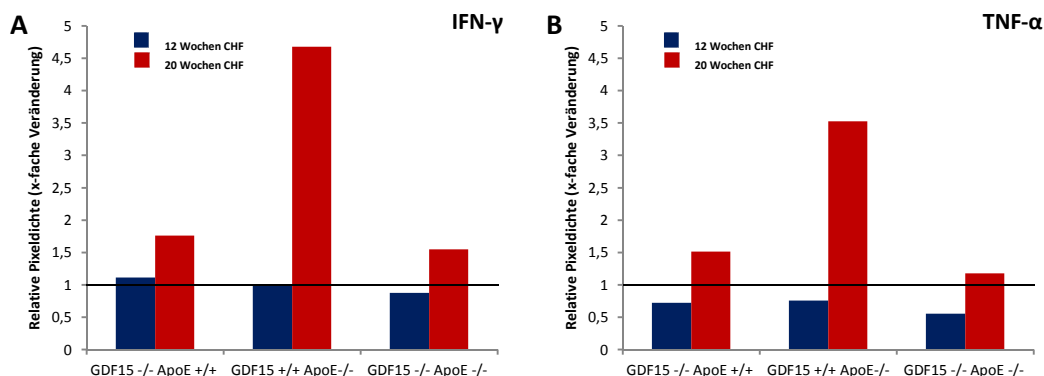


Abb. 23: Proteome Profiler™ Antibody Array (Mouse Cytokine Array) der Interferon- und Tumor-Nekrose-Faktor-Proteinexpression im M. gastrocnemius nach 12 bzw. 20 Wochen CHF. M. gastrocnemius von 12 Wochen CHF gefütterten GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup> (n=5), GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> (n=4), GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> (n=6) Mäusen und 20 Wochen CHF gefütterten GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup> (n=4), GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> (n=5), GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> (n=5) Mäusen. **A** Interferon- $\gamma$  **B** Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). Relative Pixeldichte (x-fache Veränderung) im Vergleich zum Wildtyp (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) 12 Wochen CHF (n=4) bzw. 20 Wochen CHF (n=5); Proteinexpressionswert Wildtyp 12 bzw. 20 Wochen CHF auf 1 gesetzt.

#### 3.3.2.1 IFN- $\gamma$

##### GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup> vs. Wildtyp (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>):

Bei GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>-Mäusen war die IFN- $\gamma$ -Proteinexpression im M. gastrocnemius nach 12 Wochen CHF 1,1fach und nach 20 Wochen CHF 1,8fach höher als bei Wildtyp-Mäusen (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) (s. Abb. 23 und Tab. 38).

##### GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> vs. Wildtyp (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>):

Die Proteinexpression von IFN- $\gamma$  im M. gastrocnemius von GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen war nach 12 Wochen CHF 1 % niedriger und nach 20 Wochen CHF 4,7fach höher als bei Wildtyp-Mäusen (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) (s. Abb. 23 und Tab. 38).

##### Doppelknockout (GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>) vs. GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>:

Die IFN- $\gamma$ -Proteinexpression im M. gastrocnemius von GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen war nach 12 Wochen CHF 11 % und nach 20 Wochen CHF 67 % niedriger als bei GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen (s. Abb. 23 und Tab. 38).

**12 Wochen CHF vs. 20 Wochen CHF:**

Die IFN- $\gamma$ -Proteinexpression im M. gastrocnemius von Wildtyp-Mäusen (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) war nach 20 Wochen CHF 2,9fach höher als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 38).

In der Gruppe der GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>-Mäuse war die Proteinexpression von IFN- $\gamma$  im M. gastrocnemius nach 20 Wochen CHF 4,6fach höher als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 38).

Bei GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen war die Proteinexpression von IFN- $\gamma$  im M. gastrocnemius nach 20 Wochen CHF 13,9fach höher als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 38).

Die IFN- $\gamma$ -Proteinexpression im M. gastrocnemius der GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse war nach 20 Wochen CHF 5,2fach höher als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 38).

**3.3.2.2 TNF- $\alpha$** **GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup> vs. Wildtyp (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>):**

Bei GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>-Mäusen war die TNF- $\alpha$ -Proteinexpression im M. gastrocnemius nach 12 Wochen CHF 27 % niedriger und nach 20 Wochen CHF 1,5fach höher als bei Wildtyp-Mäusen (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) (s. Abb. 23 und Tab. 38).

**GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> vs. Wildtyp (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>):**

Die Proteinexpression von TNF- $\alpha$  im M. gastrocnemius von GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen war nach 12 Wochen CHF 24 % niedriger und nach 20 Wochen CHF 3,5fach höher als bei Wildtyp-Mäusen (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) (s. Abb. 23 und Tab. 38).

**Doppelknockout (GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>) vs. GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>:**

Die TNF- $\alpha$ -Proteinexpression im M. gastrocnemius von GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen war nach 12 Wochen CHF 27 % und nach 20 Wochen CHF 67 % niedriger als bei GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen (s. Abb. 23 und Tab. 38).

**12 Wochen CHF vs. 20 Wochen CHF:**

Die TNF- $\alpha$ -Proteinexpression im M. gastrocnemius von Wildtyp-Mäusen (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) war nach 20 Wochen CHF 2fach höher als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 38).

In der Gruppe der GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>-Mäuse war die Proteinexpression von TNF- $\alpha$  im M. gastrocnemius nach 20 Wochen CHF 4,2fach höher als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 38).

Bei GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen war die Proteinexpression von TNF- $\alpha$  im M. gastrocnemius nach 20 Wochen CHF 9,3fach höher als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 38).

Die TNF- $\alpha$ -Proteinexpression im M. gastrocnemius der GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse war nach 20 Wochen CHF 4,2fach höher als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 38).

### 3.3.3 Wachstumsfaktoren

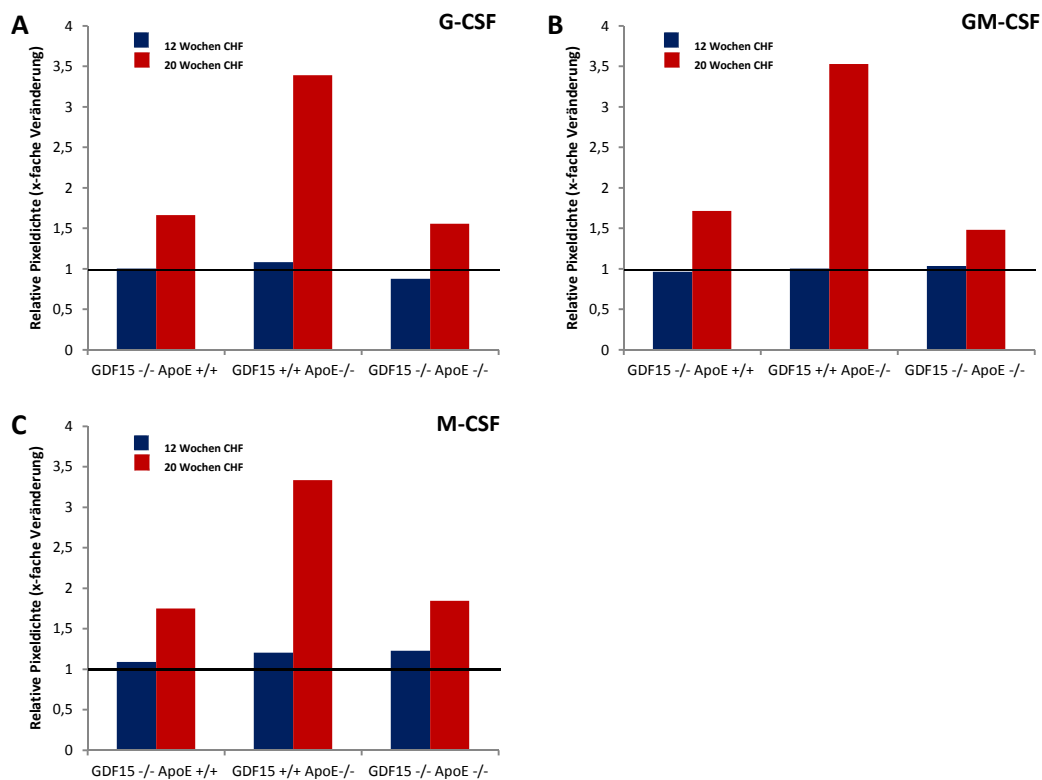


Abb. 24: Proteome Profiler™ Antibody Array (Mouse Cytokine Array) der Wachstumsfaktor-Proteinexpression im M. gastrocnemius nach 12 bzw. 20 Wochen CHF. M. gastrocnemius von 12 Wochen CHF gefütterten GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup> (n=5), GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> (n=4), GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> (n=6) Mäusen und 20 Wochen CHF gefütterten GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup> (n=4), GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> (n=5), GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> (n=5) Mäusen. **A** Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor (G-CSF) **B** Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF) **C** Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor (M-CSF). Relative Pixeldichte (x-fache Veränderung) im Vergleich zum Wildtyp (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) 12 Wochen CHF (n=4) bzw. 20 Wochen CHF (n=5); Proteinexpressionswert Wildtyp 12 bzw. 20 Wochen CHF auf 1 gesetzt.

#### 3.3.3.1 G-CSF

##### GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup> vs. Wildtyp (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>):

Nach 12 Wochen CHF unterschied sich die G-CSF-Proteinexpression im M. gastrocnemius zwischen GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>- und Wildtyp-Mäusen (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) nicht. Nach 20 Wochen CHF war die Proteinexpression von G-CSF im M. gastrocnemius 1,7fach höher als bei Wildtyp-Mäusen (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) (s. Abb. 24 und Tab. 38).



**GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> vs. Wildtyp (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>):**

Die Proteinexpression von G-CSF im M. gastrocnemius von GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen war nach 12 Wochen CHF 1,1fach und nach 20 Wochen CHF 3,4fach höher als bei Wildtyp-Mäusen (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) (s. Abb. 24 und Tab. 38).

**Doppelknockout (GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>) vs. GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>:**

Die G-CSF-Proteinexpression im M. gastrocnemius von GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen war nach 12 Wochen CHF 19 % und nach 20 Wochen CHF 54 % niedriger als bei GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen (s. Abb. 24 und Tab. 38).

**12 Wochen CHF vs. 20 Wochen CHF:**

Die G-CSF-Proteinexpression im M. gastrocnemius von Wildtyp-Mäusen (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) war nach 20 Wochen CHF 1,6fach höher als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 38).

In der Gruppe der GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>-Mäuse war die Proteinexpression von G-CSF im M. gastrocnemius nach 20 Wochen CHF 2,6fach höher als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 38).

Bei GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen war die Proteinexpression von G-CSF im M. gastrocnemius nach 20 Wochen CHF 4,9fach höher als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 38).

Die G-CSF-Proteinexpression im M. gastrocnemius der GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse war nach 20 Wochen CHF 2,8fach höher als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 38).

**3.3.3.2 GM-CSF**

**GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup> vs. Wildtyp (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>):**

Bei GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>-Mäusen war die GM-CSF-Proteinexpression im M. gastrocnemius nach 12 Wochen CHF 4 % niedriger und nach 20 Wochen CHF 1,7fach höher als bei Wildtyp-Mäusen (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) (s. Abb. 24 und Tab. 38).

**GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> vs. Wildtyp (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>):**

Nach 12 Wochen CHF unterschied sich die GM-CSF-Proteinexpression im M. gastrocnemius zwischen GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>- und Wildtyp-Mäusen (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) nicht. Nach 20

Wochen CHF war die Proteinexpression von GM-CSF im M. gastrocnemius 3,5fach höher bei Wildtyp-Mäusen (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) (s. Abb. 24 und Tab. 38).

**Doppelknockout (GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>) vs. GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>:**

Nach 12 Wochen CHF unterschied sich die GM-CSF-Proteinexpression im M. gastrocnemius zwischen GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>- und GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen nicht. Nach 20 Wochen CHF war die Proteinexpression von GM-CSF im M. gastrocnemius 58 % niedriger als bei GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen (s. Abb. 24 und Tab. 38).

**12 Wochen CHF vs. 20 Wochen CHF:**

Die GM-CSF-Proteinexpression im M. gastrocnemius von Wildtyp-Mäusen (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) war nach 20 Wochen CHF 1,5fach höher als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 38).

In der Gruppe der GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>-Mäuse war die Proteinexpression von GM-CSF im M. gastrocnemius nach 20 Wochen CHF 2,7fach höher als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 38).

Bei GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen war die Proteinexpression von GM-CSF im M. gastrocnemius nach 20 Wochen CHF 5,4fach höher als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 38).

Die GM-CSF-Proteinexpression im M. gastrocnemius der GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse war nach 20 Wochen CHF 2,2fach höher als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 38).

**3.3.3.3 M-CSF**

**GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup> vs. Wildtyp (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>):**

Bei GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>-Mäusen war die M-CSF-Proteinexpression im M. gastrocnemius nach 12 Wochen CHF 1,1fach und nach 20 Wochen CHF 1,7fach höher als bei Wildtyp-Mäusen (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) (s. Abb. 24 und Tab. 38).

**GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> vs. Wildtyp (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>):**

Die Proteinexpression von M-CSF im M. gastrocnemius von GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen war nach 12 Wochen CHF 1,2fach und nach 20 Wochen CHF 3,3fach höher als bei Wildtyp-Mäusen (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) (s. Abb. 24 und Tab. 38).

**Doppelknockout (GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>) vs. GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>:**

Nach 12 Wochen CHF unterschied sich die M-CSF-Proteinexpression im M. gastrocnemius zwischen GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>- und GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen nicht. Nach 20 Wochen CHF war die Proteinexpression von M-CSF im M. gastrocnemius 45 % niedriger als bei GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen (s. Abb. 24 und Tab. 38).

**12 Wochen CHF vs. 20 Wochen CHF:**

Die M-CSF-Proteinexpression im M. gastrocnemius von Wildtyp-Mäusen (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) war nach 20 Wochen CHF 1,6fach höher als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 38).

In der Gruppe der GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>-Mäuse war die Proteinexpression von M-CSF im M. gastrocnemius nach 20 Wochen CHF 2,6fach höher als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 38).

Bei GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen war die Proteinexpression von M-CSF im M. gastrocnemius nach 20 Wochen CHF 4,5fach höher als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 38).

Die M-CSF-Proteinexpression im M. gastrocnemius der GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse war nach 20 Wochen CHF 2,4fach höher als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 38).

### 3.3.4 Chemokine

#### 3.3.4.1 Chemokine der CC-Familie

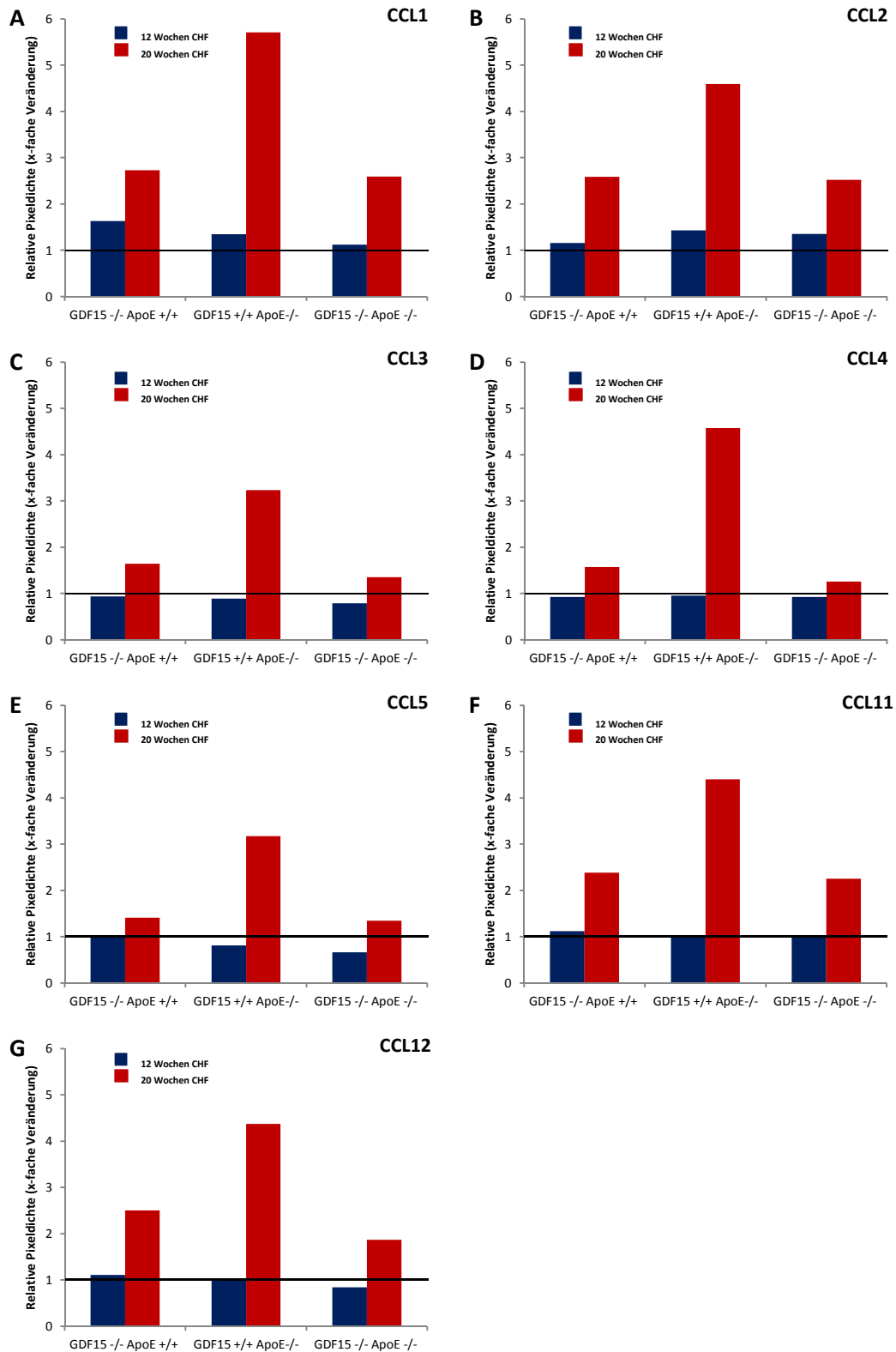


Abb. 25: Proteome Profiler™ Antibody Array (Mouse Cytokine Array) der Chemokin-Proteinexpression der CC-Familie im M. gastrocnemius nach 12 bzw. 20 Wochen CHF. M. gastrocnemius von 12 Wochen CHF gefütterten

GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup> (n=5), GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> (n=4), GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> (n=6) Mäusen und 20 Wochen CHF gefütterten GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup> (n=4), GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> (n=5), GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> (n=5) Mäusen. **A** CC-Chemokinligand 1 (CCL1) **B** CC-Chemokinligand 2 (CCL2) **C** CC-Chemokinligand 3 (CCL3) **D** CC-Chemokinligand 4 (CCL4) **E** CC-Chemokinligand 5 (CCL5) **F** CC-Chemokinligand 11 (CCL11) **G** CC-Chemokinligand 12 (CCL12). Relative Pixeldichte (x-fache Veränderung) im Vergleich zum Wildtyp (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) 12 Wochen CHF (n=4) bzw. 20 Wochen CHF (n=5); Proteinexpressionswert Wildtyp 12 bzw. 20 Wochen CHF auf 1 gesetzt.

#### 3.3.4.1.1 CCL1

##### **GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup> vs. Wildtyp (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>):**

Bei GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>-Mäusen war die CCL1-Proteinexpression im M. gastrocnemius nach 12 Wochen CHF 1,6fach und nach 20 Wochen CHF 2,7fach höher als bei Wildtyp-Mäusen (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) (s. Abb. 25 und Tab. 38).

##### **GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> vs. Wildtyp (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>):**

Die Proteinexpression von CCL1 im M. gastrocnemius von GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen war nach 12 Wochen CHF 1,3fach und nach 20 Wochen CHF 5,7fach höher als bei Wildtyp-Mäusen (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) (s. Abb. 25 und Tab. 38).

##### **Doppelknockout (GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>) vs. GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>:**

Die CCL1-Proteinexpression im M. gastrocnemius von GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen war nach 12 Wochen CHF 17 % und nach 20 Wochen CHF 55 % niedriger als bei GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen (s. Abb. 25 und Tab. 38).

##### **12 Wochen CHF vs. 20 Wochen CHF:**

Die CCL1-Proteinexpression im M. gastrocnemius von Wildtyp-Mäusen (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) war nach 20 Wochen CHF 31 % niedriger als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 38).

In der Gruppe der GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>-Mäuse war die Proteinexpression von CCL1 im M. gastrocnemius nach 20 Wochen CHF 1,1fach höher als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 38).

Bei GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen war die Proteinexpression von CCL1 im M. gastrocnemius nach 20 Wochen CHF 2,9fach höher als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 38).

Die CCL1-Proteinexpression im M. gastrocnemius der GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse war nach 20 Wochen CHF 1,6fach höher als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 38).

#### **3.3.4.1.2 CCL2**

##### **GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup> vs. Wildtyp (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>):**

Bei GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>-Mäusen war die CCL2-Proteinexpression im M. gastrocnemius nach 12 Wochen CHF 1,2fach und nach 20 Wochen CHF 2,6fach höher als bei Wildtyp-Mäusen (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) (s. Abb. 25 und Tab. 38).

##### **GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> vs. Wildtyp (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>):**

Die Proteinexpression von CCL2 im M. gastrocnemius von GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen war nach 12 Wochen CHF 1,4fach und nach 20 Wochen CHF 4,6fach höher als bei Wildtyp-Mäusen (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) (s. Abb. 25 und Tab. 38).

##### **Doppelknockout (GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>) vs. GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>:**

Die CCL2-Proteinexpression im M. gastrocnemius von GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen war nach 12 Wochen CHF 6 % und nach 20 Wochen CHF 45 % niedriger als bei GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen (s. Abb. 25 und Tab. 38).

##### **12 Wochen CHF vs. 20 Wochen CHF:**

Die CCL2-Proteinexpression im M. gastrocnemius von Wildtyp-Mäusen (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) war nach 20 Wochen CHF 10 % niedriger als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 38).

In der Gruppe der GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>-Mäuse war die Proteinexpression von CCL2 im M. gastrocnemius nach 20 Wochen CHF 2fach höher als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 38).

Bei GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen war die Proteinexpression von CCL2 im M. gastrocnemius nach 20 Wochen CHF 2,9fach höher als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 38).

Die CCL2-Proteinexpression im M. gastrocnemius der GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse war nach 20 Wochen CHF 1,7fach höher als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 38).

### 3.3.4.1.3 CCL3

#### **GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup> vs. Wildtyp (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>):**

Bei GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>-Mäusen war die CCL3-Proteinexpression im M. gastrocnemius nach 12 Wochen CHF 7 % niedriger und nach 20 Wochen CHF 1,6fach höher als bei Wildtyp-Mäusen (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) (s. Abb. 25 und Tab. 38).

#### **GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> vs. Wildtyp (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>):**

Die Proteinexpression von CCL3 im M. gastrocnemius von GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen war nach 12 Wochen CHF 11 % niedriger und nach 20 Wochen CHF 3,2fach höher als bei Wildtyp-Mäusen (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) (s. Abb. 25 und Tab. 38).

#### **Doppelknockout (GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>) vs. GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>:**

Die CCL3-Proteinexpression im M. gastrocnemius von GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen war nach 12 Wochen CHF 11 % und nach 20 Wochen CHF 58 % niedriger als bei GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen (s. Abb. 25 und Tab. 38).

#### **12 Wochen CHF vs. 20 Wochen CHF:**

Die CCL3-Proteinexpression im M. gastrocnemius von Wildtyp-Mäusen (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) war nach 20 Wochen CHF 3 % niedriger als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 38).

In der Gruppe der GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>-Mäuse war die Proteinexpression von CCL3 im M. gastrocnemius nach 20 Wochen CHF 1,7fach höher als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 38).

Bei GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen war die Proteinexpression von CCL3 im M. gastrocnemius nach 20 Wochen CHF 3,5fach höher als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 38).

Die CCL3-Proteinexpression im M. gastrocnemius der GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse war nach 20 Wochen CHF 1,7fach höher als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 38).

### 3.3.4.1.4 CCL4

#### **GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup> vs. Wildtyp (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>):**

Bei GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>-Mäusen war die CCL4-Proteinexpression im M. gastrocnemius nach 12 Wochen CHF 7 % niedriger und nach 20 Wochen CHF 1,6fach höher als bei Wildtyp-Mäusen (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) (s. Abb. 25 und Tab. 38).

**GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> vs. Wildtyp (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>):**

Die Proteinexpression von CCL4 im M. gastrocnemius von GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen war nach 12 Wochen CHF 4 % niedriger und nach 20 Wochen CHF 4,6fach höher als bei Wildtyp-Mäusen (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) (s. Abb. 25 und Tab. 38).

**Doppelknockout (GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>) vs. GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>:**

Die CCL4-Proteinexpression im M. gastrocnemius von GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen war nach 12 Wochen CHF 3 % und nach 20 Wochen CHF 73 % niedriger als bei GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen (s. Abb. 25 und Tab. 38).

**12 Wochen CHF vs. 20 Wochen CHF:**

Die CCL4-Proteinexpression im M. gastrocnemius von Wildtyp-Mäusen (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) war nach 20 Wochen CHF 20 % niedriger als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 38).

In der Gruppe der GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>-Mäuse war die Proteinexpression von CCL4 im M. gastrocnemius nach 20 Wochen CHF 1,4fach höher als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 38).

Bei GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen war die Proteinexpression von CCL4 im M. gastrocnemius nach 20 Wochen CHF 3,8fach höher als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 38).

Die CCL4-Proteinexpression im M. gastrocnemius der GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse war nach 20 Wochen CHF 1,1fach höher als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 38).

**3.3.4.1.5 CCL5****GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup> vs. Wildtyp (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>):**

Bei GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>-Mäusen war die CCL5-Proteinexpression im M. gastrocnemius nach 12 Wochen CHF 1 % niedriger und nach 20 Wochen CHF 1,4fach höher als bei Wildtyp-Mäusen (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) (s. Abb. 25 und Tab. 38).

**GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> vs. Wildtyp (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>):**

Die Proteinexpression von CCL5 im M. gastrocnemius von GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen war nach 12 Wochen CHF 18 % niedriger und nach 20 Wochen CHF 3,2fach höher als bei Wildtyp-Mäusen (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) (s. Abb. 25 und Tab. 38).



**Doppelknockout (GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>) vs. GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>:**

Die CCL5-Proteinexpression im M. gastrocnemius von GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen war nach 12 Wochen CHF 18 % und nach 20 Wochen CHF 58 % niedriger als bei GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen (s. Abb. 25 und Tab. 38).

**12 Wochen CHF vs. 20 Wochen CHF:**

Die CCL5-Proteinexpression im M. gastrocnemius von Wildtyp-Mäusen (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) war nach 20 Wochen CHF 20 % niedriger als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 38).

In der Gruppe der GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>-Mäuse war die Proteinexpression von CCL5 im M. gastrocnemius nach 20 Wochen CHF 1,1fach höher als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 38).

Bei GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen war die Proteinexpression von CCL5 im M. gastrocnemius nach 20 Wochen CHF 3,1fach höher als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 38).

Die CCL5-Proteinexpression im M. gastrocnemius der GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse war nach 20 Wochen CHF 1,6fach höher als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 38).

**3.3.4.1.6 CCL11****GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup> vs. Wildtyp (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>):**

Bei GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>-Mäusen war die CCL11-Proteinexpression im M. gastrocnemius nach 12 Wochen CHF 1,1fach und nach 20 Wochen CHF 2,4fach höher als bei Wildtyp-Mäusen (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) (s. Abb. 25 und Tab. 38).

**GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> vs. Wildtyp (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>):**

Nach 12 Wochen CHF unterschied sich die CCL11-Proteinexpression im M. gastrocnemius zwischen GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> und Wildtyp-Mäusen (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) nicht. Nach 20 Wochen CHF war die Proteinexpression von CCL11 im M. gastrocnemius 4,4fach höher als bei Wildtyp-Mäusen (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) (s. Abb. 25 und Tab. 38).

**Doppelknockout (GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>) vs. GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>:**

Nach 12 Wochen CHF unterschied sich die CCL11-Proteinexpression im M. gastrocnemius zwischen GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> und GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen nicht. Nach 20 Wochen CHF war

die Proteinexpression von CCL11 im M. gastrocnemius 49 % niedriger als bei GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen (s. Abb. 25 und Tab. 38).

#### **12 Wochen CHF vs. 20 Wochen CHF:**

Die CCL11-Proteinexpression im M. gastrocnemius von Wildtyp-Mäusen (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) war nach 20 Wochen CHF 1,1fach höher als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 38).

In der Gruppe der GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>-Mäuse war die Proteinexpression von CCL11 im M. gastrocnemius nach 20 Wochen CHF 2,4fach höher als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 38).

Bei GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen war die Proteinexpression von CCL11 im M. gastrocnemius nach 20 Wochen CHF 4,9fach höher als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 38).

Die CCL11-Proteinexpression im M. gastrocnemius der GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse war nach 20 Wochen CHF 2,5fach höher als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 38).

#### **3.3.4.1.7 CCL12**

##### **GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup> vs. Wildtyp (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>):**

Bei GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>-Mäusen war die CCL12-Proteinexpression im M. gastrocnemius nach 12 Wochen CHF 1,1fach und nach 20 Wochen CHF 2,5fach höher als bei Wildtyp-Mäusen (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) (s. Abb. 25 und Tab. 38).

##### **GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> vs. Wildtyp (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>):**

Die Proteinexpression von CCL12 im M. gastrocnemius von GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen war nach 12 Wochen CHF 1 % niedriger und nach 20 Wochen CHF 4,4fach höher als bei Wildtyp-Mäusen (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) (s. Abb. 25 und Tab. 38).

##### **Doppelknockout (GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>) vs. GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>:**

Die CCL12-Proteinexpression im M. gastrocnemius von GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen war nach 12 Wochen CHF 15 % und nach 20 Wochen CHF 57 % niedriger als bei GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen (s. Abb. 25 und Tab. 38).

**12 Wochen CHF vs. 20 Wochen CHF:**

Die CCL12-Proteinexpression im M. gastrocnemius von Wildtyp-Mäusen (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) war nach 20 Wochen CHF 35 % niedriger als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 38).

In der Gruppe der GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>-Mäuse war die Proteinexpression von CCL12 im M. gastrocnemius nach 20 Wochen CHF 1,5fach höher als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 38).

Bei GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen war die Proteinexpression von CCL12 im M. gastrocnemius nach 20 Wochen CHF 2,9fach höher als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 38).

Die CCL12-Proteinexpression im M. gastrocnemius der GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse war nach 20 Wochen CHF 1,6fach höher als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 38).

### 3.3.4.2 Chemokine der CXC-Familie

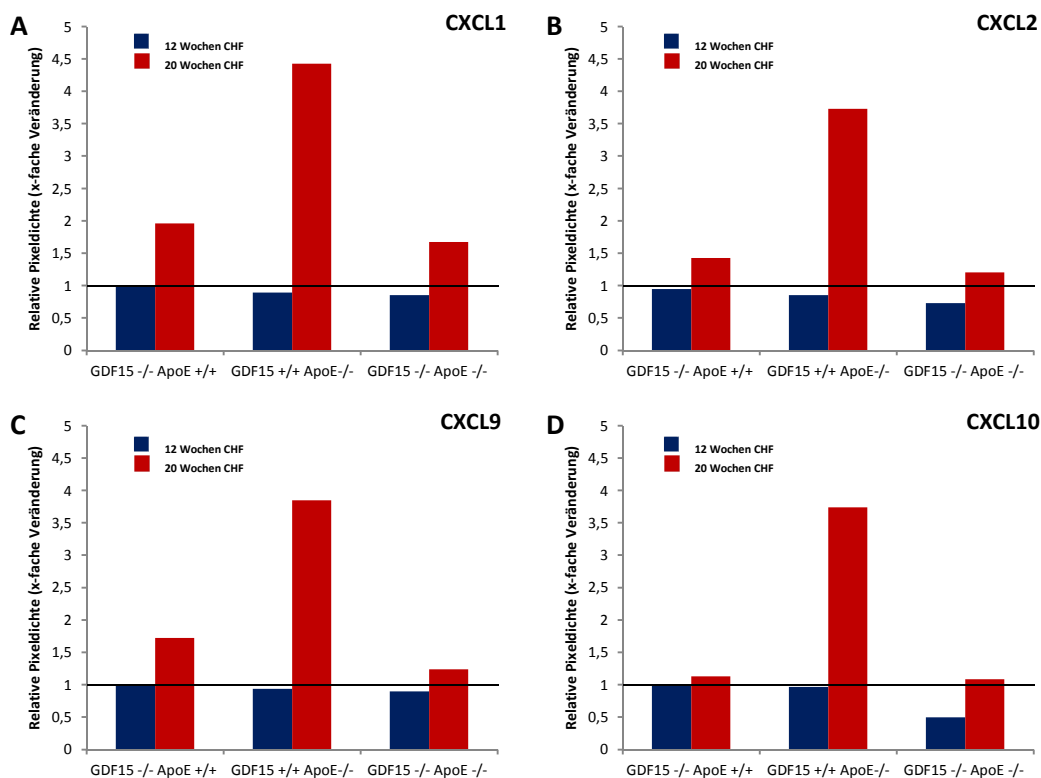


Abb. 26: Proteome Profiler™ Antibody Array (Mouse Cytokine Array) der Chemokin-Proteinexpression der CXC-Familie im M. gastrocnemius nach 12 bzw. 20 Wochen CHF. M. gastrocnemius von 12 Wochen CHF gefütterten GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup> (n=5), GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> (n=4), GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> (n=6) Mäusen und 20 Wochen CHF gefütterten GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup> (n=4), GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> (n=5), GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> (n=5) Mäusen. **A** CXC-Chemokinligand 1 (CXCL1) **B** CXC-Chemokinligand 2 (CXCL2) **C** CXC-Chemokinligand 9 (CXCL9) **D** CXC-Chemokinligand 10 (CXCL10). Relative Pixeldichte (x-fache Veränderung) im Vergleich zum Wildtyp (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) 12 Wochen CHF (n=4) bzw. 20 Wochen CHF (n=5); Proteinexpressionswert Wildtyp 12 bzw. 20 Wochen CHF auf 1 gesetzt.

#### 3.3.4.2.1 CXCL1

##### GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup> vs. Wildtyp (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>):

Bei GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>-Mäusen war die CXCL1-Proteinexpression im M. gastrocnemius nach 12 Wochen CHF 2 % niedriger und nach 20 Wochen CHF 2fach höher als bei Wildtyp-Mäusen (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) (s. Abb. 26 und Tab. 38).

**GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> vs. Wildtyp (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>):**

Die Proteinexpression von CXCL1 im M. gastrocnemius von GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen war nach 12 Wochen CHF 11 % niedriger und nach 20 Wochen CHF 4,4fach höher als bei Wildtyp-Mäusen (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) (s. Abb. 26 und Tab. 38).

**Doppelknockout (GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>) vs. GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>:**

Die CXCL1-Proteinexpression im M. gastrocnemius von GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen war nach 12 Wochen CHF 4 % und nach 20 Wochen CHF 62 % niedriger als bei GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen (s. Abb. 26 und Tab. 38).

**12 Wochen CHF vs. 20 Wochen CHF:**

Die CXCL1-Proteinexpression im M. gastrocnemius von Wildtyp-Mäusen (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) war nach 20 Wochen CHF 2,6fach höher als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 38).

In der Gruppe der GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>-Mäuse war die Proteinexpression von CXCL1 im M. gastrocnemius nach 20 Wochen CHF 5,2fach höher als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 38).

Bei GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen war die Proteinexpression von CXCL1 im M. gastrocnemius nach 20 Wochen CHF 13fach höher als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 38).

Die CXCL1-Proteinexpression im M. gastrocnemius der GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse war nach 20 Wochen CHF 5,1fach höher als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 38).

**3.3.4.2.2 CXCL2****GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup> vs. Wildtyp (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>):**

Bei GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>-Mäusen war die CXCL2-Proteinexpression im M. gastrocnemius nach 12 Wochen CHF 5 % niedriger und nach 20 Wochen CHF 1,4fach höher als bei Wildtyp-Mäusen (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) (s. Abb. 26 und Tab. 38).

**GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> vs. Wildtyp (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>):**

Die Proteinexpression von CXCL2 im M. gastrocnemius von GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen war nach 12 Wochen CHF 15 % niedriger und nach 20 Wochen CHF 3,7fach höher als bei Wildtyp-Mäusen (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) (s. Abb. 26 und Tab. 38).

**Doppelknockout (GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>) vs. GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>:**

Die CXCL2-Proteinexpression im M. gastrocnemius von GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen war nach 12 Wochen CHF 15 % und nach 20 Wochen CHF 68 % niedriger als bei GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen (s. Abb. 26 und Tab. 38).

**12 Wochen CHF vs. 20 Wochen CHF:**

Die CXCL2-Proteinexpression im M. gastrocnemius von Wildtyp-Mäusen (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) war nach 20 Wochen CHF 14 % niedriger als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 38).

In der Gruppe der GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>-Mäuse war die Proteinexpression von CXCL2 im M. gastrocnemius nach 20 Wochen CHF 1,3fach höher als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 38).

Bei GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen war die Proteinexpression von CXCL2 im M. gastrocnemius nach 20 Wochen CHF 3,8fach höher als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 38).

Die CXCL2-Proteinexpression im M. gastrocnemius der GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse war nach 20 Wochen CHF 1,4fach höher als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 38).

**3.3.4.2.3 CXCL9****GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup> vs. Wildtyp (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>):**

Nach 12 Wochen CHF unterschied sich die CXCL9-Proteinexpression im M. gastrocnemius zwischen GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>- und Wildtyp-Mäusen (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) nicht. Nach 20 Wochen CHF war die CXCL9-Proteinexpression im M. gastrocnemius 1,7fach höher als bei Wildtyp-Mäusen (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) (s. Abb. 26 und Tab. 38).

**GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> vs. Wildtyp (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>):**

Die Proteinexpression von CXCL9 im M. gastrocnemius von GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen war nach 12 Wochen CHF 6 % niedriger und nach 20 Wochen CHF 3,8fach höher als bei Wildtyp-Mäusen (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) (s. Abb. 26 und Tab. 38).

**Doppelknockout (GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>) vs. GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>:**

Die CXCL9-Proteinexpression im M. gastrocnemius von GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen war nach 12 Wochen CHF 4 % und nach 20 Wochen CHF 68 % niedriger als bei GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen (s. Abb. 26 und Tab. 38).

**12 Wochen CHF vs. 20 Wochen CHF:**

Die CXCL9-Proteinexpression im M. gastrocnemius von Wildtyp-Mäusen (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) war nach 20 Wochen CHF 1,7fach höher als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 38).

In der Gruppe der GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>-Mäuse war die Proteinexpression von CXCL9 im M. gastrocnemius nach 20 Wochen CHF 2,9fach höher als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 38).

Bei GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen war die Proteinexpression von CXCL9 im M. gastrocnemius nach 20 Wochen CHF 6,9fach höher als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 38).

Die CXCL9-Proteinexpression im M. gastrocnemius der GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse war nach 20 Wochen CHF 2,3fach höher als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 38).

**3.3.4.2.4 CXCL10****GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup> vs. Wildtyp (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>):**

Nach 12 Wochen CHF unterschied sich die CXCL10-Proteinexpression im M. gastrocnemius zwischen GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>- und Wildtyp-Mäusen (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) nicht. Nach 20 Wochen CHF war die Proteinexpression von CXCL10 im M. gastrocnemius 1,1fach höher als bei Wildtyp-Mäusen (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) (s. Abb. 26 und Tab. 38).

**GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> vs. Wildtyp (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>):**

Die Proteinexpression von CXCL10 im M. gastrocnemius von GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen war nach 12 Wochen CHF 3 % niedriger und nach 20 Wochen CHF 3,7fach höher als bei Wildtyp-Mäusen (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) (s. Abb. 26 und Tab. 38).

**Doppelknockout (GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>) vs. GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>:**

Die CXCL10-Proteinexpression im M. gastrocnemius von GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen war nach 12 Wochen CHF 49 % und nach 20 Wochen CHF 71 % niedriger als bei GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen (s. Abb. 26 und Tab. 38).

**12 Wochen CHF vs. 20 Wochen CHF:**

Die CXCL10-Proteinexpression im M. gastrocnemius von Wildtyp-Mäusen (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) war nach 20 Wochen CHF 1,4fach höher als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 38).

In der Gruppe der GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>-Mäuse war die Proteinexpression von CXCL10 im M. gastrocnemius nach 20 Wochen CHF 1,6fach höher als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 38).

Bei GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen war die Proteinexpression von CXCL10 im M. gastrocnemius nach 20 Wochen CHF 5,4fach höher als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 38).

Die CXCL10-Proteinexpression im M. gastrocnemius der GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse war nach 20 Wochen CHF 3fach höher als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 38).



### 3.3.5 Myeloidzellrezeptoren, Komplementfaktoren, Metalloproteinaseninhibitoren

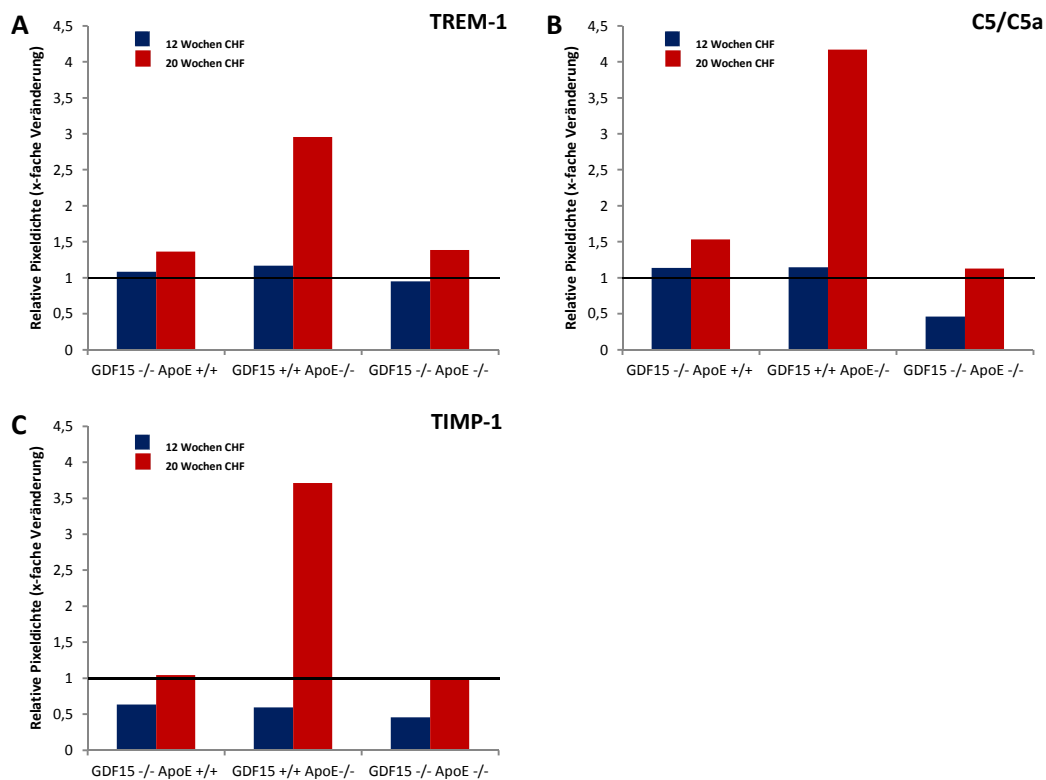


Abb. 27: Proteome Profiler™ Antibody Array (Mouse Cytokine Array) der Myeloidzellrezeptor-, Komplementfaktor- und Metalloproteinaseninhibitor-Proteinexpression im *M. gastrocnemius* nach 12 bzw. 20 Wochen CHF. *M. gastrocnemius* von 12 Wochen CHF gefütterten GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup> (n=5), GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> (n=4), GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> (n=6) Mäusen und 20 Wochen CHF gefütterten GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup> (n=4), GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> (n=5), GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> (n=5) Mäusen. **A** Triggering receptor expressed on myeloid cells 1 (TREM-1) **B** Komplementfaktor C5/C5a (C5/C5a) **G** Tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP-1). Relative Pixeldichte (x-fache Veränderung) im Vergleich zum Wildtyp (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) 12 Wochen CHF (n=4) bzw. 20 Wochen CHF (n=5); Proteinexpressionswert Wildtyp 12 bzw. 20 Wochen CHF auf 1 gesetzt.

#### 3.3.5.1 TREM-1

##### GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup> vs. Wildtyp (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>):

Bei GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>-Mäusen war die TREM-1-Proteinexpression im *M. gastrocnemius* nach 12 Wochen CHF 1,1fach und nach 20 Wochen CHF 1,4fach höher als bei Wildtyp-Mäusen (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) (s. Abb. 27 und Tab. 38).

**GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> vs. Wildtyp (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>):**

Die Proteinexpression von TREM-1 im M. gastrocnemius von GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen war nach 12 Wochen CHF 1,2fach und nach 20 Wochen CHF 3fach höher als bei Wildtyp-Mäusen (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) (s. Abb. 27 und Tab. 38).

**Doppelknockout (GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>) vs. GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>:**

Die TREM-1-Proteinexpression im M. gastrocnemius von GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen war nach 12 Wochen CHF 19 % und nach 20 Wochen CHF 53 % niedriger als bei GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen (s. Abb. 27 und Tab. 38).

**12 Wochen CHF vs. 20 Wochen CHF:**

Die TREM-1-Proteinexpression im M. gastrocnemius von Wildtyp-Mäusen (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) war nach 20 Wochen CHF 1,5fach höher als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 38).

In der Gruppe der GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>-Mäuse war die Proteinexpression von TREM-1 im M. gastrocnemius nach 20 Wochen CHF 1,9fach höher als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 38).

Bei GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen war die Proteinexpression von TREM-1 im M. gastrocnemius nach 20 Wochen CHF 3,9fach höher als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 38).

Die TREM-1-Proteinexpression im M. gastrocnemius der GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse war nach 20 Wochen CHF 2,3fach höher als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 38).

**3.3.5.2 C5/C5a****GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup> vs. Wildtyp (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>):**

Bei GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>-Mäusen war die C5/C5a-Proteinexpression im M. gastrocnemius nach 12 Wochen CHF 1,1fach und nach 20 Wochen CHF 1,5fach höher als bei Wildtyp-Mäusen (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) (s. Abb. 27 und Tab. 38).

**GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> vs. Wildtyp (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>):**

Die Proteinexpression von C5/C5a im M. gastrocnemius von GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen war nach 12 Wochen CHF 1,1fach und nach 20 Wochen CHF 4,2fach höher als bei Wildtyp-Mäusen (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) (s. Abb. 27 und Tab. 38).

**Doppelknockout (GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>) vs. GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>:**

Die C5/C5a-Proteinexpression im M. gastrocnemius von GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen war nach 12 Wochen CHF 60 % und nach 20 Wochen CHF 73 % niedriger als bei GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen (s. Abb. 27 und Tab. 38).

**12 Wochen CHF vs. 20 Wochen CHF:**

Die C5/C5a-Proteinexpression im M. gastrocnemius von Wildtyp-Mäusen (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) war nach 20 Wochen CHF 2,5fach höher als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 38).

In der Gruppe der GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>-Mäuse war die Proteinexpression von C5/C5a im M. gastrocnemius nach 20 Wochen CHF 3,3fach höher als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 38).

Bei GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen war die Proteinexpression von C5/C5a im M. gastrocnemius nach 20 Wochen CHF 9fach höher als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 38).

Die C5/C5a-Proteinexpression im M. gastrocnemius der GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse war nach 20 Wochen CHF 6fach höher als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 38).

**3.3.5.3 TIMP-1****GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup> vs. Wildtyp (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>):**

Bei GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>-Mäusen war die TIMP-1-Proteinexpression im M. gastrocnemius nach 12 Wochen CHF 36 % niedriger als bei Wildtyp-Mäusen (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>). Nach 20 Wochen CHF unterschied sich die Proteinexpression von TIMP-1 im M. gastrocnemius zwischen GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>- und Wildtyp-Mäusen (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) nicht (s. Abb. 27 und Tab. 38).

**GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> vs. Wildtyp (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>):**

Die Proteinexpression von TIMP-1 im M. gastrocnemius von GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen war nach 12 Wochen CHF 40 % niedriger und nach 20 Wochen CHF 3,7fach höher als bei Wildtyp-Mäusen (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) (s. Abb. 27 und Tab. 38).

**Doppelknockout (GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>) vs. GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>:**

Die TIMP-1-Proteinexpression im M. gastrocnemius von GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen war nach 12 Wochen CHF 23 % und nach 20 Wochen CHF 73 % niedriger als bei GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen (s. Abb. 27 und Tab. 38).

**12 Wochen CHF vs. 20 Wochen CHF:**

Die TIMP-1-Proteinexpression im M. gastrocnemius von Wildtyp-Mäusen (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) war nach 20 Wochen CHF 2,1fach höher als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 38).

In der Gruppe der GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>-Mäuse war die Proteinexpression von TIMP-1 im M. gastrocnemius nach 20 Wochen CHF 3,5fach höher als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 38).

Bei GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen war die Proteinexpression von TIMP-1 im M. gastrocnemius nach 20 Wochen CHF 13,3fach höher als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 38).

Die TIMP-1-Proteinexpression im M. gastrocnemius der GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse war nach 20 Wochen CHF 4,7fach höher als nach 12 Wochen CHF (s. Tab. 38).

#### 4 DISKUSSION

Der Wachstums-Differenzierungs-Faktor-15 (GDF-15) gehört zur TGF- $\beta$ -Superfamilie und wird nach Stressexposition insbesondere von Makrophagen, Gefäßmuskelzellen, Kardiomyozyten, Adipozyten und Endothelzellen exprimiert (Schlittenhardt et al., 2004; Bauskin et al., 2005; Bermúdez et al., 2008; Ding et al., 2009; Adela and Banerjee, 2015). Die Protein- und mRNA-Expression von GDF-15 ist in arteriosklerotischen Gefäßwänden hochreguliert und dort in Makrophagen lokalisiert (Schlittenhardt et al., 2004; Bonaterra et al., 2012). GDF-15 dient als neuer Biomarker für kardiovaskulären Stress und ist u.a. mit Herzinsuffizienz und kardialem Remodeling assoziiert (Andersson et al., 2016; Meijers et al., 2016). Es konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass durch GDF-15-Defizienz die Entstehung und Progression der Arteriosklerose gehemmt wird (de Jager et al., 2011; Bonaterra et al., 2012).

Eine erhöhte GDF-15-Expression wurde bei verschiedenen malignen Erkrankungen (z.B. Kolon- und Pankreaskarzinom) festgestellt (Adela and Banerjee, 2015). Die Höhe des Serum-GDF-15-Spiegels ist dabei mit dem histopathologischen Malignitätsgrad und der Zellproliferation sowie fortschreitenden Metastasierung des Tumors assoziiert (Unsicker et al., 2013). Ein direkter Zusammenhang zwischen GDF-15 und tumorassoziertem Gewichtsverlust wurde bei Patienten mit fortgeschrittenem Prostatakarzinom beschrieben (Johnen et al., 2007). Lerner et al. konnten darüber hinaus zeigen, dass GDF-15 und andere inflammatorische Marker (z.B. IL-6, IL8) bei tumor erkrankten Patienten erhöht sind und dabei mit Gewichtsverlust, Abnahme des Body-Maß-Indexes (BMI) und schlechterem Überleben assoziiert sind (Lerner et al., 2015).

GDF-15 wird darüber hinaus auch mit auf der Intensivstation erworbener Muskelschwäche („intensive care unit acquired weakness“, ICUAW) assoziiert. Hier könnte GDF-15 über die Hemmung der Expression muskulärer microRNAs (miRNA), kurze nicht-kodierende Genabschnitte, das Ablaufen der TGF- $\beta$ -Signalkaskade verstärken und damit die Muskelatrophie fördern (Bloch et al., 2015).

Über GDF-15 und die Wirkung auf die Skelettmuskulatur bei Hypercholesterinämie ist jedoch insgesamt wenig bekannt. In diesem Zusammenhang sollte deshalb der Einfluss von GDF-15 auf die Expression inflammatorischer, angiogenetischer, apoptotischer bzw. atrophischer Gene/Proteine in der Skelettmuskulatur bei cholesteringefütterten Mäusen in einem Mausmodell für experimentelle Arteriosklerose (ApoE<sup>-/-</sup>) untersucht werden. Die mRNA-Expression von relevanten Genen für Inflammation, Apoptose, Angiogenese und Atrophie im M. gastrocnemius

wurde dafür mithilfe quantitativer Real-Time-RT-PCR (qRT-PCR) analysiert und die Proteinexpression mittels „Proteome Profiler™ Mouse Cytokine Array Kit“-System gemessen.

#### **4.1 Gewicht, Serum-Cholesterin- und -Triglyzeridspiegel**

##### **4.1.1 Gewicht**

Eine Zunahme des Gewichts nach Gabe eines cholesterinreichen Futters (CHF) für 12 bzw. 20 Wochen im Vergleich zum Referenzgewicht der Tiere (Charles-River-Datenbank; [www.criver.de](http://www.criver.de)) konnte in allen vier untersuchten Maus-Genotypen festgestellt werden (Kubo, 2013). Dies ist vermutlich auf die Fütterung mit cholesterinreicher Nahrung und der damit verbundenen erhöhten Kalorienzufuhr zurückzuführen, was bereits in anderen Studien gezeigt werden konnte (Harrington et al., 2007; Teng and Mustafa, 2011; Wang et al., 2011; Zhou et al., 2011).

Nach 20 Wochen CHF war bei GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen das Gewicht signifikant geringer als bei Wildtyp-Tieren (Kubo, 2013). Dieses Ergebnis deckt sich mit Beobachtungen, die Harrington et al. bei ApoE-defizienten Mäusen machten (Harrington et al., 2007).

Wir konnten darüber hinaus zeigen, dass GDF-15<sup>-/-</sup>-Mäuse vor CHF-Gabe bzw. nach 20 Wochen CHF signifikant schwerer waren als die jeweils korrespondierende Kontrolle (Wildtyp- bzw. GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Tiere) (Kubo, 2013). Dies deutet darauf hin, dass GDF-15 an der Regulation des Gewichts beteiligt ist. GDF-15 wird von Adipozyten als Adipokin freigesetzt und fungiert damit als Regulator des Stoffwechsels (Ding et al., 2009). Möglicherweise soll GDF-15 zentral über den Hypothalamus den Appetit und das Hungergefühl regulieren (Johnen et al., 2007). Macia et al. konnten zeigen, dass GDF-15 die Nahrungsaufnahme, das Körpergewicht sowie die Adipositas reduzieren und gleichzeitig die Glukosetoleranz verbessern kann (Macia et al., 2012). Umgekehrt kommt es bei GDF-15-defizienten Mäusen zu einem erhöhten Gewicht und Fettleibigkeit, die durch GDF-15-Applikationen reversibel sind (Tsai et al., 2013). Darüber hinaus korreliert der Serum-GDF-15-Spiegel bei adipösen und an Typ-2-Diabetes erkrankten Frauen u.a. mit dem Body-Maß-Index (BMI). Des Weiteren beschreiben Tsai et al., dass dem Einfluss von GDF-15 als Initiator der tumorassoziierten Gewichtsabnahme und Kachexie eine zentrale Bedeutung zukommt (Tsai et al., 2016). Da Johnen et al. bei GDF-15-überexprimierenden Mäusen mit ApoE-Knockout verglichen mit ApoE<sup>-/-</sup>-Tieren (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>) nach 6-monatiger Gabe einer fettreichen Nahrung eine Gewichtsreduktion feststellen konnten und unsere Arbeitsgruppe bei GDF-15-defizienten Mäusen eine Erhöhung des Gewichts fand, deutet dies auf eine gewichtsregulatorische Funktion von GDF-15 hin (Johnen et al., 2012; Kubo, 2013). Preusch et al. hingegen sahen bei GDF-15-defizienten

Mäusen mit LDL-Rezeptor-Knockout (GDF-15<sup>-/-</sup>/LDLr<sup>-/-</sup>) bei fettreicher Fütterung für 24 Wochen keine Veränderung des Gewichts im Vergleich zu GDF-15<sup>+/+</sup>/LDLr<sup>-/-</sup>-Mäusen (Preusch et al., 2013).

#### 4.1.2 Serum-Cholesterinspiegel

In allen untersuchten Tiergruppen wurden nach 12 bzw. 20 Wochen CHF signifikant höhere Serum-Cholesterinspiegel als vor Beginn der CHF-Gabe festgestellt (Kubo, 2013). Die Serum-Cholesterinspiegel der CHF-gefütterten Tiere lagen dabei über den Referenzwerten für Mäuse ohne CHF-Fütterung (Charles-River-Datenbank; [www.criver.com](http://www.criver.com)) (Kubo, 2013). In anderen Studien wurde dieser Effekt nach CHF-Gabe bereits beschrieben (Harrington et al., 2007).

Bei GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen wurde nach CHF-Gabe ein signifikant höherer Serum-Cholesterinspiegel im Vergleich zu Wildtyp-Tieren festgestellt (Kubo, 2013). Erhöhte Serum-Cholesterinspiegel bei ApoE-Defizienz wurden auch bereits im Rahmen anderer Studien gemessen (Harrington et al., 2007; Atkinson et al., 2008).

Die Serum-Cholesterinspiegel der GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>-Mäuse waren vor CHF-Gabe signifikant niedriger und nach 12 bzw. 20 Wochen CHF ähnlich im Vergleich zu Wildtyp-Tieren (Kubo, 2013). Möglich wäre hier eine Steigerung des Cholesterinstoffwechsels durch GDF-15-Defizienz bei ApoE-kompetenten Mausgenotypen. Bei GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen wurden, verglichen mit GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Tieren, signifikant höhere Serum-Cholesterinspiegel gemessen. Bonaterra et al. fanden erstaunlicherweise trotz der erhöhten Cholesterinspiegel signifikant kleinere arteriosklerotische Plaques im Truncus brachiocephalicus und dem Aortenbogen der GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse im Vergleich zu GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Tieren (Bonaterra et al., 2012). Die Erhöhung des Cholesterins, aber auch des Gewichts und der Serum-Triglyzeridspiegel bei GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen verglichen mit GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Tieren ist daher in diesem Zusammenhang vermutlich auf die gesteigerte CHF-Aufnahme durch GDF-15-Defizienz zurückzuführen (Johnen et al., 2007; Johnen et al., 2012; Macia et al., 2012; Tsai et al., 2013). Unsere Ergebnisse stehen in Einklang mit Untersuchungen von Johnen et al., die zeigten, dass GDF-15-Überexpression bei ApoE-defizienten Mäusen, an die für sechs Monate eine fettreiche Nahrung verfüttert wurde, tendenziell zu einer Reduktion des Serum-Cholesterinspiegels im Vergleich zu ApoE-defizienten Tieren (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>) führt (Johnen et al., 2012). Keinen Unterschied in der Höhe des Serum-Cholesterinspiegels fanden hingegen Preusch et al. bei GDF-15-defizienten Mäusen mit LDL-Rezeptor-Knockout (GDF-15<sup>-/-</sup>/LDLr<sup>-/-</sup>) bei fettreicher Fütterung für 24 Wochen im Vergleich zu GDF-15<sup>+/+</sup>/LDLr<sup>-/-</sup>-Mäusen (Preusch et al., 2013).

### 4.1.3 Serum-Triglyzeridspiegel

Vor cholesterinreicher Fütterung und nach 12 bzw. 20 Wochen CHF wurden bei ApoE-kompetenten Mäusen (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup> und GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) niedrigere Serum-Triglyzeridspiegel als die angegebenen Referenzwerte für Mäuse ohne CHF-Gabe (Charles-River-Datenbank; [www.criver.com](http://www.criver.com)) gemessen (Kubo, 2013). Bei GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Tieren zeigten sich vor CHF-Gabe und nach 12 Wochen CHF höhere Serum-Triglyzeridspiegel im Vergleich zu den angegebenen Referenzwerten für Mäuse ohne cholesterinreiche Fütterung (Kubo, 2013). Durch die ApoE-Kompetenz des Wildtyps bei gleichzeitiger CHF-Gabe könnte der Cholesterinstoffwechsel gesteigert werden. Dies könnte damit zusammenhängen, dass die Sekretion von Lipin-1 und -2 durch cholesterinhaltiges Futter herunterreguliert wird und der Serum-Triglyzeridspiegel dadurch absinkt (Obama et al., 2011).

Erhöhte Serum-Triglyzeridspiegel wurden bei GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen vor CHF-Gabe und nach 12 bzw. 20 Wochen CHF im Vergleich zu Wildtyp-Tieren gefunden (Kubo, 2013). Der Effekt der ApoE-Defizienz konnte in diesem Zusammenhang auch in anderen Studien bereits gezeigt werden (Zhang et al., 1992; Atkinson et al., 2008).

GDF-15-Defizienz (GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>) führte im Vergleich zum Wildtyp nach 12 bzw. 20 Wochen CHF sowie bei ApoE-defizienten Tieren (GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>) verglichen mit GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen nach 20 Wochen CHF zu signifikant höheren Serum-Triglyzeridspiegeln (Kubo, 2013). Erstaunlicherweise wurden bei GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen trotz höheren Serum-Triglyzerid- und -Cholesterinspiegeln sowie höherem Gewicht kleinere arteriosklerotische Plaques im Truncus brachiocephalicus und Aortenbogen gefunden als bei GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Tieren (Bonaterra et al., 2012; Kubo, 2013). Dies deutet auf einen Einfluss von GDF-15 auf die Entstehung und Progression arteriosklerotischer Plaques unabhängig vom Serum-Lipidspiegel hin. Hingegen konnten Johnen et al. zwischen GDF-15-überexprimierenden Mäusen mit ApoE-Defizienz und ApoE-Knockout-Tieren (GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>) nach 6-monatiger Gabe einer fettreichen Nahrung keinen Unterschied bezüglich der Höhe der Serum-Triglyzeridspiegel feststellen (Johnen et al., 2012). Auch Preusch et al. sahen bei GDF-15<sup>-/-</sup>/LDLr<sup>-/-</sup>-Mäusen keinen Unterschied in der Höhe des Serum-Triglyzeridspiegels zu GDF-15<sup>+/+</sup>/LDLr<sup>-/-</sup>-Tieren (Preusch et al., 2013).

GDF-15 könnte also nicht nur an der Regulation des Appetits beteiligt sein (Johnen et al., 2007) und über die Nahrungsaufnahme das Gewicht und den Serum-Cholesterinspiegel beeinflussen, sondern sich auch modulierend auf die Serum-Triglyzeridspiegel auswirken. Darüber hinaus könnte GDF-15 unabhängig vom Serum-Lipidspiegel zudem die Entstehung und Progression arteriosklerotischer Plaques fördern (Bonaterra et al., 2012).



## 4.2 Quantitative Real-Time RT-PCR (qRT-PCR) und Proteome Profiler™ Antibody Array

### 4.2.1 Inflammation und Angiogenese

#### 4.2.1.1 Interleukine, Interferone, Tumor-Nekrose-Faktoren und Wachstumsfaktoren

##### Effekte der cholesterinreichen Fütterung

Nach 20 Wochen CHF fanden wir in der Skelettmuskulatur von GDF-15<sup>-/-</sup>-Mäusen eine bis zu 5,2fach (IFN- $\gamma$ ; GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse) und von GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Tieren eine bis zu 13,9fach (IFN- $\gamma$ ) höhere Proteinexpression der pro-inflammatorischen IL-1 $\alpha$ , -1 $\beta$ , -6, -7, -12p70, -17 und -23, von IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  sowie allen untersuchten Wachstumsfaktoren (IL-3, -5, G-, GM- und M-CSF) als nach 12 Wochen CHF. Bei den anti-inflammatorischen IL-4, -10, -13 und -27 stellten wir nach 20 Wochen CHF in diesen Gruppen ebenfalls eine bis zu 5fach (IL-27; GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse) erhöhte Proteinexpression verglichen mit 12 Wochen CHF fest. Die IL-6-mRNA-Expression war nach 20 Wochen CHF bei GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen signifikant 94 % erniedrigt verglichen mit 12 Wochen CHF. Die IL-1 $\beta$ -mRNA-Expression zeigte sich nach 20 Wochen CHF bei GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>-Mäusen signifikant 98 % niedriger und bei GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Tieren signifikant 383fach höher als nach 12 Wochen CHF.

Neben erhöhten Serum-Cholesterinspiegeln führt cholesterin- bzw. fettreiches Futter auch zu einem Anstieg der venösen Plasma-IL-1 $\beta$ - und -TNF $\alpha$ -Spiegel bei Ratten mit 8-wöchiger Gabe eines stark fetthaltigen Futters (70 % Cholesterinanteil am Gesamtfett) im Vergleich zu Ratten mit geringerer fetthaltiger (10 % Cholesterinanteil am Gesamtfett) bzw. normaler Nahrung (< 5 % Fett) und gleicher Fütterungsdauer (Bilski et al., 2015). Andererseits konnten Jacob et al. keinen Einfluss der cholesterinreichen Fütterung auf die Proteinexpression des pro-inflammatorischen IKK- $\beta$  („inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit beta“) im M. soleus von Ratten nach isokalorischer 12-wöchiger Gabe eines cholesterinhaltigen Futters im Vergleich zu normalgefütterten Kontrolltieren nachweisen (Jacob et al., 2013).

Wir können erstmals zeigen, dass durch die Verabreichung einer cholesterinreichen Nahrung im Skelettmuskel von ApoE- bzw. GDF-15-defizienten Mäusen die Proteinexpression inflammatorischer und wachstumsrelevanter Zytokine induziert ist. Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass bei ApoE- bzw. GDF-15-Defizienz die Proteinexpression sowohl pro- als auch anti-inflammatorischer Zytokine im M. gastrocnemius gleichermaßen erhöht ist. Die niedrigere mRNA-Expression von IL-6 nach 20 Wochen CHF bei GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen verglichen mit 12 Wochen CHF und von IL-1 $\beta$  nach 20 Wochen CHF bei GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>-Mäusen verglichen mit 12 Wochen CHF könnte in diesem Zusammenhang auf einen negativen Feedback-Mechanismus durch den Anstieg der Proteinexpression hindeuten.

### Effekte der ApoE-Defizienz

Bei GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen zeigte sich im Vergleich zum Wildtyp nach 20 Wochen CHF, jedoch überwiegend nicht nach 12 Wochen CHF, eine bis zu 8,4fach (IL-17) höhere Proteinexpression aller untersuchter pro-inflammatorischer und anti-inflammatorischer Interleukine, von IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  sowie allen Wachstumsfaktoren im Skelettmuskel. Die mRNA-Expression von IL-6 war dabei in dieser Gruppe nach 12 Wochen CHF signifikant 11fach höher und nach 20 Wochen signifikant 89 % niedriger als bei Wildtyp-Tieren. Hier könnte die negative Rückkopplung von der Protein- auf die Genexpressionsebene ebenfalls als möglicher Erklärungsansatz dienen. Bei der IL-1 $\beta$ -mRNA-Expression sahen wir, wenn auch nicht signifikant, den umgekehrten Effekt bei GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen: Eine 86 % niedrigere bzw. eine 10fach höhere Genexpression nach 12 bzw. 20 Wochen CHF bei GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen verglichen mit Wildtyp-Tieren. Das Ergebnis der IL-1 $\beta$ -Messung könnte möglicherweise wegen des geringen Stichprobenumfangs auf einen statistischen  $\beta$ -Fehler bzw. Fehler 2. Art zurückzuführen sein. Als Hinweis darauf zeigte hier auch die Teststärke nach 12 Wochen CHF lediglich einen Wert von 25 % (Referenzwert: 80 %) an.

Unsere Daten bzgl. der erhöhten Expression von inflammatorischen Proteinen im Skelettmuskel von hypercholesterinämischen ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen könnten ein Hinweis darauf sein, dass die von Stapleton et al. bei ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Tieren gefundenen höheren Serum-TNF- $\alpha$ - und -IL-1 $\beta$ -Spiegel tatsächlich ApoE-bedingt sind (Stapleton et al., 2010). Unsere Annahme wird dabei zusätzlich dadurch verstärkt, dass höhere Serum-TNF- $\alpha$ -Spiegel auch von Henninger et al. bei LDL-Rezeptor-Knockout-Mäusen (LDLR<sup>-/-</sup>) nach 4-wöchiger cholesterinreicher Fütterung und Stimulation mit Lipopolysacchariden (LPS) im Vergleich zu Wildtyp-Tieren nach entsprechender CHF-Gabe beobachtet wurden (Henninger et al., 1997). Andererseits wurden nach 12-wöchiger Gabe einer fettreichen Nahrung im M. quadriceps femoris von ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen auch niedrigere mRNA-Expressionen pro-inflammatorischer Zytokine (z.B. TNF- $\alpha$ ) als bei normalgefütterten Wildtyp-Tieren nachgewiesen (Wang et al., 2012). Ursache hierfür könnte sein, dass bei Wang et al. anstatt Gewebe des M. gastrocnemius der M. quadriceps femoris untersucht wurde. Zudem wurden abweichend von unserer Studie bei Wang et al. die verschiedenen Mausgenotypen mit unterschiedlich zusammengesetzter Nahrung gefüttert: So enthielt das von Wang et al. für die ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse verwendete Futter 21 % und das der Wildtyp-Tiere 4,5 % Fett (Wang et al., 2012). Im Rahmen unserer Untersuchung erhielten alle Mäuse die gleiche standardisierte cholesterinreiche Fütterung mit 21,2 % Fett- und 0,2 % Cholesterinanteil.

Wir können erstmals zeigen, dass durch ApoE-Defizienz bei hypercholesterinämischen Mäusen die Proteinexpression pro- und anti-inflammatorischer sowie wachstumsrelevanter Zytokine im

Vergleich zu Wildtyp-Tieren im M. gastrocnemius abhängig von der Fütterungsdauer induziert ist. Gleichzeitig wird durch die erhöhten Proteinspiegel in der Skelettmuskulatur der ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse zunehmend die Expression pro-inflammatorischer Gene im Vergleich zu Wildtyp-Tieren gehemmt.

### **Effekte der GDF-15-Defizienz**

Bei GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>-Mäusen fanden wir nach 20 Wochen CHF im Vergleich zum Wildtyp eine bis zu 3,1fach (IL-7) erhöhte Proteinexpression aller untersuchter pro- und anti-inflammatorischer Interleukine sowie von IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und Wachstumsfaktoren in der Skelettmuskulatur. Die IL-6- und IL-1 $\beta$ -Genexpression war in dieser Gruppe nach 12 Wochen CHF signifikant 21- bzw. 6fach höher und nach 20 Wochen CHF signifikant 69 bzw. 98 % niedriger als bei Wildtyp-Mäusen. Bei GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen stellten wir nach 12 Wochen CHF eine meist moderate und bis zu 51 % (IL-3) sowie nach 20 Wochen CHF eine bis zu 85 % (IL-17) erniedrigte Proteinexpression aller untersuchter pro- und anti-inflammatorischer Interleukine sowie von IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und Wachstumsfaktoren im M. gastrocnemius verglichen mit GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Tieren fest. Bei GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen konnten wir darüber hinaus einerseits eine 89 % niedrigere IL-6-mRNA-Expression nach 20 Wochen CHF feststellen und andererseits eine signifikant 301fach höhere mRNA-Expression von IL-1 $\beta$  nach 12 Wochen CHF im Vergleich zu GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen nachweisen.

Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass GDF-15-Defizienz bei ApoE-kompetenten („gesunden“) Tieren im Vergleich zum Wildtyp abhängig von der Fütterungsdauer zu einer ausgeglichenen und moderaten Erhöhung der pro- und anti-inflammatorischen Zytokinsynthese beitragen und bei ApoE-defizienten („kranken“) Mäusen eine Synthese von entzündungsfördernden und -hemmenden Zytokinen verglichen mit GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Tieren gleichermaßen deutlich reduzieren könnte. Die durch die Erhöhung der Proteinsynthese vermutete negative Rückkopplung auf die Genexpression von inflammatorischen Markern scheint hier im Zusammenhang mit GDF-15-Defizienz nur bei ApoE-kompetenten Tieren zum Tragen zu kommen. GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse zeigen zwar nach 12 Wochen CHF noch einen signifikanten Anstieg der IL-1 $\beta$ -mRNA-Expression bei niedriger inflammatorischer Proteinsynthese, haben jedoch nach 20 Wochen CHF bei deutlich niedrigeren inflammatorischen Proteinexpressionsprofilen keine höhere Expression pro-inflammatorischer Gene.

Aufgrund unserer Ergebnisse ist anzunehmen, dass GDF-15-Defizienz bei ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen (GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>) mit Hypercholesterinämie einen vorteilhaften Effekt hat, da die

Proteinexpression pro- und anti-inflammatorischer Zytokine im Vergleich mit GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Tieren gehemmt wird. Untersuchungen von de Jager et al. haben in diesem Zusammenhang in Peritonealmakrophagen von GDF-15<sup>-/-</sup>/LDLr<sup>-/-</sup>-Mäusen eine signifikant niedrigere mRNA-Expression des pro-inflammatorischen IFN- $\gamma$  festgestellt (de Jager et al., 2011). Unsere Untersuchungen nach 20 Wochen CHF zeigen passend zu den von Bonaterra et al. erhobenen Daten, dass bei Peritonealmakrophagen von GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen, die für zwölf Stunden mit oxidiertem LDL (oxLDL) stimuliert wurden, die mRNA-Expression von IL-6 und IL-1 $\beta$  verglichen mit GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen signifikant erniedrigt ist (Bonaterra et al., 2012). Vice versa lassen diese Daten die Hypothese zu, dass GDF-15 eine höhere Proteinexpression pro- und anti-inflammatorischer Zytokine in Makrophagen bzw. Skelettmuskulatur induzieren könnte. Allerdings fanden Johnen et al. nach 6-monatiger Gabe einer fettreichen Nahrung keine Veränderung pro- (z.B. IL-6, IL-12, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ) und anti-inflammatorischer (IL-4, IL-10) Zytokinexpressionsprofile im Serum und in Peritonealmakrophagen von GDF-15-überexprimierenden Mäusen mit ApoE-Defizienz im Vergleich zu ApoE<sup>-/-</sup>-Tieren (Johnen et al., 2012). Kim et al. stellten hingegen bei transgenen Mäusen, die humanes NAG-1/GDF-15 ubiquitär exprimieren, fest, dass diese nach LPS-Stimulation niedrigere Serum-IL-6- und -TNF- $\alpha$ -Spiegel haben als Wildtyp-Tiere (Kim et al., 2013). Allerdings hemmte NAG-1/GDF-15 *in vitro* nicht die LPS-induzierte Zytokinexpression in Mausmakrophagen (RAW 264.7 Zellen), entnommenen Maus-Peritonealmakrophagen oder Kupfferzellen der Mausleber (Kim et al., 2013). Diese und unsere Daten lassen deshalb vermuten, dass NAG-1/GDF-15 zum einen die LPS-induzierte Zytokinexpression nicht direkt hemmt und zum anderen der GDF-15 mediierte inhibitorische Effekt auf die inflammatorische Zytokinproduktion nicht in allen Zelltypen identisch ist.

Wir können einerseits zeigen, dass durch GDF-15-Defizienz bei hypercholesterinämischen Mäusen die Proteinexpression pro- und anti-inflammatorischer sowie wachstumsrelevanter Zytokine im Vergleich zu Wildtyp-Tieren im M. gastrocnemius abhängig von der Fütterungsdauer gehemmt ist. Gleichzeitig wird durch die erhöhten Proteinspiegel in der Skelettmuskulatur von GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>-Mäusen zunehmend die Expression pro-inflammatorischer Gene in der Skelettmuskulatur im Vergleich zu Wildtyp-Tieren gehemmt. Andererseits hemmt GDF-15-Defizienz im M. gastrocnemius von ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen mit Hypercholesterinämie gleichermaßen die Expression pro- und anti-inflammatorischer sowie wachstumsrelevanter Proteine und, abhängig von der Fütterungsdauer, pro-inflammatorischer Gene im Vergleich zu GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Tieren.

#### 4.2.1.2 Chemokine, VEGFA und Notch1

##### Effekte der cholesterinreichen Fütterung

Nach 20 Wochen CHF fanden wir in der Skelettmuskulatur von GDF-15<sup>-/-</sup>-Mäusen eine bis zu 5,2fach (CXCL1; GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>-Mäuse) und von GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Tieren eine bis zu 13fach (CXCL1) höhere Proteinexpression pro-inflammatorischer und pro-angiogenetischer Chemokine (CCL2, CXCL1, CXCL2), pro-inflammatorischer und anti-angiogenetischer Chemokine (CXCL9 und CXCL10) sowie pro-inflammatorischer Chemokine (CCL1, 3, 4, 5, 11, 12) als nach 12 Wochen CHF. Die mRNA-Expression der pro-angiogenetischen Faktoren VEGFA und Notch1 war bei GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen nach 20 Wochen CHF im Vergleich zu 12 Wochen CHF bis zu 97 % (Notch1) erniedrigt.

Neben erhöhten Serum-Cholesterinspiegeln führt cholesterin- bzw. fettreiches Futter auch zu niedrigeren pro-angiogenetischen Notch2-, Notch4- und Jagged1- bzw. höheren pro-apoptotischen Casp8-Proteinexpressionen im Herzmuskelgewebe von Schweinen mit 11-wöchiger cholesterinreicher Fütterung und chronisch-ischämischem Myokardgewebe im Vergleich zu normalgefütterten Wildtyp-Tieren (Elmadhun et al., 2014). Die Autoren schlussfolgerten, dass Hypercholesterinämie bei Schweinen mit ischämischem Myokard über eine Notch-Hemmung die Bildung von Kollateralgefäßen in den Koronararterien und die Angiogenese hemmen sowie gleichzeitig die Apoptose fördern könnte (Elmadhun et al., 2014). Unsere Daten bzgl. der erhöhten Proteinexpression von pro-inflammatorischen sowie pro- und anti-angiogenetischen Chemokinen im Skelettmuskel von Mäusen nach CHF-Gabe könnten ein Hinweis darauf sein, dass die von Yu et al. in den Karotiden von Primaten mit fett- bzw. cholesterinhaltiger Fütterung im Vergleich zu normocholesterinämischen Tieren gefundenen höheren mRNA-CCL2-Level tatsächlich fütterungsbedingt sind (Yu et al., 1992).

Wir können somit erstmals zeigen, dass durch die Verabreichung einer cholesterinreichen Nahrung im Skelettmuskel von ApoE- bzw. GDF-15-defizienten Mäusen die Proteinexpression pro-inflammatorischer und angiogenetischer Chemokine induziert ist. Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass bei ApoE- bzw. GDF-15-Defizienz die Proteinexpression sowohl pro- als auch anti-angiogenetischer Chemokine im M. gastrocnemius gleichermaßen erhöht ist. Die niedrigere mRNA-Expression von VEGFA und Notch1 nach 20 Wochen CHF bei GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen verglichen mit 12 Wochen CHF könnte auf einen negativen Feedback-Mechanismus durch den Anstieg der Proteinexpression hindeuten.

### Effekte der ApoE-Defizienz

GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse hatten nach 12 Wochen CHF im Vergleich zum Wildtyp überwiegend eine bis zu 18 % (CCL5) geringfügig niedrigere und nach 20 Wochen CHF eine bis zu 5,7fach (CCL1) höhere Proteinexpression der untersuchten Chemokine in der Skelettmuskulatur. Die VEGFA- und Notch1-mRNA-Expression war dabei in dieser Gruppe nach 12 Wochen CHF signifikant 6,3- bzw. 6,6fach erhöht und nach 20 Wochen CHF bzgl. VEGFA-Genexpression signifikant um 56 % im Vergleich zu Wildtyp-Tieren erniedrigt.

Unsere Daten bzgl. der erhöhten Proteinexpression von pro-inflammatorischen sowie pro- und anti-angiogenetischen Chemokinen im Skelettmuskel von hypercholesterinämischen ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen könnten ein Hinweis darauf sein, dass die von Stapleton et al. bei ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Tieren gefundenen höheren Serum-CCL2-Spiegel tatsächlich ApoE-bedingt sind (Stapleton et al., 2010). Neben erhöhten Serum-Lipidspiegeln führt ApoE-Defizienz anscheinend auch zu höheren CXCL1- und CXCL2-Proteinkonzentrationen in der Wadenmuskulatur von ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen 28 Tage nach einer linkseitigen Extremitätenischämie und nachfolgender regelmäßiger Bewegung im Vergleich zu Wildtyp-Tieren mit gleicher Behandlung (Crawford et al., 2013). Auch die 14 Tage nach Reperfusion einer 90-minütigen unilateralen Extremitätenischämie von Kang et al. gemessene höhere CCL2-Proteinexpression in der Skelettmuskulatur des Hinterbeins von ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Tieren mit gleicher Behandlung scheint durch den ApoE-Knockout bedingt zu sein (Kang et al., 2008). Die Autoren führten an, dass die verlängerte inflammatorische Reaktion auf den verzögerten muskulären Heilungsprozess oder die verminderte Expression des entsprechenden CC-Rezeptors (CCR2) bei ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen zurückzuführen sein könnte (Kang et al., 2008). Die Plasma-VEGFA- und -IL-6-Level waren bei ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen ohne Bewegung erhöht und mit Training erniedrigt im Vergleich zu Wildtyp-Tieren (Crawford et al., 2013). Die Autoren schlussfolgerten, dass bei ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen die Ischämie eine erhöhte Expression pro-inflammatorischer Zytokine induzieren könnte (Crawford et al., 2013). Andererseits konnten Couffinhal et al. in der Skelettmuskulatur der Hinterbeine von ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen mit einseitiger Ischämie der Extremitäten eine niedrigere VEGFA-Expression mittels Immunhistochemie und Gen- bzw. Proteinexpression im Vergleich zu gleichbehandelten Wildtyp-Tieren feststellen (Couffinhal et al., 1999). Die Autoren vermuteten darin die Ursache für die von ihnen beobachtete geringere Ausbildung von Kollateralgefäßen im Ischämiegebiet der ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse (Couffinhal et al., 1999). Allerdings stellten Wang et al. nach 12-wöchiger Gabe einer fettreichen Nahrung bei ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen im M. quadriceps femoris eine niedrigere pro-angiogenetische mRNA-Expression (CCL2) als bei normalgefütterten Wildtyp-Tieren fest (Wang et al., 2012). Als mögliche Erklärung wurde angemerkt, dass ApoE-Defizienz den pro-

inflammatorischen Effekt der fettreichen Fütterung auf die Skelettmuskulatur hemmen könnte (Wang et al., 2012). Die Diskrepanz zu unseren Daten könnte dadurch zu erklären sein, dass Wang et al. für ihre Untersuchungen anstatt Gewebe des M. gastrocnemius den M. quadriceps femoris verwendeten. Darüber hinaus wurden abweichend von unserer Studie bei Wang et al. die verschiedenen Mausgenotypen mit unterschiedlich zusammengesetzter Nahrung gefüttert: So enthielt das von Wang et al. für die ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse verwendete Futter 21 % und das der Wildtyp-Tiere 4,5 % Fett (Wang et al., 2012). Im Rahmen unserer Untersuchung erhielten alle Mäuse die gleiche standardisierte cholesterinreiche Fütterung mit 21,2 % Fett- und 0,2 % Cholesterinanteil.

Wir können erstmals zeigen, dass durch ApoE-Defizienz bei hypercholesterinämischen Mäusen die Proteinexpression pro-inflammatorischer sowie pro- und anti-angiogenetischer Chemokine im Vergleich zu Wildtyp-Tieren im M. gastrocnemius abhängig von der Fütterungsdauer induziert ist. Gleichzeitig wird durch die erhöhten Proteinspiegel in der Skelettmuskulatur der ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse zunehmend die Expression pro-angiogenetischer Gene im Vergleich zu Wildtyp-Tieren gehemmt.

### **Effekte der GDF-15-Defizienz**

Bei GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>-Mäusen fanden wir im Vergleich zum Wildtyp nach 20 Wochen CHF, jedoch überwiegend nicht nach 12 Wochen CHF, eine bis zu 2,7fach (CCL1) erhöhte Proteinexpression der untersuchten Chemokine in der Skelettmuskulatur. Des Weiteren stellten wir bei GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>-Mäusen nach 12 Wochen CHF ebenfalls eine im Vergleich zum Wildtyp 7fach höhere VEGFA- und eine signifikant 6,9fach höhere Notch1-Genexpression fest. Nach 20 Wochen CHF war die mRNA-Expression beider Gene in dieser Gruppe bis zu 56 % niedriger als bei Wildtyp-Mäusen. GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse hatten nach 12 Wochen CHF eine bis zu 49 % (CXCL10) meist moderate und nach 20 Wochen CHF eine bis zu 73 % (CCL4) niedrigere Proteinexpression aller untersuchter Chemokine in der Skelettmuskulatur verglichen mit GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Tieren. Auf Genexpressionsebene konnten wir eine signifikant um 97 % niedrigere Notch1- und 72 % niedrigere VEGFA-mRNA-Expression nach 20 Wochen CHF bei GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen im Vergleich zu GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Tieren feststellen.

GDF-15-Defizienz scheint bei ApoE-kompetenten („gesunden“) Tieren auch die Proteinexpression pro-inflammatorischer sowie pro- und anti-angiogenetischer Chemokine im Skelettmuskel im Vergleich zum Wildtyp abhängig von der Fütterungsdauer zu erhöhen. Bei ApoE-defizienten („kranken“) Mäusen führt GDF-15-Defizienz zu einer Hemmung der Proteinexpression aller untersuchter Chemokine im M. gastrocnemius verglichen mit GDF-

15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Tieren. Die negative Rückkopplung auf die Expression pro-angiogenetischer Gene wird hier unabhängig des ApoE-Genotyps bei GDF-15-defizienten Tieren deutlich.

Aufgrund unserer Ergebnisse ist anzunehmen, dass GDF-15-Defizienz bei ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen (GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>) mit Hypercholesterinämie u.a. die mRNA-Expression pro-angiogenetischer Gene im Vergleich zu GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Tieren hemmt. In Peritonealmakrophagen von GDF-15<sup>-/-</sup>/LDLr<sup>-/-</sup>-Mäusen fanden de Jager et al. hingegen eine unveränderte mRNA-Expression des pro-angiogenetischen Chemokins CCL2 im Vergleich zu GDF-15<sup>+/+</sup>/LDLr<sup>-/-</sup>-Tieren bei gleichzeitig erniedrigter Expression des entsprechenden CC-Rezeptors 2 (CCR2) (de Jager et al., 2011). Hieraus wurde geschlossen, dass GDF-15-Defizienz durch die Hemmung der CCR2-abhängigen Makrophagenchemotaxis in arteriosklerotische Plaques und deren dortige konsekutive Ansammlung atheroprotektive Effekte hat (de Jager et al., 2011). Allerdings konnten Johnen et al. vice versa bei GDF-15-überexprimierenden ApoE-defizienten Mäusen nach 6-monatiger Gabe einer fettreichen Nahrung keine Veränderung bei der Freisetzung von CCL2 im Serum und in Peritonealmakrophagen im Vergleich zu ApoE<sup>-/-</sup>-Tieren feststellen (Johnen et al., 2012). Whitson et al. beschreiben darüber hinaus, dass das pro-angiogenetische Protein „connective tissue growth factor“ (CTGF/CCN2) als Bindungspartner von GDF-15 agiert und sich GDF-15 hemmend auf die CCN2-vermittelte Angiogenese auswirkt (Whitson et al., 2013). Kim et al. stellten hingegen bei transgenen Mäusen, die humanes NAG-1/GDF-15 ubiquitär exprimieren, fest, dass diese nach LPS-Stimulation niedrigere Serum-CXCL1- und -CCL2-Spiegel haben als Wildtyp-Tiere (Kim et al., 2013). Allerdings ist hier anzumerken, dass der pro-inflammatorische Stimulus von LPS nicht mit dem Effekt der Hypercholesterinämie vergleichbar ist.

Wir können einerseits zeigen, dass durch GDF-15-Defizienz bei hypercholesterinämischen Mäusen die Proteinexpression pro-inflammatorischer sowie pro- und anti-angiogenetischer Chemokine im Vergleich zu Wildtyp-Tieren im M. gastrocnemius abhängig von der Fütterungsdauer gehemmt ist. Gleichzeitig wird durch die erhöhten Proteinspiegel in der Skelettmuskulatur von GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>-Mäusen zunehmend die Expression pro-angiogenetischer Gene in der Skelettmuskulatur im Vergleich zu Wildtyp-Tieren gehemmt. Andererseits hemmt GDF-15-Defizienz im M. gastrocnemius von ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen mit Hypercholesterinämie gleichermaßen die Expression pro-inflammatorischer sowie pro- und anti-angiogenetischer Chemokine und pro-angiogenetischer Gene im Vergleich zu GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Tieren.



#### 4.2.1.3 Myeloidzellrezeptoren, Komplementfaktoren und Metalloproteinaseninhibitoren

##### Effekte der cholesterinreichen Fütterung

Nach 20 Wochen CHF fanden wir in der Skelettmuskulatur von GDF-15<sup>-/-</sup>-Mäusen eine bis zu 6fach (C5/C5a; GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse) und von GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Tieren eine bis zu 13,3fach (TIMP-1) höhere Proteinexpression von TREM-1, C5/C5a und TIMP-1 verglichen mit 12 Wochen CHF.

Neben erhöhten Serum-Cholesterinspiegeln führt cholesterin- bzw. fettreiches Futter auch zu erhöhten TIMP-1- bzw. erniedrigten Matrix-Metalloproteinase (MMP)-Leveln in aortalen arteriosklerotischen Plaques von ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen mit 16-wöchiger fettreicher Fütterung und regelmäßiger Bewegung im Vergleich zu gleichgefütterten ApoE<sup>-/-</sup>-Tieren ohne Bewegung (Moustardas et al., 2014). Die Autoren vermuteten, dass Bewegung über die Beeinflussung des MMP/TIMP-Gleichgewichts das Maß der Makrophagenakkumulation und damit die Plaquestabilität beeinflussen könnte (Moustardas et al., 2014).

Wir können somit erstmals zeigen, dass durch die Verabreichung einer cholesterinreichen Nahrung im Skelettmuskel von ApoE- bzw. GDF-15-defizienten Mäusen die Proteinexpression inflammatorischer und atherogener Faktoren induziert ist.

##### Effekte der ApoE-Defizienz

GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse hatten im Vergleich zum Wildtyp nach 12 Wochen CHF eine 40 % niedrigere (TIMP-1) oder nahezu unveränderte (TREM-1, C5/C5a) und nach 20 Wochen CHF eine bis zu 4,2fach (C5/C5a) höhere Proteinexpression dieser Faktoren in der Skelettmuskulatur.

Unsere Daten bzgl. der erhöhten Expression des Komplementfaktors C5/C5a im Skelettmuskel von hypercholesterinämischen ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen könnten ein Hinweis darauf sein, dass der von Manthey et al. in der Aorta von normalgefütterten ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen beobachtete Anstieg der mRNA-Expression des C5a-Rezeptors (CD88) bei gleichzeitig vermehrter Plaquentstehung im Vergleich zu Wildtyp-Tieren tatsächlich ApoE-bedingt ist (Manthey et al., 2011). Neben erhöhten Blutlipidspiegeln führt ApoE-Defizienz anscheinend auch zu geringeren TREM-1-mRNA-Expressionen in Peritonealmakrophagen von normalgefütterten 20 Wochen alten ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen nach Infizierung mit dem gramnegativen Bakterium *Porphyromonas gingivalis* im Vergleich zu Wildtyp-Tieren (Lei et al., 2013).

Wir können somit erstmals zeigen, dass durch ApoE-Defizienz bei hypercholesterinämischen Mäusen die Proteinexpression dieser inflammatorischen und atherogenen Faktoren im Vergleich zu Wildtyp-Tieren in der Skelettmuskulatur abhängig von der Fütterungsdauer induziert ist.

### **Effekte der GDF-15-Defizienz**

Bei GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>-Mäusen fanden wir nach 20 Wochen CHF im Vergleich zum Wildtyp eine bis zu 1,5fach (C5/C5a) moderat erhöhte Proteinexpression von TREM-1, C5/C5a und TIMP-1 in der Skelettmuskulatur. GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse hatten nach 12 Wochen CHF eine bis zu 60 % (C5/C5a) und nach 20 Wochen CHF eine bis zu 73 % (TIMP-1, C5/C5a) niedrigere Expression aller drei Proteine in der Skelettmuskulatur verglichen mit GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Tieren.

GDF-15-Defizienz scheint bei ApoE-kompetenten („gesunden“) Tieren die Expression dieser Proteine im Skelettmuskel im Vergleich zum Wildtyp abhängig von der Fütterungsdauer moderat zu erhöhen. Bei ApoE-defizienten („kranken“) Mäusen führt GDF-15-Defizienz zu einer Hemmung der Expression aller drei Proteine im M. gastrocnemius verglichen mit GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Tieren.

Wir können somit erstmals zeigen, dass einerseits durch GDF-15-Defizienz bei hypercholesterinämischen Mäusen die Expression dieser inflammatorischen und atherogenen Proteine im Vergleich zu Wildtyp-Tieren im M. gastrocnemius induziert ist. Andererseits hemmt GDF-15-Defizienz im M. gastrocnemius von ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen mit Hypercholesterinämie die Expression dieser inflammatorischen und atherogenen Proteine im Vergleich zu GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Tieren.

## **4.2.2 Apoptose, Atrophie und ACh-Rezeptoren**

### **4.2.2.1 Caspase-3, Bax, Bcl2, MuRF1, Fbxo32 und Chrna1**

#### **Effekte der cholesterinreichen Fütterung**

Nach 20 Wochen CHF fanden wir in der Skelettmuskulatur von GDF-15<sup>-/-</sup>-Mäusen eine bis zu 89 % (Bax; GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse) niedrigere mRNA-Expression der pro-apoptotischen Gene Casp3 und Bax im Vergleich zu 12 Wochen CHF. Der Unterschied war bei der Bax-mRNA-Expression von GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Tieren signifikant. Auch eine 74 % niedrigere Expression des anti-apoptotischen Bcl2-Gens konnte nach 20 Wochen CHF bei GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Tieren im Vergleich zu 12 Wochen CHF festgestellt werden. Die mRNA-Expression des Atrophiemarkers Fbxo32 war bei GDF-15-Defizienz nach 20 Wochen CHF im Vergleich zu 12 Wochen CHF bis zu 78 % (GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse) niedriger. Signifikant niedriger zeigte sich das Ergebnis der Fbxo32-Genexpression dabei nach 20 Wochen CHF bei den GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen im Vergleich zu 12 Wochen CHF. Auch für MuRF1 wurde eine 25 % niedrigere mRNA-Expression bei GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen nach 20 Wochen CHF im

Vergleich zu 12 Wochen CHF nachgewiesen. GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse zeigten nach 20 Wochen CHF eine signifikant 1,6fach höhere Expression des Chrna1-Gens verglichen mit 12 Wochen CHF. Die Genexpression von Casp3, Bax, Bcl2, MuRF1, Fbxo32 und Chrna1 bei GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen blieb im Verlauf der Fütterung nahezu unverändert.

Neben erhöhten Serum-Cholesterinspiegeln führt cholesterin- bzw. fettreiches Futter auch zu einem Anstieg der Infarktgröße und Freisetzung myokardialer Enzyme in Koronargefäßen sowie einer höheren histologisch detektierbaren Apoptoserate im Herzmuskelgewebe von Ratten mit 8-wöchiger cholesterinreicher Fütterung und Myokardinfarkt im Vergleich zu normalgefütterten Wildtyp-Tieren mit gleicher Behandlung (Wu et al., 2015). Zuvor war in einer früheren Studie nach CHF-Gabe eine signifikant höhere anti-apoptotische Bcl2-Proteinexpression im nicht-infarzierten Myokardgewebe von Ratten mit 8-wöchiger cholesterinreicher Fütterung und Myokardinfarkt im Vergleich zu normalgefütterten Wildtyp-Tieren mit gleicher Behandlung festgestellt worden (Wang et al., 2002).

Wir können somit erstmals zeigen, dass durch die Verabreichung einer cholesterinreichen Nahrung im Skelettmuskel von GDF-15-defizienten Mäusen die Expression apoptotischer und atrophierelevanter Gene erniedrigt bzw. von nikotinergen ACh-Rezeptoren erhöht ist. Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass bei GDF-15-Defizienz die Expression sowohl pro- als auch anti-apoptotischer Gene gleichermaßen im M. gastrocnemius erniedrigt ist.

### **Effekte der ApoE-Defizienz**

GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse hatten nach 12 Wochen CHF eine signifikant bis zu 30,2fach (MuRF1) höhere Expression der Casp3-, Bax-, Bcl2-, MuRF1- und Fbxo32-Gene im Vergleich zu Wildtyp-Tieren. Nach 20 Wochen CHF konnten wir in dieser Gruppe bei Casp3-, Bax- und Fbxo32-Genen eine bis zu 72 % (Fbxo32) niedrigere mRNA-Expression im Vergleich zu Wildtyp-Tieren feststellen. Keine Veränderung wurde bei der Chrna1-mRNA-Expression der GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse im Vergleich zum Wildtyp gefunden.

Neben erhöhten Serum-Lipidspiegeln führt ApoE-Defizienz anscheinend auch zu einer verzögerten muskulären Heilung in der Skelettmuskulatur des Hinterbeins von ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen nach Reperfusion einer 90-minütigen unilateralen Extremitätenischämie im Vergleich zu Wildtyp-Tieren mit gleicher Behandlung (Kang et al., 2008). ApoE-Defizienz bzw. Hypercholesterinämie könnte folglich die muskuläre Heilung nach ischämischem Ereignis negativ beeinflussen (Kang et al., 2008).

Wir können somit erstmals zeigen, dass durch ApoE-Defizienz bei hypercholesterinämischen Mäusen die Expression apoptotischer und atrophierelevanter Gene im Vergleich zu Wildtyp-Tieren in der Skelettmuskulatur abhängig von der Fütterungsdauer erniedrigt ist.

### **Effekte der GDF-15-Defizienz**

Bei GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>-Mäusen fanden wir in der Skelettmuskulatur nach 12 Wochen CHF eine signifikant bis zu 31,4fach (Bax) höhere Genexpression aller untersuchter pro- bzw. anti-apoptotischer Gene und Atrophiemarker im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen. Nach 20 Wochen CHF konnten wir in dieser Gruppe hingegen eine bis zu 82 % (Fbxo32) niedrigere Genexpression aller untersuchter pro-apoptotischer Gene und Atrophiemarker im Vergleich zum Wildtyp feststellen. GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse hatten nach 12 Wochen CHF verglichen mit GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Tieren eine nahezu unveränderte und nach 20 Wochen CHF eine bis zu 86 % (Casp3, Bax) niedrigere Genexpression von Casp3 (p≤0,05), Bax (p≤0,05), Bcl2, MuRF1 und Fbxo32. Die Genexpression von Chrn1 blieb sowohl bei GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>- als auch GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen verglichen mit Wildtyp- bzw. GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Tieren unverändert.

GDF-15-Defizienz scheint bei ApoE-kompetenten („gesunden“) Tieren im Skelettmuskel nach 12 Wochen CHF zunächst pro- und anti-apoptotische Gene sowie Atrophiemarker im Vergleich zum Wildtyp gleichermaßen zu erhöhen, anschließend jedoch pro-apoptotische und atrophierelevante Gene abhängig von der Fütterungsdauer zu hemmen. GDF-15-Defizienz führt bei ApoE-defizienten („kranken“) Tieren abhängig von der Fütterungsdauer gleichermaßen zu einer Hemmung der Expression pro- und anti-apoptotischer Gene sowie Atrophiemarker im M. gastrocnemius verglichen mit GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Tieren. GDF-15-Defizienz zeigt keinen Einfluss auf die Expression muskulärer nikotinerger ACh-Rezeptoren im Vergleich mit Wildtyp- bzw. GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Tieren. In diesem Zusammenhang sollte in weiterführenden Studien neben der Expression von apoptose- und atrophierelevanten Genen auch die korrespondierende Proteinexpression untersucht werden. Ob sich hier analog der bereits in Zusammenhang mit Inflammation und Angiogenese beobachtete negative Rückkopplungseffekt von der Protein- auf die Genexpression zeigen ließe, wäre dabei von besonderem Interesse.

Aufgrund unserer Ergebnisse ist anzunehmen, dass GDF-15-Defizienz bei hypercholesterinämischen ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen die mRNA-Expression pro-apoptotischer Gene im Vergleich zu GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Tieren hemmt. Von de Jager et al. wurde in diesem Zusammenhang in arteriosklerotischen Plaques von GDF-15<sup>-/-</sup>/LDLr<sup>-/-</sup>-Mäusen eine geringere Apoptoserate verglichen mit GDF-15<sup>+/+</sup>/LDLr<sup>-/-</sup>-Tieren festgestellt (de Jager et al., 2011). Die Autoren vermuteten zudem, dass GDF-15-defiziente Makrophagen über eine erhöhte

Apoptoseresistenz verfügen (de Jager et al., 2011). Zudem konnte unsere Arbeitsgruppe in diesem Zusammenhang zeigen, dass in-vitro in Humanmakrophagen die oxLDL-medierte Apoptoseinduktion mit einer Erhöhung der GDF-15-Expression einhergeht und in arteriosklerotischen Plaques humaner Karotiden GDF-15-Immunreaktivität mit oxLDL und Casp3-Immunreaktivität kolokalisiert ist (Schlittenhardt et al., 2004). Des Weiteren wurden bei GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen neben signifikant kleineren arteriosklerotischen Plaques in der Aorta ascendens und Truncus brachiocephalicus auch geringere Apoptose- und Autophagieraten in den Plaques als bei GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Tieren gefunden (Bonaterra et al., 2012). Auch mit Retinolsäure/Phorbolster stimulierte Humanmakrophagen zeigten eine Induktion der GDF-15-Gen- und Proteinexpression (Schober et al., 2001). Alle diese Befunde deuten auf eine Funktion von GDF-15 bei der Apoptoseregulation zumindest in Makrophagen hin (Schlittenhardt et al., 2004; de Jager et al., 2011; Bonaterra et al., 2012). Allerdings konnten Schiegnitz et al. in-vitro eine Hemmung der Casp3-Aktivität in oralen Plattenepithelkarzinomzellen durch GDF-15 nachweisen (Schiegnitz et al., 2012). Dies lässt vermuten, dass GDF-15 zwar an der Apoptoseregulation beteiligt ist, wobei dieser Effekt zelltypspezifisch anscheinend allerdings pro- bzw. anti-apoptotisch sein kann.

Wir können somit erstmals zeigen, dass durch GDF-15-Defizienz bei hypercholesterinämischen Mäusen die Expression apoptotischer und atrophierelevanter Gene in der Skelettmuskulatur im Vergleich zu Wildtyp- bzw. GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Tieren abhängig von der Fütterungsdauer erniedrigt ist.

### **4.3 Limitationen und Ausblick**

Aufgrund unserer molekularbiologisch erhobenen Befunde wäre es zukünftig interessant, morphologische und (immun)histomorphometrische Untersuchungen der Skelettmuskulatur durchzuführen, wie z.B. die Quantifizierung unterschiedlicher Fasertypen, der Vaskularisierung (z.B. Lektin für Kapillaren), der Energiespeicher (Glykogen, Lipid) sowie inflammations- und apoptoserelevanter Proteine bzw. Zytokine (z.B. MIF, COX-2, IL-6, LOX-1, TUNEL, Casp3, APG5L/ATG), um diese in den Kontext unserer Daten zu stellen. Aufgrund mangelhafter Gewebequalität, konnten wir leider keine morphologischen Untersuchungen des Muskelgewebes vornehmen.

GDF-15-hemmende Substanzen könnten künftig tierexperimentell im Zusammenhang mit Kachexie, chronisch-inflammatorischen Erkrankungen, Karzinomen und zahlreichen muskulären Erkrankungen auf ihre pharmakologische Wirkung untersucht werden.

#### 4.4 Zusammenfassung

**Einleitung:** Der Wachstums-Differenzierungs-Faktor-15 (GDF-15) gehört zur TGF- $\beta$ -Superfamilie und wird bei Entzündungen und Stressexposition insbesondere von Makrophagen, Gefäßmuskelzellen, Kardiomyozyten, Adipozyten und Endothelzellen vermehrt exprimiert (Schlittenhardt et al., 2004; Bauskin et al., 2005; Bermúdez et al., 2008; Ding et al., 2009; Adela and Banerjee, 2015). In früheren Arbeiten haben wir gezeigt, dass die Protein- und mRNA-Expression von GDF-15 in arteriosklerotischen Gefäßwänden induziert und dort in Makrophagen lokalisiert ist (Schlittenhardt et al., 2004; Bonaterra et al., 2012). GDF-15 dient als neuer Biomarker für kardiovaskulären Stress und ist u.a. mit Herzinsuffizienz und kardialem Remodeling assoziiert (Andersson et al., 2016; Meijers et al., 2016). Außerdem wurde gefunden, dass bei GDF-15-Defizienz die Entstehung und Progression der Arteriosklerose gehemmt ist (de Jager et al., 2011; Bonaterra et al., 2012). In der vorliegenden Studie sollte der Einfluss von GDF-15 auf die Expression inflammatorischer, angiogenetischer, apoptotischer bzw. atrophischer Gene/Proteine in der Skelettmuskulatur bei cholesteringefütterten Mäusen in einem Mausmodell für experimentelle Arteriosklerose (ApoE<sup>-/-</sup>) untersucht werden.

**Material und Methoden:** Mithilfe eines LacZknockin-Konstrukts wurden GDF-15-defiziente Mäuse generiert (Strelau et al., 2009) und anschließend mit ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen gekreuzt, sodass folgende Genotypen zur Verfügung standen: GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup> (Wildtyp), GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>, GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> und GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>. Im Alter von zehn Wochen wurden die Tiere mit einem cholesterinreichen Futter (CHF) über einen Zeitraum von 12 bzw. 20 Wochen gefüttert. Das Gewicht sowie die Serum-Cholesterin- und -Triglyzeridspiegel der Mäuse wurden dabei vor CHF-Gabe und nach 12 bzw. 20 Wochen cholesterinreicher Fütterung bestimmt. Anschließend wurde der M. gastrocnemius entnommen und RNA sowie Proteine isoliert. Die mRNA-Expression von relevanten Genen für Inflammation, Apoptose, Angiogenese, Atrophie und nikotinerge Acetylcholin-Rezeptoren (AChR) wurde mithilfe quantitativer Real-Time RT-PCR (qRT-PCR) untersucht. Auf Proteinebene wurden im Skelettmuskel u.a. pro-/anti-inflammatorische Zytokine und pro-/anti-angiogenetische Chemokine mittels „Proteome Profiler™ Mouse Cytokine Array Kit“-System quantifiziert.

**Ergebnisse:** Das Gewicht war bei GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>-Mäusen nach 20 Wochen CHF (10 %; p $\leq$ 0,01) und bei GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Tieren vor CHF (6 %; p $\leq$ 0,01) und nach 12 (16 %; p $\leq$ 0,01) bzw. 20 Wochen CHF (34 %; p $\leq$ 0,001) höher als bei Wildtyp- bzw. GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen (Kubo, 2013). Der Serum-Cholesterinspiegel war bei GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen vor CHF (22 %; p $\leq$ 0,05) und nach 12 (34 %; p $\leq$ 0,001) bzw. 20 Wochen CHF (14 %; p $\leq$ 0,05) höher als bei GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen (Kubo, 2013). Des Weiteren waren bei GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>-Mäusen nach 12 (54 %; p $\leq$ 0,05) bzw. 20 Wochen CHF (35 %; p $\leq$ 0,05) und bei GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-

Mäusen nach 20 Wochen CHF (95 %;  $p \leq 0,01$ ) die Serum-Triglyzeridspiegel höher als bei Wildtyp- bzw. GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen (Kubo, 2013).

Nach 12 Wochen CHF zeigte die quantitative Real-Time RT-PCR im M. gastrocnemius von GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>-Mäusen eine 21- und 6fach ( $p \leq 0,05$ ) höhere IL-6- bzw. IL-1 $\beta$ -Expression im Vergleich zu Wildtyp-Tieren. Nach 20 Wochen CHF konnte eine 69 % bzw. 98 % ( $p \leq 0,05$ ) niedrigere IL-6- bzw. IL-1 $\beta$ -mRNA-Expression in dieser Gruppe festgestellt werden. Die Expression des pro-apoptotischen Bax-Gens war im M. gastrocnemius von GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>-Mäusen nach 12 Wochen CHF 31fach ( $p \leq 0,05$ ) höher als bei Wildtyp-Tieren. Darüber hinaus fanden wir nach 20 Wochen CHF in GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen eine 86 % ( $p \leq 0,05$ ) niedrigere Bax-Expression als bei GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Tieren. Die Expression des pro-angiogenetischen Notch1-Gens war nach 20 Wochen CHF im M. gastrocnemius von GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen 97 % ( $p \leq 0,05$ ) niedriger als bei GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Tieren. Die mRNA-Expression des Fbxo32-Atrophie-Gens war nach 12 Wochen CHF in GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>-Mäusen 23fach höher ( $p \leq 0,05$ ) als bei Wildtyp-Tieren.

Darüber hinaus zeigte die Untersuchung mittels membranbasiertem Sandwich-Immunoassay (Proteome Profiler™ Mouse Cytokine Array Kit) im M. gastrocnemius von GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>-Mäusen nach 20 Wochen CHF eine 1,5-3,1fach erhöhte Proteinexpression pro-inflammatorischer (z.B. IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-17, IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$ ) und eine 1,2-2,5fach erhöhte Proteinexpression anti-inflammatorischer (z.B. IL-4, IL-10 und IL-13) Zytokine im Vergleich zu Wildtyp-Tieren. Im M. gastrocnemius von GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen war nach 20 Wochen CHF die Expression sowohl pro- als auch anti-inflammatorischer Proteine 39-85 % im Vergleich zu GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Tieren erniedrigt. Die Proteinexpression inflammatorischer und pro-/anti- angiogenetischer Chemokine (z.B. CCL2, CXCL1 und CXCL9) war im M. gastrocnemius von GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>-Mäusen verglichen mit Wildtyp-Tieren nach 20 Wochen CHF 1,1-2,7fach erhöht. GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse hatten nach 20 Wochen CHF im M. gastrocnemius im Vergleich zu GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Tieren eine 45-73 % niedrigere Proteinexpression inflammatorischer und angiogenetischer Chemokine.

**Schlussfolgerung:** GDF-15 scheint im M. gastrocnemius die Expression pro-/anti-inflammatorischer, pro-/anti-angiogenetischer, apoptose- und atrophierelevanter Gene/Proteine abhängig von der Fütterungsdauer zu beeinflussen. Des Weiteren moduliert GDF-15 das Gewicht sowie die Serum-Cholesterin- bzw. -Triglyzeridspiegel.

#### 4.5 Summary

**Introduction:** Growth differentiation factor-15 (GDF-15) is a distant member of the TGF- $\beta$  superfamily and is induced under inflammatory and stress conditions particularly in macrophages, smooth muscle cells, cardiomyocytes, adipocytes and endothelial cells (Schlittenhardt et al., 2004; Bauskin et al., 2005; Bermúdez et al., 2008; Ding et al., 2009; Adela and Banerjee, 2015). In former studies we showed an induction of GDF-15 protein and mRNA expression in human arteriosclerotic vessel walls and a localisation in macrophages (Schlittenhardt et al., 2004; Schlittenhardt et al., 2005). GDF-15 is a new biomarker for cardiovascular stress and is associated with heart failure and cardiac remodeling (Andersson et al., 2016; Meijers et al., 2016). Recently, we have shown that GDF-15 deficiency inhibits atherosclerosis development and progression (de Jager et al., 2011; Bonaterra et al., 2012). The aim of the present study was to investigate the influence of GDF-15 on the expression of inflammatory, angiogenic, apoptotic and atrophy genes/proteins in the skeletal muscle of mice fed a cholesterol-enriched diet in a mouse model for experimental atherosclerosis (ApoE<sup>-/-</sup>).

**Methods:** GDF-15 deficient (GDF-15<sup>-/-</sup>) mice were generated using a LacZknockin construct (Strelau et al., 2009). These GDF-15<sup>-/-</sup> mice were cross-bred with ApoE<sup>-/-</sup> mice, yielding the following genotypes: GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup> (wild type; WT), GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>, GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> and GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>. 10 weeks old mice received a cholesterol-enriched diet (CED) for 12 or 20 weeks. The weight and the blood lipid concentrations of the animals were measured before CED and after feeding a cholesterol-enriched diet for 12 or 20 weeks. Afterwards the gastrocnemius muscles were dissected and shock-frozen. RNA and proteins were isolated, relevant genes for inflammation, apoptosis, angiogenesis, atrophy and nicotinic acetylcholine receptor (AChR) were analysed by quantitative Real-Time RT-PCR (qRT-PCR). Proteins in skeletal muscle were quantified for pro-/anti-inflammatory cytokines and pro-/anti-angiogenic chemokines using a “Proteome Profiler™ Mouse Cytokine Array Kit” system.

**Results:** The weight was increased in GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup> mice after 20 weeks CED (10 %;  $p \leq 0.01$ ) and in GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> mice before CED (6 %;  $p \leq 0.01$ ) and after 12 (16 %;  $p \leq 0.01$ ) or 20 weeks CED (34 %;  $p \leq 0.001$ ) compared with WT or GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> mice (Kubo, 2013). The serum cholesterol level was increased in GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> mice before CED (22 %;  $p \leq 0.05$ ) and after 12 (34 %;  $p \leq 0.001$ ) or 20 weeks CED (14 %;  $p \leq 0.05$ ) compared with GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> animals (Kubo, 2013). Further, the serum triglyceride level was increased in GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup> mice after 12 (54 %;  $p \leq 0.05$ ) or 20 weeks CED (35 %;  $p \leq 0.05$ ) and in GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> mice after 20 weeks CED (95 %;  $p \leq 0.01$ ) in comparison with WT or GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> mice (Kubo, 2013).



After 12 weeks CED, qRT-PCR showed in gastrocnemius muscle of GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup> mice a 21- and 6-fold ( $p \leq 0.05$ ) IL-6 and IL-1 $\beta$  expression compared with WT. After 20 weeks CED, a 69 % and 98 % ( $p \leq 0.05$ ) decrease of IL-6 and IL-1 $\beta$  expression in this group was measured. Pro-apoptotic Bax mRNA expression was 31-fold increased ( $p \leq 0.05$ ) in gastrocnemius muscle of GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup> mice after 12 weeks CED compared with WT. Moreover, we found in gastrocnemius muscle of GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> mice a 86 % ( $p \leq 0.05$ ) decrease of Bax expression compared with GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> mice after 20 weeks CED. Expression of pro-angiogenic Notch1 gene was 97 % decreased ( $p \leq 0.05$ ) in gastrocnemius muscle of GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> compared with GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> mice after 20 weeks CED. Expression of atrophy gene Fbxo32 was 23-fold increased ( $p \leq 0.05$ ) in GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup> mice after 12 weeks CED compared with WT mice.

Furthermore, the analysis with membrane-based sandwich immunoassay (Proteome Profiler<sup>™</sup> Mouse Cytokine Array Kit) showed in gastrocnemius muscle of GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup> mice after 20 weeks CED a 1.5-3.1-fold increased protein expression of pro-inflammatory (e.g. IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-17, IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ ) and a 1.2-2.5-fold increased protein expression of anti-inflammatory (e.g. IL-4, IL-10 and IL-13) cytokines compared with WT mice. In gastrocnemius muscle of GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> mice after 20 weeks CED, a 39-85 % decrease of pro- and anti-inflammatory protein expression was measured compared with GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> mice. The protein expression of inflammatory and pro-/anti-angiogenic chemokines (e.g. CCL2, CXCL1 and CXCL9) in gastrocnemius muscle of GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup> mice after 20 weeks was 1.1-2.7-fold increased compared with WT mice. Protein expression of inflammatory and angiogenic chemokines in gastrocnemius muscle of GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> mice after 20 weeks CED was 45-73 % decreased compared with GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> mice.

**Conclusion:** The lack of GDF-15 seems to modulate the expression of pro-/anti-inflammatory, pro-/anti-angiogenic, apoptotic and atrophy genes/proteins in gastrocnemius muscle dependent from the duration of CED application. Furthermore, GDF-15 influences the weight and the blood lipid concentrations.

## 5 LITERATURVERZEICHNIS

- Abbas, A., Gregersen, I., Holm, S., Daissormont, I., Bjerkeli, V., Krohg-Sørensen, K., Skagen, K.R., Dahl, T.B., Russell, D., and Almås, T., et al. (2015). Interleukin 23 Levels Are Increased in Carotid Atherosclerosis. Possible Role for the Interleukin 23/Interleukin 17 Axis. *Stroke* *46*, 793-799.
- Adela, R., and Banerjee, S.K. (2015). GDF-15 as a Target and Biomarker for Diabetes and Cardiovascular Diseases: A Translational Prospective. *Journal of diabetes research* *2015*.
- Ahmed, T.A., Buzzelli, M.D., Lang, C.H., Capen, J.B., Shumate, M.L., Navaratnarajah, M., Nagarajan, M., and Cooney, R.N. (2007). Interleukin-6 inhibits growth hormone-mediated gene expression in hepatocytes. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* *292*, 803.
- Ait-Oufella, H., Taleb, S., Mallat, Z., and Tedgui, A. (2011). Recent advances on the role of cytokines in atherosclerosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* *31*, 969-979.
- Akdis, M., Burgler, S., Cramer, R., Eiwegger, T., Fujita, H., Gomez, E., Klunker, S., Meyer, N., O'Mahony, L., and Palomares, O., et al. (2011). Interleukins, from 1 to 37, and interferon- $\gamma$ : Receptors, functions, and roles in diseases. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* *127*, 701.
- Alaupovic, P., Lee, D.M., and McConathy, W.J. (1972). Studies on the composition and structure of plasma lipoproteins. Distribution of lipoprotein families in major density classes of normal human plasma lipoproteins. *Biochimica et biophysica acta* *260*, 689-707.
- Allen, S.J., Crown, S.E., and Handel, T.M. (2007). Chemokine. Receptor Structure, Interactions, and Antagonism. *Annu. Rev. Immunol.* *25*, 787-820.
- Andersen, C.L., Jensen, J.L., and Orntoft, T.F. (2004). Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer research* *64*, 5245-5250.
- Andersson, C., Enserro, D., Sullivan, L., Wang, T.J., Januzzi Jr., J.L., Benjamin, E.J., Vita, J.A., Hamburg, N.M., Larson, M.G., and Mitchell, G.F., et al. (2016). Relations of circulating GDF-15, soluble ST2, and troponin-I concentrations with vascular function in the community: The Framingham Heart Study. *Atherosclerosis* *248*, 245-251.
- Assmann, G. (1982). Lipid metabolism and atherosclerosis (Stuttgart: Schattauer).
- Atkinson, R.D., Coenen, K.R., Plummer, M.R., Gruen, M.L., and Hasty, A.H. (2008). Macrophage-derived apolipoprotein E ameliorates dyslipidemia and atherosclerosis in obese apolipoprotein E-deficient mice. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* *294*, 90.
- Bachelier, F., Ben-Baruch, A., Burkhardt, A.M., Combadiere, C., Farber, J.M., Graham, G.J., Horuk, R., Sparre-Ulrich, A.H., Locati, M., and Luster, A.D., et al. (2014). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXIX. Update on the Extended Family of Chemokine Receptors and Introducing a New Nomenclature for Atypical Chemokine Receptors. *Pharmacol Rev* *66*, 1-79.
- Baek, S.J., Wilson, L.C., and Eling, T.E. (2002). Resveratrol enhances the expression of non-steroidal anti-inflammatory drug-activated gene (NAG-1) by increasing the expression of p53. *Carcinogenesis* *23*, 425-434.
- Bauskin, A.R., Brown, D.A., Junankar, S., Rasiah, K.K., Eggleton, S., Hunter, M., Liu, T., Smith, D., Kuffner, T., and Pankhurst, G.J., et al. (2005). The propeptide mediates formation of stromal stores of PROMIC-1: role in determining prostate cancer outcome. *Cancer research* *65*, 2330-2336.
- Bauskin, A.R., Zhang, H.P., Fairlie, W.D., He, X.Y., Russell, P.K., Moore, A.G., Brown, D.A., Stanley, K.K., and Breit, S.N. (2000). The propeptide of macrophage inhibitory cytokine (MIC-1), a TGF-beta superfamily member, acts as a quality control determinant for correctly folded MIC-1. *The EMBO journal* *19*, 2212-2220.
- Beaudeau, J.-L., Giral, P., Bruckert, E., Bernard, M., Foglietti, M.-J., and Chapman, M. (2003). Serum matrix metalloproteinase-3 and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 as potential markers of carotid atherosclerosis in infraclinical hyperlipidemia. *Atherosclerosis* *169*, 139-146.

- Bermúdez, B., López, S., Pacheco, Y.M., Villar, J., Muriana, F.J.G., Hoheisel, J.D., Bauer, A., and Abia, R. (2008). Influence of postprandial triglyceride-rich lipoproteins on lipid-mediated gene expression in smooth muscle cells of the human coronary artery. *Cardiovascular research* 79, 294-303.
- Bilski, J., Mazur-Bialy, A.I., Brzozowski, B., Magierowski, M., Jasnos, K., Krzysiek-MacZka, G., Urbanczyk, K., Ptak-Belowska, A., Zwolinska-Wcislo, M., and MacH, T., et al. (2015). Moderate Exercise Training Attenuates the Severity of Experimental Rodent Colitis: The Importance of Crosstalk between Adipose Tissue and Skeletal Muscles. *Mediators of inflammation* 2015.
- Blobe, G.C., Schiemann, W.P., and Lodish, H.F. (2000). Role of transforming growth factor beta in human disease. *The New England journal of medicine* 342, 1350-1358.
- Bloch, S.A.A., Lee, J.Y., Syburra, T., Rosendahl, U., Griffiths, M.J.D., Kemp, P.R., and Polkey, M.I. (2015). Increased expression of GDF-15 may mediate ICU-acquired weakness by down-regulating muscle microRNAs. *Thorax* 70, 219-228.
- Blue, M.L., Williams, D.L., Zucker, S., Khan, S.A., and Blum, C.B. (1983). Apolipoprotein E synthesis in human kidney, adrenal gland, and liver. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 80, 283-287.
- Bodine, S.C., and Baehr, L.M. (2014). Skeletal muscle atrophy and the E3 ubiquitin ligases MuRF1 and MAFbx/atrogen-1. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 307, 84.
- Bodine, S.C., Latres, E., Baumhueter, S., Lai, V.K., Nunez, L., Clarke, B.A., Poueymirou, W.T., Panaro, F.J., Na, E., and Dharmarajan, K., et al. (2001a). Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science (New York, N.Y.)* 294, 1704-1708.
- Bodine, S.C., Stitt, T.N., Gonzalez, M., Kline, W.O., Stover, G.L., Bauerlein, R., Zlotchenko, E., Scrimgeour, A., Lawrence, J.C., and Glass, D.J., et al. (2001b). Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. *Nature cell biology* 3, 1014-1019.
- Bonaca, M.P., Morrow, D.A., Braunwald, E., Cannon, C.P., Jiang, S., Breher, S., Sabatine, M.S., Kempf, T., Wallentin, L., and Wollert, K.C. (2011). Growth differentiation factor-15 and risk of recurrent events in patients stabilized after acute coronary syndrome: observations from PROVE IT-TIMI 22. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 31, 203-210.
- Bonaterrea, G.A., Zügel, S., Thogersen, J., Walter, S.A., Haberkorn, U., Strelau, J., and Kinscherf, R. (2012). Growth differentiation factor-15 deficiency inhibits atherosclerosis progression by regulating interleukin-6-dependent inflammatory response to vascular injury. *Journal of the American Heart Association* 1, e002550.
- Bootcov, M.R., Bauskin, A.R., Valenzuela, S.M., Moore, A.G., Bansal, M., He, X.Y., Zhang, H.P., Donnellan, M., Mahler, S., and Pryor, K., et al. (1997). MIC-1, a novel macrophage inhibitory cytokine, is a divergent member of the TGF-beta superfamily. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 11514-11519.
- Böttner, M., Laaff, M., Schechinger, B., Rappold, G., Unsicker, K., and Suter-Crazzolara, C. (1999a). Characterization of the rat, mouse, and human genes of growth/differentiation factor-15/macrophage inhibiting cytokine-1 (GDF-15/MIC-1). *Gene* 237, 105-111.
- Böttner, M., Suter-Crazzolara, C., Schober, A., and Unsicker, K. (1999b). Expression of a novel member of the TGF-beta superfamily, growth/differentiation factor-15/macrophage-inhibiting cytokine-1 (GDF-15/MIC-1) in adult rat tissues. *Cell and tissue research* 297, 103-110.
- Bouchon, A., Facchetti, F., Weigand, M.A., and Colonna, M. (2001). TREM-1 amplifies inflammation and is a crucial mediator of septic shock. *Nature* 410, 1103-1107.
- Brand-Saberi, B. (2005). Genetic and epigenetic control of skeletal muscle development. *Annals of anatomy = Anatomischer Anzeiger: official organ of the Anatomische Gesellschaft* 187, 199-207.
- Breit, S.N., Johnen, H., Cook, A.D., Tsai, V.W.W., Mohammad, M.G., Kuffner, T., Zhang, H.P., Marquis, C.P., Jiang, L., and Lockwood, G., et al. (2011). The TGF- $\beta$  superfamily cytokine, MIC-1/GDF15: a pleiotropic cytokine with roles in inflammation, cancer and metabolism. *Growth factors (Chur, Switzerland)* 29, 187-195.
- Brown, D.A., Bauskin, A.R., Fairlie, W.D., Smith, M.D., Liu, T., Xu, N., and Breit, S.N. (2002a). Antibody-based approach to high-volume genotyping for MIC-1 polymorphism. *BioTechniques* 33, 118.

- Brown, D.A., Breit, S.N., Buring, J., Fairlie, W.D., Bauskin, A.R., Liu, T., and Ridker, P.M. (2002b). Concentration in plasma of macrophage inhibitory cytokine-1 and risk of cardiovascular events in women: a nested case-control study. *Lancet (London, England)* *359*, 2159-2163.
- Brown, D.A., Moore, J., Johnen, H., Smeets, T.J., Bauskin, A.R., Kuffner, T., Weedon, H., Milliken, S.T., Tak, P.P., and Smith, M.D., et al. (2007). Serum macrophage inhibitory cytokine 1 in rheumatoid arthritis: a potential marker of erosive joint destruction. *Arthritis and rheumatism* *56*, 753-764.
- Brown, D.A., Ward, R.L., Buckhaults, P., Liu, T., Romans, K.E., Hawkins, N.J., Bauskin, A.R., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., and Breit, S.N. (2003). MIC-1 serum level and genotype: associations with progress and prognosis of colorectal carcinoma. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* *9*, 2642-2650.
- Cartwright, I.J., Plonne, D., and Higgins, J.A. (2000). Intracellular events in the assembly of chylomicrons in rabbit enterocytes. *Journal of lipid research* *41*, 1728-1739.
- Castelli, W.P., Anderson, K., Wilson, P.W., and Levy, D. (1992). Lipids and risk of coronary heart disease. The Framingham Study. *Annals of epidemiology* *2*, 23-28.
- Chan, M.M., Santhanakrishnan, R., Chong, J.P., Chen, Z., Tai, B.C., Liew, O.W., Ng, T.P., Ling, L.H., Sim, D., and Leong, K.T., et al. (2016). Growth differentiation factor 15 in heart failure with preserved vs. reduced ejection fraction. *European journal of heart failure* *18*, 81-88.
- Chen, Y.-G., Wang, Q., Lin, S.-L., Chang, C.D., Chuang, J., and Ying, S.-Y. (2006). Activin signaling and its role in regulation of cell proliferation, apoptosis, and carcinogenesis. *Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)* *231*, 534-544.
- Chomczynski, P., and Sacchi, N. (2006). The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nature protocols* *1*, 581-585.
- Choy, J.C., Granville, D.J., Hunt, D.W., and McManus, B.M. (2001). Endothelial Cell Apoptosis: Biochemical Characteristics and Potential Implications for Atherosclerosis. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* *33*, 1673-1690.
- Christ, B., and Ordahl, C.P. (1995). Early stages of chick somite development. *Anatomy and embryology* *191*, 381-396.
- Clark, K.A., McElhinny, A.S., Beckerle, M.C., and Gregorio, C.C. (2002). Striated muscle cytoarchitecture: an intricate web of form and function. *Annual review of cell and developmental biology* *18*, 637-706.
- Clarke, B.A., Drujan, D., Willis, M.S., Lo Murphy, Corpina, R.A., Burova, E., Rakhilin, S.V., Stitt, T.N., Patterson, C., and Latres, E., et al. (2007). The E3 Ligase MuRF1 degrades myosin heavy chain protein in dexamethasone-treated skeletal muscle. *Cell metabolism* *6*, 376-385.
- Clarke, D.C., and Liu, X. (2008). Decoding the quantitative nature of TGF-beta/Smad signaling. *Trends in cell biology* *18*, 430-442.
- Clevers, H., and Nusse, R. (2012). Wnt/beta-catenin signaling and disease. *Cell* *149*, 1192-1205.
- Cooper, A.D. (1997). Hepatic uptake of chylomicron remnants. *Journal of lipid research* *38*, 2173-2192.
- Corella, D., and Ordovas, J.M. (2005). Single nucleotide polymorphisms that influence lipid metabolism: Interaction with dietary factors. *Annual review of nutrition* *25*, 341-390.
- Costamagna, D., Costelli, P., Sampaolesi, M., and Penna, F. (2015). Role of Inflammation in Muscle Homeostasis and Myogenesis. *Mediators of inflammation* *2015*, 1-14.
- Couffinhal, T., Silver, M., Kearney, M., Sullivan, A., Witzgenbichler, B., Magner, M., Annex, B., Peters, K., and Isner, J.M. (1999). Impaired Collateral Vessel Development Associated With Reduced Expression of Vascular Endothelial Growth Factor in ApoE<sup>-/-</sup> Mice. *Circulation* *99*, 3188-3198.
- Crawford, R.S., Albadawi, H., Robaldo, A., Peck, M.A., Abularrage, C.J., Yoo, H.-J., Lamuraglia, G.M., and Watkins, M.T. (2013). Divergent systemic and local inflammatory response to hind limb demand ischemia in wild-type and ApoE<sup>-/-</sup> mice. *Journal of Surgical Research* *183*, 952-962.
- Cruz, P.M.R., Palace, J., and Beeson, D. (2014a). Congenital myasthenic syndromes and the neuromuscular junction. *Current Opinion in Neurology* *27*, 566-575.

- Cruz, P.M.R., Palace, J., and Beeson, D. (2014b). Inherited disorders of the neuromuscular junction: an update. *Journal of neurology* 261, 2234-2243.
- de Jager, S.C., Bermúdez, B., Bot, I., Koenen, R.R., Bot, M., Kavelaars, A., Waard, V. de, Heijnen, C.J., Muriana, F.J., and Weber, C., et al. (2011). Growth differentiation factor 15 deficiency protects against atherosclerosis by attenuating CCR2-mediated macrophage chemotaxis. *The Journal of experimental medicine* 208, 217-225.
- Dehoux, M.J., van Beneden, R.P., Fernandez-Celemin, L., Lause, P.L., and Thissen, J.P. (2003). Induction of MafBx and Murf ubiquitin ligase mRNAs in rat skeletal muscle after LPS injection. *FEBS letters* 544, 214-217.
- Del Amo, F.F., Smith, D.E., Swiatek, P.J., Gendron-Maguire, M., Greenspan, R.J., McMahon, A.P., and Gridley, T. (1992). Expression pattern of Motch, a mouse homolog of Drosophila Notch, suggests an important role in early postimplantation mouse development. *Development (Cambridge, England)* 115, 737-744.
- Desjardins, P., and Conklin, D. (2010). NanoDrop microvolume quantitation of nucleic acids. *Journal of visualized experiments : JoVE*.
- Di Gregoli, K., George, S.J., Jackson, C.L., Newby, A.C., and Johnson, J.L. (2016). Differential effects of tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-1 and TIMP-2 on atherosclerosis and monocyte/macrophage invasion. *Cardiovascular research* 109, 318-330.
- Ding, Q., Mracek, T., Gonzalez-Muniesa, P., Kos, K., Wilding, J., Trayhurn, P., and Bing, C. (2009). Identification of macrophage inhibitory cytokine-1 in adipose tissue and its secretion as an adipokine by human adipocytes. *Endocrinology* 150, 1688-1696.
- Dombrowski, Y. (2010). Charakterisierung von GDF-15 als Immunmodulator im Ovarialkarzinom. Medizinische Dissertation, Universität Würzburg.
- Dominguez-Rodriguez, A., Abreu-Gonzalez, P., Avanzas, P., and Consuegra-Sanchez, L. (2016). Effect of Serum Growth Differentiation Factor-15 and the Syntax Score on 2-Year Outcomes in Patients With Acute Coronary Syndrome. *The American journal of cardiology* 117, 1569-1574.
- Dostálová, I., Roubíček, T., Bártlová, M., Mráz, M., Lacinová, Z., Haluzíková, D., Kaválková, P., Matoulek, M., Kasalický, M., and Haluzík, M. (2009). Increased serum concentrations of macrophage inhibitory cytokine-1 in patients with obesity and type 2 diabetes mellitus: the influence of very low calorie diet. *European journal of endocrinology/European Federation of Endocrine Societies* 161, 397-404.
- Eggers, K.M., Kempf, T., Lind, L., Sundstrom, J., Wallentin, L., Wollert, K.C., and Siegbahn, A. (2012). Relations of growth-differentiation factor-15 to biomarkers reflecting vascular pathologies in a population-based sample of elderly subjects. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation* 72, 45-51.
- Ellis, J.A., Ponsonby, A.L., Pezic, A., Williamson, E., Cochrane, J.A., Dickinson, J.L., and Dwyer, T. (2011). APOE genotype and cardio-respiratory fitness interact to determine adiposity in 8-year-old children from the Tasmanian Infant Health Survey. *PLoS one* 6, e26679.
- Elmadhun, N.Y., Sabe, A.A., Lassaletta, A.D., Chu, L.M., Kondra, K., Sturek, M., and Sellke, F.W. (2014). Metabolic syndrome impairs notch signaling and promotes apoptosis in chronically ischemic myocardium. *Proceedings of the 94th Annual Meeting of the American Association for Thoracic Surgery* 148, 1048-1055.
- Endo, T. (2015). Molecular mechanisms of skeletal muscle development, regeneration, and osteogenic conversion. *Muscle Bone Interactions* 80, 2-13.
- Fairlie, W.D., Moore, A.G., Bauskin, A.R., Russell, P.K., Zhang, H.P., and Breit, S.N. (1999). MIC-1 is a novel TGF-beta superfamily cytokine associated with macrophage activation. *Journal of leukocyte biology* 65, 2-5.
- Fairlie, W.D., Zhang, H.P., Wu, W.M., Pankhurst, S.L., Bauskin, A.R., Russell, P.K., Brown, P.K., and Breit, S.N. (2001). The propeptide of the transforming growth factor-beta superfamily member, macrophage inhibitory cytokine-1 (MIC-1), is a multifunctional domain that can facilitate protein folding and secretion. *The Journal of biological chemistry* 276, 16911-16918.

- Fehon, R.G., Kooh, P.J., Rebay, I., Regan, C.L., Xu, T., Muskavitch, M.A., and Artavanis-Tsakonas, S. (1990). Molecular interactions between the protein products of the neurogenic loci Notch and Delta, two EGF-homologous genes in *Drosophila*. *Cell* *61*, 523-534.
- Flanagan-Steet, H., Hannon, K., McAvoy, M.J., Hullinger, R., and Olwin, B.B. (2000). Loss of FGF receptor 1 signaling reduces skeletal muscle mass and disrupts myofiber organization in the developing limb. *Developmental Biology* *218*, 21-37.
- Fleige, S., and Pfaffl, M.W. (2006). RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. *Molecular aspects of medicine* *27*, 126-139.
- Foletta, V.C., White, L.J., Larsen, A.E., Leger, B., and Russell, A.P. (2011). The role and regulation of MAFbx/atrogen-1 and MuRF1 in skeletal muscle atrophy. *Pflügers Archiv: European journal of physiology* *461*, 325-335.
- Forte, T.M., Sharma, V., and Ryan, R.O. (2016). Apolipoprotein A-V gene therapy for disease prevention / treatment: a critical analysis. *Journal of biomedical research* *30*, 88-93.
- Frostegard, J., Nilsson, J., Haegerstrand, A., Hamsten, A., Wigzell, H., and Gidlund, M. (1990). Oxidized low density lipoprotein induces differentiation and adhesion of human monocytes and the monocytic cell line U937. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *87*, 904-908.
- Ghavami, S., Hashemi, M., Ande, S.R., Yeganeh, B., Xiao, W., Eshraghi, M., Bus, C.J., Kadkhoda, K., Wiehac, E., and Halayko, A.J., et al. (2009). Apoptosis and cancer: mutations within caspase genes. *Journal of Medical Genetics* *46*, 497-510.
- Ghiselli, G., Schaefer, E.J., Gascon, P., and Bresler, H.B., JR (1981). Type III hyperlipoproteinemia associated with apolipoprotein E deficiency. *Science (New York, N.Y.)* *214*, 1239-1241.
- Ghobrial, I.M., Witzig, T.E., and Adjei, A.A. (2005). Targeting Apoptosis Pathways in Cancer Therapy. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* *55*, 178-194.
- Goldberg, I.J., Scheraldi, C.A., Yacoub, L.K., Saxena, U., and Bisgaier, C.L. (1990). Lipoprotein ApoC-II activation of lipoprotein lipase. Modulation by apolipoprotein A-IV. *The Journal of biological chemistry* *265*, 4266-4272.
- Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (1977). The low-density lipoprotein pathway and its relation to atherosclerosis. *Annual review of biochemistry* *46*, 897-930.
- Gomes, M.D., Lecker, S.H., Jagoe, R.T., Navon, A., and Goldberg, A.L. (2001). Atrogen-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *98*, 14440-14445.
- Gotto, A.M. (1990). Interrelationship of triglycerides with lipoproteins and high-density lipoproteins. *The American journal of cardiology* *66*, 20-23.
- Goulding, M.D., Chalepakis, G., Deutsch, U., Erselius, JR, and Gruss, P. (1991). Pax-3, a novel murine DNA binding protein expressed during early neurogenesis. *The EMBO journal* *10*, 1135-1147.
- Greenow, K., Pearce, N.J., and Ramji, D.P. (2005). The key role of apolipoprotein E in atherosclerosis. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* *83*, 329-342.
- Grütter, M.G. (2000). Caspases: key players in programmed cell death. *Current Opinion in Structural Biology* *10*, 649-655.
- Gumucio, J.P., and Mendias, C.L. (2013). Atrogen-1, MuRF-1, and sarcopenia. *Endocrine* *43*, 12-21.
- Guo, Y.-S., Wu, Z.-G., Yang, J.-K., and Chen, X.-J. (2015). Impact of losartan and angiotensin II on the expression of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in rat vascular smooth muscle cells. *Molecular medicine reports* *11*, 1587-1594.
- Gursky, O. (2015). Structural stability and functional remodeling of high-density lipoproteins. *FEBS letters* *589*, 2627-2639.
- Haddad, F., Roy, R.R., Zhong, H., Edgerton, V.R., and Baldwin, K.M. (2003). Atrophy responses to muscle inactivity. II. Molecular markers of protein deficits. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md.: 1985)* *95*, 791-802.

- Hamilton, J.A. (2008). Colony-stimulating factors in inflammation and autoimmunity. *Nature Reviews Immunology* 8, 533-544.
- Han, X., and Boisvert, W.A. (2015). Interleukin-10 protects against atherosclerosis by modulating multiple atherogenic macrophage function. *Thrombosis and haemostasis* 113, 505-512.
- Hara, M., Yuasa, S., Shimoji, K., Onizuka, T., Hayashiji, N., Ohno, Y., Arai, T., Hattori, F., Kaneda, R., and Kimura, K., et al. (2011). G-CSF influences mouse skeletal muscle development and regeneration by stimulating myoblast proliferation. *The Journal of experimental medicine* 208, 715-727.
- Harrington, S.C., Simari, R.D., and Conover, C.A. (2007). Genetic deletion of pregnancy-associated plasma protein-A is associated with resistance to atherosclerotic lesion development in apolipoprotein E-deficient mice challenged with a high-fat diet. *Circulation research* 100, 1696-1702.
- Hartmann, P., Schober, A., and Weber, C. (2015). Chemokines and microRNAs in atherosclerosis. *Cellular and molecular life sciences: CMLS* 72, 3253-3266.
- Hatters, D.M., Peters-Libeu, C.A., and Weisgraber, K.H. (2006). Apolipoprotein E structure: insights into function. *Trends in biochemical sciences* 31, 445-454.
- Haugen, F., Norheim, F., Lian, H., Wensaas, A.J., Dueland, S., Berg, O., Funderud, A., Skålhegg, B.S., Raastad, T., and Drevon, C.A. (2010). IL-7 is expressed and secreted by human skeletal muscle cells. *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 298, C807-C816.
- Hawke, T.J., and Garry, D.J. (2001). Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. *Journal of applied physiology* (Bethesda, Md.: 1985) 91, 534-551.
- Hayes, V.M., Severi, G., Southey, M.C., Padilla, E.J.D., English, D.R., Hopper, J.L., Giles, G.G., and Sutherland, R.L. (2006). Macrophage inhibitory cytokine-1 H6D polymorphism, prostate cancer risk, and survival. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 15, 1223-1225.
- Hegele, R.A. (2009). Plasma lipoproteins: genetic influences and clinical implications. *Nature reviews. Genetics* 10, 109-121.
- Henninger, D.D., Gerritsen, M.E., and Granger, D.N. (1997). Low-density lipoprotein receptor knockout mice exhibit exaggerated microvascular responses to inflammatory stimuli. *Circulation research* 81, 274-281.
- Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., and Watson, R. (1993). Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Bio/technology* (Nature Publishing Company) 11, 1026-1030.
- Hirase, T., Hara, H., Miyazaki, Y., Ide, N., Nishimoto-Hazuku, A., Fujimoto, H., Saris, C.J.M., Yoshida, H., and Node, K. (2013). Interleukin 27 inhibits atherosclerosis via immunoregulation of macrophages in mice. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 305, H420-H429.
- Hopkins, P.M. (2006). Skeletal muscle physiology. *Continuing Education in Anaesthesia, Critical Care & Pain* 6, 1-6.
- Horak, M., Novak, J., and Bienertova-Vasku, J. (2016). Muscle-specific microRNAs in skeletal muscle development. *Developmental Biology* 410, 1-13.
- Hromas, R., Hufford, M., Sutton, J., Xu, D., Li, Y., and Lu, L. (1997). PLAB, a novel placental bone morphogenetic protein. *Biochimica et biophysica acta* 1354, 40-44.
- Huang, Y., and Mahley, R.W. (2014). Apolipoprotein E: Structure and function in lipid metabolism, neurobiology, and Alzheimer's diseases. *Special Issue: Metabolic disorders and neurodegeneration* 72, Part A, 3-12.
- Huff, M.W., Evans, A.J., Wolfe, B.M., Connelly, P.W., Maguire, G.F., and Strong, W.L. (1990). Identification and metabolic characteristics of an apolipoprotein C-II variant isolated from a hypertriglyceridemic subject. *Journal of lipid research* 31, 385-396.
- Huggett, J., Dheda, K., Bustin, S., and Zumla, A. (2005). Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes and immunity* 6, 279-284.

- Huxley, A.F., and Niedergerke, R. (1954). Structural Changes in Muscle During Contraction: Interference Microscopy of Living Muscle Fibres *173*, 971-973.
- Huxley, H., and Hanson, J. (1954). Changes in the cross-striations of muscle during contraction and stretch and their structural interpretation. *Nature 173*, 973-976.
- Ito, Y., Kayama, T., and Asahara, H. (2012). A systems approach and skeletal myogenesis. *Comparative and functional genomics 2012*, 759407.
- Jacob, P.S., Meneses, F.T.M. de, Yamada, M., Borges, M.C., Pantaleao, L.C., Borelli, P., Fock, R., and Rogero, M.M. (2013). Isocaloric intake of a high-fat diet promotes insulin resistance and inflammation in Wistar rats. *Cell biochemistry and function 31*, 244-253.
- Jain, K.S., Kathiravan, M.K., Somani, R.S., and Shishoo, C.J. (2007). The biology and chemistry of hyperlipidemia. *Bioorganic & medicinal chemistry 15*, 4674-4699.
- Johansson, M.E., Ulleryd, M.A., Bernardi, A., Am Lundberg, Andersson, A., Folkersen, L., Fogelstrand, L., Islander, U., Yan, Z.Q., and Hansson, G.K. (2014). alpha7 Nicotinic acetylcholine receptor is expressed in human atherosclerosis and inhibits disease in mice--brief report. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology 34*, 2632-2636.
- Johnen, H., Kuffner, T., Brown, D.A., Wu, B.J., Stocker, R., and Breit, S.N. (2012). Increased expression of the TGF- $\beta$  superfamily cytokine MIC-1/GDF15 protects ApoE(-/-) mice from the development of atherosclerosis. *Cardiovascular pathology: the official journal of the Society for Cardiovascular Pathology 21*, 499-505.
- Johnen, H., Lin, S., Kuffner, T., Brown, D.A., Tsai, V.W.-W., Bauskin, A.R., Wu, L., Pankhurst, G., Jiang, L., and Junankar, S., et al. (2007). Tumor-induced anorexia and weight loss are mediated by the TGF- $\beta$  superfamily cytokine MIC-1. *Nature medicine 13*, 1333-1340.
- Johnson, J.L., Baker, A.H., Oka, K., Chan, L., Newby, A.C., Jackson, C.L., and George, S.J. (2006). Suppression of atherosclerotic plaque progression and instability by tissue inhibitor of metalloproteinase-2: involvement of macrophage migration and apoptosis. *Circulation 113*, 2435-2444.
- Kang, J., Albadawi, H., Patel, V.I., Abbruzzese, T.A., Yoo, J.-H., Austen Jr, W.G., and Watkins, M.T. (2008). Apolipoprotein E-/- mice have delayed skeletal muscle healing after hind limb ischemia-reperfusion. *Journal of Vascular Surgery 48*, 701-708.
- Kant, I. (1784). *Beantwortung der Frage. Was ist Aufklärung?* (Berlin: Haude und Spener).
- Kassar-Duchossoy, L., Giacone, E., Gayraud-Morel, B., Jory, A., Gomes, D., and Tajbakhsh, S. (2005). Pax3/Pax7 mark a novel population of primitive myogenic cells during development. *Genes & development 19*, 1426-1431.
- Katoh, M. (2007). WNT signaling pathway and stem cell signaling network. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research 13*, 4042-4045.
- Keeley, E.C., Mehrad, B., and Strieter, R.M. (2008). Chemokines as mediators of neovascularization. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology 28*, 1928-1936.
- Kelly-Welch, A.E., Hanson, E.M., Boothby, M.R., and Keegan, A.D. (2003). Interleukin-4 and Interleukin-13 Signaling Connections Maps. *Science 300*, 1527-1528.
- Kempf, T., Eden, M., Strelau, J., Naguib, M., Willenbockel, C., Tongers, J., Heineke, J., Kotlarz, D., Xu, J., and Molkentin, J.D., et al. (2006). The transforming growth factor- $\beta$  superfamily member growth-differentiation factor-15 protects the heart from ischemia/reperfusion injury. *Circulation research 98*, 351-360.
- Kempf, T., Haehling, S. von, Peter, T., Allhoff, T., Cicoira, M., Doehner, W., Ponikowski, P., Filippatos, G.S., Rozeny, P., and Drexler, H., et al. (2007). Prognostic utility of growth differentiation factor-15 in patients with chronic heart failure. *Journal of the American College of Cardiology 50*, 1054-1060.
- Kempf, T., Zarbock, A., Widera, C., Butz, S., Stadtmann, A., Rossaint, J., Bolomini-Vittori, M., Korf-Klingebiel, M., Napp, L.C., and Hansen, B., et al. (2011). GDF-15 is an inhibitor of leukocyte integrin activation required for survival after myocardial infarction in mice. *Nature medicine 17*, 581-588.



- Kim, J.M., Kosak, J.P., Kim, J.K., Kissling, G., Germolec, D.R., Zeldin, D.C., Bradbury, J.A., Baek, S.J., and Eling, T.E. (2013). NAG-1/GDF15 Transgenic Mouse Has Less White Adipose Tissue and a Reduced Inflammatory Response. *Mediators of inflammation* 2013.
- Kooijman, S., Meurs, I., van der Stoep, M., Habets, K.L., Lammers, B., Berbee, J.F., Havekes, L.M., van Eck, M., Romijn, J.A., and Korpelaar, S.J., et al. (2015). Hematopoietic alpha7 nicotinic acetylcholine receptor deficiency increases inflammation and platelet activation status, but does not aggravate atherosclerosis. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 13, 126-135.
- Kramsch, D.M., and Hollander, W. (1973). The interaction of serum and arterial lipoproteins with elastin of the arterial intima and its role in the lipid accumulation in atherosclerotic plaques. *The Journal of clinical investigation* 52, 236-247.
- Krauss, R.M. (2010). Lipoprotein subfractions and cardiovascular disease risk. *Current opinion in lipidology* 21, 305-311.
- Krebs, L.T., Shutter, JR, Tanigaki, K., Honjo, T., Stark, K.L., and Gridley, T. (2004). Haploinsufficient lethality and formation of arteriovenous malformations in Notch pathway mutants. *Genes & development* 18, 2469-2473.
- Kubiczkova, L., Sedlarikova, L., Hajek, R., and Sevcikova, S. (2012). TGF-beta - an excellent servant but a bad master. *Journal of translational medicine* 10, 183.
- Kubo, H. (2013). Einfluss des Wachstums-Differenzierungs-Faktors-15 (GDF-15) auf die Morphologie der Milz bei hypercholesterinämischen (knockout) Mäusen. Medizinische Dissertation, Universität Marburg.
- Labeit, S., Kohl, C.H., Witt, C.C., Labeit, D., Jung, J., and Granzier, H. (2010). Modulation of muscle atrophy, fatigue and MLC phosphorylation by MuRF1 as indicated by hindlimb suspension studies on MuRF1-KO mice. *Journal of biomedicine & biotechnology* 2010, 693741.
- Lardelli, M., Dahlstrand, J., and Lendahl, U. (1994). The novel Notch homologue mouse Notch 3 lacks specific epidermal growth factor-repeats and is expressed in proliferating neuroepithelium. *Mechanisms of development* 46, 123-136.
- Lawson, N.D., Scheer, N., Pham, V.N., Kim, C.H., Chitnis, A.B., Campos-Ortega, J.A., and Weinstein, B.M. (2001). Notch signaling is required for arterial-venous differentiation during embryonic vascular development. *Development (Cambridge, England)* 128, 3675-3683.
- Lawton, L.N., Bonaldo, M.F., Jelenc, P.C., Qiu, L., Baumes, S.A., Marcelino, R.A., Jesus, G.M. de, Wellington, S., Knowles, J.A., and Warburton, D., et al. (1997). Identification of a novel member of the TGF-beta superfamily highly expressed in human placenta. *Gene* 203, 17-26.
- Lecker, S.H., Jagoe, R.T., Gilbert, A., Gomes, M., Baracos, V., Bailey, J., Price, SR, Mitch, W.E., and Goldberg, A.L. (2004). Multiple types of skeletal muscle atrophy involve a common program of changes in gene expression. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 18, 39-51.
- Lei, L., Li, H., Yan, F., and Xiao, Y. (2013). Hyperlipidemia Impaired Innate Immune Response to Periodontal Pathogen Porphyromonas gingivalis in Apolipoprotein E Knockout Mice. *PLOS ONE* 8, e71849.
- Lemaître, V., Soloway, P.D., and D'Armiento, J. (2003). Increased Medial Degradation With Pseudo-Aneurysm Formation in Apolipoprotein E-Knockout Mice Deficient in Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-1. *Circulation* 107, 333-338.
- Lemarié, J., Barraud, D., and Gibot, S. (2015a). Host response biomarkers in sepsis: overview on sTREM-1 detection. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 1237, 225-239.
- Lemarié, J., Derive, M., and Gibot, S. (2015b). The Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells-1: A new player during acute myocardial infarction. *Pharmacological research* 100, 261-265.
- Lerner, L., Hayes, T.G., Tao, N., Krieger, B., Feng, B., Wu, Z., Nicoletti, R., Chiu, M.I., Gyuris, J., and Garcia, J.M. (2015). Plasma growth differentiation factor 15 is associated with weight loss and mortality in cancer patients. *Journal of cachexia, sarcopenia and muscle* 6, 317-324.

- Li, H., Dakour, J., Guilbert, L.J., Winkler-Lowen, B., Lyall, F., and Morrish, D.W. (2005). PL74, a novel member of the transforming growth factor-beta superfamily, is overexpressed in preeclampsia and causes apoptosis in trophoblast cells. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* *90*, 3045-3053.
- Li, H.H., Kedar, V., Zhang, C., McDonough, H., Arya, R., Wang, D.Z., and Patterson, C. (2004). Atrogin-1/muscle atrophy F-box inhibits calcineurin-dependent cardiac hypertrophy by participating in an SCF ubiquitin ligase complex. *The Journal of clinical investigation* *114*, 1058-1071.
- Li, J.-L., and Harris, A.L. (2005). Notch signaling from tumor cells: a new mechanism of angiogenesis. *Cancer cell* *8*, 1-3.
- Lindmark, F., Zheng, S.L., Wiklund, F., Bensen, J., Balter, K.A., Chang, B., Hedelin, M., Clark, J., Stattin, P., and Meyers, D.A., et al. (2004). H6D polymorphism in macrophage-inhibitory cytokine-1 gene associated with prostate cancer. *Journal of the National Cancer Institute* *96*, 1248-1254.
- Liu, T., Bauskin, A.R., Zaunders, J., Brown, D.A., Pankhurst, S., Russell, P.J., and Breit, S.N. (2003). Macrophage inhibitory cytokine 1 reduces cell adhesion and induces apoptosis in prostate cancer cells. *Cancer research* *63*, 5034-5040.
- Llovera, M., García-Martínez, C., López-Soriano, J., Agell, N., López-Soriano, F.J., Garcia, I., and Argilés, J.M. (1998). Protein turnover in skeletal muscle of tumour-bearing transgenic mice overexpressing the soluble TNF receptor-1. *Cancer letters* *130*, 19-27.
- Londhe, P., and Guttridge, D.C. (2015). Inflammation induced loss of skeletal muscle. *Bone* *80*, 131-142.
- Lu, X., Peng, Q., and Wang, G. (2015). Discovery of new biomarkers of idiopathic inflammatory myopathy. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* *444*, 117-125.
- Lüllmann-Rauch, R., and Asan, E. (2015). *Taschenbuch Histologie* (Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag).
- Macia, L., Tsai, V.W.-W., Nguyen, A.D., Johnen, H., Kuffner, T., Shi, Y.-C., Lin, S., Herzog, H., Brown, D.A., and Breit, S.N., et al. (2012). Macrophage inhibitory cytokine 1 (MIC-1/GDF15) decreases food intake, body weight and improves glucose tolerance in mice on normal & obesogenic diets. *PloS one* *7*, e34868.
- Macias, M.J., Martin-Malpartida, P., and Massague, J. (2015). Structural determinants of Smad function in TGF-beta signaling. *Trends in biochemical sciences* *40*, 296-308.
- Mahley, R.W. (1988). Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science (New York, N.Y.)* *240*, 622-630.
- Mahley, R.W., and Huang, Y. (1999). Apolipoprotein E: from atherosclerosis to Alzheimer's disease and beyond. *Current opinion in lipidology* *10*, 207-217.
- Mahley, R.W., Huang, Y., and Rall, S.C., JR (1999). Pathogenesis of type III hyperlipoproteinemia (dysbetalipoproteinemia). Questions, quandaries, and paradoxes. *Journal of lipid research* *40*, 1933-1949.
- Mahley, R.W., Innerarity, T.L., Rall, S.C., JR, and Weisgraber, K.H. (1984). Plasma lipoproteins: apolipoprotein structure and function. *Journal of lipid research* *25*, 1277-1294.
- Mahley, R.W., and Rall, S.C. (2000). Apolipoprotein E: far more than a lipid transport protein. *Annual review of genomics and human genetics* *1*, 507-537.
- Mahley, R.W., Weisgraber, K.H., and Huang, Y. (2009). Apolipoprotein E: structure determines function, from atherosclerosis to Alzheimer's disease to AIDS. *Journal of lipid research* *50 Suppl*, 8.
- Manthey, H.D., Thomas, A.C., Shiels, I.A., Zerneck, A., Woodruff, T.M., Rolfe, B., and Taylor, S.M. (2011). Complement C5a inhibition reduces atherosclerosis in ApoE<sup>-/-</sup> mice. *FASEB J* *25*, 2447-2455.
- Massagué, J. (1998). TGF-beta signal transduction. *Annual review of biochemistry* *67*, 753-791.
- Massagué, J. (2000). How cells read TGF-beta signals. *Nature reviews. Molecular cell biology* *1*, 169-178.
- Massagué, J., and Chen, Y.G. (2000). Controlling TGF-beta signaling. *Genes & development* *14*, 627-644.

- Mehrad, B., Keane, M.P., and Strieter, R.M. (2007). Chemokines as mediators of angiogenesis. *Thrombosis and haemostasis* 97, 755-762.
- Meijers, W.C., van der Velde, A.R., and Boer, R.A. de (2016). Biomarkers in heart failure with preserved ejection fraction. *Netherlands heart journal: monthly journal of the Netherlands Society of Cardiology and the Netherlands Heart Foundation* 24, 252-258.
- Mijatovic, T., Kruys, V., Caput, D., Defrance, P., and Huez, G. (1997). Interleukin-4 and -13 inhibit tumor necrosis factor-alpha mRNA translational activation in lipopolysaccharide-induced mouse macrophages. *The Journal of biological chemistry* 272, 14394-14398.
- Moustardas, P., Kadoglou, N.P.E., Katsimpoulas, M., Kapelouzou, A., Kostomitsopoulos, N., Karayannacos, P.E., Kostakis, A., and Liapis, C.D. (2014). The Complementary Effects of Atorvastatin and Exercise Treatment on the Composition and Stability of the Atherosclerotic Plaques in ApoE Knockout Mice. *PLOS ONE* 9, e108240.
- Mueller, O., Lightfoot, S., and Schroeder, A. (2004). RNA Integrity Number (RIN) – Standardization of RNA quality control. *Agilent Technologies*.
- Navab, M., Reddy, S.T., van Lenten, B.J., and Am Fogelman (2011). HDL and cardiovascular disease: atherogenic and atheroprotective mechanisms. *Nature reviews. Cardiology* 8, 222-232.
- Naya, F.J., and Olson, E. (1999). MEF2: a transcriptional target for signaling pathways controlling skeletal muscle growth and differentiation. *Current opinion in cell biology* 11, 683-688.
- Nesto, R.W. (2005). Beyond low-density lipoprotein: addressing the atherogenic lipid triad in type 2 diabetes mellitus and the metabolic syndrome. *American journal of cardiovascular drugs: drugs, devices, and other interventions* 5, 379-387.
- Neufeld, G., Cohen, T., Gengrinovitch, S., and Poltorak, Z. (1999). Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 13, 9-22.
- Nickel, N., Jonigk, D., Kempf, T., Bockmeyer, C.L., Maegel, L., Rische, J., Laenger, F., Lehmann, U., Sauer, C., and Greer, M., et al. (2011). GDF-15 is abundantly expressed in plexiform lesions in patients with pulmonary arterial hypertension and affects proliferation and apoptosis of pulmonary endothelial cells. *Respiratory research* 12, 62.
- Obama, T., Nagaoka, S., Akagi, K., Kato, R., Horiuchi, N., Horai, Y., Aiuchi, T., Arata, S., Yamaguchi, T., and Watanabe, M., et al. (2011). Dietary cholesterol reduces plasma triacylglycerol in apolipoprotein E-null mice: suppression of lipin-1 and -2 in the glycerol-3-phosphate pathway. *PloS one* 6, e22917.
- Olson, E.N. (1990). MyoD family: a paradigm for development? *Genes & development* 4, 1454-1461.
- Olson, R.E. (1998). Discovery of the lipoproteins, their role in fat transport and their significance as risk factors. *The Journal of nutrition* 128, 439-443.
- Paralkar, V.M., Vail, A.L., Grasser, W.A., Brown, T.A., Xu, H., Vukicevic, S., Ke, H.Z., Qi, H., Owen, T.A., and Thompson, D.D. (1998). Cloning and characterization of a novel member of the transforming growth factor-beta/bone morphogenetic protein family. *The Journal of biological chemistry* 273, 13760-13767.
- Patterson, G.I., and Padgett, R.W. (2000). TGF beta-related pathways. Roles in *Caenorhabditis elegans* development. *Trends in genetics: TIG* 16, 27-33.
- Patzelt, J., Verschoor, A., and Langer, H.F. (2015). Platelets and the complement cascade in atherosclerosis. *Frontiers in Physiology* 6, 49.
- Paul, W.E. (1991). Interleukin-4: a prototypic immunoregulatory lymphokine. *Blood* 77, 1859-1870.
- Peake, J.M., Della Gatta, P., Suzuki, K., and Nieman, D.C. (2015). Cytokine expression and secretion by skeletal muscle cells: regulatory mechanisms and exercise effects. *Exercise immunology review* 21, 8-25.
- Pedersen, B.K. (2013). Muscle as a secretory organ. *Comprehensive Physiology* 3, 1337-1362.
- Peeters, W., Moll, F.L., Vink, A., van der Spek, P.J., Kleijn, D.P. de, Vries, J.P. de, Verheijen, J.H., Newby, A.C., and Pasterkamp, G. (2011). Collagenase matrix metalloproteinase-8 expressed in

- atherosclerotic carotid plaques is associated with systemic cardiovascular outcome. *European heart journal* 32, 2314-2325.
- Petrova, T.V., Makinen, T., and Alitalo, K. (1999). Signaling via Vascular Endothelial Growth Factor Receptors. *Experimental Cell Research* 253, 117-130.
- Pette, D., and Staron, R.S. (2000). Myosin isoforms, muscle fiber types, and transitions. *Microscopy research and technique* 50, 500-509.
- Preusch, M.R., Baeuerle, M., Albrecht, C., Blessing, E., Bischof, M., Katus, H.A., and Bea, F. (2013). GDF-15 protects from macrophage accumulation in a mousemodel of advanced atherosclerosis. *European journal of medical research* 18, 19.
- Rader, D.J., and Hovingh, G.K. (2014). HDL and cardiovascular disease. *Lancet (London, England)* 384, 618-625.
- Relaix, F., Rocancourt, D., Mansouri, A., and Buckingham, M. (2005). A Pax3/Pax7-dependent population of skeletal muscle progenitor cells. *Nature* 435, 948-953.
- Riedel, B.C., Thompson, P.M., and Brinton, R.D. (2016). Age, APOE and sex: Triad of risk of Alzheimer's disease. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 160, 134-147.
- Rommel, C., Bodine, S.C., Clarke, B.A., Rossman, R., Nunez, L., Stitt, T.N., Yancopoulos, G.D., and Glass, D.J. (2001). Mediation of IGF-1-induced skeletal myotube hypertrophy by PI(3)K/Akt/mTOR and PI(3)K/Akt/GSK3 pathways. *Nature cell biology* 3, 1009-1013.
- Rosenfeld, M.E., Butler, S., Ord, V.A., Lipton, B.A., Dyer, C.A., Curtiss, L.K., Palinski, W., and Witztum, J.L. (1993). Abundant expression of apoprotein E by macrophages in human and rabbit atherosclerotic lesions. *Arteriosclerosis and thrombosis: a journal of vascular biology / American Heart Association* 13, 1382-1389.
- Ross, R. (1981). George Lyman Duff Memorial Lecture. Atherosclerosis: a problem of the biology of arterial wall cells and their interactions with blood components. *Arteriosclerosis (Dallas, Tex.)* 1, 293-311.
- Rudnicki, M.A., and Williams, B.O. (2015). Wnt signaling in bone and muscle. *Muscle Bone Interactions* 80, 60-66.
- Saitoh, T., Kishida, H., Tsukada, Y., Fukuma, Y., Sano, J., Yasutake, M., Fukuma, N., Kusama, Y., and Hayakawa, H. (2000). Clinical significance of increased plasma concentration of macrophage colony-stimulating factor in patients with angina pectoris. *Journal of the American College of Cardiology* 35, 655-665.
- Schaefer, E.J., Gregg, R.E., Ghiselli, G., Forte, T.M., Ordovas, J.M., Zech, L.A., and Brewer, H.B., JR (1986). Familial apolipoprotein E deficiency. *The Journal of clinical investigation* 78, 1206-1219.
- Schiegnitz, E., Kämmerer, P.W., Koch, F.P., Krüger, M., Berres, M., and Al-Nawas, B. (2012). GDF 15 as an anti-apoptotic, diagnostic and prognostic marker in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncology* 48, 608-614.
- Schindowski, K., von Bohlen und Halbach, Oliver, Strelau, J., Ridder, D.A., Herrmann, O., Schober, A., Schwaninger, M., and Unsicker, K. (2011). Regulation of GDF-15, a distant TGF-beta superfamily member, in a mouse model of cerebral ischemia. *Cell and tissue research* 343, 399-409.
- Schlittenhardt, D., Schmiedt, W., Bonaterra, G.A., Metz, J., and Kinscherf, R. (2005). Colocalization of oxidized low-density lipoprotein, caspase-3, cyclooxygenase-2, and macrophage migration inhibitory factor in arteriosclerotic human carotid arteries. *Cell and tissue research* 322, 425-435.
- Schlittenhardt, D., Schober, A., Strelau, J., Bonaterra, G.A., Schmiedt, W., Unsicker, K., Metz, J., and Kinscherf, R. (2004). Involvement of growth differentiation factor-15/macrophage inhibitory cytokine-1 (GDF-15/MIC-1) in oxLDL-induced apoptosis of human macrophages in vitro and in arteriosclerotic lesions. *Cell and tissue research* 318, 325-333.
- Schneider, M.F. (1994). Control of calcium release in functioning skeletal muscle fibers. *Annual review of physiology* 56, 463-484.
- Schober, A., Bottner, M., Strelau, J., Kinscherf, R., Bonaterra, G.A., Barth, M., Schilling, L., Fairlie, W.D., Breit, S.N., and Unsicker, K. (2001). Expression of growth differentiation factor-15/ macrophage

- inhibitory cytokine-1 (GDF-15/MIC-1) in the perinatal, adult, and injured rat brain. *The Journal of comparative neurology* 439, 32-45.
- Schroeder, A., Mueller, O., Stocker, S., Salowsky, R., Leiber, M., Gassmann, M., Lightfoot, S., Menzel, W., Granzow, M., and Ragg, T. (2006). The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC molecular biology* 7, 3.
- Schumaker, V.N., and Adams, G.H. (1969). Circulating lipoproteins. *Annual review of biochemistry* 38, 113-136.
- Schwandt, P., Parhofer, K.G., Assmann, G. and Schwandt-Parhofer (2007). *Handbuch der Fettstoffwechselstörungen. Dyslipoproteinämien und Atherosklerose: Diagnostik, Therapie und Prävention; mit 193 Tabellen* (Stuttgart: Schattauer).
- Sethi, J.K., and Vidal-Puig, A. (2010). Wnt signalling and the control of cellular metabolism. *The Biochemical journal* 427, 1-17.
- Shi, Y., and Massagué, J. (2003). Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 113, 685-700.
- Si, Y., Liu, X., Cheng, M., Wang, M., Gong, Q., Yang, Y., Wang, T., and Yang, W. (2011). Growth differentiation factor 15 is induced by hepatitis C virus infection and regulates hepatocellular carcinoma-related genes. *PloS one* 6, e19967.
- Silence, J., Collen, D., and Lijnen, H.R. (2002). Reduced atherosclerotic plaque but enhanced aneurysm formation in mice with inactivation of the tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) gene. *Circulation research* 90, 897-903.
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., and Klenk, D.C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical biochemistry* 150, 76-85.
- Speidl, W.S., Exner, M., Amighi, J., Kastl, S.P., Zorn, G., Maurer, G., Wagner, O., Huber, K., Minar, E., and Wojta, J., et al. (2005). Complement component C5a predicts future cardiovascular events in patients with advanced atherosclerosis. *European heart journal* 26, 2294-2299.
- Speidl, W.S., Kastl, S.P., Huber, K., and Wojta, J. (2011). Complement in atherosclerosis: friend or foe? *Journal of thrombosis and haemostasis: JTH* 9, 428-440.
- Squire, J.M. (1997). Architecture and function in the muscle sarcomere. *Current Opinion in Structural Biology* 7, 247-257.
- Stapleton, P.A., Goodwill, A.G., James, M.E., D'Audiffret, A.C., and Frisbee, J.C. (2010). Differential Impact of Familial Hypercholesterolemia and Combined Hyperlipidemia on Vascular Wall and Network Remodeling in Mice. *Microcirculation* 17, 47-58.
- Stern-Straeter, J., Bonaterra, G.A., Hörmann, K., Kinscherf, R., and Goessler, U.R. (2009). Identification of valid reference genes during the differentiation of human myoblasts. *BMC molecular biology* 10, 66.
- Strelau, J., Bottner, M., Lingor, P., Suter-Crazzolara, C., Galter, D., Jaszai, J., Sullivan, A., Schober, A., Krieglstein, K., and Unsicker, K. (2000a). GDF-15/MIC-1 a novel member of the TGF-beta superfamily. *Journal of neural transmission. Supplementum*, 273-276.
- Strelau, J., Strzelczyk, A., Rusu, P., Bendner, G., Wiese, S., Diella, F., Altick, A.L., Bartheld, C.S. von, Klein, R., and Sendtner, M., et al. (2009). Progressive postnatal motoneuron loss in mice lacking GDF-15. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 29, 13640-13648.
- Strelau, J., Sullivan, A., Bottner, M., Lingor, P., Falkenstein, E., Suter-Crazzolara, C., Galter, D., Jaszai, J., Krieglstein, K., and Unsicker, K. (2000b). Growth/differentiation factor-15/macrophage inhibitory cytokine-1 is a novel trophic factor for midbrain dopaminergic neurons in vivo. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 20, 8597-8603.
- Sukari, A., Muqbil, I., Mohammad, R.M., Philip, P.A., and Azmi, A.S. (2016). F-BOX proteins in cancer cachexia and muscle wasting: Emerging regulators and therapeutic opportunities. *Seminars in Cancer Biology* 36, 95-104.
- Taleb, S., Tedgui, A., and Mallat, Z. (2015). IL-17 and Th17 cells in atherosclerosis: subtle and contextual roles. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 35, 258-264.

- Tanno, T., Noel, P., and Miller, J.L. (2010). Growth differentiation factor 15 in erythroid health and disease. *Current opinion in hematology* 17, 184-190.
- ten Dijke, P., Goumans, M.-J., Itoh, F., and Itoh, S. (2002). Regulation of cell proliferation by Smad proteins. *Journal of cellular physiology* 191, 1-16.
- Teng, B., and Mustafa, S.J. (2011). A(2A) adenosine receptor-mediated increase in coronary flow in hyperlipidemic APOE-knockout mice. *Journal of experimental pharmacology* 2011, 59-68.
- Thellin, O., Zorzi, W., Lakaye, B., Borman, B. de, Coumans, B., Hennen, G., Grisar, T., Igout, A., and Heinen, E. (1999). Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *Journal of biotechnology* 75, 291-295.
- Thornberry, N.A., and Lazebnik, Y. (1998). Caspases: Enemies Within. *Science* 281, 1312-1316.
- Tisdale, M.J. (2005). Molecular Pathways Leading to Cancer Cachexia. *Physiology* 20, 340-348.
- Tsai, V.W., Lin, S., Brown, D.A., Salis, A., and Breit, S.N. (2016). Anorexia-cachexia and obesity treatment may be two sides of the same coin: role of the TGF- $\beta$  superfamily cytokine MIC-1/GDF15. *International journal of obesity* (2005) 40, 193-197.
- Tsai, V.W.-W., Macia, L., Johnen, H., Kuffner, T., Manadhar, R., Jorgensen, S.B., Lee-Ng, K.K.M., Zhang, H.P., Wu, L., and Marquis, C.P., et al. (2013). TGF- $\beta$  superfamily cytokine MIC-1/GDF15 is a physiological appetite and body weight regulator. *PloS one* 8, e55174.
- Unsicker, K., Spittau, B., and Kriegelstein, K. (2013). The multiple facets of the TGF- $\beta$  family cytokine growth/differentiation factor-15/macrophage inhibitory cytokine-1. *Cytokine & growth factor reviews* 24, 373-384.
- Utermann, G., Hees, M., and Steinmetz, A. (1977). Polymorphism of apolipoprotein E and occurrence of dysbetalipoproteinaemia in man. *Nature* 269, 604-607.
- Voloshyna, I., Littlefield, M.J., and Reiss, A.B. (2014). Atherosclerosis and interferon- $\gamma$ : new insights and therapeutic targets. *Trends in cardiovascular medicine* 24, 45-51.
- von Maltzahn, J., Chang, N.C., Bentzinger, C.F., and Rudnicki, M.A. (2012). Wnt signaling in myogenesis. *Trends in cell biology* 22, 602-609.
- Wagner, M., Bonaterra, G.A., Schwarzbach, H., Zügel, S., Strelau, J., and Kinscherf, R. (2014). Influence of Growth differentiation factor-15 (GDF-15) on the gene and protein expression in gastrocnemius muscle of hypercholesterolemic ApoE $^{-/-}$  mice. *Perfusion* 27, 33.
- Wagner, M., Bonaterra, G.A., Schwarzbach, H., Zügel, S., Strelau, J., and Kinscherf, R. (2016). Effect of Growth differentiation factor-15 (GDF-15) on the gene and protein expression in gastrocnemius muscle of hypercholesterolemic ApoE $^{-/-}$  mice after 12 or 20 weeks cholesterol-enriched diet. *Perfusion* 29, 114.
- Wang, J., Perrard, X.D., Perrard, J.L., Mukherjee, A., Rosales, C., Chen, Y., Smith, C.W., Pownall, H.J., Ballantyne, C.M., and Wu, H. (2012). ApoE and the role of very low density lipoproteins in adipose tissue inflammation. *Atherosclerosis* 223, 342-349.
- Wang, P., Wu, P., Siegel, M.I., Egan, R.W., and Billah, M.M. (1995). Interleukin (IL)-10 inhibits nuclear factor kappa B (NF kappa B) activation in human monocytes. IL-10 and IL-4 suppress cytokine synthesis by different mechanisms. *The Journal of biological chemistry* 270, 9558-9563.
- Wang, T.D., Chen, W.J., Su, S.S., Lo SC, Lin, W.W., and Lee, Y.T. (2002). Increased cardiomyocyte apoptosis following ischemia and reperfusion in diet-induced hypercholesterolemia: relation to Bcl-2 and Bax proteins and caspase-3 activity. *Lipids* 37, 385-394.
- Wang, W.-y., Zhang, J., Wu, W.-y., Li, J., Ma, Y.-l., Chen, W.-h., Yan, H., Wang, K., Xu, W.-w., and Shen, J.-h., et al. (2011). Inhibition of lipoprotein-associated phospholipase A2 ameliorates inflammation and decreases atherosclerotic plaque formation in ApoE-deficient mice. *PloS one* 6, e23425.
- Weinmaster, G., Roberts, V.J., and Lemke, G. (1992). Notch2: a second mammalian Notch gene. *Development (Cambridge, England)* 116, 931-941.
- Weisgraber, K.H. (1994). Apolipoprotein E: structure-function relationships. *Advances in protein chemistry* 45, 249-302.

- Wezel, A., Vries, M.R., Lagraauw, H.M., Foks, A.C., Kuiper, J., Quax, P.H., and Bot, I. (2014). Complement factor C5a induces atherosclerotic plaque disruptions. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 18, 2020-2030.
- Whitson, R.J., Lucia, M.S., and Lambert, JR (2013). Growth differentiation factor-15 (GDF-15) suppresses in vitro angiogenesis through a novel interaction with connective tissue growth factor (CCN2). *Journal of cellular biochemistry* 114, 1424-1433.
- Wollert, K.C. (2007). Growth-differentiation factor-15 in cardiovascular disease: from bench to bedside, and back. *Basic research in cardiology* 102, 412-415.
- Wollert, K.C., and Kempf, T. (2012). Growth differentiation factor 15 in heart failure: an update. *Current heart failure reports* 9, 337-345.
- Wollert, K.C., Kempf, T., Lagerqvist, B., Lindahl, B., Olofsson, S., Allhoff, T., Peter, T., Siegbahn, A., Venge, P., and Drexler, H., et al. (2007a). Growth differentiation factor 15 for risk stratification and selection of an invasive treatment strategy in non ST-elevation acute coronary syndrome. *Circulation* 116, 1540-1548.
- Wollert, K.C., Kempf, T., Peter, T., Olofsson, S., James, S., Johnston, N., Lindahl, B., Horn-Wichmann, R., Brabant, G., and Simoons, M.L., et al. (2007b). Prognostic value of growth-differentiation factor-15 in patients with non-ST-elevation acute coronary syndrome. *Circulation* 115, 962-971.
- Wu, N., Zhang, X., Jia, P., and Jia, D. (2015). Hypercholesterolemia aggravates myocardial ischemia reperfusion injury via activating endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis. *Experimental and Molecular Pathology* 99, 449-454.
- Xu, J., Kimball, T.R., Lorenz, J.N., Brown, D.A., Bauskin, A.R., Klevitsky, R., Hewett, T.E., Breit, S.N., and Molkentin, J.D. (2006). GDF15/MIC-1 functions as a protective and antihypertrophic factor released from the myocardium in association with SMAD protein activation. *Circulation research* 98, 342-350.
- Xu, X.Y., Nie, Y., Wang, F.F., Bai, Y., Lv, Z.Z., Zhang, Y.Y., Li, Z.J., and Gao, W. (2014). Growth differentiation factor (GDF)-15 blocks norepinephrine-induced myocardial hypertrophy via a novel pathway involving inhibition of epidermal growth factor receptor transactivation. *The Journal of biological chemistry* 289, 10084-10094.
- Yu, X., Druz, S., Graves, D.T., Zhang, L., Antoniades, H.N., Hollander, W., Prusty, S., Valente, A.J., Schwartz, C.J., and Sonenshein, G.E. (1992). Elevated expression of monocyte chemoattractant protein 1 by vascular smooth muscle cells in hypercholesterolemic primates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 6953-6957.
- Zachary, I. (2001). Signaling mechanisms mediating vascular protective actions of vascular endothelial growth factor. *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 280, C1375-C1386.
- Zhang, M., Pan, K., Liu, Q., Zhou, X., Jiang, T., and Li, Y. (2016). Growth differentiation factor 15 may protect the myocardium from no-reflow by inhibiting the inflammatory-like response that predominantly involves neutrophil infiltration. *Molecular medicine reports* 13, 623-632.
- Zhang, S.H., Reddick, R.L., Piedrahita, J.A., and Maeda, N. (1992). Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. *Science (New York, N.Y.)* 258, 468-471.
- Zhou, Q., Bea, F., Preusch, M., Wang, H., Isermann, B., Shahzad, K., Katus, H.A., and Blessing, E. (2011). Evaluation of plaque stability of advanced atherosclerotic lesions in apo E-deficient mice after treatment with the oral factor Xa inhibitor rivaroxaban. *Mediators of inflammation* 2011, 432080.
- Zlotnik, A., and Yoshie, O. (2012). The Chemokine Superfamily Revisited. *Immunity* 36, 705-716.

## 6 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1: Schematische Darstellung eines Sarkomers mit Anordnung der Myofilamente im Ruhezustand.	13
Abb. 2: Kanonischer Wnt-Signalweg.	16
Abb. 3: Aufbau eines Lipoproteins.	17
Abb. 4: Struktur von ApoE3.	23
Abb. 5: Struktur eines TGF- $\beta$ 3-Homodimers als repräsentatives Mitglied der TGF- $\beta$ -Superfamilie.	25
Abb. 6: Synthese und Aktivierung von TGF- $\beta$ .	26
Abb. 7: Signaltransduktion von TGF- $\beta$ über SMAD.	27
Abb. 8: Genaufbau (A) und Proteinstruktur (B) von GDF-15.	29
Abb. 9: Generierung GDF-15-defizienter Mäuse unter Anwendung des LacZknockin-Konstrukts.	45
Abb. 10: Exemplarische Darstellung eines Elektropherogramms.	49
Abb. 11: Beispiel einer Kalibrierungskurve zur Proteinkonzentrationsbestimmung.	57
Abb. 12: Schematische Darstellung einer Proteome-Profiler™ -Antibody-Array-Kit-Membran (R&D Systems).	59
Abb. 13: Tiergewichte (g) der 4 Gruppen vor Gabe des CHFs (Alter der Tiere: 9 Wochen) und nach 12 bzw. 20 Wochen CHF.	63
Abb. 14: Serum-Cholesterinspiegel (mg/dl) der 4 Gruppen vor Gabe des CHFs (Alter der Tiere: 9 Wochen) und nach 12 bzw. 20 Wochen CHF.	65
Abb. 15: Serum-Triglyzeridspiegel (mg/dl) der 4 Gruppen vor Gabe des CHFs (Alter der Tiere: 9 Wochen) und nach 12 bzw. 20 Wochen CHF.	67
Abb. 16: Quantitative Real-Time RT-PCR (qRT-PCR) der Interleukin 6 (IL-6)- und Interleukin 1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )-Genexpression im <i>M. gastrocnemius</i> nach 12 bzw. 20 Wochen CHF.	69
Abb. 17: Quantitative Real-Time RT-PCR (qRT-PCR) der Caspase-3 (Casp3)-, Bcl-associated X protein (Bax)- und B-cell leukemia/lymphoma 2 (Bcl2)-Genexpression im <i>M. gastrocnemius</i> nach 12 bzw. 20 Wochen CHF.	72
Abb. 18: Quantitative Real-Time RT-PCR (qRT-PCR) der Vascular endothelial growth factor (VEGFA)- und Notch homolog 1, translocation-associated ( <i>Drosophila</i> ) (Notch1)-Genexpression im <i>M. gastrocnemius</i> nach 12 bzw. 20 Wochen CHF.	76
Abb. 19: Quantitative Real-Time RT-PCR (qRT-PCR) der Muscle-specific ring finger protein 1 (MuRF1)-, F-box protein 32 (Fbxo32)- und Cholinergic receptor, nicotinic, alpha polypeptide 1 (muscle) (Chrna1)-Genexpression im <i>M. gastrocnemius</i> nach 12 bzw. 20 Wochen CHF.	79



Abb. 20: Proteome Profiler™ Antibody Array (Mouse Cytokine Array) der Interleukin-Proteinexpression im M. gastrocnemius nach 12 bzw. 20 Wochen CHF. ....	83
Abb. 21: Proteome Profiler™ Antibody Array (Mouse Cytokine Array) der Interleukin-Proteinexpression im M. gastrocnemius nach 12 bzw. 20 Wochen CHF. ....	84
Abb. 22: Proteome Profiler™ Antibody Array (Mouse Cytokine Array) der Interleukin-Proteinexpression im M. gastrocnemius nach 12 bzw. 20 Wochen CHF. ....	85
Abb. 23: Proteome Profiler™ Antibody Array (Mouse Cytokine Array) der Interferon- und Tumor-Nekrose-Faktor-Proteinexpression im M. gastrocnemius nach 12 bzw. 20 Wochen CHF. ....	101
Abb. 24: Proteome Profiler™ Antibody Array (Mouse Cytokine Array) der Wachstumsfaktor-Proteinexpression im M. gastrocnemius nach 12 bzw. 20 Wochen CHF. ....	104
Abb. 25: Proteome Profiler™ Antibody Array (Mouse Cytokine Array) der Chemokin-Proteinexpression der CC-Familie im M. gastrocnemius nach 12 bzw. 20 Wochen CHF. ....	108
Abb. 26: Proteome Profiler™ Antibody Array (Mouse Cytokine Array) der Chemokin-Proteinexpression der CXC-Familie im M. gastrocnemius nach 12 bzw. 20 Wochen CHF. ....	116
Abb. 27: Proteome Profiler™ Antibody Array (Mouse Cytokine Array) der Myeloidzellrezeptor-, Komplementfaktor- und Metalloproteinaseninhibitor-Proteinexpression im M. gastrocnemius nach 12 bzw. 20 Wochen CHF. ....	121

## 7 TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1: Physikalische, kontraktile und metabolische Unterschiede der Skelettmuskulatur. ....	14
Tab. 2: Klassifikation der Lipoproteine. ....	18
Tab. 3: Zusammensetzung der Apolipoproteine. ....	19
Tab. 4: Übersicht über die TGF- $\beta$ -Untergruppen. ....	25
Tab. 5: Verwendete Geräte und Herstellerangaben. ....	40
Tab. 6: Verwendete Verbrauchsmaterialien und Herstellerangaben. ....	41
Tab. 7: Verwendete Chemikalien und Herstellerangaben. ....	41
Tab. 8: Verwendete Primer, Symbol, Amplikonlänge (bp) und Katalognummer. ....	42
Tab. 9: Verwendete Kits, Inhalt und Herstellerangaben. ....	43
Tab. 10: Verwendete Software und Herstellerangaben. ....	44
Tab. 11: Amplifizierungsprogramm der quantitativen Real-Time RT-PCR (qRT-PCR) im Thermocycler Mx3005P QPCR System (Agilent Technologies). ....	52
Tab. 12: Gruppen-Proteinpools. ....	58
Tab. 13: Übersicht über die getesteten Zytokine, Chemokine und Positiv-/Negativkontrollen. ....	59
Tab. 14: Darstellung der getesteten Housekeeping-Gene und deren Varianz mithilfe der NormFinder-Software (Aarhus University Hospital). ....	61
Tab. 15: HTN-Nummern der vier Tiergruppen der 12 Wochen CHF Tiere (Kubo, 2013). ....	164
Tab. 16: HTN-Nummern der vier Tiergruppen der 20 Wochen CHF Tiere (Kubo, 2013). ....	164
Tab. 17: Gewicht (g) 9. Woche (vor CHF). ....	164
Tab. 18: Gewicht (g) 12 Wochen CHF. ....	165
Tab. 19: Gewicht (g) 20 Wochen CHF. ....	165
Tab. 20: Serum-Cholesterinspiegel (mg/d) 9. Woche (vor CHF). ....	165
Tab. 21: Serum-Cholesterinspiegel (mg/dl) 12 Wochen CHF. ....	165
Tab. 22: Serum-Cholesterinspiegel (mg/dl) 20 Wochen CHF. ....	166
Tab. 23: Serum-Triglyzeridspiegel (mg/dl) 9. Woche (vor CHF). ....	166
Tab. 24: Serum-Triglyzeridspiegel (mg/dl) 12 Wochen CHF. ....	166
Tab. 25: Serum-Triglyzeridspiegel (mg/dl) 20 Wochen CHF. ....	166
Tab. 26: HTN-Nummern der vier Tiergruppen der 12 Wochen CHF Tiere. ....	167

Tab. 27: HTN-Nummern der vier Tiergruppen der 20 Wochen CHF Tiere.....	167
Tab. 28: Quantitative Real-Time RT-PCR (qRT-PCR) der Interleukin 6 (IL-6)-Genexpression im M. gastrocnemius nach 12 bzw. 20 Wochen CHF. ....	167
Tab. 29: Quantitative Real-Time RT-PCR (qRT-PCR) der Interleukin 1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )-Genexpression im M. gastrocnemius nach 12 bzw. 20 Wochen CHF. ....	168
Tab. 30: Quantitative Real-Time RT-PCR (qRT-PCR) der Caspase 3 (Casp3)-Genexpression im M. gastrocnemius nach 12 bzw. 20 Wochen CHF. ....	168
Tab. 31: Quantitative Real-Time RT-PCR (qRT-PCR) der Bcl-associated X Protein (Bax)-Genexpression im M. gastrocnemius nach 12 bzw. 20 Wochen CHF. ....	169
Tab. 32: Quantitative Real-Time RT-PCR (qRT-PCR) der B-cell leukemia/lymphoma 2 (Bcl2)-Genexpression im M. gastrocnemius nach 12 bzw. 20 Wochen CHF. ....	169
Tab. 33: Quantitative Real-Time RT-PCR (qRT-PCR) der Vascular endothelial growth factor (VEGFA)-Genexpression im M. gastrocnemius nach 12 bzw. 20 Wochen CHF. ....	170
Tab. 34: Quantitative Real-Time RT-PCR (qRT-PCR) der Notch homolog 1, translocation-associated (Drosophila) (Notch1)-Genexpression im M. gastrocnemius nach 12 bzw. 20 Wochen CHF. ....	170
Tab. 35: Quantitative Real-Time RT-PCR (qRT-PCR) der Muscle-specific ring finger protein 1 (MuRF1)-Genexpression im M. gastrocnemius nach 12 bzw. 20 Wochen CHF. ....	171
Tab. 36: Quantitative Real-Time RT-PCR (qRT-PCR) der F-box protein 32 (Fbxo32)-Genexpression im M. gastrocnemius nach 12 bzw. 20 Wochen CHF. ....	171
Tab. 37: Quantitative Real-Time RT-PCR (qRT-PCR) der Cholinergic receptor, nicotinic, alpha polypeptide 1 (muscle) (Chrna1)-Genexpression im M. gastrocnemius nach 12 bzw. 20 Wochen CHF. ....	172
Tab. 38: Proteome Profiler™ Antibody Array Kit (Mouse Cytokine Array) des M. gastrocnemius nach 12 bzw. 20 Wochen CHF. ....	172

## 8 TABELLARISCHER ANHANG

### 8.1 Gewicht, Serum-Cholesterin- und -Triglyzeridspiegel

#### 8.1.1 Tiergruppen

Tab. 15: HTN-Nummern der vier Tiergruppen der 12 Wochen CHF Tiere (Kubo, 2013).

Nummer	GDF-15 <sup>+/+</sup> ApoE <sup>+/+</sup>	GDF-15 <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>+/+</sup>	GDF-15 <sup>+/+</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>	GDF-15 <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>
HTN	56	4	1	26
HTN	57	5	2	27
HTN	58	6	3	28
HTN	59	7	9	29
HTN	60	8	10	30
HTN	61	49	11	31
HTN	62	50	46	32
HTN	63	51	47	33

Tab. 16: HTN-Nummern der vier Tiergruppen der 20 Wochen CHF Tiere (Kubo, 2013).

Nummer	GDF-15 <sup>+/+</sup> ApoE <sup>+/+</sup>	GDF-15 <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>+/+</sup>	GDF-15 <sup>+/+</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>	GDF-15 <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>
HTN	66	15	12	36
HTN	67	16	13	37
HTN	68	18	14	38
HTN	69	19	17	39
HTN	70	20	23	40
HTN	71	21	24	41
HTN	72	22	25	42
HTN	73	75	79	43

#### 8.1.2 Gewicht

Tab. 17: Gewicht (g) 9. Woche (vor CHF). Mittelwert, Standardabweichung, Standardfehler des Mittelwerts (SEM), t-Test vs. Wildtyp (WT) 9. Woche (vor CHF). Signifikanter Unterschied Doppelknockout vs. Wildtyp (Kubo, 2013).

	GDF-15 <sup>+/+</sup> ApoE <sup>+/+</sup>	GDF-15 <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>+/+</sup>	GDF-15 <sup>+/+</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>	GDF-15 <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>
Mittelwert	23,5	23,3	24,1	25,6
Standardabweichung	1,9	2,5	1,8	1,9
SEM	0,4	0,6	0,4	0,4
t-Test vs. WT		0,752	0,284	<b>0,001</b>

Tab. 18: Gewicht (g) 12 Wochen CHF. Mittelwert, Standardabweichung, Standardfehler des Mittelwerts (SEM), t-Test vs. Wildtyp (WT) 12 Wochen CHF. Signifikanter Unterschied Doppelknockout vs. Wildtyp (Kubo, 2013).

	GDF-15 <sup>+/+</sup> ApoE <sup>+/+</sup>	GDF-15 <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>+/+</sup>	GDF-15 <sup>+/+</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>	GDF-15 <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>
Mittelwert	37,5	38,7	36,6	42,6
Standardabweichung	9,5	10,7	8,6	11,3
SEM	3,0	3,4	2,6	3,6
t-Test vs. WT		0,599	0,459	<b>0,016</b>

Tab. 19: Gewicht (g) 20 Wochen CHF. Mittelwert, Standardabweichung, Standardfehler des Mittelwerts (SEM), t-Test vs. Wildtyp (WT) 20 Wochen CHF. Signifikanter Unterschied aller Tiergruppen vs. Wildtyp (Kubo, 2013).

	GDF-15 <sup>+/+</sup> ApoE <sup>+/+</sup>	GDF-15 <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>+/+</sup>	GDF-15 <sup>+/+</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>	GDF-15 <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>
Mittelwert	45,0	49,6	40,6	54,5
Standardabweichung	12,1	12,9	7,9	13,7
SEM	4,0	4,1	2,1	4,1
t-Test vs. WT		<b>0,002</b>	<b>p≤0,001</b>	<b>p≤0,001</b>

### 8.1.3 Serum-Cholesterinspiegel

Tab. 20: Serum-Cholesterinspiegel (mg/d) 9. Woche (vor CHF). Mittelwert, Standardabweichung, Standardfehler des Mittelwerts (SEM), t-Test vs. Wildtyp (WT) 9. Woche (vor CHF). Signifikanter Unterschied aller Tiergruppen vs. Wildtyp (Kubo, 2013).

	GDF-15 <sup>+/+</sup> ApoE <sup>+/+</sup>	GDF-15 <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>+/+</sup>	GDF-15 <sup>+/+</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>	GDF-15 <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>
Mittelwert	102,9	83,3	232,6	284,0
Standardabweichung	13,2	11,9	58,2	76,1
SEM	3,0	2,7	12,4	16,6
t-Test vs. WT		<b>p≤0,001</b>	<b>p≤0,001</b>	<b>p≤0,001</b>

Tab. 21: Serum-Cholesterinspiegel (mg/dl) 12 Wochen CHF. Mittelwert, Standardabweichung, Standardfehler des Mittelwerts (SEM), t-Test vs. Wildtyp (WT) 12 Wochen CHF. Signifikanter Unterschied Doppelknockout und GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> vs. Wildtyp (Kubo, 2013).

	GDF-15 <sup>+/+</sup> ApoE <sup>+/+</sup>	GDF-15 <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>+/+</sup>	GDF-15 <sup>+/+</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>	GDF-15 <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>
Mittelwert	204,0	209,6	564,5	755,1
Standardabweichung	23,3	69,7	73,7	116,2
SEM	7,4	22,0	22,2	36,7
t-Test vs. WT		0,836	<b>p≤0,001</b>	<b>p≤0,001</b>

Tab. 22: Serum-Cholesterinspiegel (mg/dl) 20 Wochen CHF. Mittelwert, Standardabweichung, Standardfehler des Mittelwerts (SEM), t-Test vs. Wildtyp (WT) 20 Wochen CHF. Signifikanter Unterschied Doppelknockout und GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> vs. Wildtyp (Kubo, 2013).

	GDF-15 <sup>+/+</sup> ApoE <sup>+/+</sup>	GDF-15 <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>+/+</sup>	GDF-15 <sup>+/+</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>	GDF-15 <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>
Mittelwert	303,7	309,4	619,8	705,2
Standardabweichung	42,5	64,8	53,9	146,3
SEM	14,2	20,5	16,2	44,1
t-Test vs. WT		0,836	<b>p≤0,001</b>	<b>p≤0,001</b>

#### 8.1.4 Serum-Triglyzeridspiegel

Tab. 23: Serum-Triglyzeridspiegel (mg/dl) 9. Woche (vor CHF). Mittelwert, Standardabweichung, Standardfehler des Mittelwerts (SEM), t-Test vs. Wildtyp (WT) 9. Woche (vor CHF). Signifikanter Unterschied Doppelknockout und GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> vs. Wildtyp (Kubo, 2013).

	GDF-15 <sup>+/+</sup> ApoE <sup>+/+</sup>	GDF-15 <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>+/+</sup>	GDF-15 <sup>+/+</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>	GDF-15 <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>
Mittelwert	79,7	86,2	151,1	199,6
Standardabweichung	31,0	30,0	88,1	92,2
SEM	7,1	6,7	18,8	20,1
t-Test vs. WT		0,448	<b>p≤0,001</b>	<b>p≤0,001</b>

Tab. 24: Serum-Triglyzeridspiegel (mg/dl) 12 Wochen CHF. Mittelwert, Standardabweichung, Standardfehler des Mittelwerts (SEM), t-Test vs. Wildtyp (WT) 12 Wochen CHF. Signifikanter Unterschied aller Tiergruppen vs. WT (Kubo, 2013).

	GDF-15 <sup>+/+</sup> ApoE <sup>+/+</sup>	GDF-15 <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>+/+</sup>	GDF-15 <sup>+/+</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>	GDF-15 <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>
Mittelwert	65,9	101,3	185,4	233,0
Standardabweichung	27,9	41,4	60,8	62,5
SEM	8,8	13,1	18,3	19,8
t-Test vs. WT		<b>0,048</b>	<b>p≤0,001</b>	<b>p≤0,001</b>

Tab. 25: Serum-Triglyzeridspiegel (mg/dl) 20 Wochen CHF. Mittelwert, Standardabweichung, Standardfehler des Mittelwerts (SEM), t-Test vs. Wildtyp (WT) 20 Wochen CHF. Signifikanter Unterschied aller Tiergruppen vs. WT (Kubo, 2013).

	GDF-15 <sup>+/+</sup> ApoE <sup>+/+</sup>	GDF-15 <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>+/+</sup>	GDF-15 <sup>+/+</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>	GDF-15 <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>
Mittelwert	70,4	95,0	179,5	351,6
Standardabweichung	14,9	28,4	23,6	158,9
SEM	5,0	9,0	7,1	47,9
t-Test vs. WT		<b>0,042</b>	<b>p≤0,001</b>	<b>p≤0,001</b>

## 8.2 Quantitative Real-Time RT-PCR (qRT-PCR) und Proteome Profiler™ Antibody Array

### 8.2.1 Tiergruppen

Tab. 26: HTN-Nummern der vier Tiergruppen der 12 Wochen CHF Tiere.

Nummer	GDF-15 <sup>+/+</sup> ApoE <sup>+/+</sup>	GDF-15 <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>+/+</sup>	GDF-15 <sup>+/+</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>	GDF-15 <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>
HTN	99	97	108	95
HTN	100	104	109	113
HTN	101	105	110	114
HTN	102	106	112	115
HTN		107		116
HTN				117

Tab. 27: HTN-Nummern der vier Tiergruppen der 20 Wochen CHF Tiere.

Nummer	GDF-15 <sup>+/+</sup> ApoE <sup>+/+</sup>	GDF-15 <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>+/+</sup>	GDF-15 <sup>+/+</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>	GDF-15 <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>
HTN	66	86	79	75
HTN	70	118	80	76
HTN	71	119	81	77
HTN	72	120	93	78
HTN	83		124	122

### 8.2.2 Quantitative Real-Time RT-PCR (qRT-PCR)

Tab. 28: Quantitative Real-Time RT-PCR (qRT-PCR) der Interleukin 6 (IL-6)-Genexpression im M. gastrocnemius nach 12 bzw. 20 Wochen CHF. Absolute und relative Expression (x-fache Veränderung im Vergleich zum Wildtyp (GDF15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>)), GDF15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> und 12 Wochen CHF. Mittelwert (MW), Standardfehler des Mittelwerts (SEM), t-Test vs. Wildtyp (WT), vs. GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> und 12 vs. 20 Wochen CHF.

12 Wochen CHF	GDF-15 <sup>+/+</sup> ApoE <sup>+/+</sup>	GDF-15 <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>+/+</sup>	GDF-15 <sup>+/+</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>	GDF-15 <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>
MW	0,55	11,44	6,12	5,74
MW (vs. WT)	1,00	20,84	11,16	10,47
SEM (vs. WT)	0,27	7,46	3,04	2,58
MW (vs. GDF-15 <sup>+/+</sup> /ApoE <sup>-/-</sup> )			1,00	0,94
t-Test vs. WT		P = 0,016	P = 0,028	P = 0,028
t-Test vs. GDF-15 <sup>+/+</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>				P = 0,762
20 Wochen CHF	GDF-15 <sup>+/+</sup> ApoE <sup>+/+</sup>	GDF-15 <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>+/+</sup>	GDF-15 <sup>+/+</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>	GDF-15 <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>
MW	27,17	8,53	3,13	0,33
MW (vs. WT)	1,00	0,31	0,12	0,01
SEM (vs. WT)	0,17	0,17	0,06	0,00
MW (vs. GDF-15 <sup>+/+</sup> /ApoE <sup>-/-</sup> )			1,00	0,11
t-Test vs. WT		P = 0,044	P = 0,003	P = 0,008
t-Test vs. GDF-15 <sup>+/+</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>				P = 0,095
12 vs. 20 Wochen CHF	GDF-15 <sup>+/+</sup> ApoE <sup>+/+</sup>	GDF-15 <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>+/+</sup>	GDF-15 <sup>+/+</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>	GDF-15 <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>
12 Wochen CHF	1,00	1,00	1,00	1,00
20 Wochen CHF	49,53	0,75	0,51	0,06
t-Test 12 vs. 20 Wochen	P = 0,016	P = 0,689	P = 0,297	P = 0,009

Tab. 29: Quantitative Real-Time RT-PCR (qRT-PCR) der Interleukin 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )-Genexpression im M. gastrocnemius nach 12 bzw. 20 Wochen CHF. Absolute und relative Expression (x-fache Veränderung im Vergleich zum Wildtyp (GDF15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>), GDF15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> und 12 Wochen CHF. Mittelwert (MW), Standardfehler des Mittelwerts (SEM), t-Test vs. Wildtyp (WT), vs. GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> und 12 vs. 20 Wochen CHF.

12 Wochen CHF	GDF-15 <sup>+/+</sup> ApoE <sup>+/+</sup>	GDF-15 <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>+/+</sup>	GDF-15 <sup>+/+</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>	GDF-15 <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>
MW	1,96	11,68	0,28	83,73
MW (vs. WT)	1,00	5,96	0,14	42,77
SEM (vs. WT)	0,47	1,46	0,12	24,40
MW (vs. GDF-15 <sup>+/+</sup> /ApoE <sup>-/-</sup> )			1,00	301,33
t-Test vs. WT		P = 0,035	P = 0,180	P = 0,029
t-Test vs. GDF-15 <sup>+/+</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>				P = 0,029
<b>20 Wochen CHF</b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>
MW	10,80	0,18	106,30	152,51
MW (vs. WT)	1,00	0,02	9,85	14,13
SEM (vs. WT)	0,39	0,01	8,00	9,31
MW (vs. GDF-15 <sup>+/+</sup> /ApoE <sup>-/-</sup> )			1,00	1,43
t-Test vs. WT		P = 0,016	P = 0,413	P = 0,063
t-Test vs. GDF-15 <sup>+/+</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>				P = 0,200
<b>12 vs. 20 Wochen CHF</b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>
12 Wochen CHF	1,00	1,00	1,00	1,00
20 Wochen CHF	5,51	0,02	382,56	1,82
t-Test 12 vs. 20 Wochen	P = 0,145	P = 0,016	P = 0,029	P = 0,686

Tab. 30: Quantitative Real-Time RT-PCR (qRT-PCR) der Caspase 3 (Casp3)-Genexpression im M. gastrocnemius nach 12 bzw. 20 Wochen CHF. Absolute und relative Expression (x-fache Veränderung im Vergleich zum Wildtyp (GDF15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>), GDF15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> und 12 Wochen CHF. Mittelwert (MW), Standardfehler des Mittelwerts (SEM), t-Test vs. Wildtyp (WT), vs. GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> und 12 vs. 20 Wochen CHF.

12 Wochen CHF	GDF-15 <sup>+/+</sup> ApoE <sup>+/+</sup>	GDF-15 <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>+/+</sup>	GDF-15 <sup>+/+</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>	GDF-15 <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>
MW	1,20	5,72	3,81	3,37
MW (vs. WT)	1,00	4,78	3,18	2,82
SEM (vs. WT)	0,16	1,15	0,32	1,09
MW (vs. GDF-15 <sup>+/+</sup> /ApoE <sup>-/-</sup> )			1,00	0,89
t-Test vs. WT		P = 0,036	P = 0,002	P = 0,261
t-Test vs. GDF-15 <sup>+/+</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>				P = 0,818
<b>20 Wochen CHF</b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>
MW	5,98	3,50	4,73	0,65
MW (vs. WT)	1,00	0,59	0,79	0,14
SEM (vs. WT)	0,07	0,11	0,19	0,04
MW (vs. GDF-15 <sup>+/+</sup> /ApoE <sup>-/-</sup> )			1,00	0,14
t-Test vs. WT		P = 0,068	P = 0,493	P = 0,036
t-Test vs. GDF-15 <sup>+/+</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>				P = 0,016
<b>12 vs. 20 Wochen CHF</b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>
12 Wochen CHF	1,00	1,00	1,00	1,00
20 Wochen CHF	4,99	0,61	1,24	0,19
t-Test 12 vs. 20 Wochen	P = 0,057	P = 0,272	P = 0,886	P = 0,126



Tab. 31: Quantitative Real-Time RT-PCR (qRT-PCR) der Bcl-associated X Protein (Bax)-Genexpression im M. gastrocnemius nach 12 bzw. 20 Wochen CHF. Absolute und relative Expression (x-fache Veränderung im Vergleich zum Wildtyp (GDF15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>), GDF15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> und 12 Wochen CHF. Mittelwert (MW), Standardfehler des Mittelwerts (SEM), t-Test vs. Wildtyp (WT), vs. GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> und 12 vs. 20 Wochen CHF.

12 Wochen CHF	GDF-15 <sup>+/+</sup> ApoE <sup>+/+</sup>	GDF-15 <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>+/+</sup>	GDF-15 <sup>+/+</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>	GDF-15 <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>
MW	0,32	10,11	7,00	9,57
MW (vs. WT)	1,00	31,40	21,75	29,73
SEM (vs. WT)	0,14	10,40	6,73	9,01
MW (vs. GDF-15 <sup>+/+</sup> /ApoE <sup>-/-</sup> )			1,00	1,37
t-Test vs. WT		P = 0,016	P = 0,029	P = 0,038
t-Test vs. GDF-15 <sup>+/+</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>				P = 0,579
<b>20 Wochen CHF</b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>
MW	14,82	6,65	7,48	1,05
MW (vs. WT)	1,00	0,45	7,26	0,07
SEM (vs. WT)	0,09	0,19	0,25	0,04
MW (vs. GDF-15 <sup>+/+</sup> /ApoE <sup>-/-</sup> )			1,00	0,14
t-Test vs. WT		P = 0,190	P = 0,151	P = 0,008
t-Test vs. GDF-15 <sup>+/+</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>				P = 0,056
<b>12 vs. 20 Wochen CHF</b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>
12 Wochen CHF	1,00	1,00	1,00	1,00
20 Wochen CHF	46,03	0,66	1,07	0,11
t-Test 12 vs. 20 Wochen	P = 0,016	P = 0,521	P = 0,928	P = 0,041

Tab. 32: Quantitative Real-Time RT-PCR (qRT-PCR) der B-cell leukemia/lymphoma 2 (Bcl2)-Genexpression im M. gastrocnemius nach 12 bzw. 20 Wochen CHF. Absolute und relative Expression (x-fache Veränderung im Vergleich zum Wildtyp (GDF15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>), GDF15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> und 12 Wochen CHF. Mittelwert (MW), Standardfehler des Mittelwerts (SEM), t-Test vs. Wildtyp (WT), vs. GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> und 12 vs. 20 Wochen CHF.

12 Wochen CHF	GDF-15 <sup>+/+</sup> ApoE <sup>+/+</sup>	GDF-15 <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>+/+</sup>	GDF-15 <sup>+/+</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>	GDF-15 <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>
MW	0,46	7,59	6,29	10,99
MW (vs. WT)	1,00	16,61	13,77	24,04
SEM (vs. WT)	0,03	3,55	4,66	8,37
MW (vs. GDF-15 <sup>+/+</sup> /ApoE <sup>-/-</sup> )			1,00	1,75
t-Test vs. WT		P = 0,016	P = 0,029	P = 0,010
t-Test vs. GDF-15 <sup>+/+</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>				P = 0,425
<b>20 Wochen CHF</b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>
MW	7,95	9,68	11,01	2,89
MW (vs. WT)	1,00	1,22	1,38	0,36
SEM (vs. WT)	0,11	0,64	0,42	0,27
MW (vs. GDF-15 <sup>+/+</sup> /ApoE <sup>-/-</sup> )			1,00	0,26
t-Test vs. WT		P = 0,556	P = 0,548	P = 0,151
t-Test vs. GDF-15 <sup>+/+</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>				P = 0,105
<b>12 vs. 20 Wochen CHF</b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>
12 Wochen CHF	1,00	1,00	1,00	1,00
20 Wochen CHF	17,40	1,27	1,75	0,26
t-Test 12 vs. 20 Wochen	P = 0,016	P = 0,719	P = 0,356	P = 0,147

Tab. 33: Quantitative Real-Time RT-PCR (qRT-PCR) der Vascular endothelial growth factor (VEGFA)-Genexpression im M. gastrocnemius nach 12 bzw. 20 Wochen CHF. Absolute und relative Expression (x-fache Veränderung im Vergleich zum Wildtyp (GDF15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>), GDF15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> und 12 Wochen CHF. Mittelwert (MW), Standardfehler des Mittelwerts (SEM), t-Test vs. Wildtyp (WT), vs. GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> und 12 vs. 20 Wochen CHF.

12 Wochen CHF	GDF-15 <sup>+/+</sup> ApoE <sup>+/+</sup>	GDF-15 <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>+/+</sup>	GDF-15 <sup>+/+</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>	GDF-15 <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>
MW	0,94	6,62	5,99	15,19
MW (vs. WT)	1,00	7,01	6,35	16,08
SEM (vs. WT)	0,20	2,45	1,51	4,91
MW (vs. GDF-15 <sup>+/+</sup> /ApoE <sup>-/-</sup> )			1,00	2,53
t-Test vs. WT		P = 0,095	P = 0,023	P = 0,055
t-Test vs. GDF-15 <sup>+/+</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>				P = 0,194
<b>20 Wochen CHF</b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>
MW	23,94	10,56	10,58	2,98
MW (vs. WT)	1,00	0,44	0,44	0,12
SEM (vs. WT)	0,09	0,25	0,16	0,07
MW (vs. GDF-15 <sup>+/+</sup> /ApoE <sup>-/-</sup> )			1,00	0,28
t-Test vs. WT		P = 0,190	P = 0,024	P = 0,008
t-Test vs. GDF-15 <sup>+/+</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>				P = 0,139
<b>12 vs. 20 Wochen CHF</b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>
12 Wochen CHF	1,00	1,00	1,00	1,00
20 Wochen CHF	25,35	1,60	1,76	0,20
t-Test 12 vs. 20 Wochen	P = <0,001	P = 1,000	P = 0,390	P = 0,067

Tab. 34: Quantitative Real-Time RT-PCR (qRT-PCR) der Notch homolog 1, translocation-associated (Drosophila) (Notch1)-Genexpression im M. gastrocnemius nach 12 bzw. 20 Wochen CHF. Absolute und relative Expression (x-fache Veränderung im Vergleich zum Wildtyp (GDF15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>), GDF15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> und 12 Wochen CHF. Mittelwert (MW), Standardfehler des Mittelwerts (SEM), t-Test vs. Wildtyp (WT), vs. GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> und 12 vs. 20 Wochen CHF.

12 Wochen CHF	GDF-15 <sup>+/+</sup> ApoE <sup>+/+</sup>	GDF-15 <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>+/+</sup>	GDF-15 <sup>+/+</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>	GDF-15 <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>
MW	0,96	6,57	6,32	16,96
MW (vs. WT)	1,00	6,87	6,61	17,75
SEM (vs. WT)	0,20	1,59	0,19	6,48
MW (vs. GDF-15 <sup>+/+</sup> /ApoE <sup>-/-</sup> )			1,00	2,68
t-Test vs. WT		P = 0,016	P = <0,001	P = 0,067
t-Test vs. GDF-15 <sup>+/+</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>				P = 0,378
<b>20 Wochen CHF</b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>
MW	16,68	8,84	13,73	0,47
MW (vs. WT)	1,00	0,53	0,82	0,03
SEM (vs. WT)	0,14	0,16	0,29	0,01
MW (vs. GDF-15 <sup>+/+</sup> /ApoE <sup>-/-</sup> )			1,00	0,03
t-Test vs. WT		P = 0,153	P = 0,693	P = 0,036
t-Test vs. GDF-15 <sup>+/+</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>				P = 0,016
<b>12 vs. 20 Wochen CHF</b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>
12 Wochen CHF	1,00	1,00	1,00	1,00
20 Wochen CHF	17,46	1,35	2,17	0,03
t-Test 12 vs. 20 Wochen	P = 0,057	P = 0,522	P = 0,426	P = 0,063

Tab. 35: Quantitative Real-Time RT-PCR (qRT-PCR) der Muscle-specific ring finger protein 1 (MuRF1)-Genexpression im M. gastrocnemius nach 12 bzw. 20 Wochen CHF. Absolute und relative Expression (x-fache Veränderung im Vergleich zum Wildtyp (GDF15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>), GDF15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> und 12 Wochen CHF. Mittelwert (MW), Standardfehler des Mittelwerts (SEM), t-Test vs. Wildtyp (WT), vs. GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> und 12 vs. 20 Wochen CHF.

12 Wochen CHF	GDF-15 <sup>+/+</sup> ApoE <sup>+/+</sup>	GDF-15 <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>+/+</sup>	GDF-15 <sup>+/+</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>	GDF-15 <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>
MW	0,19	5,75	5,60	6,76
MW (vs. WT)	1,00	31,00	30,18	36,42
SEM (vs. WT)	0,14	9,53	8,35	12,64
MW (vs. GDF-15 <sup>+/+</sup> /ApoE <sup>-/-</sup> )			1,00	1,21
t-Test vs. WT		P = 0,016	P = 0,029	P = 0,075
t-Test vs. GDF-15 <sup>+/+</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>				P = 0,750
<b>20 Wochen CHF</b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>
MW	19,69	9,50	20,89	5,05
MW (vs. WT)	1,00	0,48	1,06	0,26
SEM (vs. WT)	0,12	0,27	0,73	0,19
MW (vs. GDF-15 <sup>+/+</sup> /ApoE <sup>-/-</sup> )			1,00	0,24
t-Test vs. WT		P = 0,286	P = 0,151	P = 0,056
t-Test vs. GDF-15 <sup>+/+</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>				P = 0,222
<b>12 vs. 20 Wochen CHF</b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>
12 Wochen CHF	1,00	1,00	1,00	1,00
20 Wochen CHF	106,10	1,65	3,73	0,75
t-Test 12 vs. 20 Wochen	P = 0,016	P = 0,540	P = 1,000	P = 0,329

Tab. 36: Quantitative Real-Time RT-PCR (qRT-PCR) der F-box protein 32 (Fbxo32)-Genexpression im M. gastrocnemius nach 12 bzw. 20 Wochen CHF. Absolute und relative Expression (x-fache Veränderung im Vergleich zum Wildtyp (GDF15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>), GDF15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> und 12 Wochen CHF. Mittelwert (MW), Standardfehler des Mittelwerts (SEM), t-Test vs. Wildtyp (WT), vs. GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> und 12 vs. 20 Wochen CHF.

12 Wochen CHF	GDF-15 <sup>+/+</sup> ApoE <sup>+/+</sup>	GDF-15 <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>+/+</sup>	GDF-15 <sup>+/+</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>	GDF-15 <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>
MW	0,28	6,32	3,90	2,94
MW (vs. WT)	1,00	22,68	13,99	10,54
SEM (vs. WT)	0,12	5,79	8,36	2,82
MW (vs. GDF-15 <sup>+/+</sup> /ApoE <sup>-/-</sup> )			1,00	0,75
t-Test vs. WT		P = 0,016	P = 0,029	P = 0,019
t-Test vs. GDF-15 <sup>+/+</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>				P = 1,000
<b>20 Wochen CHF</b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>
MW	15,44	2,77	4,29	0,65
MW (vs. WT)	1,00	0,18	0,28	0,04
SEM (vs. WT)	0,33	0,02	0,13	0,01
MW (vs. GDF-15 <sup>+/+</sup> /ApoE <sup>-/-</sup> )			1,00	0,15
t-Test vs. WT		P = 0,111	P = 0,106	P = 0,008
t-Test vs. GDF-15 <sup>+/+</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>				P = 0,222
<b>12 vs. 20 Wochen CHF</b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>
12 Wochen CHF	1,00	1,00	1,00	1,00
20 Wochen CHF	55,42	0,44	1,10	0,22
t-Test 12 vs. 20 Wochen	P = 0,016	P = 0,190	P = 1,000	P = 0,044

Tab. 37: Quantitative Real-Time RT-PCR (qRT-PCR) der Cholinergic receptor, nicotinic, alpha polypeptide 1 (muscle) (Chrna1)-Genexpression im M. gastrocnemius nach 12 bzw. 20 Wochen CHF. Absolute Expression und relative Expression (x-fache Veränderung im Vergleich zum Wildtyp (GDF15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>)), GDF15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> und 12 Wochen CHF. Mittelwert (MW), Standardfehler des Mittelwerts (SEM), t-Test vs. Wildtyp (WT), vs. GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> und 12 vs. 20 Wochen CHF.

12 Wochen CHF	GDF-15 <sup>+/+</sup> ApoE <sup>+/+</sup>	GDF-15 <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>+/+</sup>	GDF-15 <sup>+/+</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>	GDF-15 <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>
MW	1,90	1,58	1,60	2,27
MW (vs. WT)	1,00	0,83	0,84	1,20
SEM (vs. WT)	0,20	0,25	0,18	0,18
MW (vs. GDF-15 <sup>+/+</sup> /ApoE <sup>-/-</sup> )			1,00	1,42
t-Test vs. WT		P = 0,666	P = 0,626	P = 0,532
t-Test vs. GDF-15 <sup>+/+</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>				P = 0,259
20 Wochen CHF	GDF-15 <sup>+/+</sup> ApoE <sup>+/+</sup>	GDF-15 <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>+/+</sup>	GDF-15 <sup>+/+</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>	GDF-15 <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>
MW	1,80	1,91	2,27	3,74
MW (vs. WT)	1,00	1,06	1,26	2,08
SEM (vs. WT)	0,25	0,36	0,35	0,17
MW (vs. GDF-15 <sup>+/+</sup> /ApoE <sup>-/-</sup> )			1,00	1,65
t-Test vs. WT		P = 0,905	P = 0,600	P = 0,013
t-Test vs. GDF-15 <sup>+/+</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>				P = 0,094
12 vs. 20 Wochen CHF	GDF-15 <sup>+/+</sup> ApoE <sup>+/+</sup>	GDF-15 <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>+/+</sup>	GDF-15 <sup>+/+</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>	GDF-15 <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>
12 Wochen CHF	1,00	1,00	1,00	1,00
20 Wochen CHF	0,95	1,21	1,42	1,64
t-Test 12 vs. 20 Wochen	P = 0,885	P = 0,556	P = 0,465	P = 0,018

### 8.2.3 Proteome Profiler™ Antibody Array

Tab. 38: Proteome Profiler™ Antibody Array Kit (Mouse Cytokine Array) des M. gastrocnemius nach 12 bzw. 20 Wochen CHF. Absolute und relative Pixeldichte (x-fache Veränderung im Vergleich zum Wildtyp (GDF15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/+</sup>)), GDF15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> und 12 Wochen CHF. Mittelwert (MW), Wildtyp (WT), cholesterinreiche Fütterung (CHF).

Zytokin	Tiergruppe			
<b>IL-1α</b>				
12 Wochen CHF	GDF-15 <sup>+/+</sup> ApoE <sup>+/+</sup>	GDF-15 <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>+/+</sup>	GDF-15 <sup>+/+</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>	GDF-15 <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>
MW	45310	57961	46348,5	45692,5
MW (vs. WT)	1,00	1,28	1,02	1,01
MW (vs. GDF-15 <sup>+/+</sup> /ApoE <sup>-/-</sup> )			1,00	0,99
20 Wochen CHF	GDF-15 <sup>+/+</sup> ApoE <sup>+/+</sup>	GDF-15 <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>+/+</sup>	GDF-15 <sup>+/+</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>	GDF-15 <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>
MW	60656	124354,5	355993	81391
MW (vs. WT)	1,00	2,05	5,87	1,34
MW (vs. GDF-15 <sup>+/+</sup> /ApoE <sup>-/-</sup> )			1,00	0,23
12 vs. 20 Wochen CHF	GDF-15 <sup>+/+</sup> ApoE <sup>+/+</sup>	GDF-15 <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>+/+</sup>	GDF-15 <sup>+/+</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>	GDF-15 <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>
12 Wochen CHF	1,00	1,00	1,00	1,00
20 Wochen CHF	1,34	2,15	7,68	1,78
<b>IL-1β</b>				
12 Wochen CHF	GDF-15 <sup>+/+</sup> ApoE <sup>+/+</sup>	GDF-15 <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>+/+</sup>	GDF-15 <sup>+/+</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>	GDF-15 <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>
MW	22413,5	24393,5	22914	16892
MW (vs. WT)	1,00	1,09	1,02	0,75
MW (vs. GDF-15 <sup>+/+</sup> /ApoE <sup>-/-</sup> )			1,00	0,74
20 Wochen CHF	GDF-15 <sup>+/+</sup> ApoE <sup>+/+</sup>	GDF-15 <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>+/+</sup>	GDF-15 <sup>+/+</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>	GDF-15 <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>

MW	19525	32408	157158	26182
MW (vs. WT)	1,00	1,66	8,05	1,34
MW (vs. GDF-15 <sup>+/+</sup> /ApoE <sup>-/-</sup> )			1,00	0,17
<b>12 vs. 20 Wochen CHF</b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup> ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>
12 Wochen CHF	1,00	1,00	1,00	1,00
20 Wochen CHF	0,87	1,33	6,86	1,55
<b>IL-6</b>				
<b>12 Wochen CHF</b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup> ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>
MW	14645,5	16930	17315	14888,5
MW (vs. WT)	1,00	1,16	1,18	1,02
MW (vs. GDF-15 <sup>+/+</sup> /ApoE <sup>-/-</sup> )			1,00	0,86
<b>20 Wochen CHF</b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup> ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>
MW	18638	36191	68513	29977,5
MW (vs. WT)	1,00	1,94	3,68	1,61
MW (vs. GDF-15 <sup>+/+</sup> /ApoE <sup>-/-</sup> )			1,00	0,44
<b>12 vs. 20 Wochen CHF</b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup> ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>
12 Wochen CHF	1,00	1,00	1,00	1,00
20 Wochen CHF	1,27	2,14	3,96	2,01
<b>IL-17</b>				
<b>12 Wochen CHF</b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup> ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>
MW	25941	31009	25391,5	20260
MW (vs. WT)	1,00	1,20	0,98	0,78
MW (vs. GDF-15 <sup>+/+</sup> /ApoE <sup>-/-</sup> )			1,00	0,80
<b>20 Wochen CHF</b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup> ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>
MW	27625,5	46627	231809	34284
MW (vs. WT)	1,00	1,69	8,39	1,24
MW (vs. GDF-15 <sup>+/+</sup> /ApoE <sup>-/-</sup> )			1,00	0,15
<b>12 vs. 20 Wochen CHF</b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup> ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>
12 Wochen CHF	1,00	1,00	1,00	1,00
20 Wochen CHF	1,06	1,50	9,13	1,69
<b>IFN-γ</b>				
<b>12 Wochen CHF</b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup> ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>
MW	36931	41197,5	36525	32429,5
MW (vs. WT)	1,00	1,12	0,99	0,88
MW (vs. GDF-15 <sup>+/+</sup> /ApoE <sup>-/-</sup> )			1,00	0,89
<b>20 Wochen CHF</b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup> ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>
MW	108213	190789	506384	167753
MW (vs. WT)	1,00	1,76	4,68	1,55
MW (vs. GDF-15 <sup>+/+</sup> /ApoE <sup>-/-</sup> )			1,00	0,33
<b>12 vs. 20 Wochen CHF</b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup> ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>
12 Wochen CHF	1,00	1,00	1,00	1,00
20 Wochen CHF	2,93	4,63	13,86	5,17
<b>TNF-α</b>				
<b>12 Wochen CHF</b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup> ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>
MW	57842	41946	43928,5	32173,5
MW (vs. WT)	1,00	0,73	0,76	0,56
MW (vs. GDF-15 <sup>+/+</sup> /ApoE <sup>-/-</sup> )			1,00	0,73
<b>20 Wochen CHF</b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup> ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>
MW	115520	174895,5	407373,5	136152,5
MW (vs. WT)	1,00	1,51	3,53	1,18
MW (vs. GDF-15 <sup>+/+</sup> /ApoE <sup>-/-</sup> )			1,00	0,33
<b>12 vs. 20 Wochen CHF</b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup> ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>
12 Wochen CHF	1,00	1,00	1,00	1,00
20 Wochen CHF	2,00	4,17	9,27	4,23
<b>IL-2</b>				
<b>12 Wochen CHF</b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup> ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>
MW	48332	85692,5	43534,5	34818,5
MW (vs. WT)	1,00	1,77	0,90	0,72
MW (vs. GDF-15 <sup>+/+</sup> /ApoE <sup>-/-</sup> )			1,00	0,80

<b>20 Wochen CHF</b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>
MW	20826	48786,5	66498	31180,5
MW (vs. WT)	1,00	2,34	3,19	1,50
MW (vs. GDF-15 <sup>+/+</sup> /ApoE <sup>-/-</sup> )			1,00	0,47
<b>12 vs. 20 Wochen CHF</b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>
12 Wochen CHF	1,00	1,00	1,00	1,00
20 Wochen CHF	0,43	0,57	1,53	0,90
<b>IL-5</b>				
<b>12 Wochen CHF</b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>
MW	17047	11116	17072,5	11355,5
MW (vs. WT)	1,00	0,65	1,00	0,67
MW (vs. GDF-15 <sup>+/+</sup> /ApoE <sup>-/-</sup> )			1,00	0,67
<b>20 Wochen CHF</b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>
MW	18746,5	30285	55398	28969,5
MW (vs. WT)	1,00	1,62	2,96	1,55
MW (vs. GDF-15 <sup>+/+</sup> /ApoE <sup>-/-</sup> )			1,00	0,52
<b>12 vs. 20 Wochen CHF</b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>
12 Wochen CHF	1,00	1,00	1,00	1,00
20 Wochen CHF	1,10	2,72	3,24	2,55
<b>IL-7</b>				
<b>12 Wochen CHF</b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>
MW	25847	31693,5	27982,5	27523
MW (vs. WT)	1,00	1,23	1,08	1,06
MW (vs. GDF-15 <sup>+/+</sup> /ApoE <sup>-/-</sup> )			1,00	0,98
<b>20 Wochen CHF</b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>
MW	30569	95792,5	197210,5	86980
MW (vs. WT)	1,00	3,13	6,45	2,85
MW (vs. GDF-15 <sup>+/+</sup> /ApoE <sup>-/-</sup> )			1,00	0,44
<b>12 vs. 20 Wochen CHF</b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>
12 Wochen CHF	1,00	1,00	1,00	1,00
20 Wochen CHF	1,18	3,02	7,05	3,16
<b>IL-12p70</b>				
<b>12 Wochen CHF</b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>
MW	20408,5	18871,5	19030	16173,5
MW (vs. WT)	1,00	0,92	0,93	0,79
MW (vs. GDF-15 <sup>+/+</sup> /ApoE <sup>-/-</sup> )			1,00	0,85
<b>20 Wochen CHF</b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>
MW	17734	31881,5	61101,5	26132,5
MW (vs. WT)	1,00	1,80	3,45	1,47
MW (vs. GDF-15 <sup>+/+</sup> /ApoE <sup>-/-</sup> )			1,00	0,43
<b>12 vs. 20 Wochen CHF</b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>
12 Wochen CHF	1,00	1,00	1,00	1,00
20 Wochen CHF	0,87	1,69	3,21	1,62
<b>IL-13</b>				
<b>12 Wochen CHF</b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>
MW	21505,5	23931	23767,5	21601,5
MW (vs. WT)	1,00	1,11	1,11	1,00
MW (vs. GDF-15 <sup>+/+</sup> /ApoE <sup>-/-</sup> )			1,00	0,91
<b>20 Wochen CHF</b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>
MW	26790,5	44218	100248,5	61406
MW (vs. WT)	1,00	1,65	3,74	2,29
MW (vs. GDF-15 <sup>+/+</sup> /ApoE <sup>-/-</sup> )			1,00	0,61
<b>12 vs. 20 Wochen CHF</b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>
12 Wochen CHF	1,00	1,00	1,00	1,00
20 Wochen CHF	1,25	1,85	4,22	2,84
<b>IL-16</b>				
<b>12 Wochen CHF</b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>
MW	36999	53388,5	37119	32697,5
MW (vs. WT)	1,00	1,44	1,00	0,88

MW (vs. GDF-15 <sup>+/+</sup> /ApoE <sup>-/-</sup> )			1,00	0,88
<b>20 Wochen CHF</b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>
MW	20555	30286,5	110364,5	25209
MW (vs. WT)	1,00	1,47	5,37	1,23
MW (vs. GDF-15 <sup>+/+</sup> /ApoE <sup>-/-</sup> )			1,00	0,23
<b>12 vs. 20 Wochen CHF</b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>
12 Wochen CHF	1,00	1,00	1,00	1,00
20 Wochen CHF	0,56	0,57	2,97	0,77
<b>IL-23</b>				
<b>12 Wochen CHF</b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>
MW	36250	42731,5	33655	23995
MW (vs. WT)	1,00	1,18	0,93	0,66
MW (vs. GDF-15 <sup>+/+</sup> /ApoE <sup>-/-</sup> )			1,00	0,71
<b>20 Wochen CHF</b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>
MW	31238	53854,5	130537	42022
MW (vs. WT)	1,00	1,72	4,18	1,35
MW (vs. GDF-15 <sup>+/+</sup> /ApoE <sup>-/-</sup> )			1,00	0,32
<b>12 vs. 20 Wochen CHF</b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>
12 Wochen CHF	1,00	1,00	1,00	1,00
20 Wochen CHF	0,86	1,26	3,88	1,75
<b>IL-27</b>				
<b>12 Wochen CHF</b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>
MW	29450	37937,5	27333,5	22573,5
MW (vs. WT)	1,00	1,29	0,93	0,77
MW (vs. GDF-15 <sup>+/+</sup> /ApoE <sup>-/-</sup> )			1,00	0,83
<b>20 Wochen CHF</b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>
MW	25749,5	44652,5	138004,5	38658,5
MW (vs. WT)	1,00	1,73	5,36	1,50
MW (vs. GDF-15 <sup>+/+</sup> /ApoE <sup>-/-</sup> )			1,00	0,28
<b>12 vs. 20 Wochen CHF</b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>
12 Wochen CHF	1,00	1,00	1,00	1,00
20 Wochen CHF	0,87	1,18	5,05	1,71
<b>IL-1ra</b>				
<b>12 Wochen CHF</b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>
MW	28318,5	32042,5	30476	22302,5
MW (vs. WT)	1,00	1,13	1,08	0,79
MW (vs. GDF-15 <sup>+/+</sup> /ApoE <sup>-/-</sup> )			1,00	0,73
<b>20 Wochen CHF</b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>
MW	17400,5	31520	82477,5	28410
MW (vs. WT)	1,00	1,81	4,74	1,63
MW (vs. GDF-15 <sup>+/+</sup> /ApoE <sup>-/-</sup> )			1,00	0,34
<b>12 vs. 20 Wochen CHF</b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>
12 Wochen CHF	1,00	1,00	1,00	1,00
20 Wochen CHF	0,61	0,98	2,71	1,27
<b>IL-4</b>				
<b>12 Wochen CHF</b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>
MW	29108	32447,5	26197,5	16229
MW (vs. WT)	1,00	1,11	0,90	0,56
MW (vs. GDF-15 <sup>+/+</sup> /ApoE <sup>-/-</sup> )			1,00	0,62
<b>20 Wochen CHF</b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>
MW	42689	50635,5	209069,5	41114,5
MW (vs. WT)	1,00	1,19	4,90	0,96
MW (vs. GDF-15 <sup>+/+</sup> /ApoE <sup>-/-</sup> )			1,00	0,20
<b>12 vs. 20 Wochen CHF</b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>
12 Wochen CHF	1,00	1,00	1,00	1,00
20 Wochen CHF	1,47	1,56	7,98	2,53
<b>IL-10</b>				
<b>12 Wochen CHF</b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>
MW	19896	21807,5	19243	19263,5

MW (vs. WT)	1,00	1,10	0,97	0,97
MW (vs. GDF-15 <sup>+/+</sup> /ApoE <sup>-/-</sup> )			1,00	1,00
<b>20 Wochen CHF</b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>
MW	18629,5	46499	82942	37459,5
MW (vs. WT)	1,00	2,50	4,45	2,01
MW (vs. GDF-15 <sup>+/+</sup> /ApoE <sup>-/-</sup> )			1,00	0,45
<b>12 vs. 20 Wochen CHF</b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>
12 Wochen CHF	1,00	1,00	1,00	1,00
20 Wochen CHF	0,94	2,13	4,31	1,94
<b>IL-3</b>				
<b>12 Wochen CHF</b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>
MW	25819	29859	27313,5	13351
MW (vs. WT)	1,00	1,16	1,06	0,52
MW (vs. GDF-15 <sup>+/+</sup> /ApoE <sup>-/-</sup> )			1,00	0,49
<b>20 Wochen CHF</b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>
MW	32070,5	36403	97434,5	27841,5
MW (vs. WT)	1,00	1,14	3,04	0,87
MW (vs. GDF-15 <sup>+/+</sup> /ApoE <sup>-/-</sup> )			1,00	0,29
<b>12 vs. 20 Wochen CHF</b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>
12 Wochen CHF	1,00	1,00	1,00	1,00
20 Wochen CHF	1,24	1,22	3,57	2,09
<b>G-CSF</b>				
<b>12 Wochen CHF</b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>
MW	20797,5	20842,5	22473	18228
MW (vs. WT)	1,00	1,00	1,08	0,88
MW (vs. GDF-15 <sup>+/+</sup> /ApoE <sup>-/-</sup> )			1,00	0,81
<b>20 Wochen CHF</b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>
MW	32556	54165,5	110394,5	50652,5
MW (vs. WT)	1,00	1,66	3,39	1,56
MW (vs. GDF-15 <sup>+/+</sup> /ApoE <sup>-/-</sup> )			1,00	0,46
<b>12 vs. 20 Wochen CHF</b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>
12 Wochen CHF	1,00	1,00	1,00	1,00
20 Wochen CHF	1,57	2,60	4,91	2,78
<b>GM-CSF</b>				
<b>12 Wochen CHF</b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>
MW	58856,5	56656,5	59027,5	60917
MW (vs. WT)	1,00	0,96	1,00	1,04
MW (vs. GDF-15 <sup>+/+</sup> /ApoE <sup>-/-</sup> )			1,00	1,03
<b>20 Wochen CHF</b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>
MW	90252	154535	318312,5	133712
MW (vs. WT)	1,00	1,71	3,53	1,48
MW (vs. GDF-15 <sup>+/+</sup> /ApoE <sup>-/-</sup> )			1,00	0,42
<b>12 vs. 20 Wochen CHF</b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>
12 Wochen CHF	1,00	1,00	1,00	1,00
20 Wochen CHF	1,53	2,73	5,39	2,19
<b>M-CSF</b>				
<b>12 Wochen CHF</b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>
MW	18919,5	20588,5	22793,5	23263,5
MW (vs. WT)	1,00	1,09	1,20	1,23
MW (vs. GDF-15 <sup>+/+</sup> /ApoE <sup>-/-</sup> )			1,00	1,02
<b>20 Wochen CHF</b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>
MW	30821	53900,5	102753	56823,5
MW (vs. WT)	1,00	1,75	3,33	1,84
MW (vs. GDF-15 <sup>+/+</sup> /ApoE <sup>-/-</sup> )			1,00	0,55
<b>12 vs. 20 Wochen CHF</b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>
12 Wochen CHF	1,00	1,00	1,00	1,00
20 Wochen CHF	1,63	2,62	4,51	2,44
<b>CCL1</b>				
<b>12 Wochen CHF</b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>



MW	28105	45915	37886	31559,5
MW (vs. WT)	1,00	1,63	1,35	1,12
MW (vs. GDF-15 <sup>+/+</sup> /ApoE <sup>-/-</sup> )			1,00	0,83
<b>20 Wochen CHF</b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup> ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>
MW	19358	52863,5	110437,5	50138
MW (vs. WT)	1,00	2,73	5,71	2,59
MW (vs. GDF-15 <sup>+/+</sup> /ApoE <sup>-/-</sup> )			1,00	0,45
<b>12 vs. 20 Wochen CHF</b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup> ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>
12 Wochen CHF	1,00	1,00	1,00	1,00
20 Wochen CHF	0,69	1,15	2,91	1,59
<b>CCL2</b>				
<b>12 Wochen CHF</b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup> ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>
MW	27872	32307	39882,5	37641,5
MW (vs. WT)	1,00	1,16	1,43	1,35
MW (vs. GDF-15 <sup>+/+</sup> /ApoE <sup>-/-</sup> )			1,00	0,94
<b>20 Wochen CHF</b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup> ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>
MW	24969	64547,5	114645	62996
MW (vs. WT)	1,00	2,59	4,59	2,52
MW (vs. GDF-15 <sup>+/+</sup> /ApoE <sup>-/-</sup> )			1,00	0,55
<b>12 vs. 20 Wochen CHF</b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup> ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>
12 Wochen CHF	1,00	1,00	1,00	1,00
20 Wochen CHF	0,90	2,00	2,87	1,67
<b>CCL3</b>				
<b>12 Wochen CHF</b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup> ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>
MW	21800,5	20374,5	19421,5	17196
MW (vs. WT)	1,00	0,93	0,89	0,79
MW (vs. GDF-15 <sup>+/+</sup> /ApoE <sup>-/-</sup> )			1,00	0,89
<b>20 Wochen CHF</b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup> ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>
MW	21085,5	34705	68213,5	28497,5
MW (vs. WT)	1,00	1,65	3,24	1,35
MW (vs. GDF-15 <sup>+/+</sup> /ApoE <sup>-/-</sup> )			1,00	0,42
<b>12 vs. 20 Wochen CHF</b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup> ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>
12 Wochen CHF	1,00	1,00	1,00	1,00
20 Wochen CHF	0,97	1,70	3,51	1,66
<b>CCL4</b>				
<b>12 Wochen CHF</b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup> ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>
MW	25103	23262	23975,5	23259,5
MW (vs. WT)	1,00	0,93	0,96	0,93
MW (vs. GDF-15 <sup>+/+</sup> /ApoE <sup>-/-</sup> )			1,00	0,97
<b>20 Wochen CHF</b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup> ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>
MW	20081,5	31622,5	91802,5	25236
MW (vs. WT)	1,00	1,57	4,57	1,26
MW (vs. GDF-15 <sup>+/+</sup> /ApoE <sup>-/-</sup> )			1,00	0,27
<b>12 vs. 20 Wochen CHF</b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup> ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>
12 Wochen CHF	1,00	1,00	1,00	1,00
20 Wochen CHF	0,80	1,36	3,83	1,08
<b>CCL5</b>				
<b>12 Wochen CHF</b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup> ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>
MW	23786	23642	19392	15807
MW (vs. WT)	1,00	0,99	0,82	0,66
MW (vs. GDF-15 <sup>+/+</sup> /ApoE <sup>-/-</sup> )			1,00	0,82
<b>20 Wochen CHF</b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup> ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>
MW	19104,5	27026	60648	25678,5
MW (vs. WT)	1,00	1,41	3,17	1,34
MW (vs. GDF-15 <sup>+/+</sup> /ApoE <sup>-/-</sup> )			1,00	0,42
<b>12 vs. 20 Wochen CHF</b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup> ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>
12 Wochen CHF	1,00	1,00	1,00	1,00
20 Wochen CHF	0,80	1,14	3,13	1,62
<b>CCL11</b>				

<b>12 Wochen CHF</b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>
MW	17723,5	19864,5	17988,5	18169,5
MW (vs. WT)	1,00	1,12	1,01	1,03
MW (vs. GDF-15 <sup>+/+</sup> /ApoE <sup>-/-</sup> )			1,00	1,01
<b>20 Wochen CHF</b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>
MW	20083	47848	88443	45230,5
MW (vs. WT)	1,00	2,38	4,40	2,25
MW (vs. GDF-15 <sup>+/+</sup> /ApoE <sup>-/-</sup> )			1,00	0,51
<b>12 vs. 20 Wochen CHF</b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>
12 Wochen CHF	1,00	1,00	1,00	1,00
20 Wochen CHF	1,13	2,41	4,92	2,49
<b>CCL12</b>				
<b>12 Wochen CHF</b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>
MW	37828	42057	37359,5	31807,5
MW (vs. WT)	1,00	1,11	0,99	0,84
MW (vs. GDF-15 <sup>+/+</sup> /ApoE <sup>-/-</sup> )			1,00	0,85
<b>20 Wochen CHF</b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>
MW	24686,5	61760	107989,5	46081,5
MW (vs. WT)	1,00	2,50	4,37	1,87
MW (vs. GDF-15 <sup>+/+</sup> /ApoE <sup>-/-</sup> )			1,00	0,43
<b>12 vs. 20 Wochen CHF</b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>
12 Wochen CHF	1,00	1,00	1,00	1,00
20 Wochen CHF	0,65	1,47	2,89	1,59
<b>CXCL1</b>				
<b>12 Wochen CHF</b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>
MW	39863	39070	35555,5	33985,5
MW (vs. WT)	1,00	0,98	0,89	0,85
MW (vs. GDF-15 <sup>+/+</sup> /ApoE <sup>-/-</sup> )			1,00	0,96
<b>20 Wochen CHF</b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>
MW	104315	204542,5	461701,5	174531
MW (vs. WT)	1,00	1,96	4,43	1,67
MW (vs. GDF-15 <sup>+/+</sup> /ApoE <sup>-/-</sup> )			1,00	0,38
<b>12 vs. 20 Wochen CHF</b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>
12 Wochen CHF	1,00	1,00	1,00	1,00
20 Wochen CHF	2,62	5,24	12,99	5,14
<b>CXCL2</b>				
<b>12 Wochen CHF</b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>
MW	21532,5	20362,5	18324,5	15650,5
MW (vs. WT)	1,00	0,95	0,85	0,73
MW (vs. GDF-15 <sup>+/+</sup> /ApoE <sup>-/-</sup> )			1,00	0,85
<b>20 Wochen CHF</b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>
MW	18546,5	26465	69120,5	22317
MW (vs. WT)	1,00	1,43	3,73	1,20
MW (vs. GDF-15 <sup>+/+</sup> /ApoE <sup>-/-</sup> )			1,00	0,32
<b>12 vs. 20 Wochen CHF</b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>
12 Wochen CHF	1,00	1,00	1,00	1,00
20 Wochen CHF	0,86	1,30	3,77	1,43
<b>CXCL9</b>				
<b>12 Wochen CHF</b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>
MW	22247,5	22314	20801,5	20006
MW (vs. WT)	1,00	1,00	0,94	0,90
MW (vs. GDF-15 <sup>+/+</sup> /ApoE <sup>-/-</sup> )			1,00	0,96
<b>20 Wochen CHF</b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>
MW	37376,5	64301,5	143717	46333
MW (vs. WT)	1,00	1,72	3,85	1,24
MW (vs. GDF-15 <sup>+/+</sup> /ApoE <sup>-/-</sup> )			1,00	0,32
<b>12 vs. 20 Wochen CHF</b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>
12 Wochen CHF	1,00	1,00	1,00	1,00
20 Wochen CHF	1,68	2,88	6,91	2,32

**CXCL10**

**12 Wochen CHF**

MW

MW (vs. WT)

MW (vs. GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>)

**20 Wochen CHF**

MW

MW (vs. WT)

MW (vs. GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>)

**12 vs. 20 Wochen CHF**

12 Wochen CHF

20 Wochen CHF

**C5/C5a**

**12 Wochen CHF**

MW

MW (vs. WT)

MW (vs. GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>)

**20 Wochen CHF**

MW

MW (vs. WT)

MW (vs. GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>)

**12 vs. 20 Wochen CHF**

12 Wochen CHF

20 Wochen CHF

**TIMP-1**

**12 Wochen CHF**

MW

MW (vs. WT)

MW (vs. GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>)

**20 Wochen CHF**

MW

MW (vs. WT)

MW (vs. GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>)

**12 vs. 20 Wochen CHF**

12 Wochen CHF

20 Wochen CHF

**TREM-1**

**12 Wochen CHF**

MW

MW (vs. WT)

MW (vs. GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>)

**20 Wochen CHF**

MW

MW (vs. WT)

MW (vs. GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>)

**12 vs. 20 Wochen CHF**

12 Wochen CHF

20 Wochen CHF

	<b>GDF-15<sup>+/+</sup> ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>
26693	26597,5	25824	13287,5	
1,00	1,00	0,97	0,50	
		1,00	0,51	
<b>GDF-15<sup>+/+</sup> ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>	
36998	41697	138308,5	40065,5	
1,00	1,13	3,74	1,08	
		1,00	0,29	
<b>GDF-15<sup>+/+</sup> ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>	
1,00	1,00	1,00	1,00	
1,39	1,57	5,36	3,02	
<b>GDF-15<sup>+/+</sup> ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>	
33157,5	37742,5	38043,5	15312,5	
1,00	1,14	1,15	0,46	
		1,00	0,40	
<b>GDF-15<sup>+/+</sup> ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>	
82166	125909,5	342694,5	92632,5	
1,00	1,53	4,17	1,13	
		1,00	0,27	
<b>GDF-15<sup>+/+</sup> ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>	
1,00	1,00	1,00	1,00	
2,48	3,34	9,01	6,05	
<b>GDF-15<sup>+/+</sup> ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>	
69121,5	43978,5	41168,5	31520	
1,00	0,64	0,60	0,46	
		1,00	0,77	
<b>GDF-15<sup>+/+</sup> ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>	
147098,5	153481,5	546210	149210,5	
1,00	1,04	3,71	1,01	
		1,00	0,27	
<b>GDF-15<sup>+/+</sup> ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>	
1,00	1,00	1,00	1,00	
2,13	3,49	13,27	4,73	
<b>GDF-15<sup>+/+</sup> ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>	
15498	16823,5	18122	14755	
1,00	1,09	1,17	0,95	
		1,00	0,81	
<b>GDF-15<sup>+/+</sup> ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>	
24084	32790,5	71201	33327	
1,00	1,36	2,96	1,38	
		1,00	0,47	
<b>GDF-15<sup>+/+</sup> ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>+/+</sup></b>	<b>GDF-15<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>	<b>GDF-15<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></b>	
1,00	1,00	1,00	1,00	
1,55	1,95	3,93	2,26	

## 9 POSTERPRÄSENTATIONEN UND ABSTRACTS

04/2016 Posterpräsentation auf der Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Arterioskleroseforschung e.V. (DGAF), Rauschholzhausen, 07.04.-09.04.2016.

Thema: „Effekt des Wachstums-Differenzierungs-Faktors-15 (GDF-15) auf die Gen- und Proteinexpression des M. gastrocnemius bei hypercholesterinämischen ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen nach Verabreichen eines cholesterinreichen Futters für 12 bzw. 20 Wochen“.

Abstract: Wagner, M., Bonaterra, G.A., Schwarzbach, H., Zügel, S., Strelau, J., and Kinscherf, R. (2016). Effect of Growth differentiation factor-15 (GDF-15) on the gene and protein expression in gastrocnemius muscle of hypercholesterolemic ApoE<sup>-/-</sup> mice after 12 or 20 weeks cholesterol-enriched diet. *Perfusion* 29, 114.

03/2014 Posterpräsentation auf der Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Arterioskleroseforschung e.V. (DGAF), Rauschholzhausen, 13.03.-15.03.2014.

Thema: „Einfluss des Wachstums-Differenzierungs-Faktors-15 (GDF-15) auf die Gen- und Proteinexpression des M. gastrocnemius bei hypercholesterinämischen ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen“.

Abstract: Wagner, M., Bonaterra, G.A., Schwarzbach, H., Zügel, S., Strelau, J., and Kinscherf, R. (2014). Influence of Growth differentiation factor-15 (GDF-15) on the gene and protein expression in gastrocnemius muscle of hypercholesterolemic ApoE<sup>-/-</sup> mice. *Perfusion* 27, 33.

## 10 VERZEICHNIS DER AKADEMISCHEN LEHRER

Meine akademischen Lehrerinnen und Lehrer an der Philipps-Universität Marburg waren in alphabetischer Reihenfolge die Damen und Herren Dres.

Adamkiewicz, Bartsch, Bauer, Baum, Baumann, Becker A., Becker K., Becker S., Bein, Bette, Bien, Braun, Brehm, Bücking, Cetin, Czubayko, Daut, del Rey, Dettmeyer, Dodel, Donner-Banzhoff, Engenhardt-Cabillic, Fendrich, Feuser, Frink, Fuchs-Winkelmann, Görg, C., Gress, Grosse, Grundmann, Häußermann, Hegele, Hertl, Hildebrandt, Hofmann, Hoyer, Höffken, Hundt, Jerrentrup L., Kann, Kinscherf, Kircher, Klose, Knöppel, Koolman, Kortus-Götze, Köhler U., Köhler S., Krieg, Kubo, Kühnert, Lill, Lohoff, Mahnken, Maier, Maisner, Mirow, Moll, Moosdorf, Mueller, Müller, Mutters, Neubauer, Nimsky, Oertel, Oliver, Pagenstecher, Pantazis, Pape-Meyer, Plant, Preisig-Müller, Renz, Richter, Rothmund, Ruchholtz, Sahmland, Schäfer, Schieffer, Schierl, Schratt, Schütz, Seitz, Sekundo, Sevinc, Skrobek, Sommer, Steiniger, Thieme, Timmesfeld, Vogelmeier, Vogt, Wagner, Walthers, Weihe, Westermann, Werner, Wilhelm B., Wilhelm C., Wißniowski, Wrocklage, Wulf, Zemlin.

## 11 DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. Ralf Kinscherf danke ich für die Überlassung des Themas dieser Arbeit und die ausgezeichneten Möglichkeiten, es zu bearbeiten. Seine engagierte, kompetente Betreuung und die zahlreichen fachlichen Diskussionen mit wertvollen Impulsen haben maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Besonderen Dank schulde ich Herrn Dr. Gabriel Bonaterra, der mich während der Anfertigung dieser Arbeit betreut hat und mir immer motivierend mit Rat und Tat zur Seite stand. Falls es ein Problem gab, hatte er spätestens innerhalb einer Stunde die Lösung gefunden!

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Hans Schwarzbach für seine Unterstützung und Hilfestellung bei der computergestützten Auswertung der Immunassays mit dem Programm ImageJ.

Bei Herrn Prof. Dr. Eberhard Weihe bedanke ich mich für seine Unterstützung, die vielen wertvollen Anregungen und die lehrreiche Zeit in seiner Arbeitsgruppe.

Ein herzlicher Dank gilt ebenfalls allen Mitarbeitern der AG Kinscherf und Weihe, insbesondere Herrn Prof. Dr. Hildebrandt, Frau Prof. Dr. Wilhelm, Frau Dr. Schwarz, Herrn Dr. Schäfer, Herrn Prof. Dr. Schütz, Herrn PD Dr. Bette und Frau Dr. Bertoune.

Für die technische Assistenz und Hilfsbereitschaft möchte ich mich bei Frau Claudia Keppler und Frau Elke Völck-Badouin bedanken.

Der größte Dank gebührt meinen Eltern. Ihr habt mich mit eurer Anteilnahme und Hilfsbereitschaft darin bestärkt, meinen Weg zu gehen. Danken möchte ich auch meiner Freundin, die mich während der Anfertigung der Arbeit immer unterstützt hat. Es ist schön, dich an meiner Seite zu wissen. Für die Unterstützung und Hilfe bei allen auftretenden Computerproblemen bedanke ich mich bei meinem Freund David Schneider.