

Justus-Liebig-Universität Gießen

Fachbereich Medizin

Zentrum für Kinderheilkunde und Jugendmedizin

Kinderherzzentrum

Abteilung Kinderkardiologie und angeborene Herzfehler

Direktor: Prof. Dr. Christian Jux

Wachstumsregulation des prä- und postnatalen Herzens:  
Implikationen für Frühgeborene, „Developmental Programming“  
und myokardiale Regeneration

Habilitationsschrift

zur Erlangung der Lehrbefähigung für das Fach

„Experimentelle Kinderkardiologie“

im Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Dr. med. Jörg-Detlef Drenckhahn

Gießen, 2020

## **Bibliographische Beschreibung**

Drenckhahn, Jörg-Detlef

Wachstumsregulation des prä- und postnatalen Herzens: Implikationen für Frühgeborene, „Developmental Programming“ und myokardiale Regeneration

Habilitationsschrift im Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen, 2020

89 Seiten, 6 Abbildungen, 343 Literaturzitate

## Inhaltsverzeichnis

|           |                                                                                                            |           |
|-----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1.</b> | <b>Einführung .....</b>                                                                                    | <b>1</b>  |
| 1.1.      | Entwicklungsbedingte Erkrankungen des menschlichen Herzens .....                                           | 1         |
| 1.2.      | Embryonale und fetale Entwicklung des Herzens .....                                                        | 2         |
| 1.3.      | Größenwachstum des Herzens.....                                                                            | 5         |
| 1.3.1.    | Zelluläre Zusammensetzung des ventrikulären Myokards.....                                                  | 5         |
| 1.3.2.    | Proliferatives Wachstum des pränatalen Herzens und Determinierung der Kardiomyozytenzahl.....              | 6         |
| 1.3.3.    | Hypertrophes Wachstum des postnatalen Herzens.....                                                         | 7         |
| 1.3.4.    | Abhängigkeit von Kardiomyozytenzahl und –größe im postnatalen Herzen .....                                 | 8         |
| 1.4.      | Folgen einer intrauterinen Wachstumsrestriktion für das Herz .....                                         | 9         |
| 1.4.1.    | Die Barker-Hypothese und „Developmental Programming“ .....                                                 | 9         |
| 1.4.2.    | Ursachen und Folgen einer intrauterinen Wachstumsrestriktion.....                                          | 10        |
| 1.4.3.    | Folgen einer intrauterinen Wachstumsrestriktion für das menschliche Herz.....                              | 11        |
| 1.4.4.    | Tiermodelle einer intrauterinen Wachstumsrestriktion .....                                                 | 12        |
| 1.4.5.    | Auswirkungen einer intrauterinen Wachstumsrestriktion auf das neonatale Herz im Tiermodell .....           | 13        |
| 1.5.      | Fragestellungen der Forschungsarbeiten zu dieser Habilitationsschrift.....                                 | 13        |
| <b>2.</b> | <b>Diskussion .....</b>                                                                                    | <b>16</b> |
| 2.1.      | Regenerationsfähigkeit des prä- und postnatalen Herzens .....                                              | 16        |
| 2.1.1.    | Regeneration des adulten Herzens in verschiedenen Wirbeltieren .....                                       | 16        |
| 2.1.2.    | Regeneration des embryonalen und fetalen Herzens im Säuger.....                                            | 16        |
| 2.1.3.    | Regeneration des neonatalen Herzens im Säuger .....                                                        | 18        |
| 2.1.4.    | Ursachen für den postnatalen Zellzyklus-Arrest von Kardiomyozyten .....                                    | 19        |
| 2.1.5.    | Die Teilungsfähigkeit von Kardiomyozyten determiniert das regenerative Potential des Herzens .....         | 21        |
| 2.1.6.    | Therapeutische Strategien zur Regeneration des menschlichen Herzens.....                                   | 23        |
| 2.2.      | Stresstoleranz und Überleben von embryonalen Kardiomyozyten .....                                          | 24        |
| 2.2.1.    | Das therapeutische Konzept der Kardioprotektion .....                                                      | 24        |
| 2.2.2.    | Stresstoleranz in embryonalen im Vergleich zu adulten Kardiomyozyten.....                                  | 25        |
| 2.2.3.    | Weisen embryonale Kardiomyozyten den Weg zur Kardioprotektion? .....                                       | 27        |
| 2.2.4.    | Die mögliche Rolle <i>Hccs</i> -defizienter Kardiomyozyten bei der embryonalen Herzregeneration .....      | 28        |
| 2.2.5.    | Die mögliche Rolle <i>Hccs</i> -defizienter Kardiomyozyten im postnatalen Herzen ..                        | 29        |
| 2.3.      | Hypoplasie des Herzens bei der Geburt: Ursachen und Folgen für die Herzgesundheit im Erwachsenenalter..... | 29        |
| 2.3.1.    | Ursachen für eine Hypoplasie des Herzens .....                                                             | 29        |
| 2.3.2.    | Folgen einer intrauterinen Wachstumsrestriktion für das Herz im Tiermodell ...                             | 31        |
| 2.3.2.1.  | Mütterliche Proteinrestriktion während der Trächtigkeit .....                                              | 31        |
| 2.3.2.2.  | Mütterliche Kalorienrestriktion während der Trächtigkeit .....                                             | 32        |
| 2.3.2.3.  | Experimentelle Induktion einer Plazentainsuffizienz .....                                                  | 33        |

|           |                                                                                                                                           |           |
|-----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 2.3.2.4.  | Mütterliche Hypoxie während der Trächtigkeit .....                                                                                        | 34        |
| 2.3.3.    | Die Auswirkungen von Frühgeburt auf das Herz .....                                                                                        | 35        |
| 2.3.4.    | Kompensation einer kardialen Hypoplasie nach der Geburt .....                                                                             | 37        |
| 2.3.5.    | Auswirkungen von pathologischen Bedingungen auf das adulte Herz nach neonataler Hypoplasie .....                                          | 38        |
| 2.3.6.    | Translatationaler Forschungsbedarf zum hypoplastischen Herzen .....                                                                       | 40        |
| 2.4.      | Ursachen und Mechanismen einer intrauterinen Wachstumsrestriktion .....                                                                   | 41        |
| 2.4.1.    | Molekulare Regulation des embryonalen und fetalen Wachstums .....                                                                         | 41        |
| 2.4.2.    | Der Einfluss der Plazenta bei intrauteriner Wachstumsrestriktion .....                                                                    | 43        |
| 2.5.      | Wachstumsregulation im Herzen durch den mTOR-Signalweg .....                                                                              | 43        |
| 2.5.1.    | Die Rolle des mTOR-Signalwegs im adulten Herzen .....                                                                                     | 43        |
| 2.5.2.    | Die Rolle des mTOR-Signalwegs im prä- und neonatalen Herzen .....                                                                         | 44        |
| 2.5.3.    | mTORC1-Aktivität reguliert das Wachstum des fetalen Herzens in der Maus ..                                                                | 46        |
| 2.6.      | Der Einfluss der Ernährung auf die kardiovaskuläre Gesundheit .....                                                                       | 47        |
| 2.6.1.    | Der Einfluss des Kaloriengehalts der Ernährung auf das Herz .....                                                                         | 47        |
| 2.6.2.    | Der Einfluss des Proteingehalts in der Ernährung auf das Herz .....                                                                       | 48        |
| 2.6.3.    | Der Einfluss einer Proteinrestriktion auf die myokardiale Gewebe-Homöostase .                                                             | 49        |
| 2.6.4.    | Der Einfluss einer Proteinrestriktion auf Kardiomyozytenzahl und -größe .....                                                             | 50        |
| 2.6.5.    | Probleme der Interpretation und translationalen Bedeutung von IUGR-Modellen                                                               | 51        |
| 2.6.6.    | Diskrepanz zwischen prä- und postnatalem Nahrungsangebot als Ursache für Developmental Programming?                                       | 52        |
| 2.6.7.    | Geschlechtsspezifische Effekte des Developmental Programming .....                                                                        | 53        |
| <b>3.</b> | <b>Zusammenfassende Darstellung .....</b>                                                                                                 | <b>55</b> |
| <b>4.</b> | <b>Publikationen und Darstellung der eigenen Arbeiten .....</b>                                                                           | <b>57</b> |
| 4.1.      | Regeneration des embryonalen und fetalen Herzens in der Maus .....                                                                        | 57        |
| 4.2.      | Molekulare Stressantwort und Überleben von embryonalen Kardiomyozyten bei mitochondrialer Dysfunktion .....                               | 58        |
| 4.3.      | Die Folgen einer kardialen Hypoplasie bei der Geburt auf das Wachstum und die Stress-Anfälligkeit des adulten Maus-Herzens .....          | 60        |
| 4.4.      | Molekulare und zelluläre Mechanismen einer intrauterinen Wachstumsrestriktion und Folgen für das neonatale und adulte Herz der Maus ..... | 62        |
| 4.5.      | Die Folgen einer Proteinrestriktion in der Nahrung für das Wachstum des prä- und postnatalen Herzens der Maus .....                       | 64        |
| <b>5.</b> | <b>Literatur .....</b>                                                                                                                    | <b>66</b> |
| <b>6.</b> | <b>Abbildungsverzeichnis .....</b>                                                                                                        | <b>88</b> |
| <b>7.</b> | <b>Erklärung .....</b>                                                                                                                    | <b>89</b> |



## **Abkürzungsverzeichnis**

|                      |                                                                       |
|----------------------|-----------------------------------------------------------------------|
| Ang II               | Angiotensin II                                                        |
| cHccs <sup>+/-</sup> | heterozygote, herzspezifische („c“ für „cardiac“) Hccs Knockout Mäuse |
| dpc                  | days post coitum                                                      |
| Hccs                 | Holocytochrom c Synthase                                              |
| HFD                  | high fat diet                                                         |
| HLHS                 | Hypoplastisches Linksherzsyndrom                                      |
| iPS-Zellen           | induzierte pluripotente Stammzellen                                   |
| I/R                  | Ischämie/Reperfusion                                                  |
| IUGR                 | intrauterine growth restriction                                       |
| KO                   | Knockout                                                              |
| LPD                  | low protein diet                                                      |
| mTORC1               | mechanistic target of rapamycin complex 1                             |
| ROS                  | reactive oxygen species                                               |
| SPD                  | standard protein diet                                                 |
| SW                   | Schwangerschaftswoche                                                 |
| UPR                  | unfolded protein response                                             |

## 1. Einführung

### 1.1. Entwicklungsbedingte Erkrankungen des menschlichen Herzens

Eine normale Entwicklung des embryonalen und fetalen Herzens ist essentiell für ein funktionsfähiges Organ bei der Geburt und bestimmt damit maßgeblich die unmittelbare aber auch die langfristige Herz-Gesundheit des Kindes. Dabei sind zunächst frühe Prozesse wie die Spezifizierung von kardialen Vorläuferzellen im embryonalen Mesoderm nach der Gastrulation sowie die koordinierten Abläufe von Zellmigration, Proliferation und Differenzierung bei der Bildung des primitiven Herzschauches wichtig. Nicht minder komplex ist das folgende Looping des Herzens zur Formierung der Herzschleife, gefolgt von Umbauprozessen wie Septierung der Ventrikel und Vorhöfe, Ausbildung der Herzklappen und Strukturierung des Ausflusstraktes (siehe Kapitel 1.2.). Parallel zu den morphologischen Veränderungen findet ein stetiges Größenwachstum des pränatalen Herzens statt, um bis zur Geburt ein funktionsfähiges und normal großes Organ zu bilden (siehe Kapitel 1.3.).

Bei Betrachtung der komplexen Abläufe der embryonalen und fetalen Herzentwicklung wird klar, dass diese anfällig für die unterschiedlichsten pathologische Einflüsse sind. Diese können sowohl genetisch bedingt sein und damit vom Embryo bzw. Fötus selbst ausgehen, aber auch durch ungünstige intrauterine Bedingungen ausgelöst sein, die vom mütterlichen Organismus oder von Umwelteinflüssen verursacht werden (siehe Kapitel 1.4.2.). Nicht von ungefähr stellen angeborene Herzfehler die häufigste entwicklungsbedingte Fehlbildung des Menschen dar (1). Zwar variieren die genauen Inzidenzen angeborener Herzfehler je nach Studie zwischen 4 und 50 Fälle pro 1000 Lebendgeburten (2), große Meta-Analysen legen jedoch eine Zahl von ~9 Fällen pro 1000 Lebendgeburten nahe (3, 4). Damit ist beinahe 1% aller Neugeborenen mit Fehlbildungen des Herzens belastet, Zahlen die auch in Deutschland bestätigt wurden (5). Die Zahl der insgesamt betroffenen Schwangerschaften liegt sogar deutlich höher, da hier zusätzlich Totgeburten oder Aborte einbezogen werden müssen, bei denen die Rate an kardialen Fehlbildungen bei bis zu 10% liegt (6).

Unter den angeborenen Herzfehlern dominieren strukturelle Fehlbildungen, die nach der Geburt zu einem Blutfluss vom linken in den rechten Kreislauf (Links-Rechts-Shunt) führen, wie ventrikuläre Septumdefekte (VSD), atriale Septumdefekte (ASD) oder ein persistierender Ductus arteriosus (PDA). Weiterhin relativ häufig treten Obstruktionen des Ausflusstraktes und somit der Herzklappen oder der nachgeschalteten Gefäße auf (z.B. Pulmonal- oder Aortenklappenstenose, Aortenisthmus-Stenose). Weniger häufig sind schwerwiegende und komplexe Fehlbildung, wie die Fallot-Tetralogie, Transposition der großen Gefäße, Hypoplastisches Linksherzsyndrom oder der „Double Outlet Right Ventricle“ (4). Für einige der strukturellen Herzfehler konnten genetische Ursachen identifiziert werden (7), in vielen Fällen ist die Pathogenese aber komplex und in ihrer Gesamtheit nicht komplett verstanden. Es wird vermutet, dass eine Reihe von intrauterinen Faktoren und Umwelteinflüssen an der Entstehung angeborener Herzfehler beteiligt sind (8, 9). Wie diese Effekte auf molekularer und zellulärer Ebene jedoch zur Erkrankung führen, ist meist unklar.

Neben den strukturellen Herzfehlern können sich Fehlentwicklungen des embryonalen oder fetalen Herzens auch in frühkindlichen Kardiomyopathien äußern (10, 11). Hierbei werden, wie im adulten Herzen auch, sowohl dilatative, hypertrophe und restriktive als auch „Non Compaction“ Kardiomyopathie-Formen beobachtet. Die Pathogenese kindlicher Kardiomyopathien kann nach einer normalen intrauterinen Entwicklung erst nach der Geburt einsetzen, unter anderem durch die Verabreichung von Medikamenten (z.B. Chemotherapie bei Krebserkrankungen), durch inflammatorische Prozesse (z.B. Virus-Myokarditis) oder sekundär bedingt bei anderen Grunderkrankungen (10). Ein erheblicher Teil kindlicher Kardiomyopathien ist jedoch genetisch bedingt, wobei vor allem Mutationen in Genen

identifiziert wurden, die auch Kardiomyopathien im Erwachsenenalter auslösen können. Hierzu zählen vor allem Gene, die für verschiedene Sarkomer-Komponenten (z.B. Troponin, Tropomyosin, schwere und leicht Myosin-Ketten, etc.), Zell-Zell-Kontakte wie Desmosomen (z.B. Desmocollin), Intermediär-Filamente (z.B. Desmin) oder Proteine der nukleären Membran (z.B. Lamin A/C) kodieren (10, 12). Hinzu kommen syndromale Kardiomyopathien als Bestandteil von „RASopathien“ (z.B. Noonan-Syndrom) oder metabolischen Syndromen, wie Glykogen-Speicher-Krankheiten (z.B. Morbus Pompe) oder mitochondrialen Erkrankungen (z.B. MELAS-Syndrom). Bei der Pathogenese von genetisch bedingten Kardiomyopathien stellt sich die Frage, wieso Mutationen in demselben Gen bei einem Patienten zur Erkrankung im Erwachsenenalter, bei einem anderen aber schon im frühen Kindesalter führen. Derartige Genotyp/Phänotyp-Korrelationen sind oft nicht eindeutig nachvollziehbar (13). Das Phänomen deutet aber darauf hin, dass es verschiedene Einflussfaktoren gibt, die bei derselben Mutation die Ausprägung des Phänotyps bestimmen. Hierzu zählen zum einen genetische Modifikatoren, also begleitende, oft komplexe genetische Konstellationen oder Mutationen in regulatorischen Genen oder DNA-Abschnitten. Auf der anderen Seite spielen vermutlich aber auch Umwelteinflüsse eine Rolle, wobei der pränatalen Entwicklung möglicherweise eine entscheidende Bedeutung zukommt (14). Ungünstige Wachstumsbedingungen im Uterus, beispielsweise bedingt durch mütterliche Erkrankungen, Mangel- oder Fehlernährung oder eine Plazenta-Insuffizienz, können die Entwicklung des embryonalen und fetalen Herzens negativ beeinflussen, so dass es bei einer genetischen Prädisposition zu einer frühen oder schwereren Ausprägung einer Kardiomyopathie nach der Geburt kommt.

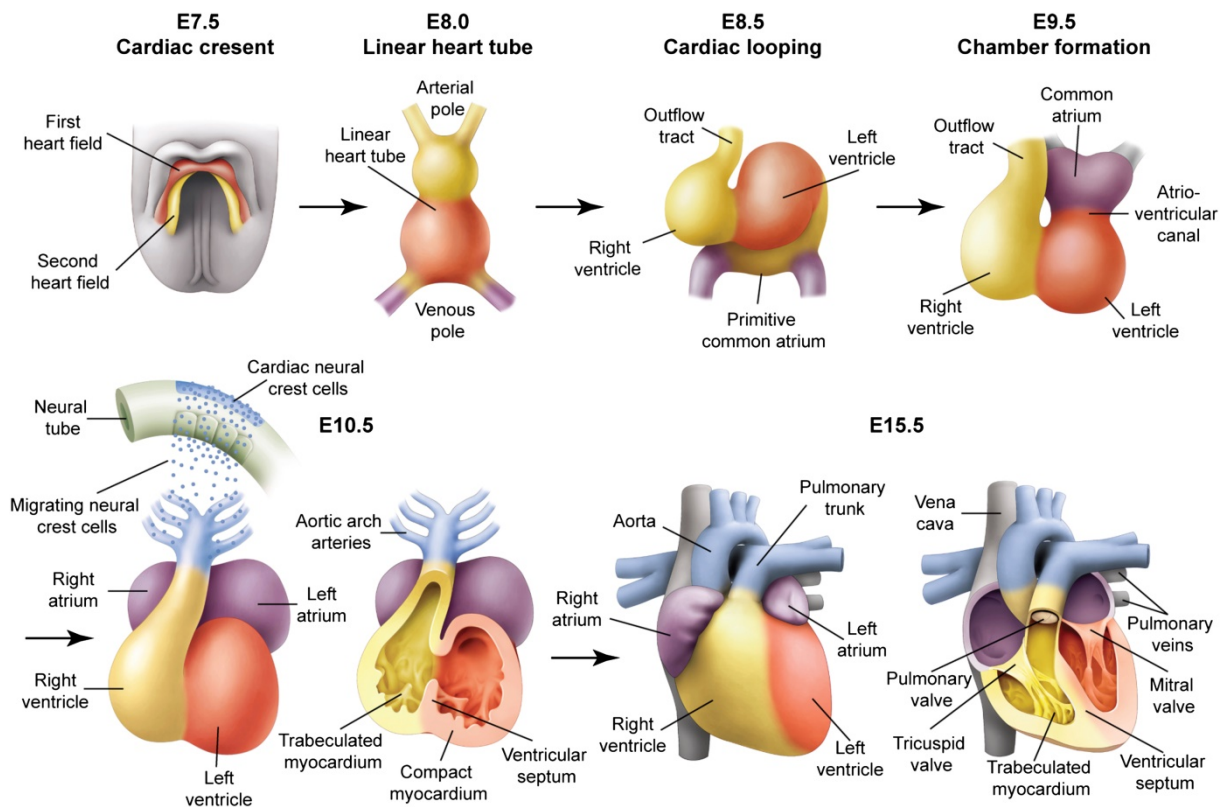
Generell spielt die intrauterine Umgebung eine wichtige Rolle bei der Pathogenese von Herzerkrankungen nach der Geburt und im Erwachsenenalter. Veränderungen des embryonalen und fetalen Wachstums, sowohl im Sinne einer Verlangsamung (Restriktion) als auch einer Beschleunigung, haben Auswirkungen auf die Herzgesundheit im weiteren Verlauf des Lebens. Dieses als „Fetal“ oder „Developmental Programming“ bezeichnete Phänomen wird heutzutage als eigenständiger Risikofaktor für die Entstehung verschiedener chronischer Erkrankungen im Erwachsenenalter angesehen, darunter Diabetes mellitus Typ 2, Bluthochdruck und koronare Herzerkrankung (siehe Kapitel 1.4.1.). Vor allem ein reduziertes Geburtsgewicht nach intrauteriner Wachstumsrestriktion ist mit einer erhöhten Mortalität durch kardiovaskuläre Erkrankungen assoziiert. Ein weiteres Szenario, bei dem Kinder unterentwickelt zur Welt kommen, sind Frühgeburten. Hierbei werden intrauterine Wachstumsprozesse zu einem Zeitpunkt abgebrochen, an dem die Entwicklung verschiedener Organsysteme teilweise noch nicht abgeschlossen ist. Welche Auswirkungen eine frühzeitige Exposition des Kindes gegenüber einer extrauterinen Umgebung für das Herz hat, ist nur in Ansätzen verstanden. Man muss aber davon ausgehen, dass ein vorzeitiger Abbruch des intrauterinen kardialen Wachstums Folgen für das Herz im weiteren Verlauf des Lebens hat (siehe Kapitel 2.3.3.).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die embryonale und fetale Herzentwicklung sowie das intrauterine kardiale Wachstum eine hohe klinische Relevanz für die Pathogenese und den Verlauf verschiedener angeborener, kindlicher und auch adulter Herzerkrankungen hat. Ein besseres Verständnis der zugrundeliegenden molekularen und zellulären Mechanismen birgt daher ein großes Potential für ihre Prävention und Therapie.

## **1.2. Embryonale und fetale Entwicklung des Herzens**

Um die Pathogenese von angeborenen und frühkindlichen Erkrankungen des Herzens zu verstehen, muss man sich die Stadien und morphologischen Meilensteine der embryonalen und fetalen Herzentwicklung vor Augen führen (15). Da entwicklungsbiologische Prozesse

aus ethischen Gründen beim Menschen nur eingeschränkt untersucht werden können, werden vor allem Modellorganismen wie die Maus herangezogen. Die Spezifizierung der ersten kardialen Vorläuferzellen der Maus beginnt etwa am Tag 7 nach Befruchtung der Eizelle (7.5 dpc = days post coitum) nach durchlaufener Gastrulation in der dreiblättrigen Keimscheibe (15, 16). In diesem Stadium bilden sich auf beiden Seiten der Mittellinie im lateralen Mesoderm Zellen, die kardiale Transkriptionsfaktoren wie Nkx2.5, GATA4 oder TBX5 exprimieren. Am kranialen Ende fusionieren die bilateralen Zellpopulationen, so dass sie eine charakteristische Halbmond-Form annehmen, was auch als „Cardiac Crescent“ bezeichnet wird (siehe Abbildung 1). Diese erste Population an kardialen Vorläuferzellen, die später vor allem die Strukturen des linken Ventrikels sowie Teile des interventrikulären Septums und der Vorhöfe bilden, wird auch als primäres Herzfeld („primary“ oder „first heart field“) bezeichnet (17). Etwas anterior und dorsal davon entsteht eine zweite Population an kardialen Vorläuferzellen, die vor allem durch die Expression der Transkriptionsfaktoren ISL1 und FGF10 charakterisiert ist und das zweite Herzfeld („secondary heart field“) bildet. Die Zellen des zweiten Herzfeldes sind maßgeblich an der Entwicklung des rechten Ventrikels und des Ausflusstraktes beteiligt, tragen aber auch Zellen zum interventrikulären Septum und zu den Vorhöfen bei (17) (siehe Abbildung 1).



**Abbildung 1: Die pränatale Entwicklung des Herzens in der Maus.** Die Strukturen, die den kardialen Vorläuferzellen des ersten bzw. zweiten Herzfeldes entstammen, sind in rot bzw. gelb dargestellt. Die Vorhöfe mit Zellen aus beiden Herzfeldern sind violett und die großen Gefäße des Ausflusstraktes blau gefärbt. („E“ = „embryonaler Tag“; Abbildung mit Erlaubnis entnommen aus: Epstein JA, et al. Cell Metab. 2015;21:163-173)

Etwa im Stadium 8.5 dpc wandern die beidseitigen Zellpopulationen des ersten Herzfeldes nach medial und fusionieren in der embryonalen Mittellinie (15). Hier beginnen sich erste unreife Kardiomyozyten zu differenzieren, die bereits Gene des Sarkomer-Apparates und der elektrophysiologischen Reizweiterleitung exprimieren und so die Fähigkeit zur spontanen

Kontraktion entwickeln (16). Durch die Fusion der Zellen in der Mittellinie entsteht das Herzrohr (heart tube), das um ein zentrales rundes Lumen herum von einem Endothel, dem Endokard, und einer einzelligen Schicht aus Kardiomyozyten gebildet wird (siehe Abbildung 1). In diesem Stadium sind erste peristaltische Kontraktionen des Herzrohrs zu beobachten, wobei der Einflusstrakt (venöser Pol) und damit die späteren Vorhöfe am kaudalen Ende und der spätere Ausflusstrakt (arterieller Pol) am kranialen Ende lokalisiert sind (18). Daher erfolgt der Blutfluss im Lumen des Herzrohrs von kaudal nach kranial. Aus dem zweiten Herzfeld wandern an beiden Polen kardiale Vorläuferzellen ins Herz ein und sind maßgeblich am Wachstum und der Morphogenese im Verlauf der weiteren Entwicklung beteiligt (17).

Um den Einfluss- und Ausflusstrakt in eine benachbarte Position zu bringen, wie es für die Funktion des postnatalen Herzens nötig ist, beginnt im Stadium 8.5 - 9 dpc ein Rotationsprozess, der „cardiac looping“ genannt wird (19). Hierbei dreht sich der Einflusstrakt mit den späteren Vorhöfen von ventral aus gesehen rechts herum nach kranial, um schließlich neben dem Ausflusstrakt zu liegen zu kommen. In der so geformten Herzscherle haben alle wichtigen morphologischen Strukturen des Herzens ihre korrekte relative Position zueinander: Ausflusstrakt und Vorhöfe liegen nebeneinander am kranialen Ende, die Ventrikel sind nach kaudal orientiert (siehe Abbildung 1). Der Looping-Prozess ist etwa im Stadium 9.5 -10 dpc abgeschlossen (19).

Ab dem Stadium 10.5 dpc findet vor allem die Formierung und Morphogenese der Vorhöfe und Ventrikel und die damit verbundene Ausreifung spezifischer Strukturen statt. Dazu zählt die Trennung der rechten und linken Herzhöhlen durch das atriale bzw. interventrikuläre Septum (20). Letzteres wächst vom Boden des gemeinsamen Ventrikels in Richtung der Vorhöfe, wo es mit dem Gewebe der Klappenebene fusioniert (siehe Abbildung 1). Die Septierung der Ventrikel ist etwa im Stadium 14.5 dpc abgeschlossen. Die Bildung des atrialen Septums läuft in mehreren Phasen ab und ist zunächst inkomplett, da bis zur Geburt der Blutfluss vom rechten in den linken Vorhof erhalten bleiben muss, um den Lungenkreislauf zu umgehen. Erst nach der Geburt kommt es aufgrund des gesteigerten pulmonal-venösen Rückstroms von Blut aus der Lunge in den linken Vorhof zu Änderungen der Strömungs- und Druckverhältnisse, die zum Verschluss des Foramen ovale und somit zur Trennung von rechtem und linkem Vorhof führen (20). Die Septierung der Vorhöfe ist aufgrund der Komplexität der Abläufe sehr anfällig für entwicklungsbedingte Störungen, so dass Vorhofseptum-Defekte zu den häufigsten angeborenen Herzfehlern zählen (1).

Neben den Herzhöhlen findet auch eine Septierung des Ausflusstraktes in den späteren Lungen- und Körperkreislauf und damit die Trennung der Aorta und Pulmonal-Arterie statt (20). Darüber hinaus kommt es zu komplexen Umbauprozessen, die schließlich zur Bildung des Aortenbogens mit den Abgängen der Hauptschlagadern zum Kopf und den oberen Extremitäten sowie der links- und rechtsseitigen Pulmonal-Arterie führen (siehe Abbildung 1). Im 10.5 dpc Herzen bilden sich sowohl im Ausflusstrakt als auch im Bereich zwischen Vorhöfen und Ventrikeln (also im Atrio-Ventrikular-Kanal) die sog. Endokard-Kissen (endocardial cushions) (21). Hierbei handelt es sich um lockere Ansammlungen von mesenchymalen Zellen (vor allem Fibroblasten) und extrazellulärer Matrix zwischen Endokard und Myokard. Aus den Endokard-Kissen entwickeln sich im Ausflusstrakt die Taschen-Klappen (Aorten- und Pulmonal-Klappe) und im AV-Kanal die Segel-Klappen (Trikuspidal- und Mitralklappe) (21). Sowohl Septierung und Modellierung des Ausflusstraktes als auch die Entwicklung der Herzklappen sind erst im fetalen Herzen und damit im Stadium 15 – 16 dpc abgeschlossen.

Die Morphogenese des atrialen und ventrikulären Myokards unterscheidet sich grundlegend (22). Während die Vorhöfe vom internen Volumen her im 10.5 dpc Herzen genauso groß sind wie die Ventrikel, besteht das Vorhof-Myokard lediglich aus einer ein- bis zweizelligen

Schicht aus Kardiomyozyten. Diese nimmt zwar im Laufe der weiteren Entwicklung etwas zu, bleibt aber bis zur Geburt mit 3 bis 4 Zellschichten relativ dünn. Die Wand des ventrikulären Myokards dagegen besteht schon im 10.5 dpc Herzen aus 3 bis 4 Zellschichten und wächst im weiteren Verlauf rapide. Hierbei bildet sich eine charakteristische Struktur mit dem trabekularisierten Myokard zum Lumen der Ventrikel und dem kompakten Myokard auf der Außenseite (23). Die Trabekularisierung entsteht durch fingerförmiges Wachstum von Kardiomyozyten und dem bedeckenden Endokard in das Lumen des Ventrikels, so dass sich eine schwammartige Gewebestruktur entwickelt (siehe Abbildung 1). Dies dient vor allem zur Vergrößerung der Kontaktfläche mit dem durch das Lumen fließenden Blut. Da das Herz in diesem Stadium noch kein funktionsfähiges Koronargefäß-System besitzt, muss die Sauerstoff- und Nährstoffversorgung direkt aus dem Blut im Ventrikel-Lumen sichergestellt werden. Darüber hinaus leistet das trabekularisierte Myokard in diesem frühen Stadium den überwiegenden Beitrag zu Kontraktilität des Herzens, da die Kardiomyozyten hier einen weiter fortgeschrittenen Grad der Differenzierung erreichen (23). Im Gegensatz dazu besitzen die weniger differenzierten Kardiomyozyten der Kompaktschicht eine höhere Proliferationsrate. Auf diese Weise entsteht entlang der Wand des ventrikulären Myokards von epikardial nach endokardial ein Gradient mit zunehmender Differenzierung aber abnehmender Teilungsfähigkeit der Kardiomyozyten (24). Das embryonale Herz wächst also vor allem durch Proliferation in den äußeren, subepikardialen Zellschichten. Dadurch kommt es im weiteren Verlauf der Entwicklung zu einem überproportionalen Wachstum des kompakten und einem relativen Rückgang des trabekularisierten Myokards. Dieser Kompaktierung genannte Prozess führt dazu, dass im neonatalen Herzen die Trabekularisierung nur noch durch kleine Erhebungen auf der endokardialen Seite der Ventrikel sichtbar ist, während die überwiegende Masse des Herzens durch kompaktes Myokard gebildet wird (23). Die prominentesten Überreste der Trabekularisierung sind die Papillar-Muskeln, die über die Chordae tendineae (Sehnenfäden) die Segelklappen mit der Myokardwand verbinden. Bis zur Geburt der Mäuse am Tag 19 bis 20 dpc entsteht somit durch die Morphogenese und die Ausreifung der verschiedenen kardialen Strukturen sowie durch das Wachstum des Myokards ein voll funktionstüchtiges Herz.

### **1.3. Größenwachstum des Herzens**

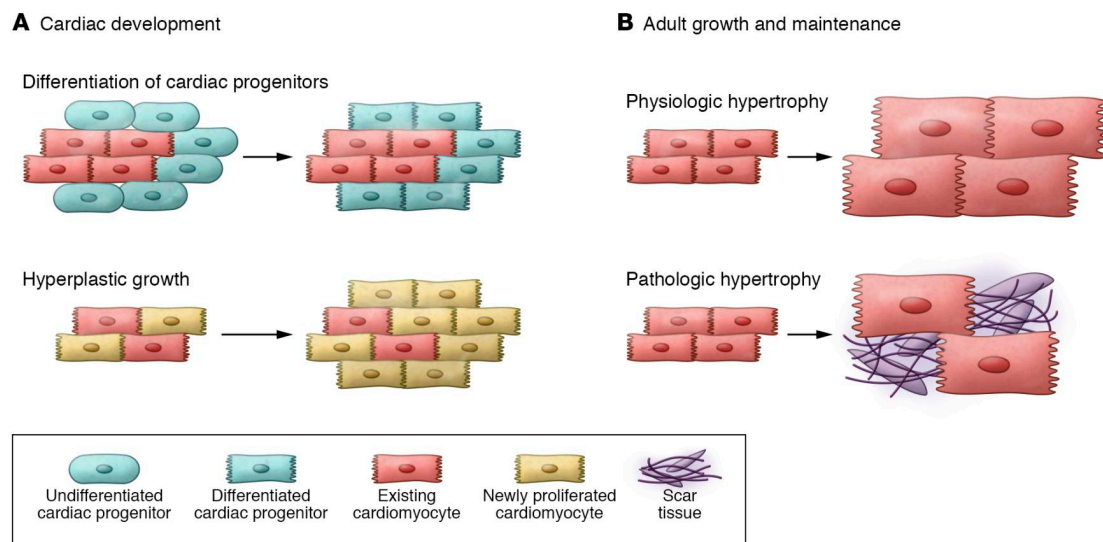
#### **1.3.1. Zelluläre Zusammensetzung des ventrikulären Myokards**

Die Organgröße des Herzens wird in erster Linie durch zwei Komponenten determiniert, nämlich die Anzahl und die Größe der Kardiomyozyten. Kardiomyozyten bilden weniger als die Hälfte der im Herzen vorhandenen Zellen. Ihr Anteil an der Gesamtzellzahl des Myokards beträgt, je nach Studie und verwendeter Methodik, zwischen 30% und 50% (25, 26). Mehr als die Hälfte der Zellen im Herzen wird daher aus anderen Zelltypen zusammengesetzt, darunter verschiedene Populationen an Fibrozyten und Fibroblasten, Zellen des Gefäßsystems (Endothel- und glatte Gefäßmuskelzellen), endokardiale und epikardiale Zellen, Zellen des Reizleitungssystems und aus dem Blut eingewanderte Leukozyten (Makrophagen, Lymphozyten, etc.). Innerhalb der Population an Nicht-Kardiomyozyten scheinen Endothelzellen mit 64% den größten Anteil auszumachen, gefolgt von mesenchymalen Zellen mit 27% (darunter Fibroblasten mit 15%) und Leukozyten mit 9% (25). Zusätzlich zu zellulären Bestandteilen wird die Gewebe-Architektur des Myokard darüber hinaus durch eine aus verschiedenen Komponenten (unter anderem Kollagen, Fibronectin und Laminin) zusammengesetzte extrazelluläre Matrix komplettiert. Obwohl Kardiomyozyten also zahlenmäßig weniger als die Hälfte der Zellen im Herzen ausmachen, bilden sie 70 bis 80% des myokardialen Volumens und damit der kardialen Masse (27, 28).

Dies liegt daran, dass sie im adulten Herzen verschiedener Spezies mit einem mittleren Zellvolumen von 20.000 bis 25.000  $\mu\text{m}^3$  um ein Vielfaches größer sind als andere Zelltypen (29). Die Größe des Herzens wird also in erster Linie durch das Volumen und die Anzahl der Kardiomyozyten bestimmen, wobei die Anzahl wiederum durch das Verhältnis von Neubildung und Untergang beeinflusst wird.

### 1.3.2. Proliferatives Wachstum des pränatalen Herzens und Determinierung der Kardiomyozytenzahl

Das Größenwachstum des embryonalen und fetalen Herzens erfolgt in erster Linie durch Proliferation, also durch Zellteilung und somit eine Vermehrung der Zahl an Kardiomyozyten (30). Um die Geburt herum ändert sich das Wachstumsverhalten grundlegend und postnatale Kardiomyozyten verlieren allmählich ihre Proliferationsfähigkeit. Das postnatale Herz wächst daher vor allem durch eine Größenzunahme (Hypertrophie) der bestehenden Zellen, während Zellteilung eine untergeordnete Rolle spielt (siehe Abbildung 2).



**Abbildung 2: Wachstum des prä- im Vergleich zum postnatalen Herzen.** (A) Während der pränatalen Entwicklung differenzieren sich kardiogene Vorläuferzellen in Kardiomyozyten, die proliferieren und somit durch eine Zunahme der Zellzahl zu hyperplastischem Wachstum führen. (B) Im adulten Herzen kommt es bei Ausdauersport oder Schwangerschaft zum Wachstum durch eine Größenzunahme der bestehenden Kardiomyozyten (physiologische Hypertrophie). Bei Druckbelastung oder nach Myokardinfarkt entsteht darüber hinaus ein maladaptiver Gewebeumbau, charakterisiert durch eine myokardiale Fibrosierung (pathologische Hypertrophie). (Abbildung mit Erlaubnis entnommen aus: Karra R & Poss KD. J Clin Invest. 2017;127:427-436)

Grundsätzlich ist der postnatale Zellzyklus-Austritt von Kardiomyozyten beim Menschen weitaus weniger gut untersucht als in Nagern. Neugeborene Mäuse und Ratten werden verhältnismäßig unreif geboren, so dass die Ausreifung verschiedener Organe erst postnatal abgeschlossen wird, was im Herzen zu einer Kardiomyozyten-Proliferation bis zu 10 Tage nach der Geburt führt (31-33). Bei größeren Säugetieren wie Schafen geht man davon aus, dass die Organogenese bereits vor der Geburt weitestgehend abgeschlossen ist, so dass im postnatalen Herzen kein nennenswertes proliferatives Wachstum mehr stattfindet (34). Ein ähnliches Szenario könnte unter Umständen auch für den Menschen gelten. Allerdings haben Studien postuliert, dass die Proliferation von Kardiomyozyten im menschlichen Herzen in den ersten 3 Monaten nach der Geburt (35) oder sogar bis ins jugendliche Alter

(36) möglich ist. Insgesamt muss man allerdings eher davon ausgehen, dass die Zahl der Kardiomyozyten im menschlichen Herzen innerhalb der ersten Monate nach der Geburt festgelegt wird und danach nicht mehr nennenswert ansteigt (37). So konnte mit Hilfe von Radio-Carbon-Datierung gezeigt werden, dass die jährlich Neubildungsrate von Kardiomyozyten („Turn-over“) bei einem 20-jährigen etwa 1% beträgt und bis zum Alter von 70 Jahren auf unter 0,5% abnimmt (38). Auch wenn beim Menschen also im Verlaufe des Lebens durchaus neue Kardiomyozyten entstehen, so führt dies insgesamt nicht zu einer Vermehrung ihrer Zahl, weil im gleichen Zeitraum auch Kardiomyozyten zugrunde gehen. Die Neubildung von Kardiomyozyten ist daher lediglich in der Lage, den physiologischen Zellverlust im Herzen (und damit praktisch den normalen Verschleiß) auszugleichen, so dass die Gesamtzahl der Kardiomyozyten im Verlaufe des Lebens konstant bleibt (37).

### **1.3.3. Hypertrophes Wachstum des postnatalen Herzens**

Während das embryonale und fetale Herz vor allem durch Proliferation und damit eine Zunahme der Kardiomyozytenzahl wächst, erfolgt das Wachstum des Herzens nach der Geburt in erster Linie durch eine Größenzunahme (Hypertrophie) der bestehenden Zellen (30). Das Volumen von Kardiomyozyten des Schafes steigt dabei vom fetalen Herzen ( $3.500 - 5.000 \mu\text{m}^3$ ) bis in adulte Stadien ( $20.000$  bis  $27.000 \mu\text{m}^3$ ) um mehr als das 5-fache an (29). Die finale Größe der Kardiomyozyten bestimmt so maßgeblich die Organgröße im Erwachsenenalter. Das postnatale Wachstum des Herzens entspricht der physiologischen Form der kardialen Hypertrophie, die ohne einen maladaptiven Gewebeumbau („Remodeling“) abläuft (siehe Abbildung 2). Auf ähnliche Weise vergrößert sich das Herz bei Ausdauersportlern (39) oder in der Schwangerschaft (40). Auch hier kommt es zu einer reversiblen Größenzunahme der bestehenden Kardiomyozyten und damit zu einer Steigerung der Herzleistung ohne einen Gewebeumbau (41). Nach Beendigung der sportlichen Belastung oder der Schwangerschaft gehen Zell- und damit auch Organgröße auf das ursprüngliche Maß zurück, ohne bleibende Veränderungen der Gewebe-Homöostase oder der Organfunktion. Interessanterweise konnte kürzlich in Mäusen gezeigt werden, dass Ausdauertraining auch die Neubildung von Kardiomyozyten im adulten Herzen anregen kann (42), was somit unter Umständen zusätzlich zum physiologischen Wachstum beiträgt. Davon abzugrenzen ist die pathologische Hypertrophie, die vor allem bei chronischer mechanischer Belastung des Herzens, wie beispielsweise bei Bluthochdruck, Aortenstenose oder nach Myokardinfarkt, eintritt (43). Hier kommt es parallel zur Größenzunahme der Kardiomyozyten zu einer Vermehrung und Aktivierung von Fibrozyten und Fibroblasten, die wiederum vermehrt extrazelluläre Matrix bilden und im interzellulären Raum ablagern (44) (siehe Abbildung 2). Man spricht in dem Fall von myokardialer Fibrose. Bei langfristig bestehenden pathologischen Bedingungen kommt es darüber hinaus zur Rarefizierung des Kapillargefäßbettes (45) sowie zu einer Reduktion des koronararteriellen Flusses (46) und damit zu einer Unterversorgung der Kardiomyozyten. Dies führt zu vermehrtem Zelluntergang (47), einer darauf folgenden Einwanderung von Makrophagen und anderer Leukozyten aus dem Blut ins Myokard und damit zu einer inflammatorischen Reaktion (48). Ab einem gewissen Stadium sind die beschriebenen Umbauprozesse des Gewebes nicht mehr reversibel und bleiben auch dann bestehen, wenn sich die mechanischen Belastungen des Herzens, beispielsweise durch die medikamentöse Einstellung des Hypertonus, wieder normalisieren. Durch die suboptimale Nährstoff- und Sauerstoff-Versorgung bei erhöhtem Bedarf der vergrößerten Kardiomyozyten wird deren Kontraktion unökonomisch und weniger effizient. Hinzu kommt die durch die Fibrose bedingte Versteifung des myokardialen Gewebes, was vor allem in der Diastole die Relaxation und damit die optimale Füllung der Ventrikel behindert. In der Summe resultiert



daraus eine progrediente sowohl systolische als auch diastolische Störung der Herzfunktion und damit schließlich eine Herzinsuffizienz.

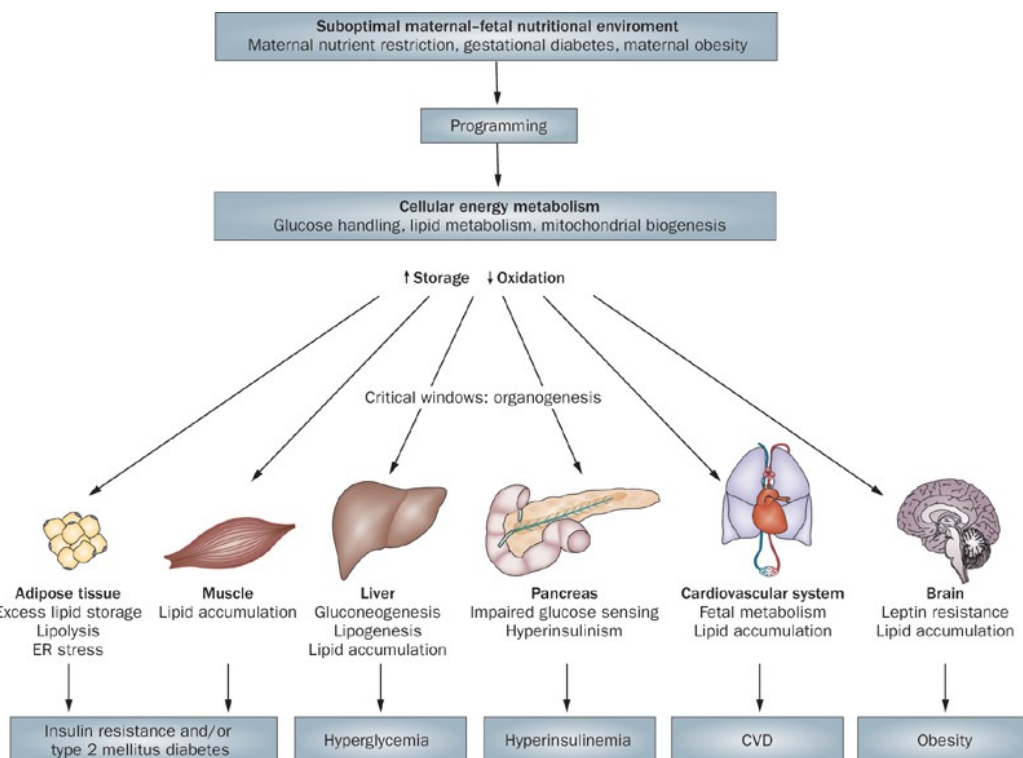
#### **1.3.4. Abhängigkeit von Kardiomyozytenzahl und –größe im postnatalen Herzen**

Die molekularen und zellulären Mechanismen der pathologischen Hypertrophie und der damit verbundene Gewebeumbau des Myokards werden intensiv beforscht, da eine hohe translationale und klinische Relevanz für verschiedene Herzerkrankungen im Alter besteht. Im Gegensatz dazu ist über die Regulation der physiologischen Hypertrophie insbesondere im Rahmen des kardialen Wachstums im Kindesalter weit weniger bekannt. Eine Störung des postnatalen Größenwachstums der Kardiomyozyten durch genetische Inaktivierung intrazellulärer Signalwege führt in erwachsenen Mäusen zu kleineren Herzen (49, 50). Im Gegensatz dazu gibt es Hinweise, dass eine reduzierte Kardiomyozytenzahl bei der Geburt durch eine überproportionale und damit kompensatorische Hypertrophie ausgeglichen werden kann (51). Auf diese Weise entsteht trotz reduzierter Kardiomyozytenzahl ein normal großes Herz im frühen Erwachsenenalter. Es scheint demnach also eine gewisse Plastizität in der Regulation der Zellgröße zu geben, mit der eine normale Organgröße trotz Variabilität der Zellzahl sichergestellt werden kann. Es ist jedoch bisher nicht geklärt, ob eine derartige Kompensation tatsächlich einer physiologischen Hypertrophie entspricht und komplett ohne maladaptiven Gewebeumbau und ohne metabolische oder anderweitige molekulare Veränderungen der Kardiomyozyten auskommt. Daraus ergibt sich die Frage, ob die Anfälligkeit solcher Herzen gegenüber altersbedingten Erkrankungen oder pathologischen Bedingungen erhöht ist. So ist es beispielsweise ungeklärt, inwieweit eine postnatale kompensatorische Hypertrophie die anderen Zellpopulationen im Herzen betrifft und möglicherweise deren Zahl, Differenzierung oder Expressionsmuster verändert. Weiterhin ist unklar, ob es zu einer adäquaten postnatalen Ausreifung des Koronargefäß-Systems und des Kapillarbetts und damit zu einer suffizienten Blutversorgung der vergrößerten Kardiomyozyten kommt. Schließlich erfolgt möglicherweise auch eine moderat vermehrte Ablagerung von extrazellulärer Matrix im interstitiellen Raum, die nicht notwendigerweise den Grad einer Fibrose erreicht und daher nicht sofort offensichtlich ist. Derartige Veränderungen des myokardialen Gewebes können unter normalen Bedingungen funktionell ohne Relevanz und damit klinisch zunächst unentdeckt bleiben, beim Auftreten pathologischer Bedingungen aber zu einer schnelleren Progredienz einer kardialen Dysfunktion beitragen. Darüber hinaus scheint es plausibel, dass Herzen mit einer reduzierten Kardiomyozytenzahl trotz kompensatorischer Hypertrophie anfälliger gegenüber Zellverlust sind. Verschiedene Szenarien können zum Zelltod und Untergang von Kardiomyozyten führen, wie beispielsweise eine chronische Hypoxie oder akute Ischämie bei einem Myokardinfarkt, der Ischämie/Reperfusions-Schaden nach Wiedereröffnung eines verschlossenen Gefäßes oder die Kardiotoxizität als Nebenwirkung von Medikamenten (47). Wenn durch derartige Bedingungen eine ohnehin reduzierte Kardiomyozytenzahl weiter abnimmt, so sind die Kompensationsmechanismen des Myokards und damit die funktionellen Reserven des Herzens möglicherweise früher erschöpft, so dass es zu schwereren klinischen Verläufen kommt als bei normaler Kardiomyozytenzahl. Zusammenfassend scheint das postnatale Herz eine gewisse Wachstums-Plastizität durch die Regulation der Kardiomyozytengröße zu haben (51), durch die eine normale Organgröße sichergestellt werden kann. Inwieweit jedoch eine entwicklungsbedingte Reduktion der Kardiomyozytenzahl langfristige Folgen für die Funktion und Krankheitsanfälligkeit des adulten Herzens hat, ist nicht verstanden.

## 1.4. Folgen einer intrauterinen Wachstumsrestriktion für das Herz

### 1.4.1. Die Barker-Hypothese und „Developmental Programming“

Ein mögliches Szenario, bei dem die Kardiomyozytenzahl im Herzen bei der Geburt reduziert sein kann, ist eine intrauterine Wachstumsrestriktion („intrauterine growth restriction“: IUGR). Hierbei wird das Wachstum des Embryos oder Föten insgesamt verlangsamt, so dass Kinder mit einem niedrigen Geburtsgewicht zur Welt kommen. Bereits 1989 beschrieben David Barker und Kollegen eine Korrelation zwischen Geburtsgewicht und dem Risiko, im Erwachsenenalter an einer koronaren Herzerkrankung zu versterben (52): dieses Risiko steigt, je geringer das Geburtsgewicht. Nachdem ähnliche Korrelationen für Diabetes mellitus Typ II, Lipidstoffwechselstörungen und Bluthochdruck gefunden wurden (53), entwickelte sich daraus die Idee des „Fetal“ oder „Developmental Programming“, die nach einem der Mitbegründer auch Barker-Hypothese genannt wird. Diese besagt, dass die intrauterine Umgebung und das pränatale Wachstum des Embryos und Föten maßgeblichen Einfluss auf die Gesundheit bzw. die Anfälligkeit gegenüber verschiedenen chronischen Erkrankungen im Erwachsenenalter haben. Jede Form einer intrauterinen Wachstumsrestriktion, die zu einem für das jeweilige Gestationsalter zu geringen Gewicht („small for gestational age“) und schließlich zu einem reduzierten Geburtsgewicht führt, erhöht das Risiko für die oben genannten Erkrankungen im weiteren Verlauf des Lebens (siehe Abbildung 3). Heute hat sich daraus das Konzept des „Developmental Origin of Health and Disease“ (DOHaD) entwickelt. Nachdem zunächst vor allem kardiovaskuläre Erkrankungen (54, 55) und Stoffwechselstörungen im Rahmen des metabolischen Syndroms (56, 57) im Fokus standen, hat sich der DOHaD-Gedanke inzwischen auch auf Tumor-Erkrankungen ausgeweitet (58).



**Abbildung 3: Developmental Programming.** Eine suboptimale Nährstoff- oder Sauerstoffversorgung des Embryos und Fötus kann zu einer intrauterinen Wachstumsrestriktion führen. Dies verursacht adaptive Veränderungen des zellulären Metabolismus in verschiedenen Organen, die nach der Geburt persistieren und das Risiko für chronische Erkrankungen im Erwachsenenalter erhöhen. (Abbildung mit Erlaubnis entnommen aus: Symonds ME, et al. Nat Rev Endocrinol. 2009;5:604-610)

Eine wichtige Frage beim Verständnis des Developmental Programming ist der evolutionsbiologische Sinn dahinter: Warum haben sich die zugrundeliegenden Mechanismen überhaupt entwickelt, wenn sie doch zu einer erhöhten Krankheitsanfälligkeit nach der Geburt führen? Eine mögliche Erklärung ist, dass das Ungeborene auf das Leben nach der Geburt vorbereitet werden soll (59). Ein Embryo oder Fötus, dessen Mutter während der Schwangerschaft unter Mangelbedingungen leidet und der daher einer IUGR ausgesetzt ist, wird mit hoher Wahrscheinlichkeit in dieselben Mangelverhältnisse hineingeboren. Auch nach der Geburt werden Nahrung und Ressourcen vermutlich knapp sein, so dass eine Übereinstimmung zwischen prä- und postnatalen Ernährungsbedingungen herrscht. In diesem Fall bietet das Developmental Programming möglicherweise einen Vorteil, da es den Embryo bzw. Fötus auf ein Leben unter Mangelbedingungen vorbereitet, ein Gedanke der auch als „Thrifty Phenotype Hypothesis“ bezeichnet wird. In der heutigen Zeit und vor allem in der industrialisierten westlichen Welt stimmt diese Gleichung aber oft nicht mehr. Ein Kind, das nach IUGR mit einem reduzierten Gewicht zur Welt kommt, wird häufig in eine Umgebung des Nahrungsüberflusses geboren (60). Die prä- und postnatalen Ernährungsbedingungen stimmen nicht mehr überein, so dass das Developmental Programming zum Nachteil wird und die Anfälligkeit für chronische Erkrankungen erhöht. In der Tat wurde festgestellt, dass Kinder mit geringem Geburtsgewicht, die durch das reichhaltige Nahrungsangebot ein beschleunigtes Aufhol-Wachstum („catch-up growth“) zeigen und das Körpergewicht innerhalb der ersten Lebensjahre im Vergleich zu Altersgenossen normalisieren, das höchste Risiko für chronische Erkrankungen im Erwachsenenalter haben (61, 62). Das Mismatch zwischen prä- und postnatalen Wachstumsbedingungen scheint also eine Schlüsselrolle bei den negativen Auswirkungen des Developmental Programming zu spielen. Der zusätzliche Einfluss von bekannten Risikofaktoren wie Rauchen, Alkohol- und Drogenmissbrauch, einseitige und kalorienreiche Ernährung, Übergewicht und Bewegungsmangel tragen ihren Teil zur Häufung von kardiovaskulären und metabolischen Erkrankungen bei Patienten nach IUGR bei.

#### **1.4.2. Ursachen und Folgen einer intrauterinen Wachstumsrestriktion**

Die Ursachen für eine intrauterine Wachstumsrestriktion sind vielfältig (63). Diese kann zum einen durch eine mütterliche Mangel- oder Fehlernährung während der Schwangerschaft bedingt sein. So traten während des ersten und zweiten Weltkrieges längere Hungerperioden beispielsweise in den Niederlanden auf, auf die viele epidemiologische Studien zum Developmental Programming zurückgehen (64, 65). Eine weitere häufige Ursache für eine IUGR ist eine Plazenta-Insuffizienz, bei der eine zu kleine oder aber nicht vollständig mit dem Uterus verbundene Plazenta zu einem reduzierten Sauerstoff- und Nährstoff-Austausch des Fetus mit dem mütterlichen Kreislauf führt. Eine Reduktion des Sauerstoffgehalts der Umgebungsluft beispielsweise in großen Höhen kann ebenfalls zu einer IUGR führen. So ist das Geburtsgewicht in Volksgruppen, die dauerhaft in den Hochlagen der Anden oder des Himalaya leben, im Vergleich zu solchen im Flachland reduziert (66). Andere Ursachen für eine IUGR sind Mehrlingsschwangerschaften, mütterlicher Alkohol-, Nikotin- bzw. Drogen-Missbrauch oder die Einnahme bestimmter Medikamente während der Schwangerschaft, mütterliche Erkrankungen (hormonelle Störungen, Anämie, Herz-, Lungen- oder Nierenerkrankungen, Resorptionsstörungen bei Zöliakie oder Morbus Crohn, Diabetes, etc.) oder Fehlbildungen bzw. Tumore des Uterus. Schließlich können auch eine Präeklampsie, eine von der Mutter auf den Embryo übertragene vertikale Infektion (z.B. Toxoplasma gondii oder Herpes-Viren) oder genetische Faktoren des Ungeborenen selbst das intrauterine Wachstum verlangsamen (63).

Die zellulären und molekularen Mechanismen, die zu den negativen Auswirkungen des Developmental Programming im Erwachsenenalter führen, sind kaum verstanden. Einer Theorie zufolge könnten es vor allem Umstellungen des zellulären Metabolismus sein, die pränatal im Rahmen von ungünstiger Nährstoff- oder Sauerstoffversorgung induziert werden und nach der Geburt persistieren (67) (siehe Abbildung 3). Weiterhin führt eine IUGR zu weitreichenden Veränderungen des Epigenoms und damit der Expression einer Vielzahl von Genen (68, 69). Das derartig veränderte Transkriptom könnte wiederum ursächlich an den metabolischen Umstellungen beteiligt sein, da beispielsweise Transkriptionsfaktoren, die an der Regulation von metabolisch relevanten Genen beteiligt sind, differentiell exprimiert werden (70). Auf der anderen Seite haben große populationsgenetische Studien ergeben, dass eine Reihe der beobachteten Assoziationen zwischen einem reduzierten Geburtsgewicht und einer erhöhten kardiovaskulären Krankheitsanfälligkeit im Alter primär genetische und weniger epigenetische Ursachen haben (71). So kann beispielsweise ein arterieller Hypertonus der Mutter zu einer IUGR und einem reduzierten Geburtsgewicht des Kindes führen. Dieses Kind entwickelt im Erwachsenenalter möglicherweise ebenfalls eine Hypertonie, allerdings nicht, weil es durch die IUGR zu einem Developmental Programming gekommen ist, sondern weil es von der Mutter die genetische Prädisposition zur Hypertonie geerbt hat (72). Ob es also tatsächlich ein intrauterines Programming im Sinne einer persistierenden Veränderung des Epigenoms gibt, ist nicht vollständig geklärt. Schließlich wird auch diskutiert, dass im Rahmen einer IUGR sowohl die zelluläre als auch die nichtzelluläre Zusammensetzung und Architektur verschiedener Gewebe verändert wird (73). Dies schließt sowohl Verschiebungen in Zahl, Differenzierung und Interaktion der gewebespezifischen Zellpopulationen als auch in Komponenten der extrazellulären Matrix ein. Derartige Veränderungen der Gewebe-Homöostase könnten postnatal persistieren und damit die Funktion und die Stressanfälligkeit eines Organs im weiteren Verlauf des Lebens negativ beeinflussen.

#### **1.4.3. Folgen einer intrauterinen Wachstumsrestriktion für das menschliche Herz**

Es gibt bisher verhältnismäßig wenige Studien, die die Auswirkungen einer IUGR auf das postnatale Herz beim Menschen analysiert haben. Im Rahmen von pränatalen Ultraschall-Untersuchungen konnten bei IUGR-Föten häufig sowohl morphologische als auch funktionelle Veränderungen nachgewiesen werden. Hierzu zählen eine abgerundete Form des Herzens sowie eine erhöhte Wanddicke und eine systolische, vor allem aber eine diastolische Dysfunktion des linken Ventrikels (74-76). Eine wichtige Frage ist allerdings, ob derartige strukturelle bzw. funktionelle Veränderungen postnatal persistieren. Hierzu haben Studien ergeben, dass das Herz bei 4 bis 5 Jahre alten Kindern nach IUGR auffällige morphologische Veränderungen zeigt, indem es eine abgerundete, kugelige Form annimmt (77). Dabei ist in den Ventrikeln der Abstand zwischen Klappenebene und Apex verkürzt, während der Durchmesser der Klappenebene erhöht ist. Dies führt in IUGR-Hezen zu einem reduzierten linksventrikulären Schlagvolumen, was jedoch durch eine Erhöhung der Herzfrequenz kompensiert wird, so dass das Herzminutenvolumen im Vergleich zu Kontrollen unbeeinträchtigt ist (77). Die Wanddicke und auch die Kontraktilität des linken Ventrikels sind dabei ebenfalls normal. Die kugelförmige Morphologie des Herzens ist nach IUGR auch im Alter von 10 bis 12 Jahren noch nachweisbar, wobei auch hier keine Beeinträchtigung von Herzminutenvolumen oder Kontraktilität beobachtet wurde (78, 79). Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass eine IUGR beim Menschen sowohl im fetalen als auch im kindlichen Herzen vor allem zu morphologischen aber auch zu subklinischen funktionellen Veränderungen führt (80). Inwieweit dies zu den negativen Auswirkungen des

Developmental Programming und damit zu einer erhöhte Anfälligkeit gegenüber kardiovaskulären Erkrankungen im Alter beiträgt, ist nicht abschließend geklärt.

Darüber hinaus gibt es auch Anzeichen dafür, dass eine IUGR die Pathogenese von angeborenen Herzfehlern beeinflusst. So sind bestimmte strukturelle Herzfehler mit der Größe der Plazenta und damit indirekt mit fetalem Wachstum assoziiert, so dass z.B. die Fallot-Tetralogie oder ventrikuläre Septumdefekte bei reduziertem Plazenta-Gewicht vermehrt auftreten (81). Genauso sind Kinder mit angeborenen Herzfehlern deutlich häufiger zu klein für das entsprechende Gestationsalter („small for gestational age“) als Kinder ohne Herzerkrankung (82). Nicht ganz geklärt ist in diesem Zusammenhang die Frage nach der Ursache und Wirkung: Sind die Kinder zu klein, weil sie einen Herzfehler haben, oder fördert die Wachstumsrestriktion die Pathogenese der kardialen Fehlbildung? Für Letzteres spricht die erhöhte Prävalenz von angeborenen Herzfehlern in Volksgruppen, die dauerhaft in großer Höhe leben, im Vergleich zu solchen im Flachland (83, 84). Da diese Menschen durch den geringen Sauerstoffgehalt der Umgebungsluft auch ein reduziertes Geburtsgewicht aufweisen (66), liegt ein Zusammenhang zwischen fetalem Wachstum und der Entstehung von strukturellen Herzfehlern nahe.

#### **1.4.4. Tiermodelle einer intrauterinen Wachstumsrestriktion**

Um die zellulären und molekularen Mechanismen des Developmental Programming im Herzen und auch in anderen Organen zu untersuchen, wurden eine Reihe von Tiermodellen zur Induktion einer IUGR etabliert (85, 86). Hierzu zählt die Simulation einer mütterlichen Mangel- oder Fehlernährung während der Trächtigkeit, die entweder durch eine generelle Kalorienreduktion oder eine Verringerung des Proteingehalts im Futter erreicht werden kann. Derartige Veränderungen der mütterlichen Diät werden vor allem in Nagern (Mäuse, Ratten, Meerschweinchen, Kaninchen) aber auch in Primaten angewendet. Bei einer „low protein diet“ (LPD) wird der Proteingehalt im Futter von Mäusen oder Ratten von normalerweise ~22% auf 8 bis 9% gesenkt. Bei einer Kalorienrestriktion wird die Menge des pro Tag angebotenen Futters auf 50 bis 70% gesenkt. Darüber hinaus ist die experimentelle Simulation einer Plazenta-Insuffizienz durch Verringerung des Sauerstoff- und Nährstoffaustausches zwischen fetalem und mütterlichem Kreislauf ein gängiges IUGR-Modell. In Mäuse und Ratten wird dies über eine Ligation der Arteria uterina erreicht, wodurch der Blutfluss zum Uterus und damit die Versorgung des Fötus reduziert wird. Eine derartige Ligation wird typischerweise in der späten Fetalphase begonnen (in Ratten am Tag 18 bei einer Gestationszeit von 23 Tagen), so dass die Nachkommen für einige Tage unmittelbar vor der Geburt einer Mangelversorgung ausgesetzt sind. In Schafen wird gelegentlich eine Teil-Embolisation der Plazenta durchgeführt, wobei Kunststoff-Kügelchen in die Nabelschnur-Arterie injiziert werden, die dann in der Plazenta einen gewissen Anteil des Kapillargefäßsystems verschließen und somit den Austausch zwischen fetalem und mütterlichem Blutstrom behindern. Darüber hinaus wird bei Schafen häufig eine Karunklektomie als Modell für eine Plazenta-Insuffizienz angewendet. Karunkel sind eine anatomische Besonderheit des Uterus von Wiederkäuern wie Schafen und Rindern und stellen gefäßreiche, drüsenlose Erhabenheiten der Schleimhaut dar. Nur an den Karunkeln kann die Plazenta im Verlaufe der Trächtigkeit an der Uteruswand anheften, und nur an diesen Kontaktstellen findet ein Sauerstoff- und Nährstoffaustausch zwischen mütterlichem und fetalem Kreislauf statt. Wird beim Muttertier vor einer Trächtigkeit ein Teil der Karunkel operativ entfernt, so reduziert dies die Kontaktfläche zwischen Plazenta und Uterus und führt so zu einer Mangelversorgung des Fötus. Ein weiteres gängiges Tiermodell zur Induktion einer IUGR ist eine mütterliche Hypoxie im Verlaufe der Trächtigkeit. Bei dieser vor allem in Mäusen und Ratten durchgeführten Prozedur werden trächtige Muttertiere für einen

definierten Zeitraum in einer Kammer mit reduziertem Luftsauerstoff gehalten. Hierbei wird der Sauerstoff von normalerweise 21% auf 10 - 11% gesenkt, was in etwa der Exposition in alpinen Höhenlagen entspricht. Neben den beschriebenen Modellen gibt es noch weniger häufig angewendete Methoden zur Induktion einer IUGR, wie beispielsweise die Behandlung von trächtigen Mäusen und Ratten mit Glukokortikoiden (z.B. Dexamethason) oder gentechnisch veränderte Knockout-Mäuse (z.B. Erk3 oder VEGF Knockout) (85). Die Auswirkungen der verschiedenen IUGR-Modelle auf die Nachkommen und insbesondere das Herz werden im Detail im Abschnitt 2.3.2. beschrieben.

#### **1.4.5. Auswirkungen einer intrauterinen Wachstumsrestriktion auf das neonatale Herz im Tiermodell**

Die Auswirkungen der verschiedenen tierexperimentellen Modelle zur Induktion einer intrauterinen Wachstumsrestriktion auf das Herz der Nachkommen bei der Geburt sind durchaus unterschiedlich. Sie sind abhängig von der eingesetzten Spezies und der angewendeten Methodik, aber auch von vielen experimentellen Variationen innerhalb derselben Methode (siehe Kapitel 2.6.5.). Es scheint sich jedoch herauszukristallisieren, dass die meisten IUGR-Modelle in den Nachkommen zu einer Reduktion des Herzgewichtes und einer Verringerung der Kardiomyozytenzahl bei der Geburt führen. Dies trifft beispielsweise auf neonatale Ratten zu, deren Mütter während der Trächtigkeit auf einer proteinreduzierten Diät gehalten wurden (87). Ebenso führt eine experimentell induzierte Plazentainsuffizienz in Ratten kurz nach der Geburt (88) sowie in fetalen Schafen (89) zu kleineren Herzen mit einer reduzierten Kardiomyozytenzahl. Die Haltung von trächtigen Ratten in einer Umgebung mit reduziertem Luftsauerstoff zur Induktion einer fetalen Hypoxie resultiert in einer Reduktion der Kardiomyozytenzahl in den Nachkommen einige Tage nach der Geburt (90). Aus diesen Beobachtungen hat sich die Hypothese entwickelt, dass die Folgen einer IUGR auf die Krankheitsanfälligkeit des adulten Herzens und damit die negativen Auswirkungen eines Developmental Programming unter anderem in einem Kardiomyozyten-Defizit zu suchen sein könnten (51, 91). Ein solches Herz hätte demnach möglicherweise eine geringere funktionelle Reserve, um mit pathologischen Bedingungen umzugehen. So würde der akute Verlust von Kardiomyozyten bei einem Myokardinfarkt ein Herz mit ohnehin schon verringerter Kardiomyozytenzahl härter treffen als ein normales Herz. Genauso könnte ein Herz mit einem Kardiomyozyten-Defizit unter Basalbedingungen scheinbar normal funktionieren, es kann dies allerdings nur mit einem deutlich höheren Aufwand sicherstellen als mit einem normalen Satz an Zellen. Das heißt, die einzelnen Kardiomyozyten arbeiten bereits am Limit, so dass jede zusätzliche Belastung unter pathologischen Bedingungen das System dekompensieren lassen würde. Wenn darüber hinaus durch das Developmental Programming tatsächlich epigenetische Veränderungen der Gen-Expression und des Metabolismus persistieren, dann könnte dies in Kombination mit einer reduzierten Zellzahl die Krankheitsanfälligkeit des Herzens nach IUGR determinieren. Vor diesem Hintergrund wird klar, dass die Erforschung des kardialen Wachstums im Embryo und Fötus bei einer intrauterinen Wachstumsrestriktion im Vergleich zu normalen Bedingungen wichtig ist, um die Mechanismen der Herzgesundheit nicht nur bei der Geburt sondern auch im Erwachsenenalter zu verstehen.

#### **1.5. Fragestellungen der Forschungsarbeiten zu dieser Habilitationsschrift**

Neben den frühen entwicklungsbiologischen Prozessen, die zu den morphologischen Meilensteinen der kardialen Organogenese führen (siehe Kapitel 1.2.), ist es vor allem das Wachstum des embryonalen und fetalen Herzens, das die Gesundheit im Kindes- aber auch Erwachsenenalter bestimmt. Ein gesunder Start ins Leben erfordert ein normal großes,

strukturell intaktes und voll funktionstüchtiges Herz bei der Geburt. Eine Vielzahl von Einflussfaktoren, die den Embryo oder Fetus selbst, die Mutter oder die Umwelt betreffen, können das intrauterine Wachstum des Herzens negativ beeinflussen und so die Anfälligkeit gegenüber kardiovaskulären Erkrankungen im weiteren Verlauf des Lebens erhöhen. Die Arbeiten zu dieser Habilitationsschrift befassen sich daher mit folgenden übergeordneten Fragestellungen:

- Welche Möglichkeiten der Wachstumsplastizität hat das pränatale Herz, um Schäden zu reparieren oder Phasen mit unzureichender Nährstoff- oder Sauerstoffversorgung zu überbrücken oder zu kompensieren?
- Wie werden embryonale Kardiomyozyten unter pathologischen Bedingungen vor zellschädigenden Einflüssen geschützt, um ihr Überleben und damit das Fortschreiten des kardialen Wachstums zu sichern?
- Wie beeinflussen ungünstige intrauterine Bedingungen die Proliferation der Kardiomyozyten und damit deren Zahl und die Herzgröße bei der Geburt?
- Wie kompensiert das Herz ein bei der Geburt bestehendes Kardiomyozyten-Defizit im weiteren Verlauf des Lebens und welchen Einfluss hat dies auf die Funktion und die Stressanfälligkeit im Erwachsenenalter?

Im Einzelnen wurden zur Beantwortung dieser Fragen folgende Projekte bearbeitet:

Regenerationsfähigkeit des pränatalen Herzens: Während der embryonalen und fetalen Entwicklung des Herzens stellt die Proliferation und Teilung von Kardiomyozyten den entscheidenden Mechanismus des kardialen Wachstums dar. Das pränatale Herz wächst demnach durch eine stetige Zunahme der Kardiomyozytenzahl, so dass bis zur Geburt ein normal großes und funktionstüchtiges Herz entsteht. Je nach Spezies beginnen Kardiomyozyten um die Geburt herum sich terminal zu differenzieren und steigen dabei aus dem Zellzyklus aus. Das postnatale Herz wächst daher vor allem durch eine Größenzunahme der bestehenden Kardiomyozyten, während deren Neubildung im weiteren Verlauf des Lebens eine untergeordnete Rolle spielt. Der postnatale Zellzyklus-Arrest der Kardiomyozyten wird als ein Hauptgrund dafür angesehen, dass das adulte Herz keine nennenswerte Fähigkeit zur Regeneration besitzt. Eine myokardiale Schädigung, beispielsweise im Rahmen eines Infarkts, kann folglich nicht durch kontraktiles Gewebe, sondern lediglich durch eine bindegewebige Narbe ersetzt werden. Wenn die Regenerationsfähigkeit des Säuger-Herzens tatsächlich unmittelbar an die Proliferation der Kardiomyozyten geknüpft ist, dann ergibt sich daraus folglich die Hypothese, dass sich das embryonale oder fetale Herz durchaus regenerieren kann. Um dies zu überprüfen, war ein Ziel der Arbeiten, die Regeneration des pränatalen Herzens in gentechnisch veränderten Mäusen zu untersuchen (siehe Kapitel 4.1.).

Zellprotektion in embryonale Kardiomyozyten: Das embryonale und fetale Herz scheint über eine verhältnismäßig große Plastizität im Hinblick auf Wachstum und Morphogenese zu verfügen. Es scheint sich zunächst also recht gut an unterschiedliche äußere Einflüsse und Umweltfaktoren (z.B. mütterliche Mangel-Ernährung oder Erkrankungen, Hypoxie, etc.), ungünstige intrauterine Wachstumsbedingungen (z.B. Plazentainsuffizienz) oder genetische Veränderungen (z.B. Mutationen in entwicklungsrelevanten Genen) anpassen zu können. Zwar können diese Faktoren durchaus zu einer Störung der Morphogenese und des Wachstums und damit zu strukturellen Herzdefekten, kindlichen Herzerkrankungen oder langfristigen Folgen im Erwachsenenalter führen. Dennoch können wichtige Meilensteine der Herzentwicklung trotz ungünstiger Bedingungen oft erreicht und damit das Überleben des Embryos oder Föten gesichert werden. Myokardiale Gewebeschäden im Sinne von Zelltod

und Kardiomyozyten-Verlust sind im pränatalen Herzen dagegen verhältnismäßig selten. Daraus ergibt sich die Hypothese, das pränatale und damit wenig differenzierte Kardiomyozyten pathologische Bedingungen deutlich besser tolerieren und überleben als adulte Kardiomyozyten. Um dies zu überprüfen, wurde in der Maus die molekulare Stress-Antwort und das Überleben von embryonalen Kardiomyozyten nach Induktion einer mitochondrialen Dysfunktion *in vivo* untersucht (siehe Kapitel 4.2.).

IUGR und kardiale Hypoplasie: Das intrauterine kardiale Wachstum durch Proliferation von Kardiomyozyten bestimmt maßgeblich die Größe, Morphologie und Funktion des Herzens bei der Geburt. Störungen im Rahmen einer intrauterinen Wachstumsrestriktion können zu unmittelbaren (z.B. strukturelle Herzfehler), mittelfristigen (z.B. frühkindliche Kardiomyopathien) oder langfristigen (z.B. Developmental Programming) Folgen für das Herz führen (siehe Kapitel 1.4.3.). Im Tiermodell verursacht eine IUGR meist eine Reduktion der Herzgröße bei der Geburt, oft bedingt durch eine Inhibierung der Zellzyklus-Aktivität und damit eine reduzierte Anzahl der Kardiomyozyten. Im Gegensatz dazu wird bei Frühgeburten das intrauterine kardiale Wachstum vorzeitig abgebrochen. Auch hier gibt es Hinweise, dass dies zu einem abrupten Ende der Kardiomyozyten-Proliferation und damit möglicherweise zu einer reduzierten Kardiomyozytenzahl führt (siehe Kapitel 2.3.3.). Daraus ergibt sich die Hypothese, dass eine Hypoplasie des Herzens bei der Geburt ein gemeinsames Charakteristikum nach IUGR und nach Frühgeburt darstellt und damit für die klinischen Auswirkungen im weiteren Verlauf des Lebens verantwortlich sein könnte. Um dies zu überprüfen, sollten im Rahmen der Arbeiten zu dieser Habilitationsschrift molekulare Mechanismen identifiziert werden, die eine Wachstumsrestriktion und damit eine Hypoplasie des Herzens bedingen (siehe Kapitel 4.4.). Darüber hinaus sollten die Folgen einer neonatalen Hypoplasie des Herzens auf das postnatale kardiale Wachstum sowie die Funktion und Stress-Anfälligkeit im Erwachsenenalter untersucht werden (siehe Kapitel 4.3.). Schließlich sollte das kardiale Wachstum im Rahmen eines der am häufigsten genutzten IUGR-Tiermodelle, nämlich einer mütterlichen Proteinrestriktion während der Trächtigkeit, sowohl während der prä- also auch postnatalen Entwicklung des Herzens charakterisiert werden (siehe Kapitel 4.5.).

Zusammengenommen sollten die Arbeiten zu dieser Habilitationsschrift neue Erkenntnisse über die Wachstumsregulation und –plastizität sowie die Regenerationsfähigkeit des pränatalen Herzens und den Einfluss des pränatalen kardialen Wachstums auf die Funktion und Stressanfälligkeit des adulten Herzes liefern.



## **2. Diskussion**

### **2.1. Regenerationsfähigkeit des prä- und postnatalen Herzens**

#### **2.1.1. Regeneration des adulten Herzens in verschiedenen Wirbeltieren**

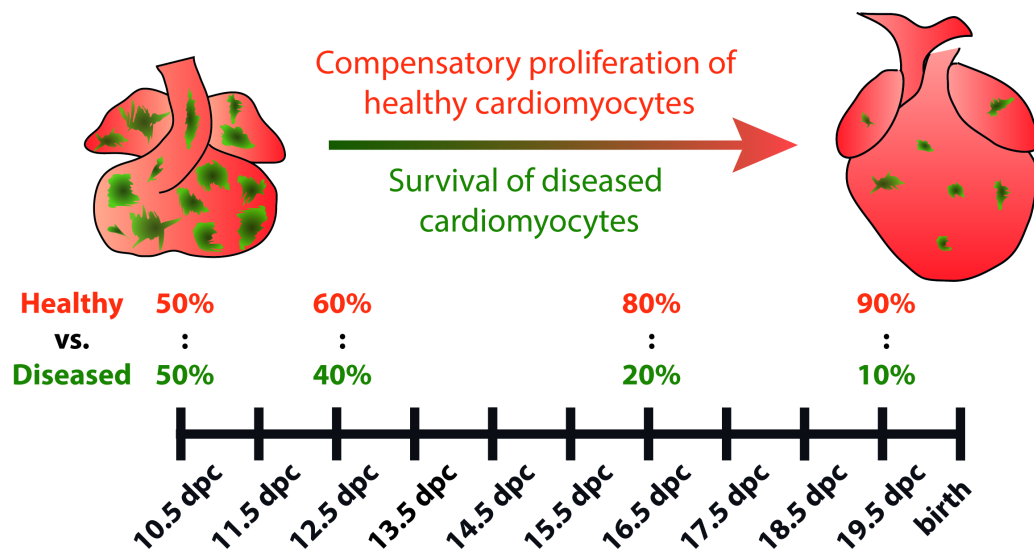
Das adulte menschliche Herz besitzt keine nennenswerte Fähigkeit zur Regeneration nach akuter Schädigung des Myokards, beispielsweise nach einem Myokardinfarkt. In dem vom verschlossenen Gefäß versorgten Areal stirbt ein Großteil der Kardiomyozyten durch unterschiedliche Zelltod-Mechanismen ab (47) und kann nicht durch neue kontraktile Zellen ersetzt werden. Stattdessen kommt es zunächst zu einer akuten inflammatorischen Phase, bei der Leukozyten und insbesondere Makrophagen aus dem Blut einwandern, um Zell- und Gewebereste zu resorbieren (48). Parallel dazu vermehren sich im Myokard ansässige Fibrozyten und werden zur Synthese von extrazellulärer Matrix (insbesondere Kollagen) angeregt (44). Auf diese Weise entsteht langfristig eine bindegewebige Narbe, die zwar das Infarktareal stabilisieren kann, aber nicht zur Kontraktion beiträgt (siehe Abbildung 5). Je nach Größe des geschädigten Areals führt dies zu einem mehr oder weniger großen Verlust der Herzleistung, was wiederum mit Einschränkungen der körperlichen Leistungsfähigkeit und damit der Lebensqualität der betroffenen Patienten verbunden ist. Zusätzlich erhöht die Infarktnarbe das Risiko für Komplikationen wie Arrhythmien sowie für die Entwicklung einer Herzinsuffizienz, was langfristig die Mortalität der Patienten erhöht.

Im Gegensatz zum Säugetier können sich die Herzen adulter Fische und Amphibien nach myokardialer Schädigung komplett regenerieren. Eine der ersten bahnbrechenden Studien auf diesem Gebiet verwendete die Methode der Apex-Resektion in Zebrafischen. Hierbei wird ein Teil des apikalen Myokards (etwa 20 % der Masse) mit einem Skalpell amputiert. Nach einer ersten Phase der Wundheilung und des Gewebeumbaus kann sich das Herz innerhalb von 2 Monaten komplett regenerieren, ohne dass eine Narbe oder eine Einschränkung der Pumpfunktion zurückbleibt (92). Das amputierte Areal wird dabei durch kontraktiles Myokard ersetzt, was durch eine vermehrte Proliferation der umliegenden Kardiomyozyten gewährleistet wird (93, 94). Auch adulte Salamander und Molche verfügen über die Fähigkeit zur Herzregeneration nach Apex-Resektion (95, 96), während diese im Krallenfrosch auf das Larven- bzw. Kaulquappen-Stadium beschränkt zu sein scheint und in erwachsenen Fröschen verloren geht (97). Zusammenfassend scheint also die Regeneration des adulten Herzens in einigen niederen Wirbeltieren möglich, während sie im Verlaufe der Evolution im Säuger verloren gegangen ist.

#### **2.1.2. Regeneration des embryonalen und fetalen Herzens im Säuger**

Der postnatale Zellzyklus-Austritt der Herzmuskelzellen (siehe Kapitel 2.1.4.) wird als eine der Hauptursachen dafür angesehen, dass das adulte Säuger-Herz praktisch keine Fähigkeit zur Regeneration besitzt (30, 98). Da sich adulte Kardiomyozyten unter normalen Umständen nicht mehr teilen, kann das nach einem Myokardinfarkt zerstörte Gewebe nicht mit neuen, kontraktilen Herzmuskelzellen besiedelt werden, sondern wird durch eine bindegewebige Narbe ersetzt. Wenn aber die Regenerationsfähigkeit des Säuger-Herzens unmittelbar mit der Proliferationsfähigkeit der Kardiomyozyten verknüpft ist, dann müsste sich entsprechend dieser Logik das embryonale und fetale Herz sehr wohl regenerieren können, da das pränatale kardiale Wachstum durch Teilung von Kardiomyozyten gewährleistet wird (siehe Kapitel 1.3.2.). In der Tat konnte dies im Rahmen unserer Studien zum herzspezifischen *Hccs*-Knockout (KO) in der Maus erstmals gezeigt werden (siehe Kapitel 4.1.). Das Enzym Holocytochrom c Synthase (*Hccs*) ist essentiell für die Synthese von Cytochrom c, einem wichtigen Elektronentransporter der mitochondrialen Atmungskette

(341). Die Inaktivierung von *Hccs* führt so zu einer mitochondrialen Dysfunktion, die mit einer verminderten Synthese von ATP und einer vermehrten Bildung von reaktiven Sauerstoffverbindungen und damit oxidativem Stress verknüpft ist (119). In unseren Studien wurde das *Hccs*-Gen während der frühen Embryonalentwicklung der Maus spezifisch in kardialen Vorläuferzellen inaktiviert. Aufgrund der X-chromosomalen Lokalisation des *Hccs*-Gens entwickeln sich im embryonalen Herzen von heterozygoten *Hccs*-Knockout-Weibchen sowohl normale als auch *Hccs*-defiziente Kardiomyozyten (Details siehe Kapitel 4.1.). Ein Gewebemosaik aus 50% gesunden und 50% defekten Kardiomyozyten im ventrikulären Myokard nach der Hälfte der Gestationszeit kann bis zur Geburt regeneriert werden, so dass das neonatale Herz zu 90% aus gesunden und nur noch zu 10% aus defekten Zellen aufgebaut ist (siehe Abbildung 4). Diese embryonale und fetale Herzregeneration wird durch eine kompensatorisch gesteigerte Proliferation der gesunden Kardiomyozyten gewährleistet, während defekte Zellen eine verminderte Teilungsrate zeigen. Während die Population gesunder Zellen bis zur Geburt also ein voll funktionsfähiges Herz entwickeln kann, tragen defekte Kardiomyozyten kaum zum Aufbau des Myokards bei.



**Abbildung 4: Schematische Darstellung der embryonalen Herzregeneration im *Hccs*-KO-Mausmodell.** Die Prozentangaben über den einzelnen Entwicklungsstadien zeigen den Anteil defekter („Diseased“) und normaler („Healthy“) Kardiomyozyten am Aufbau des Myokards an (dpc = days post coitum; Abbildung entnommen aus Magarin M et al., Genom Data. 2016;9:145-147).

Diese embryonale Herzregeneration in der Maus konnte inzwischen durch unabhängige Studien bestätigt werden (99). Im *Hccs*-KO-Modell bleiben die defekten Zellen im Laufe der prä- und postnatalen Entwicklung im Myokard nachweisbar und werden nicht durch Zelltod eliminiert. Damit fallen ihnen möglicherweise wichtige Funktionen bei der Regeneration des *Hccs*-KO-Herzens zu (siehe Kapitel 2.2.4.). Einen anderen Ansatz verfolgte eine Studie, bei der unterschiedlich hohe Anteile von kardialen Vorläuferzellen oder embryonalen Kardiomyozyten im Verlaufe der Herzentwicklung durch die Expression des Diphtherie-Toxin-Gens gezielt mittels Zelltod eliminiert wurden (99). Dabei ergab sich, dass die Ablation von bis zu 60% der Zellen im embryonalen Herzen durch eine gesteigerte Proliferationsrate der verbleibenden Kardiomyozyten kompensiert werden kann, so dass sich bis zur Geburt und auch bis ins Erwachsenenalter ein normal großes und funktionstüchtiges Herz entwickelt. Erst die Ablation von mehr als 60% der kardialen Zellen führt zum Absterben der Embryonen *in utero* (99). Auch in Schafen konnte eine Regenerationsfähigkeit des fetalen Herzens

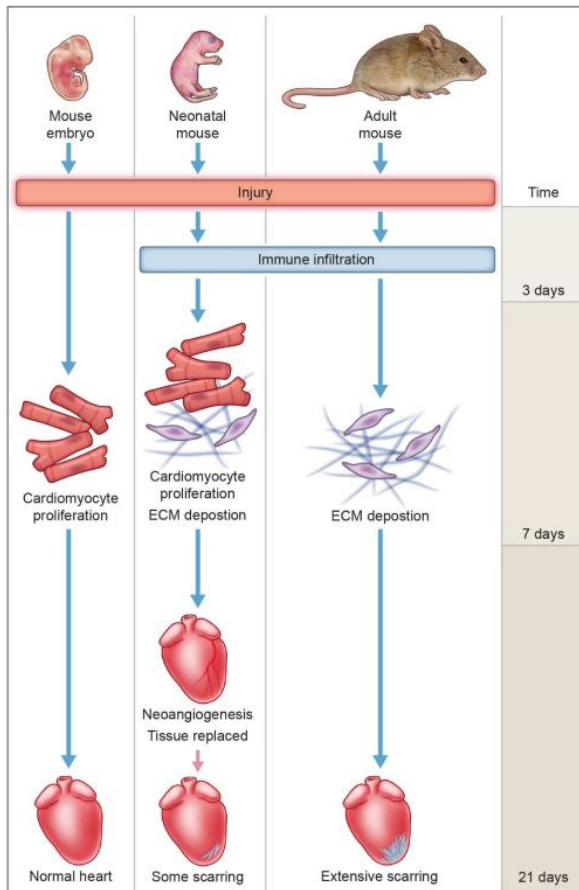
beobachtet werden. Adulte Schafe entwickeln nach Induktion eines Myokardinfarktes durch Ligation der linken Koronararterie eine persistierende Narbe mit linksventrikulärer Dilatation und Einschränkung der Kontraktilität. Im Gegensatz dazu zeigen Schafe, bei denen in der Fetalphase ein Myokardinfarkt induziert wurde, keine bleibenden Veränderungen der kardialen Morphologie oder Funktion (100, 101). Im fetalen verglichen mit adultem Myokard wurde nach Infarkt darüber hinaus eine verminderte Fibrosierung und eine gesteigerte Zellzyklus-Aktivität nachgewiesen, wobei nicht eindeutig bestimmt wurde, ob es sich dabei um proliferierende Kardiomyozyten handelt (100, 101). Zusammenfassend legen Studien in Mäusen und Schafen nahe, dass das Säuger-Herz vor der Geburt, wenn kardiales Wachstum durch Proliferation von Kardiomyozyten gewährleistet wird, die Fähigkeit zur myokardialen Regeneration nach Gewebeschädigung besitzt (siehe Abbildung 5).

### **2.1.3. Regeneration des neonatalen Herzens im Säuger**

In der Maus nimmt die Zellzyklus-Aktivität von Kardiomyozyten innerhalb der ersten 10 Tage nach der Geburt stetig ab und kommt danach weitestgehend zum Erliegen (siehe Kapitel 1.3.2.). Interessanterweise korreliert dieses Zeitfenster mit der Regenerationsfähigkeit des neonatalen Mausherzens: Nach chirurgischer Resektion der Herzspitze können neugeborene Mäuse das verlorene Gewebe durch eine gesteigerte Proliferationsrate der benachbarten Kardiomyozyten nahezu komplett und ohne die Bildung von Narbengewebe ersetzen, so dass im adulten Herzen keinerlei Einschränkungen der Pumpfunktion bestehen bleibt (102). Bei einer Herzspitzen-Resektion am Tag 7 nach der Geburt ist keine gesteigerte Teilungsrate der Kardiomyozyten nachweisbar und damit die Regeneration des Myokards nicht mehr gegeben, so dass eine bindegewebige Narbe zurückbleibt (102). Ähnlich verhält es sich bei der Induktion eines Myokardinfarkt durch die Ligation einer Koronararterie: eine Ligation am ersten Tag nach der Geburt kann bei Mäusen innerhalb der ersten 3 Wochen regeneriert werden, während dies bei einer Ligation am Tag 7 nicht mehr der Fall ist (103). Es darf allerdings auch nicht unerwähnt bleiben, dass die neonatale Herzregeneration in der Maus nicht völlig unumstritten ist. Verschiedenen Studien legen nahe, dass die Neubildung von Myokard nach Infarkt oder Apex-Resektion möglicherweise nicht komplett erfolgt und zumindest kleinere fibrotische Narbenareale zurückbleiben (104, 105) (siehe Abbildung 5). Der nach myokardialer Schädigung beobachtete Anstieg der Zellzyklus-Aktivität in Kardiomyozyten könnte demnach zwar zur Kernteilung jedoch ohne folgende Zellteilung führen (106). Dies würde bedeuten, dass vermehrt binukleäre Kardiomyozyten entstehen, ohne dass tatsächlich neue Zellen gebildet werden und damit Regeneration stattfindet.

Auch in größeren Säugern wie Schweinen, die der menschlichen Physiologie des Herzens etwas näher kommen als Nager, gibt es Hinweise, dass ein Myokardinfarkt unmittelbar nach der Geburt regeneriert werden kann. Auch hier scheint eine gesteigerte Proliferation bestehender Kardiomyozyten der verantwortliche Mechanismus zu sein. In späteren Stadien führt ein Infarkt jedoch zur Bildung einer Narbe und zur Einschränkung der kardialen Pumpfunktion (107, 108). Diese Studien unterstreicht, dass bei Mäusen und Schweinen die Regenerationsfähigkeit des Herzens innerhalb der ersten Woche nach der Geburt verloren geht und unmittelbar mit der Proliferationsfähigkeit der Kardiomyozyten verknüpft zu sein scheint. Da der postnatale Zellzyklus-Arrest von Kardiomyozyten beim Menschen nicht ausreichend verstanden ist, ist auch nicht geklärt, ob eine ähnliche Regenerationsfähigkeit des neugeborenen humanen Herzens möglich ist. In einem Fallbericht wurde ein Kind beschrieben, bei dem wenige Stunden nach der Geburt ein Myokardinfarkt diagnostiziert wurde, der mit typischen klinischen Kriterien und einer deutlichen Reduktion der linksventrikulären Funktion einherging. Nach Katheter-gestützter Wiedereröffnung des Gefäßes hat sich die Herzfunktion des Kindes innerhalb der ersten Wochen nach der Geburt

komplett erholt, so dass es ohne bleibende Einschränkungen entlassen werden konnte (109). Ob dahinter allerdings tatsächlich eine myokardiale Regeneration im Sinne einer gesteigerten Kardiomyozyten-Proliferation steckt, konnte nicht geklärt werden. Ebenso ist über den weiteren Verlauf des Kindes nicht berichtet worden.



**Abbildung 5: Regenerationsfähigkeit des Herzens in der Maus.** Das embryonale Herz kann sich nach myokardialer Schädigung durch die Proliferation von Kardiomyozyten komplett regenerieren. In neugeborenen Mäusen kommt es zu einer Entzündungs-Reaktion mit anschließender Proliferation von Kardiomyozyten und Ablagerung von extrazellulärer Matrix (ECM). Dies führt zu weitreichender Herzregeneration mit unter Umständen geringgradig persistierender Fibrosierung. Im adulten Herzen findet nach Gewebeschaden eine inflammatorische Reaktion mit anschließender Vermehrung von Fibrozyten und extrazellulärer Matrix statt. Kardiomyozyten können jedoch nicht proliferieren, so dass keine Regeneration abläuft, sondern eine bindegewebige Narbe zurückbleibt. (Abbildung mit Erlaubnis entnommen aus: Uygur A & Lee RT. Dev Cell. 2016;36:362-374)

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass es in der Phase unmittelbar nach der Geburt bei Säugern ein kurzes Fenster zu geben scheint, in dem ein Schaden des Myokards durch die Proliferation von Kardiomyozyten regeneriert werden kann. Mit dem fortschreitenden postnatalen Zellzyklus-Arrest geht diese Regenerationsfähigkeit allerdings verloren.

#### 2.1.4. Ursachen für den postnatalen Zellzyklus-Arrest von Kardiomyozyten

Die molekularen Mechanismen des postnatalen Zellzyklus-Austritts der Kardiomyozyten sind komplex und wahrscheinlich durch das Zusammenspiel unterschiedlicher bzw. sich gegenseitig bedingender Phänomene verursacht (91, 98). Hierzu zählt die Umstellung der Hämodynamik von einem fetalen auf einen postnatalen Kreislauf und die damit verbundenen Veränderungen der intrakardialen Druckverhältnisse (110). Im pränatalen Herzen des Menschen herrscht im linken Ventrikel bzw. in der Aorta kurz vor der Geburt ein systemarterieller Mitteldruck von 40-50 mmHg. Direkt nach der Geburt bleibt dieser zunächst weitestgehend unverändert, steigt in den ersten Lebensmonaten aber auf einen systemarteriellen Mitteldruck von 70-80 mmHg an. Durch die Trennung von Lungen- und Körperkreislauf bilden sich somit das Niederdrucksystem im rechten Herzen und das Hochdrucksystem im linken Herzen aus. Inwieweit die erhöhte Druckbelastung des linken Ventrikels nach der Geburt tatsächlich direkt zum Zellzyklus-Austritt der Kardiomyozyten beiträgt, ist unklar (110). Im adulten Herzen konnte jedoch gezeigt werden, dass eine

Entlastung des linken Ventrikels bei Patienten mit Herzinsuffizienz durch ein Assist-Device zu einer gesteigerten Zellzyklus-Aktivität in Kardiomyozyten führt (111).

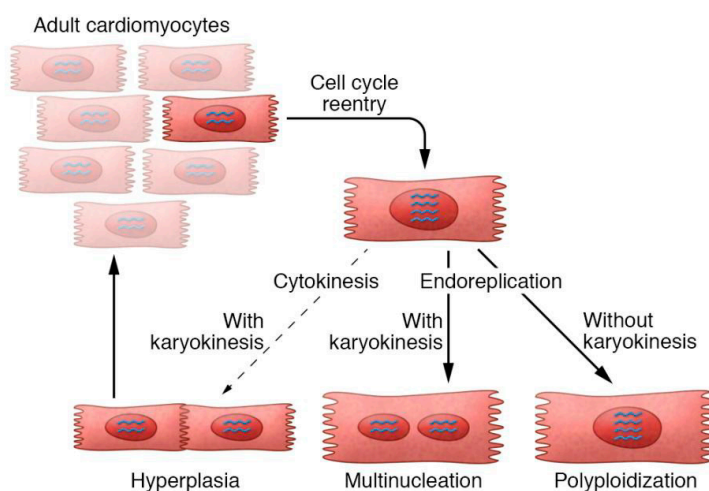
Die mechanische Belastung und die damit steigenden Ansprüche an die Kontraktionskraft der Kardiomyozyten nach der Geburt erfordern deren terminale Differenzierung. Dies schließt sowohl Veränderungen in der elektrophysiologischen Erregbarkeit, also dem Ruhemembranpotential und dem Aktionspotential, und damit in der Expression membranständiger Ionenkanäle als auch Anpassungen im intrazellulären Calcium-Handling ein (112). Vor allem aber kommt es zur Ausbildung des adulten Kontraktionsapparates, also der endgültigen Sarkomer-Organisation von Actin- und Myosin-Filamenten zusammen mit verschiedenen Adapterproteinen. Diese Kontraktionseinheiten werden darüber hinaus mit dem Zytoskelett, der Zellwand und den Zell-Zell-Kontakten verankert, um eine optimale Kraftübertragung und damit Verkürzung der gesamten Zelle bei der Kontraktion zu gewährleisten. Diese komplexe und praktisch irreversible Organisation des Kontraktionsapparates machen eine Teilung von terminal differenzierten Kardiomyozyten nahezu unmöglich (113). Dies würde zunächst eine Dedifferenzierung der Kardiomyozyten und den teilweise Abbau des Kontraktionsapparates erfordern, bevor eine Zytokinese stattfinden kann (114). Auch wenn dies vereinzelt beobachtet werden konnte, so führt die terminale Differenzierung der Kardiomyozyten zu einer zunehmend ineffizienten Proliferationsrate im postnatalen Herzen.

Weitere Faktoren, die die Zellzyklus-Aktivität von prä- im Vergleich zu postnatalen Kardiomyozyten beeinflussen, sind grundlegende metabolische Umstellungen im Energiehaushalt der Kardiomyozyten. Im embryonalen und fetalen Herzen wird ein Großteil der zellulären Energie in Form von Adenosintriphosphat (ATP) aus dem anaeroben Abbau von Kohlenhydraten (Glukose und Laktat) im Rahmen der Glykolyse gewonnen (115, 116). In der eher sauerstoffarmen intrauterinen Umgebung gewährleistet dies eine ausreichend effiziente Energiebereitstellung. Grundsätzlich scheint ein glykolytischer Stoffwechsel die Proliferation von Zellen zu begünstigen, was auch bei Tumoren bekannt ist und als Warburg Effekt bezeichnet wird (117). In der sauerstoffreichen postnatalen Umgebung dagegen stellt ein oxidativer Metabolismus von Fettsäuren und Glukose mit Hilfe der oxidativen Phosphorylierung in Mitochondrien die dominante Form der Energiegewinnung der Kardiomyozyten dar, über die 95% des ATP im Herzen bereitgestellt werden (118). Die gestiegene mechanische Beanspruchung des Herzens erfordert eine höhere kontraktile Pumpleistung zur Aufrechterhaltung des postnatalen Kreislaufs, die nur durch einen oxidativen Stoffwechsel zu gewährleisten ist. Der Wechsel von einem glykolytischen auf einen oxidativen Stoffwechsel hat neben der effizienteren ATP-Produktion einen zweiten Effekt, nämlich einen Anstieg von reaktiven Sauerstoffverbindungen als physiologische Nebenprodukte der mitochondrialen Atmungskette (119). In einer wichtigen Studie wurde in Mäusen gezeigt, dass die Umstellung von einer eher hypoxischen intrauterinen auf eine sauerstoffreiche extrauterine Umgebung maßgeblich an dem postnatalen Zellzyklus-Austritt der Kardiomyozyten beteiligt ist (120). Die damit verbundene Vermehrung des Mitochondrien-Gehalts der Zelle und die Steigerung des mitochondrialen Stoffwechsels innerhalb der ersten 7 Tage nach der Geburt führen zu einer kontinuierlich vermehrten Bildung von reaktiven Sauerstoffverbindungen. Dies verursacht oxidative Veränderungen der DNA und aktiviert entsprechende Reparatur-Mechanismen (DNA damage response = DDR). Es wurde daraufhin postuliert, dass diese oxidativen Folgen des mitochondrialen Stoffwechsels die Zellzyklus-Aktivität der Kardiomyozyten im postnatalen Verlauf reduzieren. In der Tat kann die Proliferation und Zellteilungsrate im Mausherzen in den ersten 7 Tagen nach der Geburt durch Veränderungen des Sauerstoffgehaltes in der Umgebung beeinflusst werden. Während eine Erhöhung (Hyperoxie, 100% Sauerstoff in der Umgebungsluft) zu einer Reduktion der Zellzyklus-Aktivität am Tag 4 nach der Geburt führt, erhöhen

kontinuierliche hypoxische Bedingungen ab der Geburt (Senkung des Sauerstoffgehaltes in der Luft von 21% auf 15%) die Kardiomyozyten-Proliferation am Tag 7 (120). Auch wenn viele Aspekte des postnatalen Zellzyklus-Arrests von Kardiomyozyten insbesondere beim Menschen bisher unklar sind, so scheinen die durch den postnatalen Kreislauf induzierte terminale Differenzierung sowie metabolische Umstellungen maßgeblich beteiligt zu sein.

### 2.1.5. Die Teilungsfähigkeit von Kardiomyozyten determiniert das regenerative Potential des Herzens

Wie in den vorherigen Abschnitten erläutert, ist das Potential zur Regeneration im adulten Herzen mit der Proliferationsfähigkeit der Kardiomyozyten verknüpft. Letztere geht beim Säuger um die Geburt herum verloren, so dass ein Myokardschaden danach nicht mehr mit kontraktilen Gewebe repariert werden kann. Was aber unterscheidet die postnatalen Kardiomyozyten im Säuger von denen in Fischen und Amphibien, bei denen eine Regeneration des adulten Herzens möglich ist (siehe Kapitel 2.1.1.)? Ein entscheidender Unterschied besteht im DNA-Gehalt und der Anzahl an Kernen pro Zelle. Die Kardiomyozyten in niederen Wirbeltieren besitzen einen Zellkern (sie sind also mononukleär) mit einem zweifachen (oder auch diploiden bzw.  $2n$ ) Chromosomensatz. In Säugetieren entwickelt sich in den Kardiomyozyten nach der Geburt jedoch ein mehrfacher Chromosomensatz, der je nach Spezies auf einen oder mehrere Kerne verteilt ist (29). Dies ist dadurch bedingt, dass Kardiomyozyten nach der Geburt in vielen Fällen noch einmal in den Zellzyklus eintreten und eine S-Phase durchlaufen, in der eine Verdoppelung (Replikation) der genomischen DNA stattfindet (98). Danach kann sich eine M-Phase anschließen, in der eine Kernteilung (Karyokinese) erfolgt und die DNA auf zwei Kerne mit jeweils einem  $2n$  Chromosomensatz verteilt wird. In den meisten Fällen findet im Anschluss jedoch keine Zellteilung (Zytokinese) statt, da die Trennung der beiden potentiellen Tochterzellen blockiert wird (121) (siehe Abbildung 6). Zwar bildet sich initial der dafür nötige molekulare Apparat (sie sogenannte Teilungsfurche) aus, die Abschnürung der Zellen kann aber nicht vollzogen werden und die Teilungsfurche bildet sich zurück (122, 123). Auf diese Weise entstehen binukleäre Kardiomyozyten, die also zwei Zellkernen enthalten. Diese Zellen können erneut in den Zellzyklus eintreten und eine S-Phase sowie eine anschließende Karyokinese ohne Zellteilung durchlaufen, so dass Kardiomyozyten mit vier, acht oder mehr Kernen entstehen (29).



**Abbildung 6: Zellzyklus-Aktivität im postnatalen Herzen.** Nach der Geburt können Kardiomyozyten in den Zellzyklus eintreten und eine DNA-Replikation durchlaufen. Findet danach keine Kernteilung statt, entstehen polyploide Zellen mit einem  $4n$  Chromosomensatz. Findet eine Kern- aber keine Zellteilung statt, entstehen binukleäre Zellen. In seltenen Fällen kommt es zur Zellteilung und damit einer Zunahme der Kardiomyozytenzahl. (Abbildung mit Erlaubnis entnommen aus: Karra R & Poss KD. J Clin Invest. 2017;127:427-436)

In einigen Spezies kommt es in Kardiomyozyten nach der Geburt zu einer S-Phase, auf die jedoch weder eine Kern- noch eine Zellteilung folgen. In diesem Fall entstehen

mononukleäre Kardiomyozyten, deren Kerne einen vierfachen ( $4n$ ) Chromosomensatz enthalten (siehe Abbildung 6). Auch hier können sich weitere S-Phasen anschließen, so dass polyploide ( $8n$ ,  $16n$ ,...) Zellen vorkommen. In der Maus dominiert nach der Geburt die DNA-Replikation mit Karyokinese, so dass der Großteil der Kardiomyozyten im adulten Herzen binukleär ist (29). Im Menschen dagegen entstehen vor allem mononukleäre, polyploide Zellen (37). Die Generierung binukleärer bzw. polyploider Zellen stellt dabei eine zusätzliche Komponente der terminalen Differenzierung von Kardiomyozyten dar.

Man geht derzeit davon aus, dass nur mononukleäre Kardiomyozyten mit einem  $2n$  Chromosomensatz tatsächlich teilungsfähig sind. Da dies im adulten Herzen von Fischen und Amphibien der dominierende Zelltyp ist, kann eine Myokardschädigung durch Proliferation von Kardiomyozyten regeneriert werden. Im adulten Säuger-Herzen ist dies aufgrund der terminalen Differenzierung nicht möglich. In der Tat kann die experimentell induzierte Erhöhung des Anteils polyploider Kardiomyozyten im adulten Zebrafisch die Regeneration des Herzens verhindern (124). Warum aber ist im Verlaufe der Evolution die Teilungsfähigkeit adulter Kardiomyozyten verloren gegangen und worin besteht der Vorteil von terminal differenzierten, binukleären bzw. polyploiden Zellen? Ein entscheidender Aspekt scheint hier die Entwicklung der Thermoregulation zu sein, also die Fähigkeit von Säugetieren, ihre Körpertemperatur konstant zu halten (Endothermie). Der Verlust der Regenerationsfähigkeit im adulten Säuger-Herz korreliert aus evolutionsbiologischer Sicht sowohl mit dem postnatalen Zellzyklus-Arrest und dem DNA-Gehalt der Kardiomyozyten als auch mit der Entwicklung der Endothermie (125). Im Gegensatz dazu gibt es über 41 Spezies hinweg eine inverse Korrelation zwischen dem Anteil mononukleärer, diploider Kardiomyozyten im Herzen und der metabolischen Aktivität zur Aufrechterhaltung der Körpertemperatur. Letztere wird im Säuger maßgeblich durch das Schilddrüsenhormon Thyroxin reguliert, das durch die Steigerung des metabolischen Grundumsatzes die Körpertemperatur erhöhen kann. Tatsächlich kann eine Inhibierung des Thyroxin-Signalwegs in neonatalen Mäusen den postnatalen Zellzyklus-Arrest der Kardiomyozyten hinauszögern, die Entstehung polyploider Zellen reduzieren und die Regenerationsfähigkeit bis ins Erwachsenenalter erhalten. Im Gegensatz dazu inhibiert Thyroxin die Herzregeneration im adulten Zebrafisch (125). Diese Studie legt nahe, dass der Preis für die Evolution der Endothermie im Säuger der Verlust der Zellzyklus-Aktivität der Kardiomyozyten und damit der Regenerationsfähigkeit des adulten Herzens ist (126).

Aber auch die metabolischen Umstellungen von einem glykolytischen Stoffwechsel im Uterus auf einen oxidativen Stoffwechsel nach der Geburt spielen eine Rolle beim Verlust der Regenerationsfähigkeit des Herzens (siehe Kapitel 2.1.4.). Dabei kann zum einen die Aufrechterhaltung hypoxischer Bedingungen nach der Geburt in Mäusen den Zellzyklus-Arrest der Kardiomyozyten hinauszögern und damit das Zeitfenster der Herzregeneration verlängern (120). Zum anderen ermöglicht eine hypoxische Umgebung nach einem Myokardinfarkt in adulten Mäusen die Proliferation von Kardiomyozyten und die Regeneration des Myokards (127). Interessanterweise beschleunigen hypoxische Bedingungen auch die Herzregeneration im Zebrafisch, vor allem aber wird diese durch eine Erhöhung des Sauerstoffgehaltes in der Umgebung („Hyperoxie“) inhibiert (128). Im adulten Myokard der Maus wurde eine kleine Population mononukleäre, diploider Kardiomyozyten identifiziert, die in hypoxischen Nischen des Gewebes angesiedelt sind und Charakteristika neonataler Kardiomyozyten aufweisen. Diese Zellen tragen maßgeblich zur Neubildung von Kardiomyozyten im adulten Herzen bei (129). Es scheint also, dass eine hypoxische Stoffwechsellage und die damit verbundene Signaltransduktion ein Merkmal teilungsfähiger Kardiomyozyten ist. Vor diesem Hintergrund wäre, ähnliche wie bei der Endothermie, die hohe Energieeffizienz eines oxidativen Stoffwechsels zur Etablierung einer optimalen



Kontraktilität der Kardiomyozyten aus evolutionsbiologischer Sicht erkauft für den Verlust der Regenerationsfähigkeit des adulten Herzens (130).

#### **2.1.6. Therapeutische Strategien zur Regeneration des menschlichen Herzens**

Die Regeneration des adulten Herzens nach Gewebeschädigung bleibt ein wichtiges Ziel der kardiovaskulären Forschung. Eine Reihe regenerativer Therapieansätze wurde bisher sowohl in präklinischen als auch klinischen Studien getestet, darunter vor allem die Aktivierung von im adulten Myokard ansässigen kardialen Stammzellen oder die Injektion von Knochenmarksstammzellen in das Infarktareal (131). Über derartige Zelltherapien ist eine heftige Debatte entbrannt, und es hat sich inzwischen herausgestellt, dass eine Reihe der grundlagenwissenschaftlichen Studien auf fabrizierten, manipulierten und damit nicht reproduzierbaren Daten basieren (132). So geht man heute davon aus, dass es im adulten Myokard keine dauerhaft ansässigen kardialen Stammzellen gibt, die über ein substantielles Potential zur Differenzierung in Kardiomyozyten verfügen. Selbst wenn derartige Ereignisse vereinzelt vorkommen sollten, dann sind sie so selten und ineffizient, dass dieser Prozess bei der Regeneration eines größeren myokardialen Schadens nicht nutzbar zu sein scheint (133-136). Die Injektion von mononukleären Knochenmarksstammzellen ins Infarktareal hat in einigen tierexperimentellen und auch klinischen Studien einen, wenn auch geringen, Nutzen gezeigt, da die Kontraktilität des linken Ventrikels langfristig leicht verbessert wurde (131). Es hat sich allerdings herausgestellt, dass dieser Effekt nicht auf der Differenzierung der injizierten Zellen in Kardiomyozyten und damit der Neubildung von kontraktilen Gewebe beruht. Stattdessen wurden andere Mechanismen postuliert, wie beispielsweise eine Modulation der Inflammation, parakrine Effekte auf umliegende Zellen durch Sekretion protektiver Mediatoren oder die Verbesserung der mechanischen Eigenschaften des Narbengewebes (137). Eine neue Studie zeigt, dass der positive Effekt von injizierten Knochenmarksstammzellen auf die Herzfunktion nach Myokardinfarkt vor allem auf eine Modulation der Immunantwort und die damit verbundene Einwanderung von Makrophagen zurückzuführen ist. Derselbe Effekt lässt sich jedoch auch durch die Injektion abgetöteter Zellen oder eines pharmakologischen Aktivators von Makrophagen erzielen (138). Demnach spielt die Neubildung von Kardiomyozyten aus den injizierten Zellen und damit eine echte Regeneration des Myokards keine Rolle. Aufgrund dieser und anderer Studien und aufgrund der Tatsache, dass die wissenschaftliche Grundlage für die Existenz und Wirkung von Stammzellen im Herzen zuletzt ins Wanken geraten ist, scheint die Regeneration des adulten Herzens auf der Basis von Zelltherapie mit adulten Stammzellen zumindest mit dem Ziel der Neubildung von Kardiomyozyten derzeit unrealistisch (132, 139).

Andere regenerative Strategien für das geschädigte adulte Herz rücken daher vermehrt in den Fokus (140, 141). Dazu zählt die Gewinnung von induzierten, pluripotenten Stammzellen (iPS-Zellen) beispielsweise aus Fibrozyten der Haut und die anschließende *in vitro* Differenzierung in patientenspezifische Kardiomyozyten. Nach Expansion der Zellen in Kultur sollen sie in das Infarktareal injiziert werden, um so neues kontraktilen Myokard zu bilden. In präklinischen Studien konnte die Machbarkeit eines solchen Ansatzes in nicht-menschlichen Primaten demonstriert werden (142). Ähnliches gilt für Kardiomyozyten, die aus humanen embryonalen Stammzellen differenziert und in Primaten zur Regeneration nach Myokardinfarkt eingesetzt wurden (143). Einen weiteren Ansatz stellt die direkte *in vivo* Re-Programmierung von kardialen Fibroblasten in Kardiomyozyten dar (144). Hierbei werden im Myokard ansässige Fibroblasten mit viralen Vektoren transfiziert, die zur Überexpression definierter kardialer Transkriptionsfaktoren führt. Dadurch nehmen die Zellen Eigenschaften von Kardiomyozyten an, was die Herzfunktion nach Myokardinfarkt in verschiedenen tierexperimentellen Studien verbessern konnte (145, 146). Schließlich werden auch



Methoden des „Tissue Engineerings“ verfolgt, um kontraktile myokardiale Gewebe-Patches in der Kulturschale zu generieren (147). Diese werden anschließend chirurgisch von außen auf das Infarktareal aufgebracht und können somit die Kontraktilität des Herzens unterstützen (148). Die meisten der erläuterten Strategien zur Regeneration des Herzens befinden sich in der grundlagenwissenschaftlichen Erprobung oder allenfalls in frühen präklinischen Phasen. Grundlegende Probleme wie Effizienz und Wirksamkeit, Patienten-Sicherheit (z.B. Induktion von Arrhythmien oder Tumoren), technische Machbarkeit (Skalierung vom Nager auf das menschliche Herz) und ggf. Immunkompatibilität müssen geklärt werden, bevor das translationale Potential einzelner Techniken klar wird. Vor diesem Hintergrund bleibt die Reaktivierung der Zellteilung in adulten Kardiomyozyten eine wichtige regenerative Therapieoption (30, 137, 139). Hierfür ist es jedoch unbedingt erforderlich, die Regulation des Zellzyklus-Arrests unmittelbar nach der Geburt auf zellulärer und molekularer Ebene zu verstehen. Nur so können pharmakologische oder auch biotechnologische Ansätze zur Stimulation der Proliferation in adulten Kardiomyozyten entwickelt werden. Die embryonale Herzregeneration in *Hccs*-KO-Mäusen stellt dabei ein attraktives Werkzeug dar (149). Dabei sollen zukünftig die molekularen Mechanismen untersucht werden, die gesunde Kardiomyozyten in *Hccs*-KO-Herzen zur kompensatorisch gesteigerten Proliferation anregen. Mit Hilfe neuer Techniken an aus Gewebe dissoziierten Einzelzellen, wie z.B. Single Cell RNA Sequencing, kann das Transkriptom der hyperproliferierenden mit dem normaler Kardiomyozyten verglichen werden. Derartige Analysen sollen Gene und Signalkaskaden identifizieren, die die Regeneration im embryonalen Herzen ermöglichen und somit auch als Therapiestrategien und pharmakologische Targets im adulten Herzen nützlich sein könnten.

## **2.2. Stresstoleranz und Überleben von embryonalen Kardiomyozyten**

### **2.2.1. Das therapeutische Konzept der Kardioprotektion**

Aufgrund der Unfähigkeit des adulten Herzens zur Regeneration und damit zur substantiellen Neubildung von Zellen, wiegt der Verlust von Kardiomyozyten unter pathologischen Bedingungen und bei verschiedenen Erkrankungen schwer. Hierbei spielt sowohl der akute Gewebeschaden, wie z.B. nach Myokardinfarkt, aber auch der progrediente Verlust bei chronischen Erkrankungen wie Bluthochdruck oder Diabetes mellitus eine Rolle (150-152). Adulte Kardiomyozyten sind sensibel gegenüber Hypoxie, Ischämie/Reperfusion, kardiotoxischen Medikamenten (153) oder viralen Infektionen. Oft ist dabei eine mitochondriale Dysfunktion an der Entstehung von zellulärem Stress und der Induktion von Zelltod beteiligt (47, 154). So führt sowohl bei einer Ischämie/Reperfusion als auch bei der Tumorbehandlung mit Doxorubicin (155) der intrazelluläre Anstieg von reaktiven Sauerstoffverbindungen, die in geschädigten Mitochondrien vermehrt gebildet werden, zur Apoptose oder Nekrose (154). Auch Alterungsprozesse beim Menschen sind mit einer mitochondrialen Dysfunktion in verschiedenen Geweben assoziiert (156). Mit zunehmendem Alter akkumulieren somatische Mutationen im mitochondrialen Genom, was zu einer Fehlfunktion der Atmungskette führt. Als Folge kommt es zu einem progredienten ATP (Adenosintriphosphat) Mangel der Zellen sowie zu oxidativem Stress aufgrund einer Überproduktion von reaktiven Sauerstoffverbindungen. Da spontane Mutationen im mitochondrialen Genom zufällig passieren, sind einzelne Zellen in einem Gewebeverband unterschiedlich stark betroffen. So entwickelt sich im Alter ein Mosaik aus normalen Zellen und solchen mit verschiedenen Schweregraden einer mitochondrialen Dysfunktion (157). Neben einer Reihe von regenerativen Therapieansätzen mit dem Ziel, abgestorbene Zellen nach einem Gewebeschaden des Myokards durch neue Kardiomyozyten zu ersetzen (siehe Kapitel 2.1.6.), ist ein weiteres wichtiges Konzept, die Toleranz der Zellen gegenüber Stress

zu erhöhen und somit den Zelltod von vornherein zu unterbinden (158). Dieser therapeutische Ansatz wird auch als Kardioprotektion bezeichnet. Um derartige zellprotektive Strategien verfolgen zu können, ist zunächst ein genaues Verständnis der molekularen Mechanismen nötig, die für die Stressantwort, den Zelltod und das Überleben von Kardiomyozyten verantwortlich sind. Trotz langjähriger und intensiver Grundlagen- aber auch präklinischer und translationaler Forschung ist bis heute keine routinemäßig anwendbare kardioprotektive Therapie verfügbar (159). Eine Reihe vielversprechender Ansätze, die in Tiermodellen ihre Wirksamkeit gezeigt haben, konnten nicht auf den Menschen übertragen werden. Hierzu zählen verschiedene pharmakologische Strategien mit dem Ziel, den Zelltod in Kardiomyozyten zu inhibieren, die Bildung von reaktiven Sauerstoffverbindungen zu unterdrücken, deren Neutralisierung zu fördern oder durch metabolische Umstellungen den Energiehaushalt aufrechtzuerhalten (160). Aber auch Ansätze wie Prä- oder Post-Konditionierung werden verfolgt. Die Prä-Konditionierung beschreibt das Phänomen, dass mehrere kurze Phasen der Ischämie und Reperfusion das Herz auf eine lange Ischämie vorbereiten, so dass der dadurch induzierte Myokardschaden geringer ausfällt. Man geht davon aus, dass während der Prä-Konditionierung verschiedene protektive Mechanismen aktiviert werden, die den Kardiomyozyten anschließend sofort zur Verfügung stehen und sie vor dem Zelltod schützen. Die Post-Konditionierung beschreibt einen Prozess, bei dem nach dem Verschluss einer Koronararterie diese mittels Katheter-Intervention zunächst wiedereröffnet, danach aber für kurze Zeit mehrfach wieder verschlossen und reperfundiert wird. Das Ziel hierbei ist, den Reperfusionsschaden zu minimieren, indem dem infarzierten Myokard erst allmählich normale Sauerstoff- und Nährstoffangebote zur Verfügung gestellt werden. Schließlich wird auch das Konzept der „Remote“-Konditionierung verfolgt. Hierbei werden meist Extremitäten für kurze Zeit einer Ischämie ausgesetzt und der Blutfluss danach wieder freigegeben. Dabei werden aus dem ischämischen Gebiet des Armes oder Beins Signalmoleküle ins Blut abgegeben, die im Herzen protektiv wirken und das Myokard vor einer anschließenden Ischämie schützen. Aber auch auf dem Gebiet der Konditionierung konnten vielversprechende tierexperimentelle und präklinische Studien bisher nicht in die klinische Praxis überführt werden (161).

### **2.2.2. Stresstoleranz in embryonalen im Vergleich zu adulten Kardiomyozyten**

Bei den Untersuchungen zur embryonalen Herzregeneration im *Hccs*-Knockout-Mausmodell fiel auf, dass die *Hccs*-defizienten Kardiomyozyten im Verlauf der pränatalen Entwicklung im Myokard persistieren und auch im neonatalen und adulten Herzen nachweisbar sind. Sie werden folglich trotz der Konsequenzen einer mitochondrialen Dysfunktion nicht durch Zelltod eliminiert (siehe Kapitel 4.2.). Stattdessen aktivieren embryonale Kardiomyozyten beim Fehlen von *Hccs* eine Reihe von protektiven Signalkaskaden, darunter die mitochondriale UPR (unfolded protein response), Abwehr gegen oxidativen Stress und Inhibitoren des programmierten Zelltods. Das Zusammenspiel dieser zellprotektiven Mechanismen stellt wahrscheinlich ihr Überleben bis in adulte Stadien sicher. Selbst die Inaktivierung des wichtigen Apoptose-Inhibitors ARC (162, 163) führt nicht zum Absterben von embryonalen *Hccs*-defizienten Kardiomyozyten. Dies verdeutlicht ihre bemerkenswerte Plastizität im Repertoire der zellulären Stressantwort und Apoptose-Regulation. Betrachtet man dagegen die hohe Anfälligkeit adulter Kardiomyozyten gegenüber verschiedenen pathologischen Bedingungen, so liegt die Vermutung nahe, dass die Reaktion von unreifen im Vergleich zu terminal differenzierten Kardiomyozyten auf eine mitochondriale Dysfunktion und auf oxidativen Stress fundamental unterschiedlich ist. Es scheint, dass embryonale und fetale Kardiomyozyten eine deutlich höhere Stress-Resistenz besitzen als adulte Zellen. Inwieweit dabei Unterschiede in der Reaktion auf mitochondriale Funktionsstörungen und die

Fähigkeit, oxidativen Stress zu reduzieren, involviert sind, ist bisher unklar. Die Identifizierung derartiger Mechanismen könnte aber wichtige neue Ansätze für Zellprotektion im adulten Herzen liefern.

Studien mit dem Ziel, die Stress-Toleranz, Zelltod-Regulation oder Kardioprotektion in embryonalen und adulten Kardiomyozyten zu vergleichen, sind rar, so dass es wenige Erkenntnisse über molekulare Unterschiede zwischen den Zelltypen gibt. Es wurde jedoch anhand von *in vitro* Experimenten bereits postuliert, dass fetale menschliche Kardiomyozyten eine deutlich höhere Resistenz gegenüber einer simulierten Ischämie/Reperfusion besitzen als neonatale Ratten-Kardiomyozyten (164). Letztere zeigen sowohl unter Ischämie als auch nach Reperfusion deutlich höhere Apoptose-Raten als die humanen fetalen Zellen, in denen der Zelltod überhaupt nicht induziert wird. Studien zum „Tissue Engineering“ haben myokardiales Gewebe aus embryonalen und neonatalen Kardiomyozyten *in vitro* hergestellt und auf Infarktareale adulter Rattenherzen transplantiert. Dabei zeigt sich, dass embryonale Gewebe-Patches langfristig eine höhere Proliferationsrate behalten und die linksventrikuläre Funktion des geschädigten Herzens verbessern, was mit neonatalen Patches nicht der Fall ist (165). Die Apoptose-Rate ist in den embryonalen im Vergleich zu den neonatalen Gewebe-Patches nach Transplantation jedoch nicht unterschiedlich. Im Gegensatz dazu zeigt eine andere Studie, dass die Injektion von fetalen und neonatalen Kardiomyozyten in geschädigtes Myokard adulter Ratten zum Anwachsen und Überleben der Zellen führt. Adulte Kardiomyozyten sterben nach der Injektion dagegen ab (166).

Auf der anderen Seite gibt es umgekehrt auch Hinweise, dass adulte im Vergleich zu unreifen Kardiomyozyten eine höhere Resistenz gegenüber Doxorubicin besitzen. So führt die Doxorubicin-Behandlung in kultivierten neonatalen Ratten-Kardiomyozyten zu einer deutlich stärkeren Induktion von Apoptose als in adulten Zellen (167). Studien in Mäusen zeigen, dass die Expression mehrerer proapoptotischer Proteine in neonatalen Herzen hoch ist und bis zum Alter von 3 Wochen stetig abnimmt (168). Folglich führt die Behandlung von neonatalen Mäusen mit Doxorubicin zu einer deutlich stärkeren Induktion von Apoptose im Herzen als im Alter von 3 Wochen. In der Tat nimmt die Anfälligkeit gegenüber Doxorubicin im postnatalen Verlauf und somit mit zunehmender Differenzierung der Kardiomyozyten kontinuierlich ab (168). Die im Rahmen der fortschreitenden Reifung abnehmende Anfälligkeit gegenüber Doxorubicin lässt sich auch bei der Differenzierung von Kardiomyozyten aus humanen iPS-Zellen nachvollziehen. In frühen Stadien und damit unreifen Zellen wirkt Doxorubicin zytotoxisch, während die Induktion von Zelltod mit fortschreitender Differenzierung abnimmt (169). Interessanterweise konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass eine mitochondriale Dysfunktion adulte Kardiomyozyten vor Hypoxie schützen kann und einen Ischämie/Reperfusions-Schaden im Herzen reduziert (170).

Umgekehrt könnte die Abnahme des Differenzierungsgrades (eine sog. Dedifferenzierung) adulte Kardiomyozyten resistenter gegenüber Stress machen. So zeigen sich sowohl im chronisch ischämischen Myokard als auch im Randbereich eines Infarkts strukturell veränderte Kardiomyozyten, die Anzeichen einer Dedifferenzierung zeigen. Hierzu zählen ein Ab- bzw. Umbau des Sarkomer-Apparates und des Zytoskeletts sowie ein Anstieg des Glykogen-Gehalts. Diese dedifferenzierten Kardiomyozyten zeigen dabei im Vergleich zu den umliegenden Zellen keinerlei Anzeichen von Zelltod (171, 172). Eine Dedifferenzierung gibt den Kardiomyozyten einige Eigenschaften fetaler Stadien zurück, was neben einer höheren Stresstoleranz auch den Wiedereintritt in den Zellzyklus ermöglicht (173). Generell regulieren adulte Kardiomyozyten unter pathologischen Bedingungen vermehrt Gene aus der pränatalen Entwicklung hoch und stellen von oxidativem auf glykolytischen Metabolismus um. Die Reaktivierung des fetalen Expressionsprogramms und des pränatalen Stoffwechsels scheint dabei protektiv zu sein, um die Zellen vor dem Absterben zu bewahren (174).

### 2.2.3. Weisen embryonale Kardiomyozyten den Weg zur Kardioprotektion?

Die Unterschiede in der Stressresistenz zwischen embryonalen und adulten Kardiomyozyten sind aufgrund der wenigen verfügbaren Studien nicht klar definiert. Es gibt jedoch nicht zuletzt auf der Basis unserer eigenen Daten zum Überleben von *Hccs*-defizienten Kardiomyozyten im embryonalen und adulten Herzen gute Hinweise, dass die Stresstoleranz undifferenzierter Zellen zumindest bei mitochondrialer Dysfunktion höher ist als im adulten Herzen. Dies ergibt auch vor dem Hintergrund Sinn, dass die im Uterus herrschende hypoxische Umgebung und die dadurch induzierte intrazelluläre Signaltransduktion essentiell für eine normale Entwicklung des pränatalen Herzens sind (175). Embryonale Kardiomyozyten tolerieren demnach hypoxische Bedingungen nicht nur, sondern können darunter optimal proliferieren und differenzieren. Unserer zukünftigen Forschung liegt daher die Hypothese zugrunde, dass undifferenzierte Kardiomyozyten eine mitochondriale Dysfunktion und oxidativen Stress überleben, während adulte Kardiomyozyten hochsensibel sind und nach kurzer Zeit absterben. Diese Unterschiede sind wahrscheinlich durch die andersartige Aktivierung einer Reihe von molekularen Stressreaktionen bedingt. Die protektiven Mechanismen, die embryonale Kardiomyozyten vor dem Zelltod bei oxidativem Stress bewahren, gehen dabei im adulten Herzen im Verlauf der terminalen Differenzierung der Zellen verloren. Demnach würde eine Reaktivierung von embryonalen Schutzmechanismen das Überleben adulter Kardiomyozyten verbessern und neue therapeutische Optionen zur Kardioprotektion aufzeigen.

Um derartige molekulare Mechanismen zu identifizieren, soll in zukünftigen Arbeiten die Reaktion von undifferenzierten im Vergleich zu differenzierten Kardiomyozyten unter mitochondrialer Dysfunktion und Hypoxie analysiert werden. Hierzu stehen zum einen stabile kardiale Zelllinien zur Verfügung, so zum Beispiel H9c2 Zellen, die undifferenzierte, nicht-kontraktile Kardiomyoblasten aus dem embryonalen Herz der Ratte repräsentieren. Im Gegensatz sind HL-1 Zellen differenzierte Vorhof-Kardiomyozyten aus der Maus, die unter geeigneten Kulturbedingungen kontrahieren. In diesen Zelllinien kann eine mitochondriale Dysfunktion durch die pharmakologische Inhibierung der Atmungskette induziert werden, wobei mit Rotenone, Antimycin A oder Oligomycin Inhibitoren der Komplexe I, III und V zur Verfügung stehen. Hypoxische Bedingungen können durch die Senkung des Sauerstoffgehalts im Zellkultur-Inkubator erzielt werden. Neben den genannten Zelllinien sollen diese Experimente auch auf primäre Kardiomyozyten ausgeweitet werden, die aus dem Herzen von embryonalen, neonatalen und adulten Mäusen oder Ratten isoliert wurden. Detaillierte Untersuchungen von Zellwachstum, -Tod und -Überleben sowie molekularen Mechanismen der Zelltod-Regulation, der antioxidativen Abwehr, der Protein-Homöostase sowie von Reparatur-Prozessen und vom Metabolismus können dabei wichtige Unterschiede zwischen den verschiedenen Zelltypen und Differenzierungsgraden aufzeigen. Systematische Screening-Methoden zur Untersuchung der RNA- und Proteinexpression sowie des Stoffwechsels (sogenannte „Omics“-Ansätze, wie Proteomics, Transcriptomics oder Metabolomics) vor allem in Primärzellen sollen darüber hinaus neue Targets zur Kardioprotektion identifizieren. Interessant sind dabei vor allem protektive Gene und Signalwege, die in embryonalen nicht aber in adulten Kardiomyozyten unter Stress aktiviert werden. Schließlich kann die Antwort von adulten Kardiomyozyten auf eine mitochondriale Dysfunktion *in vivo* getestet werden. Hierfür stehen induzierbare Mausmodelle zur Verfügung, mit denen das *Hccs*-Gen zu beliebigen Zeitpunkten der postnatalen Entwicklung spezifisch im Herzen inaktiviert werden kann. Durch den Vergleich der funktionellen, zellulären und molekularen Auswirkungen dieses adulten *Hccs*-Knockouts mit dem im embryonalen Herzen lassen sich wichtige Rückschlüsse auf die Stress-Toleranz von unreifen im Gegensatz zu terminal differenzierten Kardiomyozyten ziehen.

#### **2.2.4. Die mögliche Rolle *Hccs*-defizienter Kardiomyozyten bei der embryonalen Herzregeneration**

Neben der Stressantwort in embryonalen *Hccs*-defizienten Kardiomyozyten und den damit verbundenen Implikationen für die Kardioprotektion, stellt sich die Frage, welche Rolle die defekten Zellen bei der Regeneration des embryonalen Herzens spielen (siehe Kapitel 4.1.). Diese könnte zum einen darin liegen, die Integrität des Myokards und somit die Strukturen des Herzens temporär aufrechtzuerhalten, um so den gesunden Zellen ein Gerüst für die Regeneration zu bieten. Wenn 50% der Zellen gleichzeitig in den Zelltod eintreten, könnte dieser akute Verlust an Gewebe zu einem Zusammenbruch der kardialen Morphologie und Kontraktilität und damit zum Absterben des Embryos führen. Allerdings konnte kürzlich gezeigt werden, dass bis zu 60% der kardialen Vorläuferzellen oder der embryonalen Kardiomyozyten im Laufe der Herzentwicklung mittels Zelltod eliminiert werden können, ohne dass dies zu bleibenden Veränderungen des postnatalen Herzens führt (99). Das embryonale Herz kann sich demnach auch nach einem akuten Verlust von bis zu 60% der Zellen regenerieren, so dass eine Funktion der *Hccs*-defizienten Kardiomyozyten allein zur temporären Aufrechterhaltung der kardialen Morphologie unwahrscheinlich ist.

Eine interessantere Frage ist, ob die *Hccs*-defizienten Kardiomyozyten eine aktive Rolle im Verlauf der embryonalen Herzregeneration einnehmen und daran beteiligt sind, die umliegenden gesunden Zellen zur vermehrten Proliferation anzuregen. Ein derartiges Szenario konnte für apoptotische Zellen gezeigt werden, die nach einem Gewebeschaden der Haut oder der Leber Wachstumssignale freisetzen, die die Proliferation in benachbarten Zellen induzieren und somit Geweberegeneration ermöglichen (176). Dabei spielt möglicherweise eine wichtige Rolle, dass reaktive Sauerstoffverbindungen (ROS) zwar zum einen für ihre negative Wirkung bei der Oxidation von Proteinen und DNA bekannt sind, sie zum anderen aber auch physiologische Funktionen erfüllen (177). So sind ROS am intrazellulären Signalweg der Antwort auf Hypoxie, der Zell-Differenzierung, der Immunantwort oder von Alterungsprozessen beteiligt. Interessanterweise zeigen verschiedenen Studien, dass in den Mitochondrien generierte ROS bei der Regeneration der Flossen im Zebrafisch oder des Schwanzes in Kaulquappen des Krallenfrosches eine wichtige Rolle spielen (178, 179). Wird die ROS-Produktion verhindert, so inhibiert dies die kompensatorische Proliferation der umliegenden Zellen und führt zu inkompletter Regeneration. Ein wichtiges Signalmolekül in diesem Zusammenhang scheint Interleukin 11 zu sein. Nach einem akuten Leberschaden in Mäusen kommt es in geschädigten und sterbenden Hepatozyten zum Anstieg von ROS, was wiederum die Sekretion von Interleukin 11 zur Folge hat. Letzteres induziert eine kompensatorische Proliferation in benachbarten Hepatozyten und ermöglicht die Regeneration der Leber (180). In Tumoren der Fruchtfliege *Drosophila* stimuliert die ROS-Produktion in Tumorzellen die Proliferation im umliegenden Gewebe und beeinflusst somit Tumorwachstum und Malignität (181).

Aufgrund des Einflusses von mitochondrialen ROS auf die Geweberegeneration ergibt sich die Hypothese, dass auch *Hccs*-defiziente Kardiomyozyten auf ähnliche Weise aktiv an der embryonalen Herzregeneration in *cHccs*<sup>+/-</sup> Mäusen beteiligt sind. So könnten sie durch die ROS-induzierte Sekretion von Signalmolekülen die Proliferation der benachbarten gesunden Kardiomyozyten induzieren. Die Identifikation solcher Botenstoffe hätte große Bedeutung für das Verständnis der Regeneration im embryonalen, neonatalen und adulten Herzen und möglicherweise auch in anderen Geweben. Mit Hilfe von Einzelzell-Analysen (z.B. Single Cell RNA Sequenzierung oder Proteomics) sowie Untersuchungen des „Sekretoms“ (der Gesamtheit aller sezernierten Proteine eines Gewebes) soll daher in Zukunft die Interaktion zwischen *Hccs*-defizienten und gesunden Kardiomyozyten im embryonalen *cHccs*<sup>+/-</sup> Herzen untersucht werden. Ob die dabei möglicherweise identifizierte Signalgebung und damit die

kompensatorische Proliferation tatsächlich ROS-abhängig sind, ließe sich durch die Gabe von pharmakologischen Substanzen eruieren, die ROS neutralisieren können. Unter einer derartigen Behandlung müsste in dem Fall die embryonale Herzregeneration in *cHccs*<sup>+/-</sup> Mäusen bis zur Geburt inkomplett ablaufen, so dass möglicherweise morphologische Veränderungen oder funktionelle Einschränkungen zurückbleiben.

#### **2.2.5. Die mögliche Rolle *Hccs*-defizienter Kardiomyozyten im postnatalen Herzen**

Das Überleben der *Hccs*-defizienten Kardiomyozyten im Verlauf der intrauterinen Herzentwicklung von *cHccs*<sup>+/-</sup> Mäusen kann, neben den beschriebenen Aspekten der Kardioprotektion und der regenerativen Signalgebung, auch aus einem anderen Blickwinkel betrachtet werden: Am Ende verbleibt eine suboptimal ausgestattete Population von Kardiomyozyten im Herzen, die im weiteren Verlauf des Lebens zu Problemen führen kann. So haben unsere eigenen Arbeiten gezeigt, dass ein kleiner Teil der *cHccs*<sup>+/-</sup> Mäuse im fortgeschrittenen Alter Kardiomyopathien und Arrhythmien entwickeln (siehe Kapitel 4.1.). Dabei könnte die Ausprägung des Phänotyps damit zusammenhängen, wie viele der *Hccs*-defizienten Kardiomyozyten dauerhaft im Herz verbleiben und wo sie lokalisiert sind. So führen Cluster dieser Zellen im Bereich des Reizleitungssystems möglicherweise zu AV- oder Schenkel-Blockierungen, wie wir sie in alten *cHccs*<sup>+/-</sup> Mäuse beobachtet haben. Interessanterweise wurde tatsächlich berichtet, dass die allmähliche Ansammlung von Kardiomyozyten mit mitochondrialer Dysfunktion mit zunehmendem Alter die Entstehung von Arrhythmien fördert (182). Normalerweise scheint das embryonale Herz die Fähigkeit zu besitzen, benachteiligte und weniger fitte Kardiomyozyten im Verlauf der prä- und auch postnatalen Entwicklung zu eliminieren (183). Der zugrundeliegende Prozess ist als „Cell Competition“ bekannt und wurde in verschiedenen Geweben beobachtet. Wenn in einem Gewebeverband unterschiedliche Populationen desselben Zelltyps konkurrieren, die sich in ihrem Wachstumspotential unterscheiden, dann setzen sich am Ende die fitteren Zellen durch und bauen das Gewebe auf. Dies beruht nicht nur auf ihrer Fähigkeit zur schnelleren und effizienteren Proliferation, sondern auch darauf, dass die Zellen mit einem Wachstumsnachteil (die sog. „Loser-Zellen“) durch Apoptose eliminiert werden. Auf diese Weise stellt der Prozess der „Cell Competition“ ähnlich einer Qualitätskontrolle sicher, dass Gewebe nur aus den fittesten und am besten ausgerüsteten Zellen aufgebaut werden, während defekte oder funktionseingeschränkte Zellen eliminiert werden (184). Übertragen auf die embryonale Herzregeneration im *Hccs*-KO-Modell muss man davon ausgehen, dass die *Hccs*-defizienten Kardiomyozyten durch die mitochondriale Dysfunktion im Sinne der „Cell Competition“ eine „Loser“-Population darstellen. Allerdings könnte die Aktivierung von protektiven und antiapoptotischen Prozessen die Eliminierung dieser Zellen verhindern und die Mechanismen der „Cell Competition“ damit außer Kraft setzen. Demnach würde eine defekte und suboptimal ausgestattete Population von Kardiomyozyten, die normalerweise während der Herzentwicklung eliminiert worden wäre (183), im Myokard verbleiben und je nach Anzahl und Lokalisation die spätere kardiale Funktion beeinträchtigen.

### **2.3. Hypoplasie des Herzens bei der Geburt: Ursachen und Folgen für die Herzgesundheit im Erwachsenenalter**

#### **2.3.1. Ursachen für eine Hypoplasie des Herzens**

Verschiedene Szenarien können zu einer reduzierten Größe des Herzens bei der Geburt führen. Ist das Neugeborene dabei insgesamt klein und das Geburtsgewicht verringert (z.B. nach intrauteriner Wachstumsrestriktion), so ist häufig das Herzgewicht proportional zum Körpergewicht reduziert. In dem Fall weist es jedoch in Relation zur Körpergröße eine

adäquate Organgröße auf und das Verhältnis von Herz- zu Körpergewicht ist normal. Andererseits kann die Herzgröße auch überproportional verringert sein, so dass das Verhältnis von Herz- zu Körpergewicht im Vergleich zu normal entwickelten Kindern reduziert ist. Die Herzgröße wird bei der Geburt vor allem durch die Anzahl und Größe der Kardiomyozyten bestimmt, während andere kardiale Zelltypen in der Hinsicht eine untergeordnete Rolle spielen (siehe Kapitel 1.3.1.). Von einer Hypoplasie des Herzens spricht man dann, wenn die Anzahl der Kardiomyozyten bei der Geburt reduziert ist.

Eine Hypoplasie des neonatalen Herzens kann vor allem aufgrund einer intrauterinen Wachstumsrestriktion oder nach Frühgeburt auftreten, worauf in den Kapiteln 2.3.2. und 2.3.3. genauer eingegangen wird. Daneben spielen aber auch der intrakardiale Blutfluss und die Hämodynamik eine wichtige Rolle beim Wachstum des embryonalen und fetalen Herzens. So konnte gezeigt werden, dass eine Verringerung des Blutflusses im linken Ventrikel von Hühnchen-Embryonen zu einer reduzierten Proliferation der Kardiomyozyten und damit zu einem hypoplastischen Myokard führt (185). Interessanterweise kann dieser hypoplastische Phänotyp teilweise rückgängig gemacht werden, wenn der Blutfluss im linken Ventrikel anschließend wieder erhöht wird und damit die Proliferationsrate der Kardiomyozyten steigt (186). In diesem Zusammenhang ist bekannt, dass die Antworten auf Druck- oder Volumenbelastung sich im pränatalen im Vergleich zum adulten Herzen fundamental unterscheiden. Während das adult Herz mit Hypertrophie und damit einer Größenzunahme der Kardiomyozyten reagiert (siehe Kapitel 1.3.3.), führt eine Druckbelastung des linken Ventrikels in fetalen Schafen (187) und Meerschweinchen (188) sowie neugeborenen Ratten (189) zu einer Steigerung der Kardiomyozyten-Proliferation. Es scheint also, dass intrakardiale Druckverhältnisse und der Blutfluss im pränatalen Herzen maßgeblich die Proliferation der Kardiomyozyten und damit die Organogenese beeinflussen. Dies konnte kürzlich auch in fetalen Schafen bestätigt werden, bei denen der Blutfluss in den linken Ventrikel durch einen Katheter-basierten Verschluss des Foramen ovale im Vorhofseptum verringert wurde. Diese Intervention führt zu einem hypoplastischen linken Ventrikel aufgrund einer reduzierten Kardiomyozytenzahl (190).

Beim Menschen stellt das Hypoplastische Linksherzsyndrom (HLHS) eine der offensichtlichsten angeborenen Herzerkrankungen dar, die mit einer Entwicklungsstörung des linken Ventrikels einhergeht. Es besteht eine kombinierte Stenose oder Atresie der Aorten- und Mitralklappe sowie eine Unterentwicklung der linksseitigen Herzstrukturen, also des linken Ventrikels, des linken Vorhofs und des Aortenbogens. Der rechte Vorhof und der bei Links-Rechts-Shunt kompensatorisch vergrößerte rechte Ventrikel befinden sich auf Vorhofebene. Aus dem rechten Herzen wird arteriell-venöses Mischblut in die Pulmonal-Arterie und über einen offenen Ductus arteriosus in den Körperkreislauf gepumpt. Die Pathogenese der Erkrankung ist nicht eindeutig geklärt, und neben einem sekundären Phänomen als Folge einer veränderten intrakardialen Hämodynamik wurden auch primäre Veränderungen des kardialen Wachstums und der Kardiomyozyten-Proliferation diskutiert (191). So haben genetische Untersuchungen in Mäusen gezeigt, dass der Phänotyp eines HLHS durch gleichzeitige Veränderungen in mehreren Genen verursacht sein kann. Mutationen in einigen der bei Mäusen identifizierten Gene wurden auch bei Menschen mit HLHS gefunden, so dass man von einer komplexen, multigenetischen Erkrankung ausgehen muss (192). In den Mausstudien konnte in den Mutanten zumeist eine Reduktion der Kardiomyozyten-Proliferation gezeigt werden, was darauf hindeutet, dass der Phänotyp zumindest teilweise durch einen primären Wachstumsdefekt des Myokards bedingt ist.

### **2.3.2. Folgen einer intrauterinen Wachstumsrestriktion für das Herz im Tiermodell**

Wie bereits in Kapitel 2.3.1. erläutert, führt eine IUGR zu einem geringen Körpergewicht bei der Geburt mit einer meist proportionalen Reduktion der Herzgröße. Die Vermutung liegt nahe, dass Letzteres durch eine Inhibierung der Kardiomyozyten-Proliferation während der intrauterinen Entwicklung und damit durch eine Reduktion der Kardiomyozytenzahl bedingt ist. Beim Menschen gibt es hierzu praktisch keine Erkenntnisse, da histopathologische Untersuchungen aus Mangel an Myokard-Gewebe der grundsätzlich gesunden Kinder fehlen. Daher werden vor allem tierexperimentelle Techniken herangezogen, um die Auswirkungen einer IUGR auf das Herz bei der Geburt und im weiteren Verlauf des Lebens zu untersuchen (siehe Kapitel 1.4.4.). Neben Veränderungen der mütterlichen Ernährung während der Trächtigkeit (Kalorien- oder Protein-Restriktion) stehen hierfür experimentelle Modelle einer Plazentainsuffizienz oder einer fetalen Hypoxie zur Verfügung. Im Folgenden sollen die entsprechenden Erkenntnisse zu Auswirkungen gängiger IUGR-Modelle auf das Herz der Nachkommen diskutiert werden.

#### **2.3.2.1. Mütterliche Proteinrestriktion während der Trächtigkeit**

Eine Proteinrestriktion im mütterlichen Futter während der Trächtigkeit (üblicherweise 8% Protein in der „low protein diet“ (LPD) versus 22% in der „standard protein diet“ (SPD)) führt bei Ratten und Mäusen meist zu einer Reduktion des Körpergewichts der Nachkommen bei der Geburt. Proportional dazu ist das Herzgewicht reduziert, so dass das Herzgewicht/Körpergewicht-Verhältnis im Vergleich zu SPD-Tieren unverändert ist (193). Als Ursache für die geringere Herzgröße von LPD-Tieren bei der Geburt wird eine Reduktion der Kardiomyozytenzahl angenommen (87), die sich jedoch in den ersten Lebenswochen normalisiert, wenn die Tiere kurz nach der Geburt auf ein normales Futter umgestellt werden (194). Tatsächlich konnte in neonatalen Ratten auf einer LPD im Vergleich zu SPD-Tieren eine reduzierte Zellzyklus-Aktivität im Myokard nachgewiesen werden, gefolgt von einer gesteigerten Proliferationsrate am Tag 7 (195). Dies könnte zusammen genommen bedeuten, dass eine IUGR-bedingte Reduktion der Kardiomyozytenzahl durch eine kompensatorische Proliferation nach der Geburt ausgeglichen werden könnte (siehe Kapitel 2.3.4.). Im Gegensatz dazu zeigt eine Studie, dass adulte Tiere nach pränataler LPD eine Vergrößerung der Kardiomyozyten im Vergleich zu SPD-Kontrollen bei unverändertem Herzgewicht aufweisen (196). Dies wäre mit einer kompensatorischen Hypertrophie der Zellen bei reduzierter Kardiomyozytenzahl vereinbar (siehe Kapitel 2.3.4.). Tiere, die pränatal einer LPD-induzierten IUGR unterworfen waren und kurz nach der Geburt auf ein normales Futter gesetzt wurden, haben in einigen Studien auch im Erwachsenenalter ein reduziertes Körpergewicht (196-198), wobei dies nicht immer beobachtet wurde (193). Das Herzgewicht scheint dabei jedoch in jedem Fall normal zu sein (196-198). Im adulten Myokard nach pränataler LPD zeigt sich eine leicht erhöhte interstitielle Fibrose mit einem Anstieg der Fibroblastenzahl (197-199) sowie eine erhöhte Dichte an Kapillaren und intramyokardialen Arterien (199). Diese adulte LPD-Herzens entwickeln darüber hinaus funktionelle Veränderungen im Vergleich zu SPD-Kontrollen, die sich in einer reduzierten Kontraktilität und einer Dilatation des linken Ventrikels äußern (199, 200). Eine wichtige Frage im Hinblick auf die durch ein Developmental Programming möglicherweise erhöhte Krankheitsanfälligkeit von adulten Tieren nach IUGR ist die Reaktion von adulten LPD-Herzen auf pathologische Bedingungen. Hierzu werden üblicherweise die Folgen einer Ischämie/Reperfusion (I/R) am ex vivo schlagenden Herzen untersucht. Das adulte Herz wird dafür entnommen und mit einer Aorten-Kanüle an einer Langendorff-Apparatur mit einem Sauerstoff-begasten und auf 37°C vorgewärmten Puffer retrograd perfundiert. Auf diese Weise kann das Herz außerhalb des Körpers für einige Stunden schlagen, wobei ein mit einem Druckmesser verbundener



Ballon im linken Ventrikel die Beurteilung der Kontraktionskraft erlaubt. Nach einer Äquilibrationsphase wird durch das Abschalten der Perfusion für üblicherweise 30 Minuten eine globale Ischämie induziert, während der das Herz aufhört zu schlagen und die Kraftentwicklung des Ventrikels auf 0 sinkt. Nachdem die Perfusion wieder gestartet wurde, beginnt das Herz erneut zu kontrahieren und die Kraft des linken Ventrikels steigt, erreicht aufgrund des Ischämie/Reperfusions-Schadens aber nicht mehr das Niveau in der Äquilibrationsphase. Die Differenz der Kontraktionskraft vor und nach der Ischämie wird als das Maß für die Erholung des linken Ventrikels und damit indirekt für das Ausmaß des myokardialen Schadens gewertet. Mit Hilfe dieser Technik konnte gezeigt werden, dass adulte Rattenherzen nach LPD-induzierter IUGR eine schlechtere Erholung des linken Ventrikels nach I/R im Vergleich zu Kontrollen zeigten (201, 202). Diese reduzierte Ischämie-Toleranz war teilweise in Männchen stärker ausgeprägt als in Weibchen, was auf geschlechtsspezifische Mechanismen des Developmental Programming hindeutet (siehe Kapitel 2.6.7.). Zusammenfassend kann man festhalten, dass das LPD-Modell einer IUGR zwar eine Reihe kontroverser Studienergebnisse geliefert hat (siehe Kapitel 2.6.5.), dass sich aber dennoch einige Eckpunkte zu bestätigen scheinen. Demnach führt eine LPD während der Trächtigkeit zu einer Verringerung des Körper- und Herzgewichts bei der Geburt, letzteres möglicherweise aufgrund einer reduzierten Kardiomyozytenzahl. Im adulten Herzen führt die pränatale LPD zu einem myokardialen Gewebeumbau, einer Beeinträchtigung der Herzfunktion und zu einer reduzierten Ischämie-Toleranz.

### **2.3.2.2. Mütterliche Kalorienrestriktion während der Trächtigkeit**

Eine Kalorienrestriktion in der mütterlichen Ernährung wird in verschiedenen Spezies durch eine Reduktion des täglichen Futterangebots auf 50% bis 70% im Vergleich zu Kontrolltieren durchgeführt. Im Detail unterscheiden sich die verwendeten Protokolle darüber hinaus in dem Zeitfenster der Trächtigkeit, in dem die Kalorienrestriktion angewendet wird. Die unterschiedlichen Kombinationen aus Spezies, Grad der Futter-Reduktion und variablen Zeitintervallen resultieren in einem etwas unklaren Gesamtbild darüber, welche Auswirkungen eine Kalorienrestriktion tatsächlich auf das Herz der Nachkommen hat (siehe auch Kapitel 2.6.5.). So zeigt sich in adulten Pavianen, deren Mütter während der Trächtigkeit und Säugezeit einer Kalorienrestriktion ausgesetzt waren, im linken Ventrikel eine Reduktion der Wanddicke, der Kontraktilität und des Herzminutenvolumens, während das enddiastolische Volumen erhöht ist und das Herz insgesamt eine globuläre Form annimmt (ähnlich wie im menschlichen IUGR- Herzen, siehe Kapitel 1.4.3.) (203). Ähnliche funktionelle Einschränkungen sind auch im rechten Ventrikel von IUGR-Pavianen nachweisbar (204). In adulten Schafen nach mütterlicher Kalorienrestriktion im mittleren Drittel der Trächtigkeit zeigt sich im Vergleich zu Kontrolltieren eine vermehrte myokardiale Fibrose und eine erhöhte Querschnittsfläche der Kardiomyozyten sowohl im linken als auch rechten Ventrikel (205). Ob Letzteres einer kompensatorischen Hypertrophie bei insgesamt reduzierter Kardiomyozytenzahl entspricht, ist jedoch unklar.

In Ratten führt eine mütterliche Kalorienrestriktion während der zweiten Hälfte der Trächtigkeit zu einem reduzierten Körpergewicht bei der Geburt. Durch postnatales Aufholwachstum zeigen diese IUGR-Tiere im Erwachsenenalter jedoch ein erhöhtes Körpergewicht mit relativ dazu kleineren Herzen im Vergleich zu Kontrollen (206). Eine Kalorienrestriktion, die nach der Geburt für den Verlauf der Säugezeit begonnen wird, führt zu adulten Nachkommen mit normalem Körpergewicht aber ebenfalls relativ dazu kleineren Herzen (206). Diese Daten deuten darauf hin, dass das Wachstum sowohl des fetalen als auch postnatalen Herzens auf eine normale Kalorienzufuhr angewiesen ist. Adulte Ratten nach mütterlicher Kalorienrestriktion zeigen darüber hinaus Veränderungen des Calcium-

Handlings und der Kraftentwicklung am isolierten Papillarmuskel des linken Ventrikels (207) sowie eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber einer Ischämie/Reperfusion (208).

In Meerschweinchen, deren Mütter während der zweiten Hälfte der Trächtigkeit einer 70% Kalorienrestriktion ausgesetzt waren und die daher ein geringeres Geburtsgewicht im Vergleich zu Kontrollen aufweisen, zeigt sich im Erwachsenenalter ein normales Herz- und LV-Gewicht sowie eine normale Anzahl an Kardiomyozyten (209). In adulten Meerschweinchen nach einer 70% Kalorienrestriktion während der ersten Hälfte der Trächtigkeit kommt es zu einem leicht reduzierten Herzgewicht in weiblichen aber nicht in männlichen Nachkommen (210). Interessanterweise haben Meerschweinchen, bei denen die Kalorienrestriktion die erste Hälfte der Trächtigkeit überspannte, im fortgeschrittenen Alter zwar eine normale Herzfunktion, gleichzeitig aber einen erhöhten arteriellen Blutdruck sowie eine erhöhte Wanddicke und Masse des linken Ventrikels (211). Diese Veränderungen des linken Ventrikels nicht aber des Blutdrucks blieben auch in der Folgegeneration (F2) bestehen, ohne dass diese F2-Tiere selbst einer IUGR ausgesetzt waren. Derartige Daten deuten darauf hin, dass es tatsächlich ein Programming des postnatalen kardialen Wachstums gibt, das unabhängig von Blutdruckveränderungen ist und über mindestens eine Generation weitergegeben werden kann.

Eine mütterliche Kalorienrestriktion in Mäusen während der zweiten Hälfte der Trächtigkeit führt in den adulten Nachkommen im Vergleich zu Kontrollen zu einem erhöhten Herzgewicht und einer Hypertrophie der Kardiomyozyten, was aber vor allem auf eine Aktivierung des Renin-Angiotensin-Systems und eine dadurch bedingte Erhöhung des arteriellen Blutdrucks zurückgeführt wurde (212). Eine weitere Studie, bei der eine Kalorienrestriktion während der letzten beiden Trimester angelegt wurde, ergab keine wesentlichen Veränderungen der Herzfunktion in adulten Nachkommen (213).

Über die Auswirkungen einer mütterlichen Kalorienrestriktion unmittelbar auf das embryonale, fetale oder neonatale Herz ist wenig bekannt. In fetalen Schafen führt eine Kalorienrestriktion der Muttertiere während des letzten Viertels der Trächtigkeit zu einer normalen Herzgröße kurz vor der Geburt, wobei jedoch eine vermehrte Fibrosierung des rechten Ventrikels beobachtet wurde (214). In Meerschweinchen mit einem komplexen Regime einer mütterlichen Kalorienrestriktion zeigten sich in Föten wenige Tage vor der Geburt keine Veränderungen des Herzgewichts. Etwa drei Wochen nach der Geburt und im Erwachsenenalter ist das Herzgewicht in den IUGR-Tieren im Vergleich zu Kontrollen jedoch leicht reduziert (215). Dieselbe Studie postuliert darüber hinaus, dass eine mütterliche Kalorienrestriktion die Zahl der Kardiomyozyten im fetalen, juvenilen und adulten Herzen reduziert und ihr Volumen erhöht. Gleichzeitig ist demnach die Zellzyklus-Aktivität im fetalen und juvenilen Herzen bei Kalorienrestriktion erhöht, ebenso wie die Zelltod-Rate im fetalen Herzen (215). Sämtliche histologischen bzw. zellulären Daten müssen allerdings aufgrund von fragwürdiger oder zumindest unzuverlässiger Methodik mit Vorsicht betrachtet werden.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass eine mütterliche Kalorienrestriktion während der Trächtigkeit im Tiermodell trotz Verwendung unterschiedlicher Spezies und Protokolle in den erwachsenen Nachkommen zu Veränderungen der Herzfunktion, der Herzgröße, des Kardiomyozyten-Volumens und der myokardialen Gewebezusammensetzung führen kann. Ob dies jedoch in ursächlichem Zusammenhang mit einer reduzierten Kardiomyozytenzahl bei der Geburt steht, ist nicht abschließend geklärt.

### **2.3.2.3. Experimentelle Induktion einer Plazentainsuffizienz**

Ein suffizienter Austausch von Sauerstoff und Nährstoffen zwischen mütterlichem und fetalem Kreislauf über die Plazenta ist essentiell für ein adäquates Wachstum und eine normale Entwicklung des Herzens (216). Eine Plazentainsuffizienz wird in Schafen

üblicherweise durch eine Karunktektomie oder eine Teil-Embolisation der Plazenta induziert (siehe Kapitel 1.4.4.), wobei Letzteres mit einer erhöhten Nachlast des fetalen Herzens und dadurch mit sekundären Effekten aufgrund der Druckbelastung verbunden sein kann. Studien unter Anwendung der Embolisation ohne Blutdruckanstieg im fetalen Kreislauf haben gezeigt, dass die so induzierte Plazentainsuffizienz zu einer Verzögerung der terminalen Differenzierung und gleichzeitig zu einer reduzierten Zellzyklus-Aktivität fetaler Kardiomyozyten führt (217, 218). Eine Plazentainsuffizienz nach Karunktektomie führt zu kleineren fetalen Herzen mit einer reduzierten Kardiomyozytenzahl trotz unveränderter Zellzyklus-Aktivität im Vergleich zu Kontrollen (89, 219). Die Kardiomyozyten sind jedoch kleiner und zeigen, wie in den Embolisations-Studien auch, eine Verzögerung der terminalen Differenzierung (219). Interessanterweise persistiert das reduzierte Herzgewicht in Schafen nach Plazentainsuffizienz bis ins Erwachsenenalter, auch wenn dies nicht durch eine reduzierte Kardiomyozytenzahl oder –größe erklärt werden kann (220). Allerdings zeigt diese Studie, dass die Kardiomyozytenzahl im adulten Herzen des Schafes generell mit dem Geburtsgewicht korreliert (unabhängig von einer IUGR): Tiere mit hohem Geburtsgewicht haben im Erwachsenenalter mehr linksventrikuläre Kardiomyozyten (220).

In Nagern wird eine Plazentainsuffizienz durch die Ligation der Arteria uterina in der späten Fetalphase induziert (siehe Kapitel 1.4.4.). Dies führt in fetalen Kaninchen zu einer insgesamt globulären Morphologie des Herzens sowie zu Veränderungen des Koronargefäß-Systems (221). In Ratten führt eine Plazentainsuffizienz zu kleineren Herzen bei der Geburt und zu einer reduzierten Kardiomyozytenzahl am Tag 7, die allerdings normalisiert werden kann, wenn nach der Geburt ein normales Nährstoffangebot herrscht (88). Darüber hinaus verändert eine Plazentainsuffizienz die Expression einer Vielzahl von metabolisch relevanten Genen im Herzen der Nachkommen, was einen Hinweis auf ein tatsächlich stattgefundenes Developmental Programming geben könnte (222). Schließlich führt eine Ligation der Arteria uterina in Mäusen am Tag 18 zu Einschränkungen der linksventrikulären Kontraktilität der Nachkommen im Erwachsenenalter im Vergleich zu Kontrollen (223). Dies kann jedoch verhindert werden, wenn die Föten nach Induktion der Plazentainsuffizienz intrauterin mit dem Wachstumsfaktor IGF-1 (insuline like growth factor 1) behandelt werden. Die IGF-1 Gabe normalisiert dabei das Geburtsgewicht und führt zu einer normalen Herzgröße und –funktion in den adulten Nachkommen trotz Plazentainsuffizienz (223).

Untersuchungen zur Stress-Anfälligkeit von postnatalen Herzen nach Plazentainsuffizienz sind rar. Lediglich eine Studie in Schafen, bei der die in dieser Spezies selten angewendete Ligation der Arteria uterina genutzt wurde, zeigt eine erhöhte Anfälligkeit neonataler Herzen gegenüber einer Ischämie/Reperfusion im Vergleich zu Kontrollen (224).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass eine experimentell induzierte Plazentainsuffizienz im Tiermodell zu einer Reduktion der Herzgröße bei der Geburt führt. Darüber hinaus scheinen sowohl Anzahl, Größe und Differenzierungsgrad der Kardiomyozyten unter diesen IUGR-Bedingungen reduziert zu sein.

#### **2.3.2.4. Mütterliche Hypoxie während der Trächtigkeit**

Eine intrauterine Hypoxie wird im Tiermodell vor allem in Ratten aber auch in Mäusen durchgeführt, indem die Muttertiere über einen bestimmten Zeitraum der Trächtigkeit in Kammern mit reduziertem Luftsauerstoff (meist 10-11% anstatt 21%) gehalten werden. In Mäusen gibt es dabei eine unterschiedliche Anfälligkeit der Embryonen bzw. Föten gegenüber Hypoxie: die höchste Letalität zeigte sich im Stadium 12-13 dpc, während frühere und spätere Stadien weniger anfällig waren. Eine Hypoxie für 24h führt am Tag 12.5 dpc zu einer Hypoplasie des ventrikulären Myokards mit dünnen Wänden sowie einer reduzierten Zellzyklus-Aktivität der Kardiomyozyten (225). In Ratten resultiert eine mütterliche Hypoxie

von Tag 15 bis 21 in dünneren linksventrikulären Wänden in den Föten und den Nachkommen am Tag 7 im Vergleich zu Kontrollen. Gleichzeitig kommt es in beiden Stadien zu einer Reduktion der Zellzyklus-Aktivität sowie am Tag 7 zu einer vermehrten Bildung von extrazellulärer Matrix im Myokard (226). Im fetalen Rattenherzen erhöht die Hypoxie außerdem die Apoptose-Rate im Myokard (227). Wiederholte kurze Phasen von Hypoxie in neugeborenen Ratten in den ersten drei Tagen nach der Geburt reduzieren die Zellzyklus-Aktivität und die Zahl der Kardiomyozyten bis zum Tag 14 (90). Diese Studien legen nahe, dass hypoxische Bedingungen während der embryonalen, fetalen und auch der unmittelbar postnatalen Phase die Proliferation und damit die Zahl der Kardiomyozyten reduzieren. In der Tat persistiert ein derartiges Kardiomyozyten-Defizit bis ins Erwachsenenalter, da adulte Meerschweinchen nach intrauteriner Hypoxie eine reduzierte Kardiomyozytenzahl aufweisen (209). Dieser Effekt wurde jedoch nur in weiblichen nicht aber in männlichen Tieren beobachtet, was auf geschlechtsspezifische Unterschiede beim kardialen Wachstum und beim Developmental Programming hindeutet (siehe Kapitel 2.6.7.). Auch in Hühnern resultiert eine Hypoxie während der zweiten Hälfte der Entwicklung kurz vor der Geburt in hypoplastischen Herzen mit reduzierter ventrikulärer Wanddicke, vermehrter Ablagerung von extrazellulärer Matrix, einer Dilatation des linken Ventrikels und einer Einschränkung der Kontraktilität (228). Diese Veränderungen persistieren bis ins Erwachsenenalter.

Eine Exposition von Mausembryonen gegenüber Hypoxie verursacht jedoch nicht nur einen hypoplastischen kardialen Phänotyp, sondern fördert auch die Entstehung von strukturellen Herzdefekten. So führt eine mütterliche Hypoxie (5,5% Luftsauerstoff für 8h) in den Stadien 7.5 bis 10.5 dpc zu unterschiedlichen Herzfehlern am Tag 17.5, darunter vor allem ventrikuläre Septumdefekte und Ausflusstrakt-Malformationen (229). Diese Veränderungen gehen mit einer reduzierten Proliferationsrate im sekundären Herzfeld und im Ausflusstrakt-Myokard einher (229, 230). Darüber hinaus erhöht eine kurzzeitige Hypoxie während der Embryonalentwicklung die Inzidenz und die Ausprägung von strukturellen Herzdefekten in Mäusen mit Gen-Mutationen, die bekanntermaßen für Herzfehler prädisponieren (231). Folglich beeinflusst eine Hypoxie während der intrauterinen Entwicklung nicht nur das Größenwachstum sondern auch die strukturelle Morphogenese des Herzens.

Die Auswirkungen einer fetalen Hypoxie auf die Morphologie, Gewebezusammensetzung, Funktion und Stressanfälligkeit des adulten Herzens wurde in einer Reihe von Studien vor allem in Ratten untersucht. Im Alter von 1 Jahr (aber noch nicht nach 4 Monaten) entwickeln Ratten nach fetaler Hypoxie Zeichen einer diastolischen Dysfunktion bei erhaltener Kontraktilität (232). Zu beiden Zeitpunkten ist jedoch die Anfälligkeit gegenüber einer Ischämie/Reperfusion im Vergleich zu Kontrollen erhöht (233). Weitere Studien bestätigten eine schlechtere Erholung der linksventrikulären Funktion nach Ischämie und Reperfusion in Ratten nach fetaler Hypoxie im Vergleich zu Kontrollen (208, 234). Es wurde dabei postuliert, dass diese erhöhte Anfälligkeit durch eine Hypoxie-bedingte fetale Programmierung der Angiotensin-2-Rezeptor Expression bedingt sein könnte, da eine pharmakologische Inhibierung des AT2-Rezeptors die Erholung hypoxischer Herzen nach I/R verbessert (235). Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass das Tiermodell einer mütterlichen Hypoxie während der Trächtigkeit überzeugende Daten liefert, dass durch diese Behandlung das Wachstum und die Morphogenese des embryonalen und fetalen Herzens negativ beeinflusst und die Krankheitsanfälligkeit im Erwachsenenalter erhöht wird.

### **2.3.3. Die Auswirkungen von Frühgeburt auf das Herz**

Neben einer intrauterinen Wachstumsrestriktion gibt es ein weiteres Szenario, bei dem Kinder mit geringem Geburtsgewicht zur Welt kommen, nämlich nach Frühgeburt. Heutzutage liegt die Überlebenswahrscheinlichkeit von Frühgeburten in den westlichen

Industrienationen ab der 30. Schwangerschaftswoche (SW) bei über 90% und selbst ab der 24. SW noch bei 70% (236). Damit stelle sich die dringende Frage, welche Auswirkungen der vorzeitige Abbruch der intrauterinen Entwicklung auf das Herz hat, sowohl unmittelbar nach der Geburt als auch im Kindes- oder Erwachsenenalter. Betrachtet man die Mechanismen des prä- im Vergleich zum postnatalen Wachstum des Herzens (siehe Kapitel 1.3.), so induziert die Exposition gegenüber einer extrauterinen Umgebung den Zellzyklus-Arrest in Kardiomyozyten und beendet somit das proliferative Wachstum. Auch wenn der genaue Zeitpunkt dieser Umstellung beim Menschen bisher nicht feststeht, so hat die perinatale Zellzyklus-Regulation von Kardiomyozyten wichtige Implikationen für das Herz bei frühgeborenen Kindern. Die entscheidende Frage hierbei ist, ob die Kardiomyozyten-Proliferation tatsächlich mit der vorzeitigen Geburt (sei es auf natürlichem Wege oder per Kaiserschnitt) und damit unmittelbar mit der Exposition gegenüber einer extrauterinen Umgebung abnimmt. Eine kürzlich veröffentlichte Studie legt dies in der Tat nah: die Proliferation von Kardiomyozyten in frühgeborenen Babys wird abrupt und praktisch sofort nach der Geburt eingestellt (237). Die Interpretation dieser Daten wird allerdings dadurch erschwert, dass kardiales Autopsie-Gewebe von Kindern verwendet wurde, die an unterschiedlichen Tagen nach der Frühgeburt verstorben sind, während die Kinder in der Kontrollgruppe tot geboren wurden (237). Es lässt sich also nicht ausschließen, dass die jeweiligen Grunderkrankungen, die zum Tode der Kinder geführt haben, oder aber Unterschiede bei der Gewebeentnahme und -aufbereitung einen Einfluss auf die Daten haben. Dennoch drängt sich aufgrund der Studie umso mehr die Frage auf: Muss ein frühgeborenes Kind mit dem Satz an Kardiomyozyten auskommen, mit dem es geboren wird? Oder kann die Proliferation von Kardiomyozyten nach der Geburt ein mögliches Defizit noch ausgleichen? Dies ist nicht nur wichtig für die Funktion des Herzens direkt nach der Geburt, sondern auch im weiteren Verlauf des Lebens. Eine reduzierte Kardiomyozytenzahl, sei es durch IUGR (siehe Kapitel 2.3.2.) oder möglicherweise durch Frühgeburt, wird als ein Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen im Erwachsenenalter angesehen (238).

Beim Menschen hat eine Frühgeburt Auswirkungen auf die Größe, das Wachstum sowie die Funktion des Herzens im Kindesalter. Bei Frühgeburten nach der 30. SW zeigt sich direkt nach der Geburt ein globuläres Herz mit verringerter Masse, die sich jedoch in den ersten Monaten nach der Geburt normalisiert und bezogen auf das Körpergewicht im Vergleich zu regulär geborenen Kindern nach 3 Monaten sogar erhöht ist (239). Einige Parameter der Herzfunktion und des intrakardialen Blutflusses sind direkt nach der Geburt bei frühgeborenen Kindern im Vergleich zu Kontrollen unterschiedlich, jedoch normalisieren sich die Werte in den ersten Lebensmonaten weitestgehend (240, 241). Bei Kindern, die vor der 30. SW geboren wurden, zeigen sich jedoch einen Monat nach der Geburt Zeichen einer diastolischen Dysfunktion bei erhaltener Kontraktilität des linken Ventrikels (242). Kardiale Veränderungen persistieren bis ins Kleinkindesalter (6 Jahre), so dass bei extrem früh geborenen Kindern eine Reduktion der Herzmasse sowie systolische und diastolische Funktionseinschränkungen beobachtet wurden (243). Auch im Erwachsenenalter zeigen sich Konsequenzen einer Frühgeburt am Herzen, vor allem eine Erhöhung der linksventrikulären Masse, eine abgerundete Form sowie eine systolische und diastolische Dysfunktion (244). Im rechten Ventrikel lässt sich dabei ein kleineres enddiastolisches Volumen, eine erhöhte Masse und eine verringerte Kontraktilität nachweisen (245). Unter körperlicher Belastung zeigen Erwachsene nach Frühgeburt eine deutlich schlechtere Anpassung der Herzleistung, was sich bei submaximaler Belastung in einem geringeren Herzminutenvolumen und einer schlechteren Kontraktilität im Vergleich zu Kontrollen äußert (246). Dies deutet insgesamt auf eine reduzierte funktionelle Reserve des Herzens nach Frühgeburt hin. Schließlich besteht eine inverse Korrelation zwischen dem Zeitpunkt einer Frühgeburt und dem Risiko,

im Kindes- oder Erwachsenenalter eine Herzinsuffizienz zu entwickeln. Dieses Risiko steigt bei Frühgeburten vor der 32. SW stark an (247). Zusammenfassend gibt es also deutliche Hinweise darauf, dass eine Frühgeburt beim Menschen Auswirkungen auf die Größe, das Wachstum und die Funktion des Herzens nach der Geburt hat.

Grundlagenwissenschaftliche Erkenntnisse zu den Folgen einer Frühgeburt auf das Herz sind rar. Dies liegt vor allem daran, dass sich nur wenige Tiermodelle für die Induktion einer experimentellen Frühgeburt eignen. Die gängigsten Spezies für die routinemäßige Forschung, nämlich Nager wie Mäuse und Ratten, haben sehr kurze Gestationszeiten (Mäuse etwa 21 und Ratten etwa 23 Tage), und die Jungtiere kommen sehr unreif zu Welt. Verschiedene Schritte der Organogenese finden in diesen Spezies nach der Geburt statt, so dass sie nach Frühgeburt nicht lebensfähig sind. So hat sich zum Beispiel in Mäusen gezeigt, dass die Nachkommen nicht überleben, wenn sie auch nur einen Tag vor dem frühestmöglichen Geburtszeitpunkt (also am Tag 17.5 dpc) per Kaiserschnitt entwickelt werden (248). Zwar gibt es experimentelle Vorgehensweisen, um eine Frühgeburt in Mäusen und Ratten zu induzieren, allerdings zielen derartige Studien auf die Untersuchungen der Vorgänge im mütterlichen Organismus ab, die zur vorzeitigen Einleitung der Geburt führen (249). Da die Nachkommen diese Prozeduren nicht überleben, können die Auswirkungen auf deren Organe im Verlauf der postnatalen Entwicklung nicht analysiert werden.

Die wenigen verfügbaren Studien zu den Folgen einer Frühgeburt für die Nachkommen stammen aus Großtier-Modellen wie Schafen. Letztere haben eine Gestationszeit von 145 bis 150 Tagen, und man kann die Lämmer 14 Tage zuvor durch Einleitung der Geburt oder durch Kaiserschnitt zur Welt bringen. In Schafen resultiert eine derartige experimentelle Frühgeburt in einem Umbau des Herzgewebes neun Wochen nach der Geburt, charakterisiert durch eine erhöhte myokardiale Fibrose. Während nach Frühgeburt das Herzgewicht und –volumen, die Wanddicke der Ventrikel sowie die Anzahl der Kardiomyozyten im rechten und linken Ventrikel unverändert ist, zeigen diese eine Hypertrophie sowie eine erhöhte Kernzahl bzw. einen erhöhten DNA-Gehalt im Vergleich zu Kontrollen (250). Im frühen Erwachsenenalter (14 Monate) führt eine Frühgeburt in Schafen zu deutlichen Veränderungen vor allem des rechten Ventrikels, was sich in einer dünnen Wand und einer reduzierten Kardiomyozytenzahl äußert (251).

Zusammenfassend führt eine Frühgeburt beim Menschen zu deutlichen morphologischen und funktionellen Veränderungen im postnatalen Herzen, deren zellulären und molekularen Grundlagen auch aus Mangel an tierexperimentellen Daten weitestgehend unklar sind.

#### **2.3.4. Kompensation einer kardialen Hypoplasie nach der Geburt**

Wie im vorherigen Abschnitt erläutert, kann eine Hypoplasie des Herzens bei der Geburt durch eine Vielzahl unterschiedlicher Faktoren verursacht werden. Eine wichtige Frage ist dabei, welche Mechanismen dem Herzen im weiteren Verlauf des Lebens zur Verfügung stehen, um trotz reduzierter Kardiomyozytenzahl eine normale Herzfunktion sowohl unter Basal- als auch unter Stressbedingungen aufrechtzuerhalten. Diese Zusammenhänge haben wir mit Hilfe der embryonalen Herzregeneration im *Hccs*-KO-Modell ausgiebig untersucht (siehe Kapitel 4.3.). Es erscheint unwahrscheinlich, dass die Bildung eines Herzens aus nur 50% der während der Embryonalentwicklung dafür vorgesehen Kardiomyozyten ohne Folgen bleibt. In der Tat haben wir festgestellt, dass *cHccs*<sup>+/-</sup> Mäuse bei der Geburt ein geringeres absolutes Herzgewicht sowie ein reduziertes Herzgewicht zu Körpergewicht Verhältnis im Vergleich zu Kontrollen aufweisen. Morphologisch zeigen sie dünnere ventrikuläre Wände bei jedoch erhaltener kontraktile Funktion. Die reduzierte Herzgröße ist dabei auf eine um etwa 25% reduzierte Zahl der Kardiomyozyten zurückzuführen, deren Größe bei der Geburt im Vergleich zu Kontrollen jedoch unverändert ist. Dieser Phänotyp entspricht dem Bild einer

kardialen Hypoplasie. Bis zum Alter von 12 Wochen normalisiert sich das Herzgewicht der *cHccs*<sup>+/-</sup> Tiere im Vergleich zu Kontrollen, und auch die kardiale Morphologie ist zu dem Zeitpunkt nicht mehr zu unterscheiden. Diese Normalisierung der Organgröße ist darauf zurückzuführen, dass die Kardiomyozyten im Verlauf des postnatalen Wachstums größer werden, während es keinen Anhalt für eine Normalisierung ihrer Zahl gibt. Das Herz reagiert auf eine Hypoplasie bei der Geburt demnach mit einer kompensatorischen Hypertrophie der Kardiomyozyten, um so die Organgröße bis ins Erwachsenenalter zu normalisieren.

Verschiedene Studien haben ähnliche Beobachtung gemacht. So korreliert die Größe der Kardiomyozyten bei einer Hypoplasie des postnatalen Herzens der Maus direkt mit dem Grad der Zellzahl-Reduktion (252). Diese Studie hat dabei evaluiert, dass bei Mäusen eine Mindestanzahl von etwa 5 Millionen Kardiomyozyten nötig ist, um im adulten Herzen eine Größenzunahme der Zellen zu verhindern. Wird diese kritische Schwelle unterschritten, dann setzt eine zum Ausmaß der Zellzahl-Verringerung exponentielle Hypertrophie der Kardiomyozyten ein (252). Andere Maus-Modelle mit einer gestörten Herzentwicklung bestätigen, dass eine Hypoplasie des neonatalen Herzens zu einer kompensatorischen Hypertrophie der Kardiomyozyten im Erwachsenenalter führt (253). Reicht diese jedoch nicht aus, um die myokardiale Masse zu normalisieren, so kommt es zu Einschränkungen der Kontraktilität (253). Gelegentlich wird unter experimentellen Bedingungen im adulten Herzen eine Vergrößerung der Kardiomyozyten bei unverändertem Herzgewicht beobachtet, ohne dass dabei die Kardiomyozytenzahl bestimmt wurde (196). In solchen Fällen muss man nach jetziger Erkenntnis davon ausgehen, dass die Kardiomyozytenzahl reduziert ist (51). Dies betrifft auch unsere eigenen Daten zur Inhibierung des mTORC1-Signalwegs im fetalen Herzen (siehe Kapitel 4.4.). Die pränatale Rapamycin-Behandlung führt in den adulten Nachkommen zu einem deutlichen Anstieg des Kardiomyozyten-Volumens bei normalem Herzgewicht, so dass sich rechnerisch eine signifikante Reduktion der Zellzahl ergibt. Auch in der entgegengesetzten Richtung ist diese Korrelation vermutlich gültig, so dass bei einer Erhöhung der Kardiomyozytenzahl im postnatalen Herzen deren Größe reduziert ist. Unsere eigenen Studien zu den Auswirkungen einer Proteinrestriktion auf das neonatale und adulte Herz legen dies nahe (siehe Kapitel 4.5.). Nach intrauteriner und postnataler LPD ist das Kardiomyozyten-Volumen im adulten Herzen im Vergleich zu Kontrollen deutlich reduziert bei jedoch vergleichbarem Herzgewicht. Auch wenn die rechnerische Bestimmung der Kardiomyozytenzahl hier keinen statistisch signifikanten Unterschied gezeigt hat, so ist diese doch im Trend erhöht. Andere Studien zeigen, dass eine erhöhte Zahl an Kardiomyozyten mit einer reduzierten Größe korreliert (120, 254-256). Man kann daher zusammenfassend feststellen, dass eine gestörte Herzentwicklung, die zu einer reduzierten Kardiomyozytenzahl bei der Geburt führt, durch eine erstaunliche Wachstumsplastizität des postnatalen Herzen ausgeglichen werden kann. Das postnatale Herz kann dabei durch eine Anpassung des hypertrophen Wachstums die Organgröße in engen Grenzen konstant halten.

### **2.3.5. Auswirkungen von pathologischen Bedingungen auf das adulte Herz nach neonataler Hypoplasie**

Das Herz kann eine Reduktion der Kardiomyozytenzahl bei der Geburt durch eine kompensatorisch gesteigerte Hypertrophie der Zellen ausgleichen, um so unter Basisbedingungen eine normale Organgröße und Herzfunktion im Erwachsenenalter zu gewährleisten (siehe Kapitel 2.3.4.). Eine entscheidende Frage ist, ob und wenn ja wie diese Kompensationsmechanismen auch unter pathologischer Belastung funktionieren. Eine Reihe von Studien hat eine erhöhte Anfälligkeit des Herzens nach IUGR gegenüber einer Ischämie/Reperfusion gezeigt (siehe Kapitel 2.3.2.). In den seltensten Fällen wurde dies jedoch direkt mit einer reduzierten Kardiomyozytenzahl in Verbindung gebracht, da diese in

den entsprechenden Studien nicht bestimmt wurde. Dennoch wurde für einige der gängigen IUGR-Modelle postuliert, dass die Herzen bei der Geburt hypoplastisch seien (87-90). Demnach wurde die Hypothese aufgestellt, dass die erhöhte Krankheitsanfälligkeit des postnatalen Herzens nach IUGR auf eine gestörte Herzentwicklung mit einer reduzierten Kardiomyozytenzahl bei der Geburt zurückzuführen sei (257, 258). Ein eindeutiger wissenschaftlicher Nachweis hierfür fehlt jedoch bis heute, da das Design und die Datenerhebung der meisten Studien hierzu keine direkten Rückschlüsse erlauben.

Wir haben das *Hccs*-KO-Modell genutzt, um dieser Frage nachzugehen (siehe Kapitel 4.3.). *cHccs*<sup>+/-</sup> Mäuse, die bei der Geburt ein hypoplastisches Herz aufweisen, wurden im Erwachsenenalter einer neurohumoralen Stimulation mittels Angiotensin II (Ang II) Infusion für 14 Tage ausgesetzt. Ang II führt zum einen zu einer Druckbelastung des linken Ventrikels aufgrund eines systemischen Blutdruckanstiegs, zum anderen zu einer direkten hypertrophen Wirkung an Kardiomyozyten. Die Herzfunktion ist in *cHccs*<sup>+/-</sup> Mäusen nach der Ang II Behandlung im Vergleich zu Kontrollen nicht eingeschränkt. Aufgrund einer überproportionalen Hypertrophie der Kardiomyozyten ist das *cHccs*<sup>+/-</sup> Herz in der Lage, auch unter Belastung eine adäquate Größe und Kontraktilität aufrechtzuerhalten. Die überschießende Hypertrophie der Kardiomyozyten ist dabei vom JAK/STAT3-Signalweg abhängig. Dessen pharmakologische Inhibierung behindert die hypertrophe Antwort der *cHccs*<sup>+/-</sup> Herzen unter Ang II und führt so zu einer eingeschränkten Herzfunktion im Vergleich zu identisch behandelten Kontrollen. Diese Daten legen nahe, dass die Anpassung und Plastizität des hypertrophen Wachstums im adulten Herzen nach neonataler Hypoplasie essentiell für die Aufrechterhaltung der Kontraktilität unter Stress ist. Wird das kompensatorische Zellwachstum dagegen unterdrückt, so führt dies zu einer Verringerung der Stresstoleranz und zu Einschränkungen der Herzfunktion. Dies könnte wichtige Implikationen für das Developmental Programming bei Kindern mit geringem Geburtsgewicht haben. Wenn deren kardiale Krankheitsanfälligkeit im Alter tatsächlich durch eine Reduktion der Kardiomyozytenzahl bei der Geburt bedingt ist, dann würde jegliche Inhibierung von zellulären Wachstumsprozessen die Kompensationsfähigkeit und damit die Stresstoleranz des Herzens verringern. Zu solchen negativen Einflussfaktoren könnten Medikamente (z.B. Tumortherapeutika oder Immunmodulatoren) und Drogen aber auch die Ernährung (z.B. Nahrungsmangel oder einseitige Fehlernährung) und Stoffwechselerkrankungen (wie Diabetes mellitus) zählen. Damit wäre die Reduktion der Kardiomyozytenzahl im Herzen ein zusätzlicher Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen im Alter.

Neben der Ang II Infusion haben wir in *cHccs*<sup>+/-</sup> Mäusen ein zweites kardiales Stressmodell untersucht, nämlich eine Einengung („Banding“) der abdominalen Aorta auf 50% ihres Durchmessers (siehe Kapitel 4.3.). Dies führt über eine erhöhte Nachlast zu einer Druckbelastung des linken Ventrikels, der gegen einen erhöhten Widerstand pumpen muss. Überraschenderweise zeigen *cHccs*<sup>+/-</sup> Mäusen vier Wochen nach Banding eine komplett erhaltene Morphologie und Kontraktilität des linken Ventrikels, während es in Kontrolltieren zu Anzeichen einer Dilatation und zu beginnenden Funktionseinschränkungen kommt. Die *cHccs*<sup>+/-</sup> Herzen tolerieren eine chronische Druckbelastung demnach besser als Kontrollen. Auf zellulärer Ebene scheinen sie dabei vor allem das Größenwachstum der Kardiomyozyten besser beherrschen zu können. Während in Kontrolltieren nach Banding eine deutliche Hypertrophie der Zellen nachweisbar ist, ist diese in *cHccs*<sup>+/-</sup> Herzen sehr moderat und statistisch nicht signifikant verändert. Es scheint also auch unter Banding eine differentielle Regulation des Zellwachstums in *cHccs*<sup>+/-</sup> im Vergleich zu Kontroll-Hezen zu geben. Während diese unter Ang II Stimulation überschießend ist, um eine adäquate Herzgröße und Kontraktilität aufrechtzuerhalten, ist sie unter einer reinen Druckbelastung abgemildert, um so eine konstante Herzfunktion zu gewährleisten. Das postnatale Herz scheint nach einer



Reduktion der Kardiomyozytenzahl bei der Geburt seine Größe und Funktion sowohl unter Ruhe- als auch Stressbedingungen also vor allem durch eine Anpassung des hypertrophen Wachstums der Kardiomyozyten zu kontrollieren. Jegliche postnatalen Faktoren, die diese Wachstumsplastizität einschränken, könnten damit die Stresstoleranz von Herzen nach neonataler Hypoplasie verringern und die Entstehung kardialer Erkrankungen begünstigen. Dies wiederum hätte möglicherweise wichtige Implikationen für die Lebensführung und das klinische Management von Kindern mit geringem Geburtsgewicht oder nach Frühgeburt.

Es gibt nur wenige vergleichbare Studien, in denen Herzen nach neonataler Hypoplasie im Erwachsenenalter einer Druckbelastung des linken Ventrikels ausgesetzt wurden. In einer derartigen Arbeit führt eine Einengung der thorakalen Aorta in hypoplastischen Herzen zu einer deutlich beschleunigten Verschlechterung der Herzfunktion im Vergleich zu Kontrollen (253). Dies deutet im Gegensatz zu unseren eigenen Daten darauf hin, dass ein adultes Herz nach neonataler Hypoplasie eine reduzierte funktionelle Reserve unter Stress besitzt. Es gibt jedoch ein paar grundlegende Unterschiede zwischen den beiden Studien. Zum einen führt ein thorakales Banding der Aorta zu einer deutlich stärkeren Druckbelastung als das von uns verwendete abdominelle Banding. Es ist also möglich, dass ein hypoplastisches Herz eine milde Druckbelastung gut toleriert, bei starker Belastung aber schneller dekompenziert. Zum anderen unterscheiden sich die Modelle der myokardialen Hypoplasie voneinander. In der Arbeit von Bisping et al. wurden genetisch veränderte Mäuse mit einem heterozygoten Knockout des kardialen Transkriptionsfaktors GATA4 verwendet, die schon unter Basalbedingungen eine eingeschränkte Herzfunktion zeigen (253). GATA4 ist nicht nur wichtig für die frühe embryonale Herzentwicklung sondern auch für Proliferation und hypertrophes Wachstum der Kardiomyozyten (259). In diesen Tieren sind sämtliche Kardiomyozyten des Herzens von der genetischen Veränderung und damit von einer Reduktion der GATA4-Expression betroffen. Im *Hccs*-KO-Modell dagegen sind nach Abschluss der embryonalen Herzregeneration die meisten (nämlich mindestens 90%) der Kardiomyozyten intakt und von keiner genetischen Veränderung eingeschränkt. Dies verleiht ihnen im postnatalen Verlauf das volle Potential der kardialen Wachstumsplastizität, während diese in Kardiomyozyten mit reduziertem GATA4-Level eingeschränkt sein könnte. Gleichzeitig ergibt sich aus unseren Daten zum Aorten-Banding in *cHccs*<sup>+/-</sup> Mäusen die interessante Hypothese, dass es möglicherweise ein „Fetal Preconditioning“ gibt. Beim Developmental Programming geht man davon aus, dass ein gestörtes intrauterines Wachstum persistierende Veränderungen in Kardiomyozyten induziert, die die Krankheitsanfälligkeit im weiteren Verlauf des Lebens erhöhen. Durch eine fetale Präkonditionierung könnte ein verändertes Wachstum des Herzens im Embryo und Fetus allerdings auch dazu führen, dass die Wachstumsplastizität der Kardiomyozyten nach der Geburt erhöht und ihre Reaktion auf Stress günstig beeinflusst wird. Für eine derartige Hypothese gibt es derzeit keine belastbaren Daten. In adulten Mäusen konnte jedoch gezeigt werden, dass kurze Phasen einer hypertrophen Stimulation die Auswirkungen einer darauf folgenden langfristigen Druckbelastung abmildern (260). Diese „hypertrophe Präkonditionierung“ reduziert dabei das stressinduzierte Größenwachstum der Kardiomyozyten und verlangsamt auf diese Weise die Entwicklung einer Herzinsuffizienz. Solche Studien zeigen, dass eine Anpassung des zellulären Größenwachstums im Myokard ein wichtiger Regulator von Herzfunktion und Stresstoleranz im Erwachsenenalter ist.

### **2.3.6. Translatationaler Forschungsbedarf zum hypoplastischen Herzen**

Generell gibt es großen Forschungsbedarf, um die Konsequenzen einer reduzierten Kardiomyozytenzahl bei der Geburt für das adulte Herz unter Stress zu verstehen. Die medizinische Versorgung in den westlichen Ländern ermöglicht es, dass Kinder mit

geringem Geburtsgewicht nach IUGR oder auch nach Frühgeburt üblicherweise überleben. Selbst extreme Frühgeburten ab der 24. SW haben inzwischen Überlebensraten von 70% und höher (236). Daraus ergibt sich eine wachsende Zahl an Kindern, die potentiell mit einer reduzierten Kardiomyozytenzahl zur Welt kommen. Folgt man der Annahme, dass beim Menschen nach der Geburt keine nennenswerte Neubildung von Kardiomyozyten mehr stattfindet (37), dann müssen diese Personen für den Rest des Lebens mit einer reduzierten Ausstattung an Kardiomyozyten auskommen. In Anbetracht der stetig steigenden Inzidenz von altersbedingten Erkrankungen mit kardiovaskulärem Risikopotential, wie Bluthochdruck oder Diabetes mellitus, ist es wichtig zu wissen, wie das hypoplastische Herz mit derartigen pathologischen Bedingungen umgeht. Dies gilt ebenso für weitere kardiovaskuläre Risikofaktoren, wie Rauchen, Übergewicht und Bewegungsmangel oder auch die Kardiotoxizität von Medikamenten. Möglicherweise muss das klinische Management von bestimmten chronischen Erkrankungen bei Patienten nach IUGR oder Frühgeburt angepasst werden, um die funktionellen Reserven des Herzens nicht zu überlasten.

In der experimentellen Grundlagenforschung gibt es verhältnismäßig wenig Studien, die die Stressresistenz des adulten Herzens nach neonataler Hypoplasie *in vivo* untersucht haben. Die meisten Arbeiten beschränken sich auf *ex vivo* Experimente zur Ischämie/Reperfusion am isolierten, *ex vivo* schlagenden Herzen (sog. Langendorff-Perfusion) nach IUGR. Dies zeigt demnach auch einige Probleme der Forschung zum Developmental Programming auf. Zum einen wird mit der globalen Ischämie am retrograd perfundierten Herzen ein recht artifizielles System genutzt, das zwar zu wichtigen grundlegenden Erkenntnissen führen kann, gleichzeitig aber auch klare translationale Limitierungen aufweist. Außerdem wird praktische nur im Bereich Ischämie/Reperfusion geforscht, während andere klinische Szenarien, die in der alternden Bevölkerung eine mindestens ebenso große Rolle spielen, wie z.B. eine kardiale Druckbelastung bei Bluthochdruck, vernachlässigt werden. Schließlich wird mit der Ischämie/Reperfusion am *ex vivo* schlagenden Herzen nur eine kurzfristige Akutsituation simuliert, während langfristige *in vivo* Untersuchungen mit deutlich höherem translationalem Potential unterrepräsentiert sind. Daher braucht es in Zukunft überzeugende tierexperimentelle Studien, bei denen Herzen nach IUGR über einen längeren Zeitraum unter Druckbelastung (z.B. Banding der Aorta), neurohumoraler oder  $\beta$ -adrenerger Stimulation (z.B. Ang II oder Isoproterenol Behandlung) oder nach Myokardinfarkt analysiert werden. Das Verständnis der Stressantwort des hypoplastischen Herzens auf morphologischer, funktioneller, zellulärer und molekularer Ebene soll helfen, die lebenslange Herzgesundheit von Kindern nach IUGR oder Frühgeburt sicherstellen zu können.

## **2.4. Ursachen und Mechanismen einer intrauterinen Wachstumsrestriktion**

### **2.4.1. Molekulare Regulation des embryonalen und fetalen Wachstums**

Obwohl eine Reihe von Tiermodellen etabliert wurde, die zu einer intrauterinen Wachstumsrestriktion und damit zu einer Reduktion des Geburtsgewichtes führen, sind die zugrundeliegenden molekularen Zusammenhänge kaum bekannt. Die Frage ist, welche Mechanismen am Ende die Proliferation oder auch das Größenwachstum von Zellen einschränken, so dass sich die normale Körper- und Organgröße nicht entwickeln kann (261). Die experimentellen IUGR-Modelle umfassen so unterschiedliche Konzepte wie eine Reduktion des Kalorien- oder Proteingehaltes in der mütterlichen Ernährung oder des Sauerstoffgehaltes in der Umgebungsluft während der Trächtigkeit sowie die interventionelle Induktion einer Plazentainsuffizienz (siehe Kapitel 1.4.4.). Diesen Ansätzen ist gemein, dass sie die Zufuhr von Nährstoffen und/oder Sauerstoff zum Embryo und Fötus verringern. Demnach sind alle molekularen Mechanismen, die Zellwachstum und Proliferation in

Abhängigkeit des extrazellulären Nähr- oder Sauerstoffangebots regulieren, offensichtliche Kandidaten für eine ursächliche Beteiligung an der Entstehung einer IUGR (261). Hierbei sticht vor allem der mTOR (mechanistic target of rapamycin) Signalweg hervor (262). Dieser umfasst zwei Multi-Protein-Komplexe, mTORC1 und mTORC2, die beide die Serin/Threonin-Kinase mTOR selbst enthalten, sich aber in der Zusammensetzung der regulatorischen Untereinheiten und struktureller Adapter-Proteine unterscheiden. Insbesondere mTORC1 wird dabei durch das Angebot von Aminosäuren und den intrazellulären Energiehaushalt reguliert. Sind Aminosäuren reichlich vorhanden und der ATP-Spiegel hoch, so ist mTORC1 aktiv und induziert durch die Phosphorylierung von bekannten Zielproteinen die Proteinbiosynthese (262). Dies wiederum ist die Voraussetzung für zelluläres Wachstum, sowohl zur Einleitung einer Zellteilung als auch für eine Größenzunahme. Da der zelluläre Energiespiegel je nach Zelltyp abhängig vom oxidativen Stoffwechsel und damit der sauerstoffabhängigen Generierung von ATP in Mitochondrien ist, wird mTOR indirekt auch durch die Verfügbarkeit von Sauerstoff reguliert. Zusammengenommen liegt es nahe, dass der mTOR-Signalweg bei einer Unterversorgung des Embryos oder Fötus inhibiert wird und somit eine Wachstumsrestriktion verursacht. In der Tat konnte gezeigt werden, dass das gängige IUGR-Modell einer mütterlichen Proteinrestriktion während der Trächtigkeit zu einer reduzierten mTOR-Aktivität in den  $\beta$ -Zellen des Pankreas neonataler Mäuse (263) oder in der Leber und im Skelett-Muskel fetaler Schafe und Affen führt (264, 265).

mTOR ist im Zusammenspiel mit anderen wachstumsfördernden Signalwegen ein wichtiger Regulator der Organgröße (266). Dabei spielt mTORC1 sowohl im Rahmen des proliferativen als auch des hypertrophen Zellwachstums eine Rolle. Vor diesem Hintergrund haben wir die Hypothese aufgestellt, dass die Inhibierung von mTORC1 durch die reduzierte Nährstoff- und Sauerstoffzufuhr zum Embryo bzw. Fötus an der Entstehung einer IUGR beteiligt ist. Um dies zu testen, haben wir trächtige Mäuse im letzten Viertel der Gestationszeit mit dem mTORC1-Inhibitor Rapamycin behandelt (siehe Kapitel 4.4.). In der Tat führt dies zu einer IUGR und damit einer deutlichen Reduktion der Körpergröße und des Geburtsgewichtes der Nachkommen. Parallel dazu kommt es zu einer Verringerung der Organgröße von Herz und Niere, wobei das Nierengewicht proportional, das Herzgewicht jedoch überproportional im Vergleich zum Körpergewicht reduziert ist. Dies deutet daraufhin, dass das Herz besonders anfällig gegenüber einer Inhibierung von mTORC1 in der Fetalzeit ist. Unsere Studien haben erstmals den mTORC1-Signalweg als einen Regulator des pränatalen Wachstums identifiziert, dessen Inhibierung eine IUGR verursachen kann. Darüber hinaus sind bisher kaum vergleichbare Mechanismen aufgedeckt worden, obwohl es eine Reihe potentieller Kandidaten gibt, die oberhalb, unterhalb oder parallel zu mTORC1 das Zellwachstum und die Proliferation regulieren. So wurden die Wachstumsfaktoren der IGF (insulin like growth factor) Familie mit IUGR assoziiert (267), und Mutationen im Gen für IGF-1 und für den IGF-1-Rezeptor führen beim Menschen zu sowohl prä- als auch postnataler Wachstumsrestriktion (268, 269). Eine durch Plazentainsuffizienz in Mäusen induzierte IUGR kann durch die intrauterine Behandlung der Föten mit IGF-1 verhindert werden, so dass die Nachkommen ein normales Geburtsgewicht aufweisen (223). IGF ist ein extrazellulärer Wachstumsfaktor, der an einen membranständigen Rezeptor mit intrazellulärer Tyrosin-Kinase-Aktivität bindet. Dies führt über getrennte Signaltransduktionen zur Aktivierung von MAP-Kinasen oder der Kinase Akt (267). MAP-Kinasen sind wichtige Mediatoren vor allem des proliferativen Zellwachstums, während Akt neben vielen anderen Funktionen ein Upstream-Aktivator von mTOR ist. Es scheint also durchaus plausibel, dass Veränderungen im IGF-Signalweg auf mehreren Stufen an einer IUGR beteiligt sein können. Tatsächlich hat der Knockout verschiedener Komponenten in Mäusen gezeigt, dass dies zu einer Restriktion des pränatalen Wachstums und damit zu einem reduzierten Geburtsgewicht

führt (270-273). Hierzu zählt auch die p70S6-Kinase, ein Zielprotein von mTORC1 bei der Regulation der Translation und damit des Zellwachstums (274). Interessanterweise konnte außerdem gezeigt werden, dass ein geringes Geburtsgewicht in Schweinen mit einer reduzierten Aktivität der p70S6-Kinase im Skelett-Muskel und einer reduzierten Proteinbiosynthese assoziiert ist (275). Für die IGF-induzierte Aktivierung von MAP-Kinasen ist ein Zusammenhang mit einem reduzierten intrauterinen Wachstum weniger klar. Es gab zunächst Berichte, dass die Inaktivierung der untypischen MAP-Kinase Erk3 in Mäusen zu einer IUGR führt (276), was jedoch in späteren Studien wegen zunächst unerkannter Off-Target-Effekten der genetischen Veränderung relativiert werden musste (277). Zusammenfassend kann man anhand einer Reihe von Knockout-Modellen sowie der von uns entwickelten pränatalen Rapamycin-Behandlung in Mäusen feststellen, dass der IGF-Signalweg über Akt und mTOR und damit vermutlich über eine Regulation der Proteinbiosynthese maßgeblich am intrauterinen Wachstum des Embryos und Fötus beteiligt ist. Folglich führt eine Inhibierung dieses Pathways auf verschiedenen Stufen zu einer IUGR.

#### **2.4.2. Der Einfluss der Plazenta bei intrauteriner Wachstumsrestriktion**

In einigen Fällen kommt es in Knockout-Mausmodellen, bei denen das intrauterine Wachstum des Embryos oder Föten gestört ist, parallel zu morphologischen Veränderungen oder einer Unterentwicklung der Plazenta, so auch beim Knockout der p70S6-Kinase (278). Auch die IUGR-Modelle einer mütterlichen Protein- oder Kalorienrestriktion während der Trächtigkeit führen zu molekularen Umstellungen in der Plazenta, die die Aktivität des mTOR-Pathways sowie die Expression von Nährstoff- und Aminosäure-Transportern betrifft (279, 280). In so einem Fall ist nicht klar, ob die IUGR primär durch einen Wachstumsdefekt des Embryos selbst oder sekundär durch eine Plazentainsuffizienz und damit eine Unterversorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff bedingt ist. Die Bedeutung von mTOR beim Wachstum, der Entwicklung komplexer Gewebestrukturen und auch der molekularen Funktion der Plazenta wird mehr und mehr klar (281). So wurde beim Menschen eine Rolle von mTOR beim Nährstofftransport und der Proteinbiosynthese in der Plazenta identifiziert, deren Inhibierung mit einer Wachstumsrestriktion des Fötus assoziiert ist (282, 283). Auch für die von uns entwickelte Rapamycin-Behandlung trächtiger Mäuse im letzten Viertel der Gestationszeit gilt, dass mTORC1 nicht nur im Embryo bzw. Fötus sondern auch im mütterlichen Organismus inhibiert wird. Es ist daher nicht auszuschließen, dass das Wachstum und die gewebespezifische Ausreifung oder aber die molekulare Funktion der Plazenta durch die Rapamycin-Behandlung beeinträchtigt werden. Es lässt sich also auch hier nicht klar trennen, ob das geringe Geburtsgewicht der Nachkommen primär durch eine intrinsische Wachstumsrestriktion des Fötus selbst oder sekundär durch eine Unterfunktion der Plazenta ausgelöst wird. Dies erscheint besonders relevant für das Herz, dessen pränatale Entwicklung sehr von einer suffizienten Nähr- und Sauerstoffversorgung über die Plazenta abhängig ist (216). Zusammenfassend ist zu vermuten, dass eine IUGR im Tiermodell und auch im Menschen in vielen Fällen durch einen primären Wachstumsdefekt des Embryos oder Fötus in Kombination mit einer suboptimalen Plazentafunktion bedingt ist. Die Identifizierung und molekulare Charakterisierung beider Komponenten ist dabei wichtig, um die Pathogenese von intrauterinen Wachstumsdefekten zu verstehen.

### **2.5. Wachstumsregulation im Herzen durch den mTOR-Signalweg**

#### **2.5.1. Die Rolle des mTOR-Signalwegs im adulten Herzen**

Der mTOR-Signalweg spielt eine wichtige Rolle für die Funktion des Herzens, sowohl unter physiologischen als auch pathologischen Bedingungen, und damit auch bei der Pathogenese

kardiovaskulärer Erkrankungen (284). Seine Funktion wurde bisher vor allem im gestressten postnatalen und adulten Herzen im Zusammenhang mit maladaptivem Gewebeumbau und pathologischer Hypertrophie untersucht. Hierbei zeigte sich, dass der Knockout des *Mtor*-Gens, das für die Kinase mTOR selbst kodiert, im adulten Herzen der Maus zur spontanen Entwicklung einer Herzinsuffizienz und damit verbundener Letalität führt (285). Die Kardiomyozyten in den *Mtor*-KO-Hezen sind dabei kleiner als in Kontrollen und ihre Apoptose-Rate ist erhöht. Eine Druckbelastung des linken Ventrikels durch ein Banding der thorakalen Aorta resultiert in *Mtor*-KO-Mäusen in einem deutlich beschleunigten Abfall der Herzfunktion im Vergleich zu Kontrolltieren und einer Inhibierung der linksventrikulären Hypertrophie (285). Ein ähnliches Bild zeigt sich nach herzspezifischer Inaktivierung von Raptor (kodiert durch das *Rptor*-Gen), einer essentiellen regulatorischen Untereinheit des mTORC1-Komplexes (262). Auch *Rptor*-KO-Mäuse entwickeln innerhalb von 6 Wochen spontan das Bild einer dilatativen Kardiomyopathie mit hoher Letalität. Unter linksventrikulärer Druckbelastung kommt es im Vergleich zu Kontrollen zur beschleunigten Entwicklung einer Herzinsuffizienz innerhalb von einer Woche, wobei die adaptive Hypertrophie der Kardiomyozyten ausbleibt (286). Eine Studie in adulten Mäusen konnte zeigen, dass mTORC1 bei körperlichem Training im Herzen aktiviert, bei linksventrikulärer Druckbelastung dagegen inaktiviert wird (287). Dies deutet auf eine differentielle Regulation im Rahmen der physiologischen im Gegensatz zur pathologischen Hypertrophie hin. In der Tat unterdrückt die Inhibierung von mTORC1 das physiologische Wachstum des Mausherzens bei körperlichem Training (288). Im Gegensatz dazu ist eine verringerte mTORC1-Aktivität unter linksventrikulärer Druckbelastung eher günstig, da dies die pathologische Hypertrophie der Kardiomyozyten abmildert, die myokardiale Fibrosierung reduziert und so die Herzfunktion aufrechterhält (288). Letzteres konnte auch durch die pharmakologische Inhibierung von mTORC1 mittels Rapamycin gezeigt werden. Die Gabe von Rapamycin unterdrückt die pathologische Hypertrophie und myokardiale Fibrose im Herzen von Mäusen nach Banding der thorakalen Aorta und trägt so zur Erhaltung der Herzfunktion bei (289, 290). Dabei konnte Rapamycin auch den maladaptiven Gewebeumbau und die linksventrikuläre Kontraktilität in Mäusen nachträglich verbessern, die nach Druckbelastung bereits eine etablierte Hypertrophie mit eingeschränkter Herzfunktion zeigten (291). Zusammenfassend ist der mTORC1-Signalweg sowohl an der physiologischen als auch pathologischen Hypertrophie des postnatalen Herzen beteiligt. Während er dabei für das Wachstum des Herzen bei körperlichem Training essentiell ist, scheint er die maladaptiven Veränderungen des Myokards unter Belastung eher zu fördern und so eine Herzinsuffizienz zu beschleunigen. Auf der anderen Seite führt auch das völlige Fehlen der mTORC1-Signaltransduktion zur kontraktile Dysfunktion, sowohl mit als auch ohne kardiale Belastung. Dies deutet auf eine komplexe Regulation des Pathways im adulten Herzen hin, die bisher nicht komplett verstanden ist (284).

### **2.5.2. Die Rolle des mTOR-Signalwegs im prä- und neonatalen Herzen**

Während die Rolle von mTORC1 beim hypertrophen Wachstum des adulten Herzen intensiv untersucht wird, ist über seine Funktion im pränatalen Herzen weitaus weniger bekannt. mTORC1 reguliert jedoch nicht nur zelluläres Größenwachstum sondern auch Zellzyklus-Aktivität und Proliferation, was durch seine Beteiligung an verschiedenen Tumor-Erkrankungen deutlich wird (292). Von daher scheint es plausibel, dass mTOR auch für das proliferative Wachstum des pränatalen Herzen relevant ist. Es gab bisher verschiedene Versuche, den mTORC1-Signalweg während der intrauterinen Herzentwicklung in gentechnisch veränderten Mäusen auszuschalten. In diesen Studien konnte eine suffiziente Inaktivierung allerdings erst einige Tage nach der Geburt erzielt werden. Dies liegt vor allem

daran, dass für den herzspezifischen Knockout verschiedener mTOR-Komponenten das Cre/loxP-Rekombinationssystem verwendet wurde. Hierbei wurden Mäuse eingesetzt, die das Enzym Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des Promoters der  $\alpha$ -Myosin-Schwerkette (kodiert durch das *Myh6*-Gen) exprimieren. In der Maus wird im embryonalen und fetalen Herzen vor allem die  $\beta$ -Form der Myosin-Schwerkette (*Myh7*) exprimiert, und der Switch zwischen den beiden Myosin-Formen findet erst in der späten Fetal- bzw. in der Perinatal-Phase statt (41). Damit ist auch die Expression von Cre unter der Kontrolle des *Myh6*-Promoters im pränatalen Herzen relativ schwach und steigt erst nach der Geburt deutlich an. Dies führt dazu, dass die Cre-vermittelte Rekombination der Zielgene erst spät in der Herzentwicklung erfolgt. Je nach Langlebigkeit und Stabilität des Zielproteins kann es so passieren, dass eine funktionell relevante Inaktivierung erst nach der Geburt wirksam wird. So führt der herzspezifische Knockout des für mTOR kodierenden *Mtor*-Gens mit Hilfe der erwähnten *Myh6*-Cre-Mauslinie erst ab Tag 7 nach der Geburt zu einer messbaren Inaktivierung des Signalwegs (293). Diese Tiere entwickeln daraufhin eine schnell progrediente Herzinsuffizienz mit dem Bild einer dilatativen Kardiomyopathie und versterben innerhalb der ersten 3 Wochen. Dabei zeigen sich auf histologischer Ebene am Tag 15 eine Reduktion der Kardiomyozytengröße im Vergleich zu Kontrollen und eine Induktion von Apoptose (293). In einer zweiten Studie wurde das *Mtor*-Gen mit einer anderen, unabhängig generierten *Myh6*-Cre-Linie inaktiviert. Obwohl hier eine Inhibierung des mTOR-Signalwegs bereits im embryonalen Herzen erkennbar war, so betraf dies nur einen kleinen Teil der Kardiomyozyten (294). Demnach entwickelte sich im 11.5 dpc Herzen ein Mosaik aus normalen und *Mtor*-defizienten Kardiomyozyten. Letztere zeigen eine reduzierte Proliferationsrate und werden mittels Apoptose eliminiert, was vermutlich auf den bereits beschriebenen Mechanismus der „Cell Competition“ zurückzuführen ist (siehe Kapitel 2.2.5.). Obwohl die intakten Kardiomyozyten normal proliferieren, sind die Herzen der *Mtor*-Knockout-Embryonen kleiner als in Kontrollen und zeigen eine leicht eingeschränkte Kontraktilität, was möglicherweise durch den Verlust der *Mtor*-defizienten Zellen bedingt ist. Dies wiederum führt zu einer verhältnismäßig hohen Letalität der *Mtor*-KO-Tiere kurz vor der Geburt (294). Insgesamt scheint das Fehlen von mTOR in embryonalen Kardiomyozyten also Zellzyklus-Aktivität zu reduzieren und Apoptose zu induzieren, wobei dies aufgrund des inkompletten Knockouts und des Gewebemosais nicht eindeutig schlüssig ist. Eine dritte Studie verfolgte den Ansatz, das *Mtor*-Gen mit einer Mauslinie zu inaktivieren, in der Cre unter der Kontrolle des Promoters der muskulären Creatin-Kinase exprimiert wird (295). Letztere wird im Laufe der Herzentwicklung bekanntermaßen erst recht spät exprimiert, so dass eine effiziente Inaktivierung von Zielgenen im embryonalen Herzen nicht zu erwarten ist. Tatsächlich konnte mit Hilfe dieser Tiere eine Inaktivierung von *Mtor* erst nach der Geburt gezeigt werden. Die so generierten *Mtor*-KO-Mäuse waren innerhalb der ersten 14 Tage von den Kontrollen nicht zu unterscheiden, entwickelten ab dem Alter von 3 Wochen aber eine zunehmende Letalität mit dem Bild einer dilatativen Kardiomyopathie. Auf histologischer Ebene zeigten sich eine Induktion von apoptotischem und nekrotischem Zelltod und eine vermehrte Fibrosierung im Myokard von *Mtor*-Knockout-Mäusen, wobei eine Quantifizierung der Kardiomyozytengröße nicht erfolgte (295). Schließlich wurde in einer weiteren Studie ein herzspezifischer Knockout von Rheb durchgeführt, einem wichtigen Upstream-Aktivator von mTORC1. Auch hier wurde eine *Myh6*-Cre-Mauslinie verwendet, so dass eine moderate Reduktion des Rheb-Proteins ab dem dritten und eine Inaktivierung des mTORC1-Signalwegs ab dem fünften Tag nach der Geburt nachweisbar waren (296). Rheb-KO-Mäuse sterben innerhalb der ersten 10 Tage nach der Geburt an einer Herzinsuffizienz, wobei das postnatale kardiale Wachstum und die Hypertrophie der Kardiomyozyten im Vergleich zu Kontrollen verringert sind, während Zelltod keine Rolle zu spielen scheint (296). In dieser

Studie wurde darüber hinaus gezeigt, dass die Behandlung von neugeborenen Mäusen mit Rapamycin am Tag 1 und 2 zu einer Reduktion des Herzgewichtes an den Tagen 3 und 8 führt (296). Zusammenfassend scheint eine normale Aktivität von mTORC1 essentiell für das postnatale hypertrophe Wachstum und die Funktion des Herzens innerhalb der ersten Wochen nach der Geburt. Aufgrund der dargestellten methodischen Probleme, eine effiziente Inaktivierung von mTORC1 im embryonalen und fetalen Mausherzen zu generieren, ist über die Rolle von mTORC1 beim proliferativen Wachstum des pränatalen Herzens anhand der verfügbaren Studien keine verlässliche Aussage zu treffen.

### **2.5.3. mTORC1-Aktivität reguliert das Wachstum des fetalen Herzens in der Maus**

Wie im vorherigen Abschnitt erläutert, konnte die Rolle von mTORC1 beim Wachstum des pränatalen Herzens mit Hilfe genetischer Mausmodelle bisher nicht hinreichend geklärt werden. Unsere Daten zur Behandlung trächtiger Mäuse mit dem mTORC1-Inhibitor Rapamycin im letzten Viertel der Gestationszeit haben diesbezüglich daher erste Aufschlüsse geliefert (siehe Kapitel 4.4.). Die Inhibierung von mTORC1 in der Fetalphase führt im Vergleich zu Kontrollen demnach zu deutlich kleineren Herzen bei der Geburt. Das Herzgewicht ist dabei, anders als das der Niere, überproportional zum Körpergewicht reduziert, was darauf hindeutet, dass das fetale kardiale Wachstum in besonderem Maße mTORC1-abhängig ist. Die geringere Herzgröße in Rapamycin-behandelten Mäusen bei der Geburt ist dabei vor allem auf eine reduzierte Größe der Kardiomyozyten im Zusammenspiel mit einer erhöhten Apoptose-Rate zurückzuführen. Die Zellzyklus-Aktivität ist dagegen am Tag 1 nach der Geburt im Vergleich zu Kontrollen unverändert. Hierzu muss allerdings angemerkt werden, dass weder bei der Apoptose noch bei der Zellzyklus-Aktivität zwischen den verschiedenen Zelltypen im Myokard differenziert wurde. Es lässt sich aus den Daten daher nicht ableiten, ob der vermehrte Zelltod in Rapamycin-behandelten Herzen bei der Geburt die Kardiomyozyten oder eine andere Zellpopulation betrifft. Genauso könnten sich hinter der normalen Gesamt-Proliferationsrate kleinere Veränderungen speziell in der Kardiomyozyten-Population verbergen. Die Untersuchungen adulter Herzen nach pränataler Rapamycin-Behandlung zeigten ein deutlich erhöhtes Kardiomyozyten-Volumen bei gleichzeitig rechnerisch reduzierter –Zahl im Vergleich zu Kontrollen. Diese Verringerung der Zellzahl könnte durch die erhöhte Apoptose-Rate bei der Geburt bedingt sein. Demnach würden Rapamycin-behandelte Tiere mit normaler Kardiomyozytenzahl geboren, und das Defizit entsteht im postnatalen Verlauf durch erhöhten Verlust. Möglich ist auch, dass die Kardiomyozytenzahl bereits bei der Geburt aufgrund eines Proliferationsdefektes verringert ist. Letzterer zeigt sich in neonatalen Rapamycin-behandelten Tieren bisher nicht. Dies könnte dadurch bedingt sein, dass die verwendete Detektionsmethode nicht sensitiv genug ist. Andererseits könnte der Proliferationsdefekt auch in der Fetalphase liegen und sich kurz nach der Geburt normalisieren. Um dies in zukünftigen Studien differenzieren zu können, müsste in Rapamycin-behandelten Mäusen zum einen die Kardiomyozytenzahl bei der Geburt bestimmt und zum anderen die Zellzyklus-Aktivität spezifisch in Kardiomyozyten charakterisiert werden. Letzteres schließt auch die Differenzierung zwischen Zellzyklus-Aktivität, die zur echten Zellteilung führt, und solcher, die zu binukleären oder polyploiden Kardiomyozyten führt (siehe Kapitel 2.1.5.), ein. Schließlich müsste in Rapamycin-behandelten Tieren die Fetalphase untersucht werden, um hier das kardiale Wachstum, die Kardiomyozytenzahl und –größe sowie ihre Proliferationsrate zu bestimmen.

Unser Behandlungsschema mit Rapamycin im letzten Viertel der Gestationszeit deckt nur das späte Stadium der intrauterinen Herzentwicklung ab. Versuche, die tägliche Rapamycin-Behandlung bereits am Tag 10.5 dpc zu starten, führten zur Letalität der Nachkommen etwa am Tag 15.5 dpc. In zukünftigen Studien könnte durch die kürzere Gabe von Rapamycin an

definierten Tagen der Gestationszeit die Wirkung einer mTORC1-Inhibierung auf bestimmte Entwicklungsstadien des Herzens gezielt untersucht werden. Dies erlaubt möglicherweise die Einengung eines Zeitfensters, in dem das embryonale Herz besonders anfällig gegenüber einer mTORC1-vermittelten Wachstumsrestriktion ist. Es bleiben aber die bereits diskutierten Zweifel, inwieweit die Rapamycin-Gabe in trächtigen Mäusen auch das Muttertier und dabei insbesondere das Wachstum und die Funktion der Plazenta beeinträchtigen (siehe Kapitel 2.4.2.). Der Einfluss einer mTORC1-Inhibierung primär auf das Herz kann daher nicht von sekundären Effekten aufgrund einer Unterversorgung des Embryos differenziert werden. Aus diesem Grund müssen auch weiterhin genetische Modelle zur herzspezifischen Inaktivierung der mTORC1-Funktion untersucht werden. Da sich Cre-Linien, bei denen der Promoter im Herzen erst relativ spät während der Embryonalentwicklung seine volle Aktivität aufweist (wie Myh6-Cre oder Creatin-Kinase-Cre), als eher ungeeignet erwiesen haben (siehe Kapitel 2.5.2.), müssen etablierte Mauslinien verwendet werden, bei denen Cre bereits in kardialen Vorläuferzellen (z.B. Nkx2.5-Cre) oder frühen embryonalen Kardiomyozyten (Troponin T-Cre) exprimiert wird. Es liegt nahe, dass mTORC1 eine wichtige Rolle nicht nur im adulten sondern auch beim proliferativen Wachstum im embryonalen und fetalen Herzen spielt. Die genaue Charakterisierung dieser Funktionen kann wichtige Aufschlüsse für die Entstehung angeborener Herzfehler, die Folgen von intrauteriner Wachstumsrestriktion und Frühgeburt auf das neonatale Herz sowie die Zellzyklus-Regulation von Kardiomyozyten und damit auch für die Regenerationsfähigkeit des Herzens liefern.

## **2.6. Der Einfluss der Ernährung auf die kardiovaskuläre Gesundheit**

### **2.6.1. Der Einfluss des Kaloriengehalts der Ernährung auf das Herz**

Die Ernährung hat einen deutlichen Einfluss auf die allgemeine Gesundheit, aber auch auf das Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen im Verlauf des Lebens. Dies wird besonders klar im Zusammenhang mit dem zunehmenden Anteil übergewichtiger Menschen in der Bevölkerung. Die Kombination aus unausgewogener, hyperkalorischer Ernährung und Bewegungsmangel führt zu Adipositas und zum Metabolischen Syndrom, das mit dem erhöhten Risiko für Diabetes mellitus Typ 2, Bluthochdruck und andere kardiovaskuläre Folgeerkrankungen einhergeht (297). Insbesondere der Einfluss einer hochkalorischen, fettreichen Diät auf das Körpergewicht, die Glukose-Toleranz, den arteriellen Blutdruck und Fetteinlagerungen in verschiedenen Geweben wird dabei in tierexperimentellen Studien untersucht (298, 299). In Mäusen wurde gezeigt, dass eine Ernährung mit hohem Fettgehalt (high fat diet = HFD) über 6 Monate zum Bild einer hypertrophen Kardiomyopathie mit erhöhter linksventrikulärer Masse und reduzierter Kontraktilität im Vergleich zu Kontrollen führt (300). Isolierte Kardiomyozyten aus dem Herzen von HFD-Mäusen zeigen darüber hinaus ein verändertes Calcium-Handling und eine eingeschränkte Kontraktion (300). Eine HFD über 16 Monate führt in Mäusen zur Ausprägung eines progredienten metabolischen Syndroms. Im Herzen zeigt sich dabei ab dem 8. Monat eine Einschränkung der kardialen Funktionsreserve unter Stress und im weiteren Verlauf eine Hypertrophie des linken Ventrikels mit Vergrößerung der Kardiomyozyten und Anzeichen einer vermehrten Fibrosierung (301). Weiterhin steigen im Herzen von HFD-Mäusen die Einlagerung von Fettsäuren im Myokard sowie die Anfälligkeit für einen Ischämie/Reperfusions-Schaden. Letzteres zeigt sich vor allem in einer verstärkten Fibrosierung im Vergleich zu Kontrollen nach wiederholten kurzen Ischämie-Phasen (302). Eine Ischämie/Reperfusion in HFD-Ratten führt im Vergleich zu Kontrollen zu größeren Myokardinfarkten, reduzierter Erholung der linksventrikulären Funktion und erhöhter Neigung zu fatalen Arrhythmien (303).



Aufgrund der negativen Auswirkungen einer hochkalorischen Diät auf die Gesundheit wird intensiv untersucht, inwiefern Modifikationen der Ernährung das Risiko kardiovaskulärer Erkrankungen im Alter verringern können (304). Hierbei spielt beim Menschen zunächst die generelle Kalorienrestriktion eine Rolle (305), die das Risiko eines metabolischen Syndroms und der damit verbundenen arteriosklerotischen Gefäßveränderungen reduziert (306). Zusätzlich wird eine Reihe von Modellorganismen herangezogen, um die Auswirkungen einer modifizierten Ernährung auf die Gesundheit, das Altern und die Lebenserwartung zu untersuchen (307). Dabei zeigt sich, dass eine Kalorienrestriktion über 5 Wochen in einer speziellen Ratten-Linie, bei der die Tiere innerhalb der ersten 3 Monate spontan einen arteriellen Hypertonus entwickeln, zu einer deutlichen Reduktion des Blutdruckes und der damit verbundenen linksventrikulären Hypertrophie sowie einer besseren Gefäßfunktion führt (308). Ebenso resultiert eine strenge Kalorienrestriktion innerhalb der ersten 3 Monate in einer verbesserten Kontraktilität des *ex vivo* schlagenden Ratten-Herzens, sowohl unter Basalbedingungen als auch nach Ischämie/Reperfusion (309). Eine langfristige Kalorienrestriktion über 1 Jahr nach Induktion eines Myokardinfarktes in Ratten steigert die linksventrikuläre Funktion und reduziert die myokardiale Fibrose im Vergleich zu Tieren auf einer normalen Ernährung (310). Auch altersabhängige Verschlechterungen insbesondere der diastolischen Herzfunktion in 30 Monate alten Ratten können durch eine Kalorienrestriktion vermutlich über eine Optimierung des Calcium-Handlings aufgehalten werden (311). Schließlich verbessert eine Kalorienrestriktion auch die Auswirkungen eines Myokardinfarkts nach permanenter Ligation der linken Koronararterie in alternden Ratten. Hierbei entwickeln Ratten nach Kalorienrestriktion im Vergleich zu Kontrollen weniger myokardiale Fibrose, eine abgemilderte pathologische Hypertrophie der Kardiomyozyten und eine bessere diastolische Funktion (312). Interessanterweise hat auch das intermittierende Fasten in Ratten, bei dem die Tiere nur jeden zweiten Tag gefüttert werden, einen positiven Effekt auf die Herzfunktion nach Myokardinfarkt. Dies gilt zum einen für Tiere, die vor Induktion des Infarkts für 3 Monate auf diesem Regime gehalten wurden. Hier ist die Infarktgröße im Vergleich zu Kontrollen reduziert, die Apoptose-Rate der Kardiomyozyten geringer und damit der myokardiale Gewebeumbau und die linksventrikuläre Pumpfunktion verbessert (313). Auch bei Ratten mit einem etablierten Infarkt, bei denen das intermittierende Fasten also erst 2 Wochen nach Ligation der linken Koronararterie begonnen wurde, steigert dieses die Überlebensrate und die linksventrikuläre Funktion am *ex vivo* schlagenden Herzen im Vergleich zu Kontrollen (314). Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass eine reduzierte Kalorienaufnahme sowohl im Tiermodell als auch beim Menschen einen positiven Einfluss auf die Herzgesundheit hat.

## **2.6.2. Der Einfluss des Proteingehalts in der Ernährung auf das Herz**

Eine Kalorienreduktion in der Ernährung wirkt sich in vielerlei Hinsicht günstig auf die Funktion des Herzens sowohl unter Basalbedingungen als auch unter Stress aus (siehe Kapitel 2.6.1.). Dabei ergibt sich die Frage, ob es allein die Kalorien sind, die den positiven Effekt bedingen, oder ob darüber hinaus die Zusammensetzung der Ernährung und damit bestimmte Nahrungsbestandteile ebenfalls einen Einfluss haben. In der Tat wurde in Mäusen gezeigt, dass es nicht primär die Kalorienmenge sondern eher das Verhältnis der wichtigen Energieträger (Proteine, Fett und Kohlenhydrate) zueinander ist, was die metabolische und kardiovaskuläre Gesundheit bestimmt (315). So wurde beispielsweise postuliert, dass eine mediterrane Diät, wie sie in vielen Regionen des Mittelmeerraumes verbreitet ist, einen positiven Einfluss auf die kardiovaskuläre Gesundheit hat (316). Diese Ernährung zeichnet sich vor allem durch einen hohen Anteil an frischem Obst und Gemüse, Getreide, Fisch und Meeresfrüchten sowie pflanzlichen Fetten bei gleichzeitig moderatem Verzehr von Geflügel,

Eiern und Milchprodukten aus. Der Anteil von „rotem“ Fleisch (Schwein, Rind, Lamm) sowie von Süßspeisen und prozessierten Lebensmitteln ist dagegen verhältnismäßig gering. Bei dem Versuch, den Einfluss einzelner Nahrungskomponenten auf die Gesundheit beim Menschen zu untersuchen, zeigte sich, dass eine besonders proteinreiche Ernährung mit einer erhöhten Inzidenz von kardiovaskulären Erkrankungen assoziiert zu sein scheint (317, 318). Folglich entwickelte sich die Hypothese, dass der Proteingehalt der Nahrung einen wichtigen Einfluss auf die Gesundheit im Alter hat (319) und dass eine Proteinrestriktion letztere günstig beeinflussen könnte (320). Tatsächlich verbessert die Erhöhung des Kohlenhydrat- auf Kosten des Proteinanteils im Futter von Mäusen deren metabolische und kardiovaskuläre Gesundheit im Alter und damit die Lebenszeit (315). Auch inhibiert eine proteinreduzierte Diät das Tumorstadium von Mäusen und verlängert damit ihr Überleben (321). Beim Menschen werden bis zum Alter von 65 Jahren das Gesamtüberleben und die Tumorstärke durch einen geringen Proteingehalt der Nahrung positiv beeinflusst. Ab dem Alter von 65 Jahren wird eine ausreichende Proteinaufnahme jedoch essentiell, so dass die Tumor- und Gesamtsterblichkeit durch eine proteinreiche Diät reduziert wird (321). Darüber hinaus scheint eine proteinreiche Ernährung die Inzidenz von Diabetes mellitus und die damit verbundenen Komplikationen unabhängig vom Alter zu erhöhen (321).

In unseren eigenen Studien haben wir den Einfluss einer proteinreduzierten Diät (LPD) auf das prä- und postnatale Herz der Maus untersucht (siehe Kapitel 4.5.). Dabei wurden zunächst trächtige Muttertiere auf einem Futter gehalten, bei der der Proteingehalt auf 8% im Vergleich zu 22% in der Kontroll-Diät reduziert ist. Nach der Geburt der Jungtiere wurden die säugenden Muttertiere weiterhin mit der proteinreduzierten Diät gefüttert, ebenso wie die Nachkommen bis ins Alter von 11 Wochen. Diese adulten Tiere haben ein leicht reduziertes Körpergewicht bei ansonsten normaler Größe und Funktion des Herzens im Vergleich zu Tieren auf der Kontroll-Diät. Auf histologischer Ebene zeigen sich jedoch bemerkenswerte Veränderungen: Die Kardiomyozyten in LPD-Tieren haben ein deutlich reduziertes Volumen und eine höhere Dichte pro myokardialer Flächeneinheit im Vergleich zu Kontrollen. Darüber hinaus ist die interstitielle Fibrose in den LPD-Tieren erniedrigt und die Kapillar-Dichte pro Flächeneinheit erhöht. All dies deutet auf eine günstige Gewebezusammensetzung des Myokards hin. Ein maladaptiver Gewebeumbau bei kardialer Belastung ist in der Regel durch genau entgegengesetzte Veränderungen charakterisiert: eine pathologische Hypertrophie der Kardiomyozyten, vermehrte Fibrosierung und eine Rarefizierung des Kapillargefäßbettes (43). Demnach lässt sich spekulieren, dass der Umbau des Myokards nach prä- und postnataler Proteinrestriktion die Stresstoleranz des Herzens möglicherweise verbessern und damit die Anfälligkeit gegenüber pathologischen Bedingungen reduzieren kann. Dies muss jedoch in zukünftigen Studien experimentell nachgewiesen werden, indem LPD- und Kontroll-Mäuse einer Druckbelastung des Herzens, beispielsweise durch Banding der Aorta, oder aber einer Ischämie/Reperfusion ausgesetzt werden.

### **2.6.3. Der Einfluss einer Proteinrestriktion auf die myokardiale Gewebe-Homöostase**

Eine auffällige Beobachtung in adulten Herzen nach prä- und postnataler LPD ist die Erhöhung der Kapillardichte im Myokard (siehe Kapitel 4.5.). Interessanterweise führt in Ratten eine LPD während der Trächtigkeit, nach der die Nachkommen postnatal ein normales Futter erhalten, ebenfalls zu einer erhöhten Kapillardichte im adulten Myokard (199). Im Gegensatz dazu reduzierte eine pränatale LPD in Ratten die Kapillardichte im adulten Skelett-Muskel (322). In der Maus wurde gezeigt, dass eine in adulten Stadien initiierte Aminosäure-Restriktion, insbesondere der schwefelhaltigen Aminosäuren Methionin und Zystein, zur Aktivierung von Angiogenese und damit zu einem Anstieg der Kapillardichte im Skelett-Muskel führt (323). Zusammengefasst deutet dies darauf hin, dass im Skelett-

Muskel, aber nicht so sehr im Myokard, der Zeitpunkt einer prä- versus postnatalen Proteinrestriktion darüber entscheidet, ob ein günstiger Gewebeumbau mit dem Resultat einer erhöhten Kapillardichte erfolgt oder nicht. An dem zugrundeliegenden molekularen Mechanismus scheint im adulten Skelett-Muskel die vermehrte Produktion von Schwefelwasserstoff bei Aminosäure-Mangel beteiligt zu sein (324). Dies führt zur Aktivierung einer Stress-Antwort, die über den Transkriptionsfaktor ATF4 (activating transcription factor 4) die Expression des Angiogenese-fördernden Wachstumsfaktors VEGF (vascular endothelial growth factor) erhöht (323). VEGF induziert die Proliferation von Endothelzellen und damit die Verzweigung und das Wachstum von Kapillaren. Wir konnten in den Herzen von Mäusen nach prä- und postnataler LPD keine Aktivierung der ATF4-vermittelten Stressantwort und keine Induktion von VEGF feststellen, was jedoch nicht bedeutet, dass dieser Mechanismus keine Rolle spielt. Da die Herzen der LPD-Tiere erst im Erwachsenenalter untersucht wurden, ist möglicherweise nur das Endstadium einer veränderten Gewebe-Homöostase erfasst worden. Das Zeitfenster des Gewebeumbaus und damit auch der aktiven Angiogenese könnte deutlich früher liegen, so dass es in unseren Analysen verpasst wurde. Alternativ könnte die Angiogenese-fördernde Kaskade über ATF und VEGF auch spezifisch für den Skelett-Muskel bei Aminosäure-Mangel sein, während im Myokard ein anderer Mechanismus operiert. Grundsätzlich scheint die Ernährung einen Einfluss auf das Kapillargefäßbett und die Gefäßneubildung in verschiedenen Organen und Geweben zu haben. So verbessert eine Kalorienrestriktion die Revaskularisierung der unteren Extremität nach Ischämie in Mäusen unter anderem durch eine Erhöhung der Kapillardichte (325). Darüber hinaus zeigen Endothelzellen, die aus dem Gehirn von alternden Mäusen auf einer kalorienreduzierten Diät isoliert wurden, *in vitro* ein besseres Überleben, eine höhere Proliferationsrate und ein höheres Potential zur Bildung von Kapillarstrukturen im Vergleich zu Zellen aus Kontroll-Mäusen (326). Im Gegensatz dazu reduziert eine fettreiche Diät die Kapillardichte im Skelett-Muskel und Myokard von Ratten (327), was durch regelmäßiges körperliches Training verbessert werden kann (328).

#### **2.6.4. Der Einfluss einer Proteinrestriktion auf Kardiomyozytenzahl und -größe**

Ein interessanter Aspekt im Herzen von Mäusen nach prä- und postnataler LPD ist das reduzierte Volumen der Kardiomyozyten bei normalem Herzgewicht und normaler linksventrikulärer Masse. Wie im Kapitel 2.3.4. erläutert, ist die Kardiomyozytengröße eine wichtige Stellschraube bei der Regulation der kardialen Organgröße: ist die Kardiomyozytenzahl reduziert, kommt es zu einer kompensatorischen Hypertrophie der Zellen, um die Organgröße konstant zu halten. Umgekehrt führt eine Erhöhung der Kardiomyozytenzahl zu kleineren Zellen, so dass die Dichte ihrer Kerne pro myokardialer Flächeneinheit erhöht ist, was wir auch in Tieren nach prä- und postnataler LPD beobachtet haben. Man kann also spekulieren, dass LPD-Hezen im Vergleich zu Kontrollen mehr Kardiomyozyten besitzen. Die Berechnung der Kardiomyozytenzahl bestätigt dies im Trend, auch wenn der Unterschied zu Kontrolltieren keine statistische Signifikanz erreicht. Dabei muss allerdings kritisch angemerkt werden, dass derartige Berechnungen einige Vereinfachungen zugrunde legen. So wird angenommen, dass Kardiomyozyten immer zylindrisch geformt sind, was die komplexe Gestalt vieler Zellen jedoch nicht abbildet. Außerdem wird nicht zwischen kleinen mononukleären und großen multinukleären Zellen unterschieden. Der Fehler in den Berechnungen könnte also durchaus einen Unterschied in der Zellzahl zwischen LPD und Kontrolltieren maskieren. Es bleibt daher die interessante Hypothese im Raum, dass eine prä- und postnatale LPD die Zahl der Kardiomyozyten im adulten Herzen erhöht. In zukünftigen Studien sollte in diesen Tieren folglich die exakte Kardiomyozytenzahl durch geeignete, sensitive Methoden (wie Stereologie, FACS oder

direkte Zählung isolierter Zellen (37, 87, 256)) bestimmt werden. Darüber hinaus sollte in LPD-Tieren die Zellzyklus-Aktivität der Kardiomyozyten in verschiedenen Stadien vor und nach der Geburt untersucht werden, um so ggf. das Zeitfenster zu identifizieren, in dem eine Erhöhung der Kardiomyozytenzahl durch eine Steigerung der Proliferationsrate erfolgt. Dies ist insbesondere vor dem Hintergrund relevant, dass gemäß unserer Daten die Kardiomyozytengröße im neonatalen Herzen nach pränataler LPD im Vergleich zu Kontrollen bei unverändertem Herzgewicht erhöht ist. Gemäß der oben beschriebenen Logik würde dies bedeuten, dass die Kardiomyozytenzahl im neonatalen LPD-Herzen reduziert wäre. Wir haben in unserer Studie keine direkte Bestimmung der Zellzahl in neugeborenen Herzen durchführt, andere Arbeiten zeigen aber sehr wohl eine Reduktion der Kardiomyozytenzahl im LPD-Rattenherzen bei der Geburt (87). Interessanterweise ist dieses Defizit wenige Wochen nach der Geburt nicht mehr nachweisbar (194), was darauf schließen lässt, dass es in der Zwischenzeit zu einer Normalisierung der Zellzahl gekommen sein muss. In der Tat wurde postuliert, dass es nach pränataler LPD in den Nachkommen einige Tage nach der Geburt zu einer verstärkten Zellzyklus-Aktivität im Herzen kommt (195). Für unsere eigene Studie würde dies bedeuten, dass in Mäusen, die sowohl prä- als auch postnatal auf einer LPD gehalten wurden, ein Kardiomyozyten-Defizit bei der Geburt durch eine kompensatorisch gesteigerte Proliferation bis ins Erwachsenenalter möglicherweise in einen Überschuss verwandelt wird. Die Charakterisierung der zugrundeliegenden zellulären und molekularen Mechanismen hätte spannende Implikationen für den Einfluss der Ernährung auf das postnatale Wachstum und die Stresstoleranz des Herzen sowie die Zellzyklus-Regulation von Kardiomyozyten und damit die myokardiale Regeneration.

#### **2.6.5. Probleme der Interpretation und translationalen Bedeutung von IUGR-Modellen**

Die mütterliche Ernährung während der Schwangerschaft hat deutlichen Einfluss auf das Wachstum des Embryos und Fötus, und eine Mangel- oder Fehlernährung kann zur IUGR und einem reduzierten Geburtsgewicht führen. Im Tiermodell wird daher sowohl eine mütterliche Kalorien- (siehe Kapitel 2.3.2.2.) als auch Proteinrestriktion (siehe Kapitel 2.3.2.1.) während der Trächtigkeit angewendet, um die Auswirkungen für die Nachkommen *in utero*, bei der Geburt und im weiteren Verlauf des Lebens zu analysieren. Wir haben in unseren eigenen Untersuchungen trächtige Mäuse auf einer proteinreduzierten Diät (LPD) gehalten, um unter anderem die Folgen für das neonatale Herz zu charakterisieren. Dabei konnten wir einige Veränderungen, die in ähnlichen Studien veröffentlicht worden waren, nicht reproduzieren. So ist das Körpergewicht bei der Geburt gemäß unserer Daten nur in weiblichen, nicht aber in männlichen LPD-Nachkommen im Vergleich zu Kontrollen reduziert. Andere Autoren beschreiben dagegen eine robuste Verringerung des Geburtsgewichtes in beiden Geschlechtern (87, 196, 198). Noch deutlicher wird die Diskrepanz beim Herzgewicht: hier sehen wir weder in Männchen noch in Weibchen einen Unterschied zwischen LPD- und Kontrolltieren bei der Geburt, obwohl andere Studien eine Reduktion unter LPD beschreiben (87). Auch haben wir keinen Unterschied der Proliferationsrate im neonatalen Myokard von LPD- und Kontrolltieren detektiert, während in anderen Arbeiten eine verringerte Zellzyklus-Aktivität durch die Proteinreduktion postuliert wurde (195). Die Auswirkungen einer IUGR auf das embryonale, fetale, neonatale und adulte Herz im Tiermodell sind abhängig von der verwendeten Tierart und der gewählten Methode. Selbst innerhalb derselben Methode kann es jedoch zu erheblichen Unterschieden und gegensätzlichen Ergebnissen in verschiedenen Studien kommen. So kann bei einer Proteinrestriktion im mütterlichen Futter während der Trächtigkeit in Ratten oder Mäusen die Mehrzahl der Studien ein reduziertes Körpergewicht der LPD-Nachkommen bei der Geburt im Vergleich zur Standard-Protein-Diät (SPD) zeigen. Ein nicht unerheblicher Teil konnte

jedoch keinen Unterschied im Geburtsgewicht zwischen LPD- und SPD-Tieren nachweisen (193), was aber die Grundvoraussetzung ist, um überhaupt von einer IUGR ausgehen zu können. Dieses Dilemma ist in erster Linie einer fehlenden Standardisierung in den experimentellen Abläufen und Protokollen insbesondere bei den IUGR-Modellen, die eine Fehl- oder Mangelernährung simulieren sollen, geschuldet. Häufig unterscheidet sich beispielsweise die genaue Zusammensetzung sowohl des Experimental- als auch des Kontroll-Futters zwischen den Studien. Dies gilt zum einen für Mineralien, Spurenelemente sowie Vitamine, kann aber auch den Fett- und Kohlenhydrat-Gehalt betreffen (329, 330). Dazu kommt, dass die Gesamtdauer sowie der Beginn und das Ende der Experimental-Phase von vielen Wissenschaftlern unterschiedlich gewählt werden. So werden Muttertiere teilweise bereits 2 Wochen vor der Verpaarung mit der Experimental-Diät gefüttert, um eine Anpassungsphase des mütterlichen Stoffwechsels zu erlauben. In anderen Studien dagegen werden die Muttertiere am Tag der Verpaarung oder aber in verschiedenen Stadien der Trächtigkeit auf die Experimental-Diät gesetzt (193). Darüber hinaus bleiben die Muttertiere mit den Nachkommen nach der Geburt für unterschiedlich lange Zeiträume auf der Experimental-Diät, bevor auf ein normales Futter gewechselt wird. Letzteres kann am ersten Tag nach der Geburt oder aber erst nach 14 oder 21 Tagen erfolgen. Schließlich findet die Untersuchung der Nachkommen zur Bestimmung des Körpergewichts und für histologische, zelluläre sowie molekulare Analysen des Herzens zu unterschiedlichen Zeitpunkten statt. Hierbei vergehen nach der Geburt je nach Studie zwischen 1 und 3 Tage (193). Obwohl die Ligation der Arteria uterina in Nagern ein weit verbreitetes Modell zur Induktion einer Plazentainsuffizienz ist, muss auch hier kritisch angemerkt werden, dass eine Standardisierung der experimentellen Abläufe weitestgehend fehlt, ähnlich wie bei der IUGR durch Änderung der mütterlichen Diät. Dies führt zu einer Vielzahl an unterschiedlichen und oft widersprüchlichen Studienergebnissen zwischen einzelnen Wissenschaftlern und Laboren (331). Folglich wurde die translationale Relevanz dieses Modells für ein Developmental Programming beim Menschen bereits grundsätzlich in Frage gestellt (332). Zusammenfassend muss festgehalten werden, dass insbesondere bei den IUGR-Modellen zur mütterlichen Mangel- oder Fehlernährung aber auch bei experimenteller Plazentainsuffizienz eine inhomogene und teilweise widersprüchliche Datenlage herrscht. Dies macht Schlussfolgerungen zu den Auswirkungen einer IUGR im Herzen und in anderen Organen und damit zu den Mechanismen des Developmental Programming schwierig.

#### **2.6.6. Diskrepanz zwischen prä- und postnatalem Nahrungsangebot als Ursache für Developmental Programming?**

Entsprechend der Hypothese des Developmental Programming führt eine intrauterine Wachstumsrestriktion zu epigenetischen Veränderungen der Genexpression und des Metabolismus im Embryo und Fötus, die nach der Geburt persistieren (siehe Kapitel 1.4.1.). Der ursprüngliche Sinn solcher Anpassungen könnte dabei darin bestehen, die Nachkommen bereits im Uterus auf ein Leben unter Mangelbedingungen nach der Geburt vorzubereiten (59). Erst durch den Überfluss des Nahrungsangebotes nach der Geburt in westlichen Industrienationen könnten sich die IUGR-bedingten Veränderungen als nachteilig erweisen und so die Anfälligkeit gegenüber verschiedenen Erkrankungen im Erwachsenenalter erhöhen. In diesem Fall wäre es also das Mismatch zwischen intrauterinen versus postnatalen Nährstoff- und Wachstumsbedingungen, die die negativen Auswirkungen des Developmental Programming provozieren. Entsprechend dieser Überlegungen müssten Letztere folglich vermieden werden können, wenn pränatale Mangelzustände nach der Geburt fortbestehen würden. In der Tat zeigen Schafe, die nach pränataler Nahrungsrestriktion im postnatalen Verlauf freien Zugang zu Futter hatten, im

Erwachsenenalter eine Erhöhung des Blutdrucks, eine Verschlechterung der Nierenfunktion und eine linksventrikuläre Hypertrophie. Diese pathologischen Veränderungen treten dagegen nicht auf, wenn auch nach der Geburt eine Nahrungsrestriktion aufrechterhalten wird (333). Wie bereits beschrieben, führt eine mütterliche Proteinrestriktion während der Trächtigkeit in Ratten zu einer IUGR und einem reduzierten Geburtsgewicht (193). Werden die Nachkommen nach der Geburt auf eine normale Ernährung gesetzt, so führt dies zu maladaptiven Veränderungen des Myokardgewebes und zu Einschränkungen der Herzfunktion (193, 198-200). Werden die LPD-Bedingungen dagegen für 2 Wochen nach der Geburt beibehalten, so sind in adulten Tieren keine Veränderungen der Herzfunktion mehr nachweisbar (334). Auch unsere eigenen Daten zeigen, dass konstante Bedingungen einer Proteinrestriktion während der intrauterinen und postnatalen Entwicklung in Mäusen zu keinerlei Einschränkungen der Herzgröße oder Funktion im Erwachsenenalter führen. Auf histologischer Ebene gibt es sogar Anzeichen für eine begünstigende Zusammensetzung des myokardialen Gewebes im Vergleich zu Kontrollen, die zu jedem Zeitpunkt auf einer normalen Diät gehalten wurden (siehe Kapitel 2.6.2.). Eine Limitierung unserer Daten in Bezug auf eine solche Interpretation ist allerdings, dass in unserer Studie keine Gruppe an Mäusen mitgeführt wurde, die pränatal einer LPD und nach der Geburt einer normalen Diät ausgesetzt war. Daher konnten wir nicht selbst bestätigen, dass diese Tiere in der Tat auch unter dem von uns verwendeten Protokoll pathologische Veränderungen des Myokards und Einschränkungen der Herzfunktion entwickeln. In Anbetracht der bereits diskutierten Probleme bei der Interpretation einer LPD als IUGR-Modell aufgrund der Variabilität der Methoden wäre so eine Vergleichsgruppe wünschenswert (siehe Kapitel 2.6.5.). Vor dem Hintergrund muss auch für unsere eigene Studie kritisch angemerkt werden, dass die Tiere auf Normal-Diät ein handelsübliches Futter bekommen haben. Dieses war keine optimal auf die LPD abgestimmte Kontroll-Diät, so dass sich beide neben dem Proteingehalt auch in einigen anderen Komponenten unterscheiden haben (so z.B. im Zuckergehalt). Nichtsdestotrotz deuten unsere Daten zusammen mit einigen anderen Studien darauf hin, dass es das Mismatch zwischen prä- und postnatalen Nährstoff- und Wachstumsbedingungen sein könnte, was für die negativen Auswirkungen des Developmental Programming verantwortlich ist. Interessanterweise scheint dies auch in der entgegengesetzten Richtung der Fall zu sein: Mäuse, deren Mütter während der Trächtigkeit auf einer normalen Diät aber nach der Geburt während der Säugephase für drei Wochen auf einer LPD gehalten wurden, entwickeln im Erwachsenenalter kleinere Herzen mit diastolischer Dysfunktion sowie eine Einschränkung der körperlichen Leistungsfähigkeit (335). Diese Veränderungen scheinen allerdings geschlechtsspezifisch zu sein und betreffen weibliche Nachkommen stärker als männliche. In einer anderen Studie wurden männliche Ratten ab dem Alter von 4 Wochen für 35 Tage auf eine LPD gesetzt. Diese Tiere entwickeln im Erwachsenenalter kleinere Herzen als Kontrollen mit kleineren Kardiomyozyten und einer vermehrten Fibrosierung (336). Isolierte Kardiomyozyten aus diesen LPD-Hezen zeigen eine eingeschränkte Kontraktilität und ein gestörtes Calcium-Handling.

#### **2.6.7. Geschlechtsspezifische Effekte des Developmental Programming**

Es gibt Hinweise, dass die Folgen einer IUGR und damit die möglichen Effekte eines Developmental Programming in beiden Geschlechtern unterschiedlich sind. Beim Menschen ist die Situation unklar, da es eine Reihe von widersprüchlichen Studien gibt, die die Auswirkungen eines geringen Geburtsgewichts auf den Blutdruck, Cholesterin und Triglycerid-Gehalt im Blut oder die Nierenfunktion im Erwachsenenalter untersucht haben (337). Dabei konnte oft kein Unterschied zwischen Männern und Frauen gezeigt werden, während vereinzelte Daten doch auf geschlechtsspezifische Effekte hindeuten (337). Hierbei

sind aber je nach Studie mal Männer oder Frauen stärker betroffen, so dass sich kein einheitliches Bild ergibt. In tierexperimentellen Untersuchungen gibt es allerdings sehr wohl Hinweise, die unterschiedliche Effekte einer IUGR auf das kardiovaskuläre System in männlichen im Vergleich zu weiblichen Nachkommen aufzeigen. Dies ist am besten im Rahmen der Entwicklung eines arteriellen Hypertonus nach IUGR erforscht. So führt die Induktion einer Plazentainsuffizienz in Ratten zunächst sowohl in männlichen als auch weiblichen Nachkommen im Alter von 4 und 8 Wochen zu einem erhöhten Blutdruck im Vergleich zu Kontrollen, der im Alter von 12 Wochen aber nur noch in Männchen, nicht jedoch in Weibchen nachweisbar ist (338). Ähnlich verhält es sich bei einer pränatalen LPD in Ratten: Diese verursacht in adulten männlichen (339) aber nicht in weiblichen (340) Nachkommen einen arteriellen Hypertonus. Auch im Herzen zeigen sich IUGR-bedingte Unterschiede zwischen den Geschlechtern. So führt eine fetale Hypoxie in Ratten in adulten männlichen Nachkommen zu einer linksventrikulären Hypertrophie, die in Weibchen nicht beobachtet wurde (232), während die Anfälligkeit des Herzens gegenüber einer Ischämie/Reperfusion in beiden Geschlechtern gleich ist (233). Im Gegensatz dazu ist in adulten Rattenherzen nach pränataler LPD die Erholung nach Ischämie/Reperfusion lediglich in männlichen nicht aber in weiblichen Nachkommen reduziert (207). In Meerschweinchen kommt es nach pränataler Kalorienrestriktion im Erwachsenenalter zu einem reduzierten Herzgewicht in weiblichen aber nicht in männlichen Nachkommen, während die Morphologie des linken Ventrikels ansonsten in beiden Geschlechtern normal ist (210).

Auch wir haben in unseren eigenen Studien zur pränatalen LPD in Mäusen Unterschiede zwischen männlichen und weiblichen Nachkommen bei der Geburt festgestellt. Zum einen war das Körpergewicht nur in Weibchen, nicht aber in Männchen im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen reduziert. Vor allem aber zeigte sich im Herzen von weiblichen LPD-Nachkommen eine Vergrößerung der Kardiomyozyten, die in LPD-Männchen nicht nachweisbar war. Da das Herzgewicht in LPD- im Vergleich zu Kontroll-Weibchen nicht verändert war, stellt sich das bereits mehrfach beschriebene Szenario einer erhöhten Kardiomyozytengröße bei normaler Organgröße dar. Dies könnte, wie im Kapitel 2.3.4. beschrieben, auf eine kompensatorische Hypertrophie bei verringerter Kardiomyozytenzahl hindeuten. Wir haben in unseren bisherigen Studien die Zellzahl in neonatalen LPD- im Vergleich zu Kontroll- Herzen nicht direkt bestimmt, so dass die bisherigen Daten nur ein indirekter Hinweis sind, der in zukünftigen Untersuchungen bestätigt werden muss. Dennoch könnten sie möglicherweise anzeigen, dass weibliche Embryonen und Föten gegenüber einer intrauterinen Proteinrestriktion anfälliger sind als männliche. Dies äußert sich zum einen in dem reduzierten Geburtsgewicht, zum anderen in der möglicherweise reduzierten Kardiomyozytenzahl. Demnach wäre das proliferative Wachstum des embryonalen und fetalen Herzens in Weibchen stärker von einer suffizienten Protein- bzw. Aminosäure-Versorgung abhängig als in Männchen. Interessanterweise reduziert eine mütterliche Hypoxie während der Trächtigkeit in Meerschweinchen die Kardiomyozytenzahl im adulten Herzen von weiblichen aber nicht von männlichen Nachkommen (209). Dies deutet zusammenfassend darauf hin, dass es geschlechtsspezifische Einflüsse auf die Herzentwicklung und das pränatale kardiale Wachstum gibt, die möglicherweise eine unterschiedliche Risiko-Stratifizierung von weiblichen und männlichen Nachkommen mit geringem Geburtsgewicht nach IUGR erfordern.

### **3. Zusammenfassende Darstellung**

Die intrauterine Entwicklung des embryonalen und fetalen Herzens bestimmt maßgeblich die Gesundheit des Kindes bei der Geburt und im weiteren Verlauf des Lebens. Störungen der Herzentwicklung können sich im Neugeborenen als angeborene, strukturelle Herzfehler aber auch erst im Erwachsenenalter durch eine erhöhte Anfälligkeit für kardiovaskuläre Erkrankungen manifestieren. Neben essentiellen morphologischen Meilensteinen der frühen Organogenese im Embryo ist es vor allem das myokardiale Wachstum, das über ein normal großes und funktionsfähiges Herz bei der Geburt entscheidet. Das embryonale und fetale Herz bei Säugern wächst durch die Teilung und Vermehrung von Herzmuskelzellen (Kardiomyozyten). Nach der Geburt nimmt deren Proliferationsrate rapide ab und kommt im adulten Myokard weitestgehend zum Erliegen. Das postnatale Herz wächst daher vor allem durch eine Größenzunahme (Hypertrophie) der bestehenden Zellen, nicht jedoch durch eine nennenswerte Neubildung. Dieser postnatale Zellzyklus-Austritt der Kardiomyozyten ist einer der Hauptgründe dafür, dass das adulte Herz keine Fähigkeit zur Regeneration besitzt. Er hat darüber hinaus Folgen für Kinder, die mit einer kardialen Hypoplasie, also einer verringerten Zahl an Kardiomyozyten im Herzen geboren werden. Letzteres kann durch eine Behinderung des embryonalen oder fetalen Wachstums bei Erkrankungen, Fehlernährung oder Medikamenten-Abusus der Mutter oder bei einer Plazentainsuffizienz bedingt sein. Eine solche intrauterine Wachstumsrestriktion führt zu einem geringen Geburtsgewicht, meist in Kombination mit einer reduzierten Größe des Herzens. Auch Kinder nach Frühgeburt haben wegen des vorzeitigen Abbruchs der intrauterinen Entwicklung eine verringerte Herzgröße. Sowohl bei geringem Geburtsgewicht als auch nach Frühgeburt besteht die Gefahr, dass Kinder mit einem unvollständigen Satz an Kardiomyozyten zur Welt kommen. Dieser kann aufgrund des Zellzyklus-Austritts der Kardiomyozyten nach der Geburt nicht mehr ausgeglichen werden und beeinflusst somit die kardiovaskuläre Gesundheit.

Gegenstand der Forschungsarbeiten dieser Habilitationsschrift ist die Wachstumsplastizität des prä- und postnatalen Herzens. Eine Frage ist dabei, welche Möglichkeiten das Herz im Uterus hat, um Gewebeschäden zu reparieren und zellulären Stress zu kompensieren. Die Ergebnisse zeigen erstmals eine erstaunliche Regenerationsfähigkeit des embryonalen und fetalen Herzens in der Maus. Dieses kann einen Anteil von 50% defekter Zellen zur Halbzeit der intrauterinen Entwicklung bis zur Geburt durch eine gesteigerte Proliferation der gesunden Kardiomyozyten kompensieren und so ein funktionsfähiges Herz aufbauen. Die defekten Zellen werden dabei nicht durch Zelltod eliminiert, sondern aktivieren eine zelluläre Stressantwort und eine Reihe protektiver Mechanismen, die ihr Überleben bis in adulte Stadien sicherstellen. Dies legt nahe, dass das pränatale Herz durch Anpassung der Proliferationsrate in Kardiomyozyten auf Gewebeschäden und Umwelteinflüsse reagieren und so bis zur Geburt ein normales Herz generieren kann. Dabei scheinen unreife Kardiomyozyten ein Überlebensprogramm aktivieren zu können, das sie vor Zelltod unter ungünstigen intrauterinen Bedingungen schützt und so das Fortschreiten der kardialen Entwicklung und das Überleben des Embryos sichert. Diese zellulären Schutzmechanismen gehen im postnatalen Herzen im Verlauf der terminalen Differenzierung von Kardiomyozyten möglicherweise verloren, was deren hohe Anfälligkeit gegenüber Stress bedingt.

Darüber hinaus beschäftigen sich die dargestellten Arbeiten mit der Frage, wie das embryonale und fetale Herz Phasen von ungünstigen intrauterinen Wachstumsbedingungen überbrückt und wie letztere die Proliferation der Kardiomyozyten und damit deren Zahl und die Herzgröße bei der Geburt beeinflussen. Dabei konnte mit dem mTORC1 (mechanistic target of rapamycin complex 1) Signalweg, einem Aktivator der Proteinbiosynthese, ein molekularer Mechanismus identifiziert werden, der das intrauterine Wachstum des Fötus allgemein und das des Herzens im Speziellen reguliert. Die Inhibierung von mTORC1 im



letzten Viertel der Trächtigkeit der Maus führt zu kleineren Herzen bei der Geburt, vor allem aufgrund einer verringerten Größe nicht aber Zellzyklus-Aktivität der Kardiomyozyten. Bis ins Erwachsenenalter normalisiert sich die Herzgröße dieser Tiere weitgehend, wobei die Kardiomyozytenzahl reduziert ist. Während in neonatalen Mäusen nach pränataler mTORC1-Inhibierung eine leichte Einschränkung der Herzfunktion besteht, ist diese im Erwachsenenalter nicht mehr nachweisbar. Eine Reduktion der Proteinmenge in der mütterlichen Ernährung während der Trächtigkeit hat im Gegensatz zur mTORC1-Inhibierung nur milde Auswirkungen auf das Herz von neugeborenen Mäusen, wobei es Hinweise auf eine Reduktion der Kardiomyozytenzahl gibt. Wird eine intrauterine Proteinrestriktion nach der Geburt bis ins Erwachsenenalter aufrechterhalten, so entwickeln sich normal große Herzen mit einer günstigen Gewebearchitektur: die Größe der Kardiomyozyten ist verringert und ihre Zahl tendenziell erhöht, die Kapillardichte nimmt zu und die myokardiale Fibrosierung ab. Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass ungünstige intrauterine Wachstumsbedingungen das Herzgewicht, die Kardiomyozytengröße und möglicherweise auch deren Zahl bei der Geburt beeinflussen. Trotzdem kann bis ins Erwachsenenalter ein normal großes und funktionsfähiges Herz aufgebaut werden, wobei eine dauerhafte Proteinrestriktion in der Ernährung günstige Auswirkungen auf die Gewebe-Homöostase des Myokards haben könnte.

Schließlich ist eine Frage dieser Habilitationsschrift, wie das Herz ein bei der Geburt bestehendes Kardiomyozyten-Defizit im weiteren Verlauf des Lebens kompensieren kann und welchen Einfluss dies auf die Funktion und die Stressanfälligkeit im Erwachsenenalter hat. Hierbei zeigte sich in der Maus, dass eine Reduktion der Kardiomyozytenzahl bei der Geburt durch ein kompensatorisch gesteigertes Größenwachstum der Zellen ausgeglichen werden kann, so dass ein normal großes und voll funktionsfähiges adultes Herz entsteht. Werden diese Herzen einer kardialen Belastung ausgesetzt, so kann durch eine überproportionale Hypertrophie der Kardiomyozyten eine normale Funktion und Kontraktilität aufrechterhalten werden. Unter Druckbelastung des linken Ventrikels entwickelt das hypoplastische Herz durch die Anpassung der Kardiomyozytengröße sogar eine bessere Funktion als normale Herzen und kann Anzeichen einer Herzinsuffizienz verhindern. Diese Ergebnisse legen nahe, dass die Plastizität der Kardiomyozytengröße ein wichtiger Regulator ist, mit dem das hypoplastische Herz im Verlauf des Lebens sowohl unter Basal- als auch unter Stressbedingungen eine normale Funktion aufrechterhalten kann. Demnach könnten Einflüsse, die das postnatale Wachstum der Kardiomyozyten verändern, wie Ernährung oder Medikamente, die Kompensationsfähigkeit des Herzen nach neonataler Hypoplasie einschränken. Dies wiederum würde die Stressanfälligkeit im adulten Herzen beeinflussen und somit im Sinne des „Developmental Programming“ zu einem erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen nach intrauteriner Entwicklungsstörung führen.

Ein gesunder Start ins Leben erfordert ein normal großes, strukturell intaktes und voll funktionstüchtiges Herz bei der Geburt. Die Wachstumsplastizität sowohl des prä- als auch postnatalen Herzens spielt dabei eine entscheidende Rolle zur Sicherstellung der kardiovaskulären Gesundheit in allen Altersstufen.

## 4. Publikationen und Darstellung der eigenen Arbeiten

### 4.1. Regeneration des embryonalen und fetalen Herzens in der Maus

Um die Regenerationsfähigkeit des pränatalen Herzens untersuchen zu können, haben wir ein neuartiges Mausmodell entwickelt, das auf dem herzspezifischen Knockout (KO) des Holocytochrom c Synthase (*Hccs*) Gens beruht. *Hccs* kodiert für ein Enzym, das für die Synthese von Cytochrom c, einem wichtigen Elektronentransporter der mitochondrialen Atmungskette, essentiell ist (341). Durch die Inaktivierung von *Hccs* kommt es zum Fehlen von Cytochrom c und damit zu einem Abbruch des Elektronentransports zwischen den Atmungsketten-Komplexen III und IV. Dies wiederum führt zu einer mitochondrialen Dysfunktion, die mit einer verminderten Synthese von ATP und einer vermehrten Bildung von reaktiven Sauerstoffverbindungen und damit oxidativem Stress verbunden ist (119). Das *Hccs*-Gen liegt auf dem X-Chromosom und ist damit der zufälligen X-chromosomalen Inaktivierung in weiblichen Zellen unterworfen. Auf diese Weise entsteht im embryonalen Herzen von heterozygoten *Hccs*-KO-Weibchen (im weiteren Verlauf als „cardiac“ *cHccs*<sup>+/-</sup> bezeichnet) ein Gewebemosaik aus Kardiomyozyten mit einem Defekt in der mitochondrialen Atmungskette und gesunden Zellen im Verhältnis 50:50 (siehe Abbildung 4). Interessanterweise wird das ventrikuläre Myokard von *cHccs*<sup>+/-</sup> Mäusen bei der Geburt zu 90% aus gesunden und nur noch zu 10% aus defekten Kardiomyozyten aufgebaut. Diese Regeneration des embryonalen und fetalen Herzens wird durch eine kompensatorisch gesteigerte Proliferationsrate in den gesunden Zellen gewährleistet, während defekte Zellen eine verminderte Teilungsrate zeigen (Abbildung 4). Während die Population gesunder Zellen bis zur Geburt also ein voll funktionsfähiges Herz entwickeln kann, tragen defekte Kardiomyozyten kaum zum Aufbau des Myokards bei.

Die Bildung des Herzens aus nur 50% der entwicklungsbiologisch dafür vorgesehenen Zellen bleibt jedoch im weiteren Verlauf des Lebens nicht gänzlich ohne Folgen für *cHccs*<sup>+/-</sup> Mäuse. Der Großteil (85%) der Tiere zeigt bis zum Alter von 12 Monaten keinerlei Auffälligkeiten: das Herz ist morphologisch und auch histologisch nicht von Kontrolltieren zu unterscheiden, die Herzfunktion und Kontraktilität in der Echokardiographie sind unauffällig, die intrakardiale Hämodynamik und ventrikuläre Druckverhältnisse (bestimmt mit Hilfe von Katheter-basierten Druckmessungen im linken Ventrikel) sowie das Elektrokardiogramm (EKG) sind normal. Ein kleiner Teil (15%) der *cHccs*<sup>+/-</sup> Weibchen entwickelt jedoch ab dem Alter von 9 Monaten unterschiedliche morphologische Veränderungen des Herzens, die phänotypisch variabel sind und sowohl dilatativen, hypertrophen oder rein rechtsventrikulären Kardiomyopathie-Formen ähneln. Dazu kommt es bei diesen Tieren im EKG vermehrt zu Störungen der Erregungsausbreitung im Myokard, was sich vor allem in AV- und Schenkel-Blockierungen äußert. Unter den betroffenen *cHccs*<sup>+/-</sup> Tieren treten darüber hinaus vereinzelt vorzeitige Todesfällen auf, die möglicherweise durch eine Kombination aus Herzinsuffizienz und fatalen Arrhythmien ausgelöst werden.

Zusammenfassend wurde mit dieser Studie zum ersten Mal die Regenerationsfähigkeit des embryonalen und fetalen Herzens im Tierexperiment demonstriert, auch wenn diese in wenigen Einzelfällen negative Konsequenzen für die Herzfunktion im Alter haben kann.

### Veröffentlichung zu den dargestellten Arbeiten:

Drenckhahn JD, Schwarz QP, Gray S, Laskowski A, Kiriazis H, Ming Z, Harvey RP, Du XJ, Thorburn DR, Cox TC. Compensatory growth of healthy cardiac cells in the presence of diseased cells restores tissue homeostasis during heart development. *Dev Cell*. 2008;15:521-533.

# Compensatory Growth of Healthy Cardiac Cells in the Presence of Diseased Cells Restores Tissue Homeostasis during Heart Development

Jörg-Detlef Drenckhahn,<sup>1,2,3</sup> Quenten P. Schwarz,<sup>2,9</sup> Stephen Gray,<sup>1</sup> Adrienne Laskowski,<sup>4</sup> Helen Kiriazis,<sup>5</sup> Ziqiu Ming,<sup>5</sup> Richard P. Harvey,<sup>6</sup> Xiao-Jun Du,<sup>5</sup> David R. Thorburn,<sup>4,7</sup> and Timothy C. Cox<sup>1,2,8,\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Anatomy & Developmental Biology, Monash University, Wellington Road, Clayton VIC 3800, Melbourne, Australia

<sup>2</sup>School of Biomedical and Molecular Science, University of Adelaide, North Terrace, Adelaide SA 5005, Adelaide, Australia

<sup>3</sup>Max-Delbrück Center for Molecular Medicine, Robert-Rössle-Straße 10, 13125 Berlin, Germany

<sup>4</sup>Murdoch Children's Research Institute, Royal Children's Hospital, Flemington Road, Parkville VIC 3052, Melbourne, Australia

<sup>5</sup>Baker IDI Heart Research and Diabetes Institute, Commercial Road, Melbourne VIC 3004, Melbourne, Australia

<sup>6</sup>Victor Chang Cardiac Research Institute, Liverpool Street, Darlinghurst NSW 2010, Sydney, Australia

<sup>7</sup>Department of Paediatrics, University of Melbourne, Parkville VIC 3052, Melbourne, Australia

<sup>8</sup>Division of Craniofacial Medicine, Department of Pediatrics, University of Washington, Seattle, WA 98195, USA

<sup>9</sup>Present address: Department of Cell Biology, Institute of Ophthalmology, University College London, EC1V 9EL, United Kingdom

\*Correspondence: [tccox@u.washington.edu](mailto:tccox@u.washington.edu)

DOI 10.1016/j.devcel.2008.09.005

## SUMMARY

Energy generation by mitochondrial respiration is an absolute requirement for cardiac function. Here, we used a heart-specific conditional knockout approach to inactivate the X-linked gene encoding Holocytochrome c synthase (*Hccs*), an enzyme responsible for activation of respiratory cytochromes c and c1. Heterozygous knockout female mice were thus mosaic for *Hccs* function due to random X chromosome inactivation. In contrast to midgestational lethality of *Hccs* knockout males, heterozygous females appeared normal after birth. Analyses of heterozygous embryos revealed the expected 50:50 ratio of *Hccs* deficient to normal cardiac cells at midgestation; however, diseased tissue contributed progressively less over time and by birth represented only 10% of cardiac tissue volume. This change is accounted for by increased proliferation of remaining healthy cardiac cells resulting in a fully functional heart. These data reveal an impressive regenerative capacity of the fetal heart that can compensate for an effective loss of 50% of cardiac tissue.

## INTRODUCTION

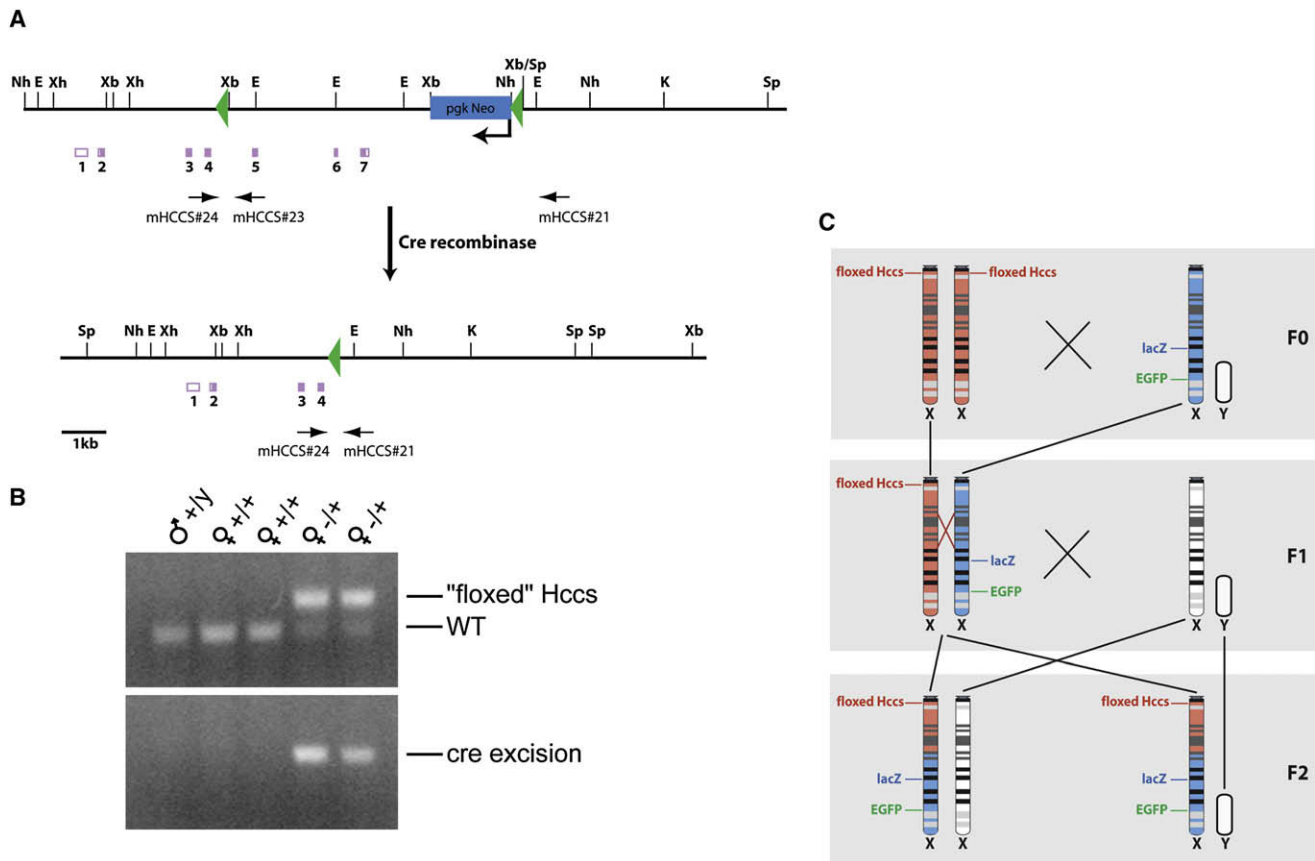
Mitochondrial disorders are one of the leading causes of fatal early onset cardiomyopathies (Marin-Garcia et al., 2000), although there is convincing evidence that mitochondrial pathology also contributes to cardiac failure in the aging heart (Marin-Garcia et al., 2001). Both the nuclear and mitochondrial genomes encode proteins that function within the mitochondrial respiratory chain, and mutations in either genome have been associated with various cardiac phenotypes (Smeitink et al., 2001). For example, defects in proteins required for the assembly of human complex IV (cytochrome oxidase or COX) are associated

with infantile cardiomyopathies that are characterized by sudden neonatal death (Antonicka et al., 2003; Papadopoulou et al., 1999). In mice, the disruption of the heart/muscle isoform of the adenine nucleotide translocator (Ant1) that is responsible for the exchange of ADP and ATP across the inner mitochondrial membrane leads to cardiomyopathy with dramatic mitochondrial proliferation (Graham et al., 1997). In addition, heart-specific disruption of the nuclear-encoded mitochondrial transcription factor A (Tfam), which is responsible for replication and transcription of the mitochondrial genome, results in cardiomyopathy and premature death (Wang et al., 1999).

Crucial components for normal function of the mitochondrial respiratory chain are the two related electron transporters cytochromes c and c1: cytochrome c1 (an integral component of complex III) transferring electrons from ubiquinol to cytochrome c; cytochrome c in turn transferring electrons from complex III to complex IV (Smeitink et al., 2001). In mammals, both precursor apocytochromes are converted to their active holoenzymes by the covalent attachment of a heme moiety by the heme lyase Holocytochrome c synthase (*Hccs*) (Bernard et al., 2003; Schwarz and Cox, 2002).

In mice and humans, the *Hccs/HCCS* gene is located on the X chromosome and is subject to X chromosome inactivation, a highly conserved process in mammals that leads to transcriptional silencing of one of the two X chromosomes in all female somatic cells during early embryonic development. This is thought to have evolved as a means to compensate for the difference in dosage of X-linked genes between the sexes (Avner and Heard, 2001). Once inactivation is established, this state is maintained through successive cell divisions such that all females can be considered cellular mosaics. Thus, the pattern of X inactivation is widely believed to be a major determinant of phenotypic outcome in females heterozygous for X-linked mutations (Lyon, 2002).

Using X-linked reporter transgenes in conjunction with heart-specific inactivation of the X-linked *Hccs* gene in female mice, we describe a remarkable regenerative capacity of the post-midgestation heart, at a time after X inactivation has been completed and all major cardiac cell types and structures are in



**Figure 1. Generation of Mice Carrying a Floxed *Hccs* Allele and in *cis* Reporter Genes**

(A) The "floxed" *Hccs* allele with two integrated loxP sites (green triangles) is shown. Relative positions of exons (pink boxes) and relevant primers (arrows) are indicated.

(B) Cre-mediated excision in the heart is confirmed by PCR on genomic DNA prepared from hearts of heterozygous *Hccs* KO females ( $\text{♀ } -/+$ ). Primers mHccs#23 and #24 [see (A)] amplify a 380 bp wild-type product and an additional 450 bp product if the 5' loxP site is present (upper panel). Primers mHccs 21 and 24 amplify a 470 bp product if Cre excision has occurred (lower panel).

(C) To aid detection of *Hccs*-deficient cells, a mouse line carrying the floxed *Hccs* allele and two X-linked reporter genes (*lacZ* and *EGFP*) in *cis* was generated by selection of appropriate meiotic recombinants (red cross) appearing in the F2 generation.

place. This previously unrecognized capacity of the embryonic heart is mediated by hyperproliferation of healthy cardiac cells in the presence of damaged cells and can effectively compensate for loss of at least 50% of diseased tissue to ensure the formation of a fully functional heart by birth.

## RESULTS

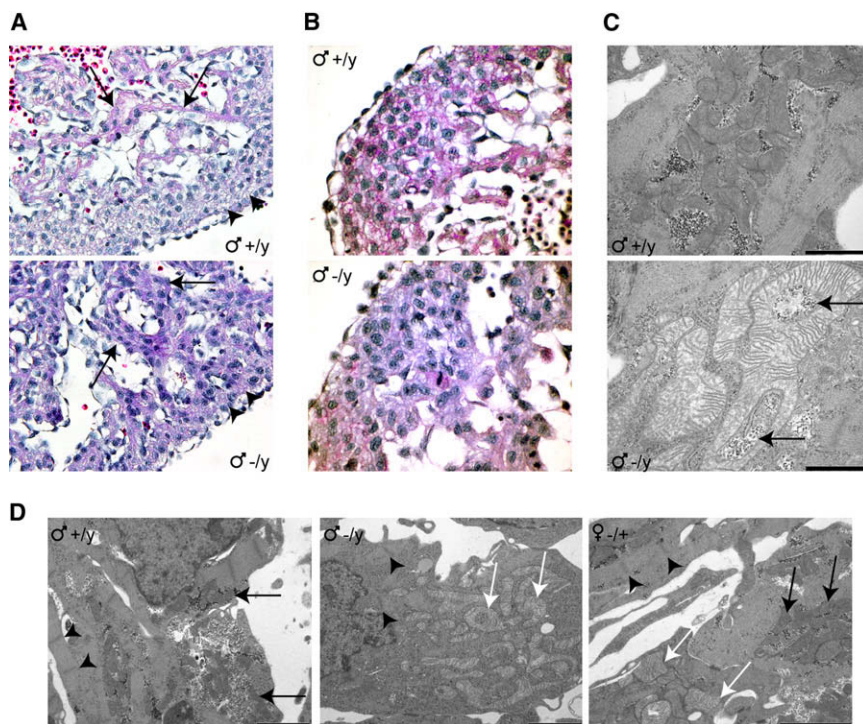
### Heart Conditional Inactivation of *Hccs* in Mice

A previous conventional knockout (KO) of *Hccs* in mice was found to be deleterious for male ES cell survival (Prakash et al., 2002). Similarly, inactivation of murine cytochrome c also resulted in early embryonic lethality (Li et al., 2000). We therefore employed a heart-conditional KO approach using the Cre/loxP recombination system (Figure 1A). We positioned one of the loxP recognition sequences and the neomycin-resistance (*Neo<sup>r</sup>*) selection marker 3' of the *Hccs* transcription unit, while the second loxP site was inserted within intron 4. Upon Cre expression, the final three exons (out of seven) of this targeted, or "floxed," *Hccs* allele are excised (Figure 1A). This excision event

produces a null allele, since these three exons encode the catalytic domain (Schaefer et al., 1996; Schwarz and Cox, 2002). To ensure inactivation of the targeted allele in the developing heart, we bred the floxed *Hccs* mice to a transgenic mouse line in which the Cre open reading frame had been introduced with an internal ribosome entry site (IRES) immediately 3' of the endogenous *Nkx2.5* gene (Stanley et al., 2002). Correct excision of the floxed *Hccs* allele in offspring was confirmed by both PCR analysis on genomic DNA prepared from hearts (Figure 1B) as well as by western blot analyses showing reduced *Hccs* and cytochrome c amounts in KO hearts (Figure 3A).

### Midgestational Lethality for Hemizygous *Hccs* KO Males

Analyses of embryos at midgestational stages have shown that the majority (~75%) of hemizygous *Hccs* knockout males as well as homozygous females die in utero between 10.5 and 12.5 dpc although a small number survive up to 14.5 dpc. Hearts from male embryos deficient in *Hccs* were morphologically normal at 10.5 and 12.5 dpc when compared to controls (see Figures S1A and S1B available online), indicating that early



**Figure 2. Cellular and Ultrastructural Changes in Hearts of Hemizygous Male and Heterozygous Female *Hccs* KO Embryos**

(A) Cardiac cells in the ventricular compact zone of *Hccs* KO male hearts (13.5 dpc) appear densely packed with a fine granular material (arrowheads), while cardiomyocytes in the trabecular zone do not show typical elongation and cross-striation (arrows) (H&E stain, magnification 40 $\times$ ).

(B) Periodic acid-Schiff (PAS) stain revealed that cardiac cells in male KO hearts (13.5 dpc) show significantly less staining, suggesting decreased glycogen content. (Magnification 60 $\times$ .)

(C) Mitochondria within cardiac cells of 13.5 dpc male KO hearts are dramatically enlarged and show disruption of internal cristae structure as well as inclusions containing electron dense granules (arrows). (Transmission electron microscopy, bar 1  $\mu$ m.)

(D) Cardiac cells in 13.5 dpc male KO hearts contain enlarged and deformed mitochondria (white arrows) compared to control mitochondria (black arrows). Sarcomere structures appear randomly spread throughout the cytoplasm in KO hearts compared to the organized sarcomeres seen in controls (arrowheads). In heterozygous *Hccs* KO female hearts, cells containing normal (black arrows) and abnormal (white arrows) mitochondria are present. Normal sarcomere maturation (arrowheads) is only apparent in those cells with normal mitochondrial morphology. (Transmission electron microscopy, bar 2  $\mu$ m.)

patterning of the cardiac compartments is not affected. However, histological analyses at 13.5 dpc showed that toward the ventricular lumen, the degree of cardiomyocyte differentiation assessed by visible sarcomere structures and cellular elongation appears to be significantly lower in male KO hearts compared to controls (Figure 2A). Furthermore, an accumulation of a fine granular material is seen in the cytoplasm of cells from both the ventricular compact zone as well as atria in male KOs compared to the vacuolated appearance of these cells in control hearts (Figure 2A). Although these granules share some similarities with glycogen in transmission electron microscopy (TEM) analyses, histological examinations revealed that KO hearts actually store less glycogen (Figure 2B). By TEM, it is also evident that, at 13.5 dpc, most mitochondria within cardiomyocytes of *Hccs*-deficient male embryos are massively enlarged and deformed, with internal disorganization of the cristae (Figure 2C). These TEM analyses also support the observation that cardiomyocytes in affected male hearts have less mature sarcomere organization and shorter, randomly arranged muscle fibrils and therefore appear less differentiated (Figure 2D).

The amount of *Hccs* protein, and concomitantly cytochrome c, is markedly reduced in the hearts of 12.5 dpc male KO embryos (Figure 3A). This reduction is highly specific for *Hccs* and cytochrome c since the levels of various respiratory complex subunits, including core 2 subunit of complex III, and other mitochondrial proteins were normal (Figure 3C). Consistent with this, respiratory chain assays conducted on individual embryonic hearts clearly demonstrate that 12.5 dpc and 14.5 dpc *Hccs*

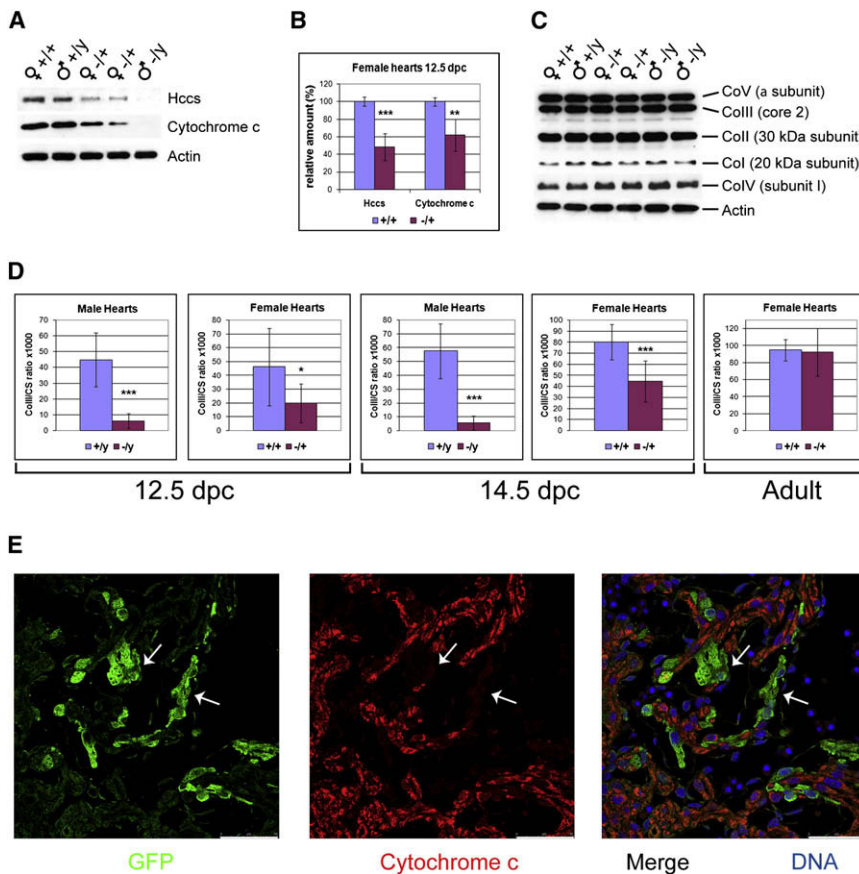
KO male embryonic hearts show  $\sim$ 10% of the complex III activity of sex- and stage-matched controls (Figure 3D).

#### Heterozygous *Hccs* KO Females Survive to Birth

Heterozygous *Hccs* KO females were expected to exhibit a mosaic cardiac tissue with roughly 50% of cells being *Hccs* deficient due to the random nature of X chromosome inactivation. Surprisingly, no embryonic lethality was observed in heterozygous *Hccs* KO females and histological analyses of cardiac tissue from newborn as well as 8-week-old mice revealed few cellular changes (see below) and no major pathology within the myocardium. Consistent with this, the protein levels of *Hccs*, cytochrome c, and subunits of the different respiratory chain complexes within adult hearts were normal (data not shown). Respiratory chain assays performed on 8-week-old heterozygous *Hccs* female hearts supported the molecular and histological analyses, showing normal levels of complex III activity (Figure 3D).

To further investigate these surprising results, we analyzed heterozygous *Hccs* KO female hearts at different embryonic stages. In contrast to the findings in adult females, 12.5 dpc and 14.5 dpc embryonic female hearts showed decreased complex III activity ( $\sim$ 50% of control hearts) (Figure 3D) in line with that expected for random X chromosome inactivation. This significantly reduced level of complex III activity was supported by the specific decrease in cardiac *Hccs* and cytochrome c protein amounts at 12.5 dpc when compared to stage- and sex-matched controls (Figures 3A and 3B). Furthermore, TEM analyses of heterozygous KO female hearts at 13.5 dpc





**Figure 3. Respiratory Chain Defects in Hearts of Hemizygous *Hccs* KO Male and Heterozygous Female Embryos**

(A) Western blot analyses confirm the absence of *Hccs* and cytochrome *c* protein in *Hccs* KO male embryonic hearts (12.5 dpc) and reduced protein amounts in heterozygous females.

(B) Hearts of 12.5 dpc heterozygous *Hccs* KO female embryos ( $n = 5$ ) contain ~50% of the level of *Hccs* and ~60% of cytochrome *c* protein compared to that of controls ( $n = 4$ ). \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.005$  versus controls.

(C) Protein levels of single subunits of the different complexes making up the respiratory chain are normal in hemizygous *Hccs* KO male and heterozygous female embryos (12.5 dpc).

(D) Hearts of 12.5 dpc ( $n = 5$ ) and 14.5 dpc ( $n = 3$ ) male *Hccs* KO embryos show only ~10% of the respiratory chain complex III (CoIII) activity of controls (12.5 dpc,  $n = 4$ ; 14.5 dpc,  $n = 5$ ). In hearts of 12.5 dpc ( $n = 11$ ) and 14.5 dpc ( $n = 10$ ) heterozygous KO female embryos CoIII activity is also significantly reduced (~43% at 12.5 dpc and ~56% at 14.5 dpc) compared to controls (12.5 dpc,  $n = 10$ ; 14.5 dpc,  $n = 6$ ). No difference in CoIII activity is seen in hearts of 8-week-old heterozygous KO females ( $n = 9$ ) compared to controls ( $n = 9$ ). \* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.005$  versus controls. (E) In 13.5 dpc heterozygous female embryos carrying the *Hccs* KO and the *EGFP* reporter gene in *cis*, the GFP-positive cardiomyocytes of the ventricular trabeculation zone lack cytochrome *c* as a consequence of *Hccs* deficiency (see arrows). (Confocal image, scale bar 50  $\mu\text{m}$ .)

confirmed the presence of enlarged and disorganized mitochondria similar to those seen in male KO hearts (Figure 2D). These irregular mitochondria were seen only in a subset of cardiac cells, while other cells contained normal mitochondria. Taken together, these findings clearly indicate that *Hccs*-deficient tissue is abundant in heterozygous female hearts at midgestation, yet remarkably by birth there is no readily observable cardiac phenotype.

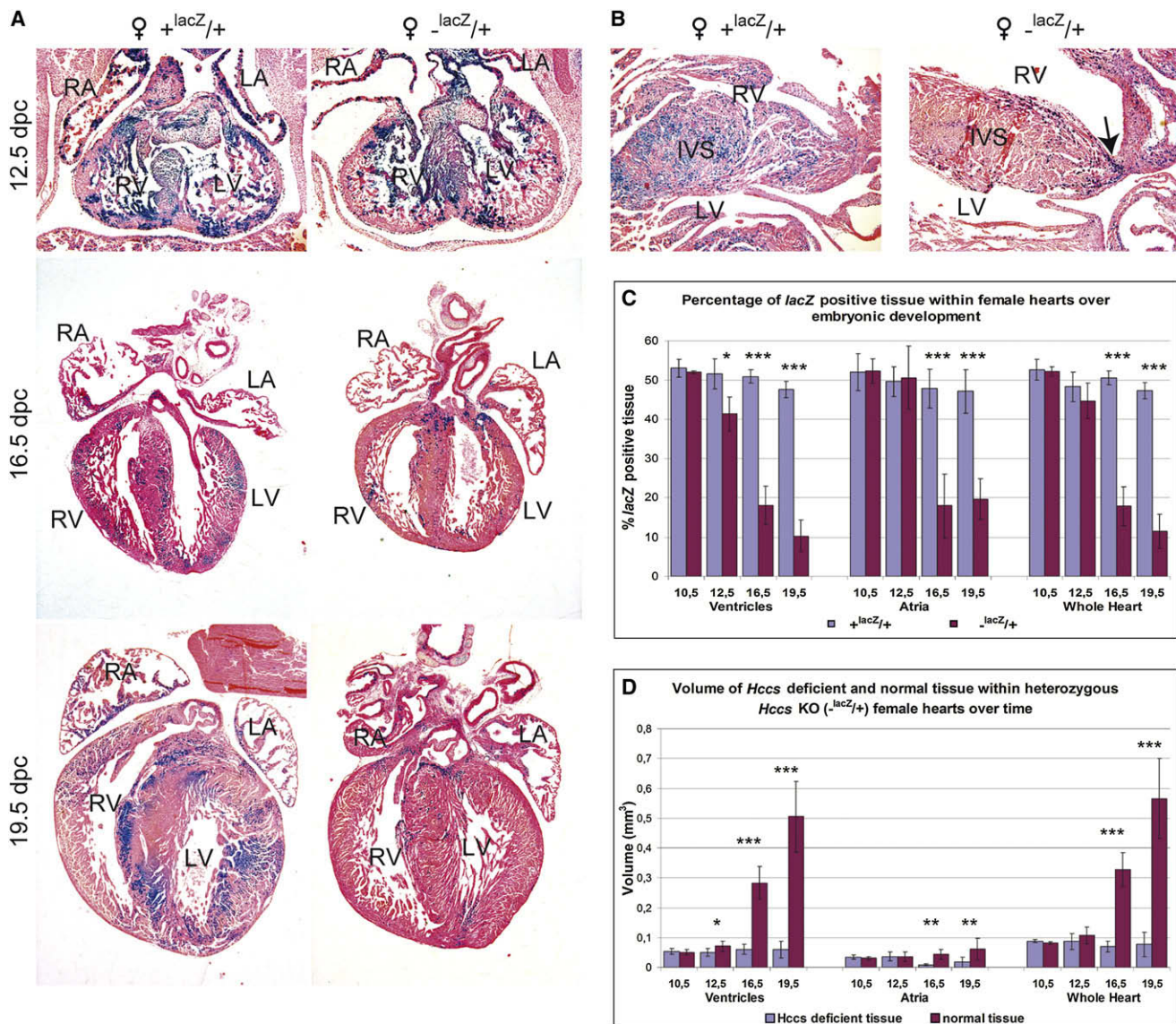
### Cardiac Regeneration during Heart Development

To determine the profile of X chromosome inactivation in heterozygous *Hccs* knockout females and to study the position and fate of *Hccs*-deficient cells within their hearts, we utilized a dual X-linked transgenic reporter system. A mouse strain (called D4X) was used that carries the enhanced Green Fluorescent Protein (*EGFP*) and  $\beta$ -galactosidase (*lacZ*) reporter genes independently integrated in *cis* onto the X chromosome. Importantly, both reporter genes have been shown to be subject to X chromosome inactivation and, as such, are undetectable in cells when the X chromosome harboring the reporter genes is inactivated (Tan et al., 1993; Hadjantonakis et al., 2001). Our floxed *Hccs* mice and the D4X line were bred and a recombinant mouse line established in which both reporter genes were located in *cis* with the floxed *Hccs* allele (Figure 1C). Following mating with the *Nkx2.5-Cre* mice, detection of either reporter gene could be used to quantitatively assess the amount of *Hccs*-deficient tissue in the hearts of heterozygous KO females at any stage of fetal development. Female embryos heterozygous for the reporter

genes but without the *Hccs* KO served as controls. Coimmunostaining for GFP and cytochrome *c* in heterozygous *Hccs* KO female embryos clearly showed that reporter positive cells in ventricular as well as atrial myocardium lack cytochrome *c* as a consequence of *Hccs* deficiency (Figure 3E and Figure S2A), demonstrating the feasibility of this approach. These data also rule out the possibility that the healthy X chromosome is reactivated in reporter positive cells.

Stereological assessment using  $\beta$ -galactosidase-stained tissue sections confirmed a dramatic decrease in the proportion of *Hccs*-deficient tissue after midgestation (Figure 4A). At stage 10.5 dpc, the expected 50:50 distribution of normal versus *Hccs*-deficient tissue in the ventricles and atria of heterozygous *Hccs* KO female embryos is evident (Figure 4C). However, the relative volume of *Hccs*-deficient tissue starts to decline by 12.5 dpc, making up ~42% of heart tissue in the developing ventricles (47% in the atria). By 16.5 dpc, this proportion has decreased markedly to ~18% (~19% in the atria), with a further decline to ~10% (~17% in the atria) prior to birth (Figure 4C). In control hearts, the ratio of *lacZ*-positive to *lacZ*-negative tissue stayed at roughly 50:50 throughout fetal development (Figure 4C). Notably, the absolute volume of *Hccs*-deficient tissue in heterozygous KO female hearts remains relatively constant throughout heart development, and thus the change in proportion of affected tissue can be accounted for by an increase in the volume of healthy tissue (Figure 4D).

Detection of *Hccs*-deficient cardiomyocytes in 12.5 and 13.5 dpc hearts of heterozygous *Hccs* KO females revealed



**Figure 4. Reduction of *Hccs*-Deficient Tissue in Heterozygous *Hccs* KO Females during Embryonic Development**

(A) In heterozygous females carrying the *Hccs* KO and a *lacZ* reporter gene in *cis* ( $\varnothing$   $-lacZ/+$ ), the proportion of *lacZ*-positive and therefore *Hccs*-deficient tissue in the heart is reduced during embryonic development in contrast to control females heterozygous for the *lacZ* reporter but wild-type for *Hccs* ( $\varnothing$   $+lacZ/+$ ). LV = left ventricle, RV = right ventricle, LA = left atrium, RA = right atrium (magnification upper panels, 10 $\times$ , middle; and lower panels, 4 $\times$ ).

(B) Higher magnification of the interventricular septum (IVS) of 19.5 dpc hearts showing strong *lacZ* staining toward the heart base and within the membranous part of the IVS in KO hearts (arrow). (Magnification, 10 $\times$ .)

(C) Stereological analyses showing the percentage of *lacZ*-positive tissue within hearts of female controls ( $+lacZ/+$ ) (10.5 dpc, n = 8; 12.5 dpc, n = 8; 16.5 dpc, n = 4; 19.5 dpc, n = 5) and heterozygous *Hccs* KO females ( $-lacZ/+$ ) (10.5 dpc, n = 3; 12.5 dpc, n = 8; 16.5 dpc, n = 10; 19.5 dpc, n = 9) during embryonic development.

(D) Stereological analyses of heterozygous *Hccs* KO females show that the absolute volume (in mm<sup>3</sup>) of *lacZ*-positive and therefore *Hccs*-deficient tissue is constant within the heart throughout embryonic development but the volume of normal tissue is dramatically increased.

that they are localized predominantly within the trabeculated myocardium, while the ventricular compact zone is almost free of *Hccs*-deficient cells (Figure 4A and Figure S2B). Furthermore, *Hccs*-deficient cardiomyocytes appear small and round when codetected by immunofluorescence staining for GFP and Troponin T compared to the elongated and cross-striated cardiomyocytes in control hearts (Figure S2B).

Despite the regenerative response of the healthy tissue in heterozygous *Hccs* KO females, a considerable proportion of

*lacZ*-positive (*Hccs*-deficient) cells is still present within the hearts at birth. Detailed histological analyses revealed that these cells are consistently found among cardiomyocytes within the interventricular septum (*Hccs*-deficient cells making up ~30% of the IVS and are particularly found toward the heart base and within the membranous part) (Figure 4B) and in the atrioventricular as well as aortic and pulmonary valves (data not shown). Within the myocardium of neonatal hearts from heterozygous *Hccs* KO females, a significant proportion of reporter-positive



cells are indeed cardiomyocytes, evident by positive immunostaining for  $\alpha$ -sarcomeric actinin (Figure S4A).

### Compensatory Increase in Proliferation of Healthy Cardiac Cells Mediates Regeneration

The stereological data, which have been used to determine the changes in tissue volume, are supported by the evaluation of cell numbers showing a significant reduction in the proportion of  $\beta$ -galactosidase-positive cells in heterozygous *Hccs* KO female hearts from 46% (at 11.5 dpc) to 29% (at 13.5 dpc) accompanied by an increase in  $\beta$ -galactosidase-negative cells from 54% (at 11.5 dpc) to 71% (at 13.5 dpc) (Figure S3A). Furthermore, calculation of absolute cell numbers within the ventricular myocardium of 11.5 and 13.5 dpc hearts revealed that in heterozygous *Hccs* KO females, the  $\beta$ -galactosidase-positive cell number increased only by 1.39-fold compared to a 2.70-fold increase in the number of  $\beta$ -galactosidase-negative cells and a 2.17-fold increase in control cells (Figure S3B). These data indicate that *Hccs*-deficient cells are still able to slowly replicate, yet this rate is insufficient to significantly increase the total volume of *Hccs*-deficient tissue during the remainder of development.

With respect to the mechanism responsible for the proportional reduction of *Hccs*-deficient tissue in heterozygous KO female embryos, we considered either the active elimination of *Hccs*-deficient cells by apoptosis or compensatory proliferation of the healthy cell population in response to the reduced proliferative capacity of the *Hccs*-deficient cells. However, detection of apoptotic cells by both TUNEL-assays and immunofluorescence staining for cleaved caspase-3 did not reveal any increase in apoptosis in either hemizygous *Hccs* KO male embryonic hearts or heterozygous *Hccs* KO females at 11.5 as well as 13.5 dpc when compared to controls (data not shown). Therefore, to evaluate proliferation rates in embryonic hearts, bromodeoxyuridine (BrdU) incorporation assays to detect cells in S-phase, as well as immunofluorescence detection of mitotic cells using an antibody against Phosphohistone H3 (PHH3), were performed. Initial costaining experiments of PHH3 and  $\alpha$ -sarcomeric actinin allowed the discrimination of mitotic cells within the epicardium, myocardium, and endocardium (Figure S5A). In 11.5 dpc embryos, the overall level of myocardial cell proliferation in heterozygous *Hccs* KO female embryos tended to be slightly higher than in controls, although this did not reach statistical significance (Figure 5A). However, when distinguishing the number of mitotic cells by PHH3 staining in  $\beta$ -galactosidase-positive versus -negative cells, a significantly reduced level of proliferation in the  $\beta$ -galactosidase-positive (*Hccs*-deficient) cell population and a significant increase in proliferation in the healthy  $\beta$ -galactosidase-negative cells were apparent in heterozygous *Hccs* KO females compared to controls (Figure 5B). Consistent with these data, an  $\sim$ 45% reduction of proliferation was observed in 11.5 dpc hemizygous KO male hearts (Figure 5A and Figure S5B). Importantly, the majority of mitotic (PHH3-positive) cells in the ventricular myocardium of 11.5 dpc heterozygous *Hccs* KO females are indeed cardiomyocytes (Figure 5C). PHH3 staining in 13.5 dpc embryos also revealed similar results, showing a significantly increased proliferation rate of the healthy cardiac cell population in heterozygous *Hccs* KO females compared to controls (Figures S6A and S6B). Again, the vast majority of these mitotic cells were cardiomyocytes (Figures S6C and

S6E), with only few PHH3-positive cells being positive for the mesenchymal marker vimentin (Figure S6D).

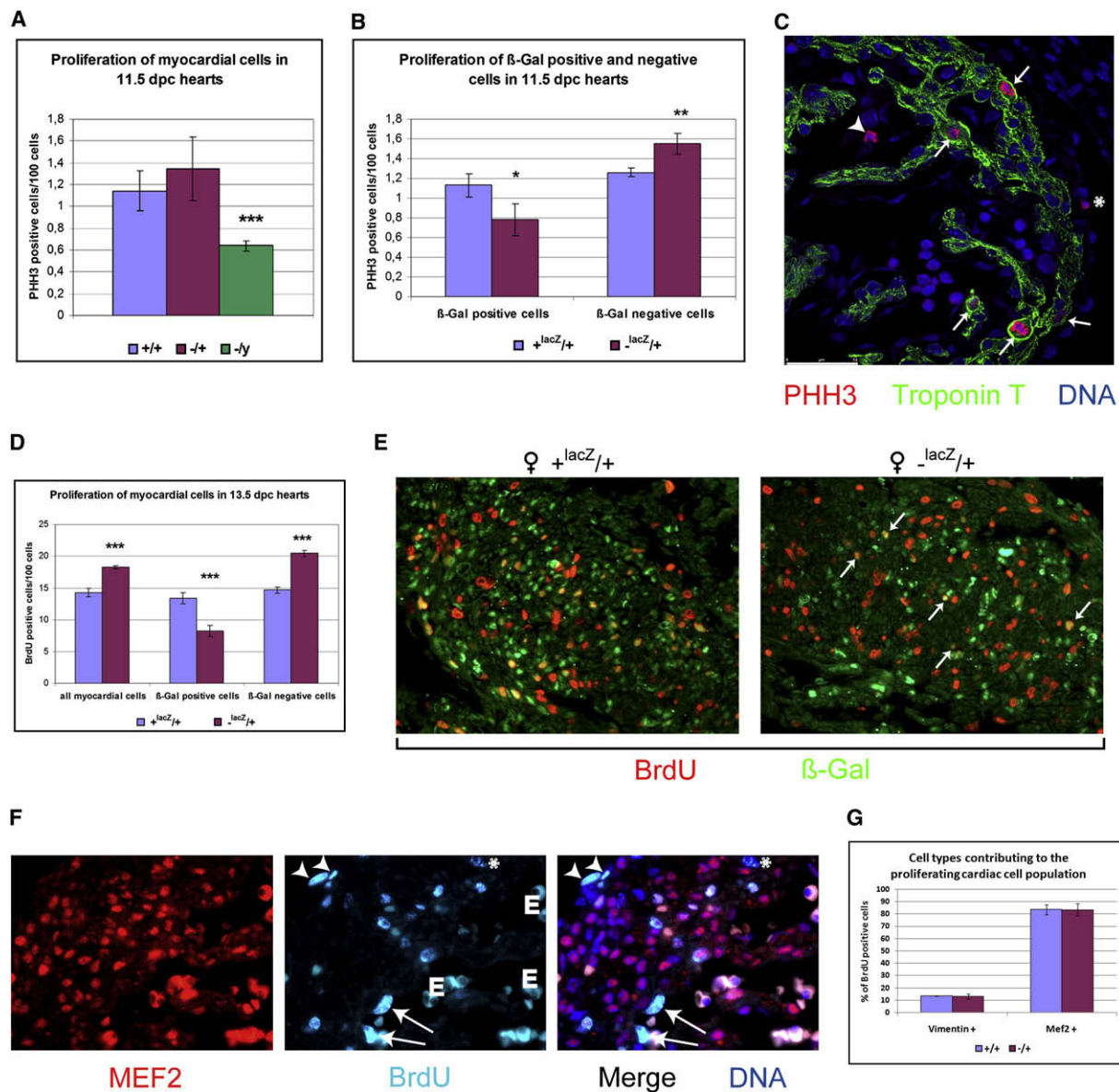
To further analyze proliferation, BrdU incorporation in myocardial cells was evaluated by immunofluorescence staining in 13.5 dpc embryos. These results show an  $\sim$ 27% increase in the number of proliferating myocardial cells in heterozygous *Hccs* KO females compared to controls (Figure 5D). Codetection of BrdU and  $\beta$ -galactosidase confirmed that this overall increase is mediated by the healthy,  $\beta$ -galactosidase-negative cell population while proliferation of *Hccs*-deficient cells is significantly reduced (Figures 5D and 5E). No significant difference in the relative ratio of proliferation between the left and right ventricle was observed when comparing heterozygous *Hccs* KO females and controls (data not shown), suggesting that the left and right ventricle have a similar regenerative capacity.

To evaluate which cell types contribute to the proliferative response of the myocardium, we costained 13.5 dpc hearts for BrdU and MEF2, a nuclear marker for cardiomyogenic cells. These data revealed that 83% of BrdU-positive cells are MEF2 positive (Figures 5F and 5G). Consistent with this, costaining of BrdU with vimentin, a marker for mesenchymal cells including fibroblasts, epicardial as well as endocardial cells showed that 12% of BrdU-positive cells are nonmyogenic (Figure 5G and Figure S6F). The remaining  $\sim$ 5% of proliferating cells might be cells of the developing vasculature or early cardiac progenitors that do not yet express MEF2. Interestingly, there was no difference in the percentage of MEF2- or vimentin-positive proliferating cells between heterozygous females and controls (Figure 5G), suggesting that all cardiac cell types contribute to the regenerative response to maintain a normal overall cellular composition of the myocardium. In summary, these results confirm that the post-midgestational reduction of *Hccs*-deficient cells in heterozygous *Hccs* KO females does not occur by active elimination of disease cells but rather represents a regenerative response mediated by an increased proliferation rate of the healthy cardiac cell population.

### Cardiomyopathies in a Subset of Heterozygous *Hccs* KO Females with Age

Although the vast majority of heterozygous *Hccs* KO female mice appeared healthy throughout their lifetime, approximately 13% ( $n = 7$  out of 54 versus  $n = 0$  out of 30 controls,  $p < 0.05$ ) died prematurely between the ages of 9 and 15 months and these exhibited a range of cardiac phenotypes, with variable degrees of dilated cardiomyopathy (DCM,  $n = 4$ ) as the most common finding (Figures 6A, 6C, and 6E). Strikingly, some cases presented with a phenotype more closely resembling a hypertrophic cardiomyopathy (HCM,  $n = 2$ ) (Figure 6D) or an isolated right ventricular dilation ( $n = 1$ ) (Figure 6F). This variability in cardiac phenotype in heterozygous *Hccs* KO females was marked and could range from completely normal (Figure 6B) to DCM and sudden cardiac death within the same litter. Histological analyses of the most severely affected DCM hearts showed left and right ventricular as well as atrial dilation including atrial thrombi (Figure 6C), hypertrophic cardiomyocytes, and interstitial fibrosis (Figure 6G). Hearts with a more HCM-like phenotype showed mainly left ventricular wall thickening (Figure 6D) and cardiomyocyte hypertrophy but less fibrosis compared to the DCM hearts (data not shown).



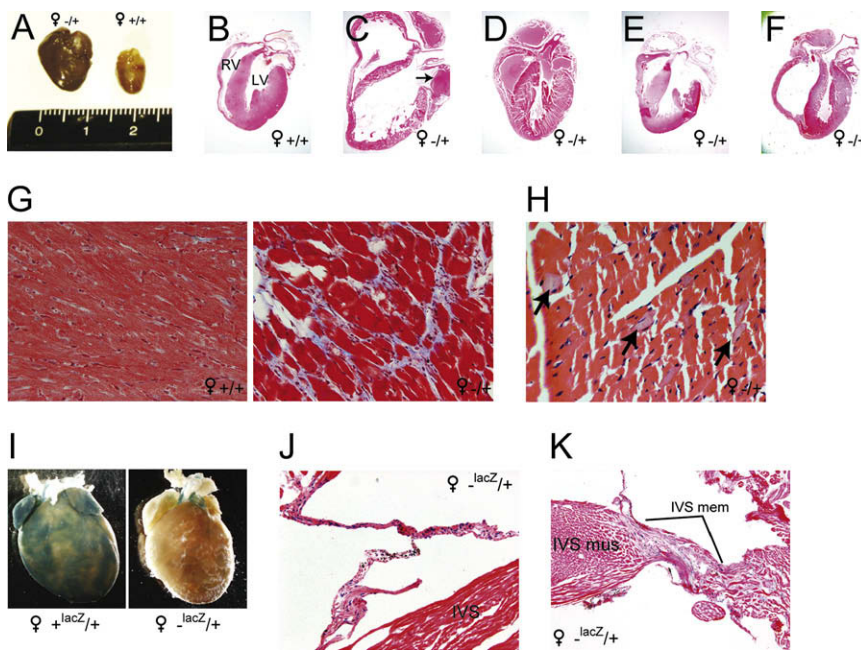


**Figure 5. Increased Proliferation of Healthy Cardiac Cells in Heterozygous *Hccs* KO Female Embryos**

(A) Proliferation of myocardial cells in hemizygous *Hccs* KO male embryos ( $n = 3$ ) is significantly reduced by ~45% compared to controls ( $n = 4$ ). (B) Proliferation of  $\beta$ -galactosidase-positive (*Hccs*-deficient) cells is reduced in the myocardium of 11.5 dpc heterozygous *Hccs* KO female embryos ( $n = 4$ ) compared to controls ( $n = 4$ ) as assessed by PHH3 immunostaining. In contrast, proliferation of healthy  $\beta$ -galactosidase-negative cells is increased. (C) The majority of mitotic (PHH3-positive) cells in the myocardium of heterozygous *Hccs* KO female embryos at 11.5 dpc are cardiomyocytes (evident as Troponin T-positive cells) compared to few nonmyogenic cells in the endocardium (arrowhead) or epicardium (asterisk). (Confocal image, scale bar 50  $\mu$ m.) (D) Incorporation of BrdU in 13.5 dpc embryos revealed a significant increase of overall proliferation of myocardial cells in heterozygous *Hccs* KO females ( $n = 3$ ) compared to controls ( $n = 3$ ), which can be attributed to an ~27% increase in proliferation of the healthy,  $\beta$ -galactosidase-negative cell population while proliferation of *Hccs*-deficient cells ( $\beta$ -Gal positive) is reduced. (E) Few  $\beta$ -galactosidase-positive (*Hccs*-deficient) cells in the interventricular septum show incorporation of BrdU (appearing as yellow nuclei) in 13.5 dpc heterozygous *Hccs* KO females (arrows) compared to controls. (Magnification 20 $\times$ .) (F) The vast majority of BrdU-positive cells in the ventricular myocardium of 13.5 dpc heterozygous *Hccs* KO female embryos is positive for MEF2. Only few proliferating MEF2-negative epicardial (arrowheads), endocardial (arrows), or myocardial (asterisk) cells are observed. (E = erythrocytes; magnification, 60 $\times$ .) (G) The percentage of cardiomyogenic and nonmyogenic cells that contribute to the proliferating cell population in the ventricular myocardium is not different in 13.5 dpc heterozygous *Hccs* KO ( $n = 3$ ) female embryos compared to controls ( $n = 3$ ).

In contrast to the findings in 1-year-old mice, histological analyses of heterozygous *Hccs* KO female mice at 8 weeks of age ( $n = 20$ ) revealed no major cardiac pathology and normal heart

weight to body weight ratios (data not shown). However, sporadic pale and granulated cells resembling degenerated cardiomyocytes were often found within the ventricular myocardium



**Figure 6. Cardiac Changes within Hearts of Heterozygous *Hccs* KO Females at Adulthood**

(A–F) A variety of cardiac phenotypes were observed in a proportion of heterozygous *Hccs* KO females at ~1 yr of age, including dramatic cardiac enlargement (A), biventricular dilated cardiomyopathy (DCM) (C) with atrial thrombus (arrow in C), mild hypertrophic cardiomyopathy (HCM) (D), mild dilated cardiomyopathy (E) and isolated right ventricular dilation (F). [Magnification in (B–F), 2.5×.]

(G) Heterozygous *Hccs* KO female hearts exhibiting DCM show cardiomyocyte hypertrophy and interstitial fibrosis within the left ventricle (Masson's trichrome stain; magnification, 40×).

(H) Degenerated, pale cardiomyocytes (arrows) are visible within the left ventricle of 8-week-old heterozygous *Hccs* KO females (H&E stain; magnification, 40×).

(I) Whole-mount *lacZ* staining of a control (+*lacZ*/+) and a heterozygous *Hccs* KO (–*lacZ*/+) female heart (8 weeks) shows almost no staining within the ventricles and atria of the KO heart, while the control shows patchy staining as expected for random X chromosome inactivation.

(J) Hearts of 8-week-old heterozygous *Hccs* KO mice (–*lacZ*/+) show *lacZ*-positive cells within the leaflets of the tricuspid valve. (Magnification, 40×.)

(K) A relatively high percentage of *lacZ*-positive tissue is observed within the membranous part of the interventricular septum (IVS mem) of 8-week-old heterozygous *Hccs* KO females (–*lacZ*/+) compared to the muscular part (IVS mus). (Magnification, 10×.)

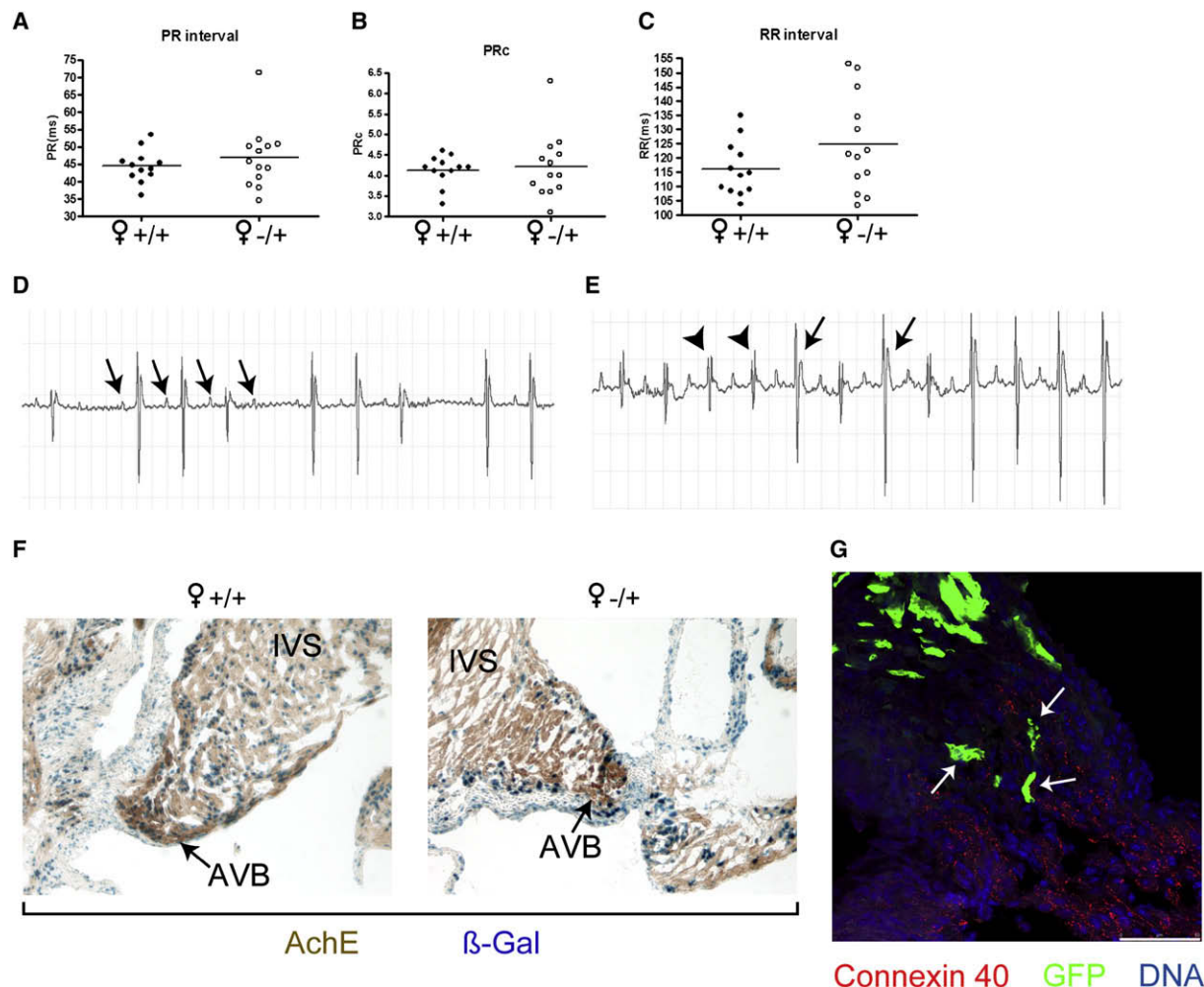
(Figure 6H). These cells clearly showed features of cellular changes caused by mitochondrial dysfunction as seen in other mitochondrial cardiomyopathies. The presence of *Hccs*-deficient cells in 8-week-old heterozygous females was furthermore confirmed using the *in cis* transgenic reporters. By  $\beta$ -galactosidase staining, *lacZ*-positive (*Hccs*-deficient) cells were consistently seen within all cardiac valves (Figure 6J) and the membranous part of the interventricular septum (Figure 6K), in line with the findings in KO females prior to birth (see above). Interestingly, all these structures arise from the endocardial cushions during heart development. In contrast, *Hccs*-deficient cardiomyocytes were less consistently detected within the ventricular and atrial myocardium (Figure 6I) and appeared either in low numbers as sporadically isolated cells or in small clusters (data not shown).

To analyze if the above-mentioned cases of DCM/HCM are just the most severe cases of a more common disturbance of cardiac physiology in heterozygous *Hccs* KO females, we performed functional analyses *in vivo* using echocardiography, electrocardiography (ECG), and heart catheterization. These data revealed that the mean values of cardiac functional parameters like contractility, chamber diameters, and wall thickness as well as cardiac hemodynamics are not affected when comparing a group of control ( $n = 12$ ) and heterozygous *Hccs* KO ( $n = 13$ ) females at 1 year of age (data not shown). However, 40% of *Hccs* KO females (versus none in the control group) exhibited various pathologies of the cardiac conduction system in baseline ECG recordings, including first degree atrioventricular (AV) block (Figures 7A and 7B), intermittent second degree AV block type II (Figure 7D), or transient bundle branch block (Figure 7E) as well as sinus bradycardia (Figure 7C) (for further details, see Tables S1 and S2). Costaining for  $\beta$ -galactosidase and acetylcholine esterase to visualize the cardiac conduction system in neonatal

heterozygous *Hccs* KO females revealed a significant contribution of *Hccs*-deficient cells to the atrioventricular bundle (Figure 7F), suggesting a causative role of these cells in the conduction abnormalities described above. This was furthermore confirmed by immunofluorescence staining showing GFP-positive cells among and adjacent to the connexin 40-positive cells of the atrioventricular bundle (Figure 7G) as well as subendocardial cells in the left ventricle (Figure S4B). These data again indicate that the proportion and the localization of residual *Hccs*-deficient tissue at birth are the likely determinants of the cardiac phenotype of heterozygous *Hccs* KO female mice later in life and that the cardiac conduction system might be more severely affected.

## DISCUSSION

The response of the embryo to fluctuations in external as well as intrinsic factors has demonstrated that most organs, including the heart, exhibit moderate plasticity in growth during the embryonic/fetal period (Conlon and Raff, 1999). However, with the exception of the mammalian liver, extensive regeneration of diseased or damaged tissue has to date only been observed in nonmammalian vertebrate species, although it remains the grail of the field of regenerative medicine (Stoick-Cooper et al., 2007). To this end, the current hype surrounding the promise of stem cell-mediated regeneration has reinvigorated research aimed at understanding the mechanisms that might initiate adult organ repair, in particular for repair of the infarcted heart, which until recently had been considered a terminally differentiated organ with little inherent proliferative capabilities (Lafamme and Murry, 2005). Here, using genetically determined mosaicism for respiratory chain deficiency, we



**Figure 7. ECG Changes in Heterozygous *Hccs* KO Females**

(A–C) PR, PRc (PR corrected for heart rate), and RR intervals were measured in a group of 1-year-old heterozygous *Hccs* KO females (♀ -/+, n = 13) and compared to age matched controls (♀ +/+, n = 12). Mean values (indicated as bars) do not reveal a significant difference between the two groups, but scatter plots show outliers within the KO group.

(D) ECG recording of a heterozygous *Hccs* KO female shows second degree atrioventricular (AV) block type II. Note that every fourth P wave (arrows) is not followed by a ventricular excitation.

(E) ECG recording of a heterozygous *Hccs* KO female indicating transient intraventricular bundle branch block. Note the different shape of the normal QRS complexes (arrowheads) compared to the aberrant excitation (arrows).

(F) The cardiac conduction system contains a relatively high proportion of  $\beta$ -Gal-positive cells in neonatal heterozygous *Hccs* KO female hearts. The atrioventricular bundle (AVB) is detected by acetylcholine esterase (AchE) staining and costained for  $\beta$ -galactosidase. (IVS, interventricular septum; magnification, 20 $\times$ .)

(G) GFP-positive cells are located among (see arrows) and adjacent to the Connexin 40-positive cells of the atrioventricular bundle in neonatal heterozygous *Hccs* KO females. (Confocal image, scale bar 50  $\mu$ m.)

provide strong evidence that the post-midgestation mammalian heart possesses an innate and dramatic regenerative capacity in the face of extensive somatic disease. The data from our unique model suggest that the embryonic/fetal heart is also likely to be able to adapt to, or buffer against, other types of tissue injury, for example, those due to toxin exposure, maternal malnutrition, or even ischemia during pregnancy, providing the cardiac insult is locally or temporally restricted. Our model thus represents a unique situation of compensatory growth of normal cells in the presence of extensive diseased tissue and most likely utilizes different signaling pathways to those employed in normal embryonic growth plasticity that can occur

in response to different environmental factors such as volume load, blood flow, or nutritional status as a consequence of various litter sizes or dietary restriction (Corstius et al., 2005; deAlmeida et al., 2007; Saiki et al., 1997).

A key question regarding embryonic heart regeneration is whether the underlying mechanism is based on cell cycle regulation or mediated by stem or progenitor cells. Our findings that the vast majority of proliferating cells in the hearts of heterozygous *Hccs* KO female embryos are cardiomyocytes supports the notion that compensatory proliferation is mediated by differentiated cells and therefore resembles a cell-cycle-based mechanism. Indeed, recent studies in mouse embryos have shown



that normal cardiac development mainly utilizes a proliferative growth pattern rather than stem cell-based growth (Meilhac et al., 2003). However, whether this is completely true in pathologic situations, such as in our heterozygous *Hccs* KO female hearts, still needs to be determined. Also, the finding that adult cardiomyocytes can reenter the cell cycle upon appropriate stimulation in vitro as well as in vivo and can mediate cardiac repair (Engel et al., 2005; Kühn et al., 2007) suggests that cell-cycle regulation of differentiated embryonic cardiomyocytes (which physiologically have the capability to divide) has a major impact on our model. Interestingly, the nonmyogenic cell population in heterozygous *Hccs* KO female embryos also shows an increased proliferation rate that might be necessary to restore the overall cellular architecture of the myocardial tissue. However, this also suggests that nonmyogenic cells either respond to a broad and rather unspecific proliferative signaling or that a subpopulation is affected by *Hccs* deficiency such that regeneration also occurs within the nonmyogenic cell population. The latter possibility would of course require that these cells derive from *Nkx2.5*-expressing progenitors, which has been shown for a subset of endocardial (Stanley et al., 2002) as well as epicardial cells (Zhou et al., 2008).

However, we cannot yet rule out regenerative contributions from stem or progenitor cells in our model, especially given that ~5% of proliferating cells could not be classified as cardiomyogenic or mesenchymal cells and therefore these cells could include a stem cell population. In this regard, it is perhaps worthy to note that anaerobic glycolytic metabolism has been reported to be sufficient for embryonic stem cell homeostasis in vitro, with mitochondrial oxidative metabolism only becoming essential as cardiac differentiation of stem cells occurs (Chung et al., 2007). One interpretation of these data in the context of our model is that cardiac stem or progenitor cells and their renewal might be unaffected by *Hccs* deficiency until the onset of differentiation. Notably, cardiac progenitor cell populations have recently been identified in the adult heart (Beltrami et al., 2003; Oh et al., 2003; Laugwitz et al., 2005) that are activated upon cardiac injury but do not seem to significantly refresh cardiomyocytes in the normal heart (Hsieh et al., 2007). Furthermore, the activation of cardiac progenitor cells by different growth factor stimuli (i.e., insulin-like growth factor and hepatocyte growth factor) and the resulting enhanced ability to repair ischemic myocardium has recently been shown in dogs (Linke et al., 2005). As some of these progenitor cells are regarded as remnants of embryonic heart development, it is not unreasonable to suppose that they would retain the capacity to respond to stimuli similar to those “received” by the healthy cardiac cell pool in our model. Therefore, the identification of molecular mechanisms and cell types mediating embryonic heart regeneration in our model may help to develop new strategies for cardiac repair and cardiac progenitor stimulation in the adult.

Notably, developmental studies in the pancreas and the liver have demonstrated that various organs have different mechanisms of cellular growth. For the pancreas, the number of progenitor cells is critical for normal organ growth since reduction of the progenitor pool results in smaller organs. In contrast, the liver shows a high level of plasticity in cellular proliferation that appears to be largely independent of progenitor cell number, suggesting that liver development is strongly influenced by

growth-factor-mediated cell growth to reach a final organ size (Stanger et al., 2007). Our model implies that the heart is fully capable of regulating size in early embryonic development, although the principal underlying mechanism is still unclear (i.e., stem cell versus growth factor dependent). Future studies using temporal specific inactivation of *Hccs* later during heart development will enable us to define the time after which the regenerative process is unable to completely restore organ size and function.

In zebrafish, complete myocardial regeneration mediated by cardiomyocyte proliferation has been reported in adults after resection of up to 20% of ventricular myocardium (Poss et al., 2002). A recent study has demonstrated that epicardial-derived stem cells (EPDC) are essential for regeneration in adult zebrafish, migrating into the newly built myocardium to allow vascularization and therefore promote regeneration (Lepilina et al., 2006). We did not observe a significant increase in proliferation of epicardial cells in our mouse embryonic hearts in contrast to the findings in zebrafish heart regeneration. However, crosstalk between myocardial and epicardial cells cannot be excluded in our model, especially since epicardial- as well as endocardial-derived Fgf signaling has been shown to regulate myocardial proliferation during heart development in mice (Lavine et al., 2005).

In addition to the potential impact of our data for understanding cardiac regeneration, our finding that more than 40% of KO mice develop various cardiac pathologies also suggests that the location, and not necessarily the amount, of diseased tissue in the heart at birth is the major determinant of cardiac outcome later in life. This study shows that prior to birth a higher proportion of *Hccs*-deficient cells are seen in the interventricular septum and the cardiac valves while the ventricular free walls and atria contain only few *Hccs*-deficient cardiomyocytes. We have considered different possibilities to account for such observations: (1) the regeneration process does not have enough time to fully remodel the septum and the valves prior to birth, since both these compartments develop relatively late during heart development (Eisenberg and Markwald, 1995); (2) the presence of *Hccs*-deficient tissue in these structures does not severely affect normal function of the embryonic heart before birth, therefore decreasing the pressure to regenerate these areas; (3) the endocardial cushion tissue is not capable of regeneration to the same degree as the ventricular and atrial myocardium; (4) endocardial cushion-derived structures of the outflow tract are invaded by *lacZ*-positive cardiac neural crest cells (de Lange et al., 2004) that do not express *Cre* and thus have not undergone inactivation of *Hccs*; or (5) certain cell types within the heart do not express the *Nkx2.5*-driven *Cre* recombinase and are therefore not subjected to the signals promoting embryonic regeneration (for example, hematopoietic-derived fibroblasts in cardiac valves (Visconti et al., 2006)). Furthermore, abnormal ECG recordings in heterozygous *Hccs* KO females in combination with a significant contribution of *Hccs*-deficient cells to the cardiac conduction system suggest that the CCS has a reduced regenerative capacity compared to the working myocardium. In this regard, it is important to note that the CCS shows reduced proliferation during normal heart development (Sedmera et al., 2003) and therefore might not be able to adapt to the proliferative demands necessary to restore tissue homeostasis in our model, resulting in conduction abnormalities.

Interestingly, in adult heterozygous *Hccs* KO female mice, the muscular part of the IVS, which contains up to 30% of *Hccs*-deficient cells at birth, shows only isolated patches similar to the ventricular free wall. This observation raises the exciting possibility that the cardiac regeneration process is not complete at birth but continues at least into the early postnatal period. However, we cannot rule out that remaining *Hccs*-deficient cells are actively eliminated by apoptosis after birth due to changes in metabolic or mechanical stresses. In this context, it is important to note that *Hccs*-deficient cells are expected to be unable to undergo normal apoptosis due to the lack of both cytochrome c (Li et al., 2000) as well as *Hccs* itself, which has been shown to have a proapoptotic function in neurons when released into the cytoplasm (Kiryu-Seo et al., 2006). Also, the absence of apoptosis in *Hccs*-deficient cells during embryonic development (that is, the retention of the diseased cells) is most likely imperative for regeneration to occur, as the acute loss of 50% of cardiac cells would certainly be lethal in heterozygous females, and the damaged cells most likely serve as important stimuli for regenerative signaling in healthy cells.

Finally, the use of the X-linked reporter genes in conjunction with the temporal inactivation of the *Hccs* gene has enabled us to demonstrate that the clinical or phenotypic outcome in our female mice is not determined by the primary pattern of X chromosome inactivation but rather by the compensatory regenerative process involving, in this case, increased expansion of the normal cardiac cell population. To the best of our knowledge, this represents the first *in vivo* demonstration of “selection” against disease tissue during embryonic heart development. Without the discovery of such a phenomenon, it is important to appreciate that assessment of adult tissue in isolation may have otherwise led to the conclusion of a skewed pattern of primary X chromosome inactivation, which represents a distinct biological mechanism.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

### Gene Targeting

To conditionally inactivate the *Hccs* locus, a targeting strategy was designed to allow *Cre*-mediated excision of exons 5–7. A targeting vector was constructed to introduce a single loxP site (5'loxP) in the *Xba*I restriction site between exons 4 and 5. The 3'loxP site was introduced together with the neomycin resistance gene (*Neo*) into the *Xba*I restriction site 3' of exon 7 (see Figure 1A). The 5' homology arm extended 2.2 kb to the *Xho*I site upstream of exon 3, and the 3' homology arm extended 6 kb to an *Spe*I restriction site downstream of 3'loxP. The targeting construct was linearized with *Sall* and electroporated into W9.5 embryonic stem (ES) cells. Homologous recombinants were then detected by southern blot and inclusion of the 5'loxP site was confirmed by PCR before injection into C57Bl/6 blastocysts.

### Histology

For histological stains, whole mouse embryos or adult hearts were isolated, fixed in 10% formalin, and embedded in paraffin. Tissue samples were sectioned at a thickness of 5  $\mu$ m and subjected to hematoxylin and eosin (H&E) stain, Masson's trichrome stain, or periodic acid-Schiff (PAS) stain. Cryosections were used for  $\beta$ -galactosidase staining of adult hearts. For this, hearts were fixed in 4% paraformaldehyde (PFA) at 4°C for 3 hr, incubated in 30% sucrose at 4°C overnight and embedded in OCT compound over dry ice. Frozen sections were cut at a thickness of 8  $\mu$ m.

### $\beta$ -Galactosidase Staining

$\beta$ -galactosidase staining was performed as described previously (Tan et al., 1993). For stage 12.5 dpc and earlier, whole embryos were stained, while for

later stages the heart was isolated and stained separately. For sectioning, tissue samples were postfixed in 10% formalin, embedded in paraffin, sectioned at a thickness of 5  $\mu$ m, and counterstained with eosin. For  $\beta$ -galactosidase staining of adult hearts, frozen sections were used, briefly postfixed with 4% PFA at 4°C, washed three times in lacZ washing buffer, stained overnight, and counterstained with eosin. To visualize the cardiac conduction system,  $\beta$ -galactosidase staining was followed by acetylcholine esterase staining for 1.5 hr at 37°C.

### Stereological Analyses

The relative volume of lacZ-positive tissue within the heart was determined using the optical disector principle on serial sections of embryonic hearts. Every third section of 10.5 dpc and 12.5 dpc hearts and every fourth section of 16.5 dpc and 19.5 dpc hearts was analyzed. Sections were visualized using an Olympus BX51 light microscope fitted with a motorized stage (Autoscan JS300, Autoscan Systems P/L), projected onto a computer screen running the CAST2 software (CAST2, Olympus Danmark A/S 2002), and selected images were superimposed with orthogonal grids. The sections were sampled using 40 $\times$  magnification and a uniform step length of 400  $\mu$ m in the horizontal and vertical directions for 10.5 dpc and 12.5 dpc hearts and 500  $\mu$ m for 16.5 dpc and 19.5 dpc hearts. The grid points were then counted as being located on lacZ-positive (blue) or lacZ-negative (pink) tissue as well as being located within the ventricles or atria, and percentages and tissue volumes of lacZ-positive versus lacZ-negative tissue were calculated (for further details see Supplemental Experimental Procedures).

### Immunofluorescence and Proliferation Assays

For BrdU incorporation experiments, pregnant females were injected intraperitoneally with 100  $\mu$ g/g body weight of bromodeoxyuridine (Sigma) in PBS 2 hr prior to embryo preparation. Embryos were fixed in 4% PFA, dehydrated, and embedded in paraffin. Sections (5  $\mu$ m) were deparaffinized, rehydrated, and heat-mediated antigen retrieval using Tris-EDTA-Buffer was performed. Incorporation of BrdU was detected using a rat anti-BrdU antibody (Abcam) and a Cy3- or Cy2-conjugated donkey anti-rat secondary antibody (Jackson ImmunoResearch). Detection of phosphohistone H3 was performed using a mouse and rabbit anti-PHH3 antibody (Cell Signaling Technologies). To determine proliferation rates, three (for 13.5 dpc embryos) or five (for 11.5 dpc embryos) nonadjacent sections were analyzed at 15 $\times$  magnification. At least 1500 cells per section (for 11.5 dpc embryos) or 4000 cells per section (for 13.5 dpc embryos) were scored for PHH3 or BrdU, respectively, and for  $\beta$ -galactosidase immunofluorescence. For colocalization, rabbit anti- $\beta$ -galactosidase (Rockland Immunochemicals), rabbit anti-GFP, rabbit anti-MEF2, rabbit anti-vimentin (all from Abcam), mouse anti-Troponin T (Developmental Studies Hybridoma Bank, University of Iowa), mouse anti-sarcomeric actinin (Sigma), rabbit anti-connexin 40 (Chemicon), and mouse anti-cytochrome c (Santa Cruz Biotechnology) antibodies were used. Secondary antibodies were Alexa 488- or Alexa 555-conjugated goat anti-rabbit or goat anti-mouse antibodies (Invitrogen). Nuclear staining was performed using DAPI (Invitrogen). Images were captured using an Olympus IX70 epifluorescence microscope equipped with a Zeiss AxioCam and AxioVision software or a Leica SP5 confocal laser scanning microscope.

### Respiratory Chain Assays

Respiratory chain complex III (decylbenzylquinol:cytochrome c oxidoreductase) and citrate synthase (CS) activities were assayed in post-600 g supernatants from embryonic hearts as described previously (Rahman et al., 1996), except that the assay temperatures were 25°C.

### Transmission Electron Microscopy

Hearts of 13.5 dpc embryos were isolated and fixed in 4% paraformaldehyde/1.25% glutaraldehyde in PBS containing 4% sucrose (pH 7.2) overnight, then washed in PBS/4% sucrose and postfixed in 2% osmium tetroxide for 1 hr. Samples were then dehydrated, incubated with propylene oxide, and infiltrated with resin before embedding in fresh resin with polymerization at 70°C for 24 hr. Ultrathin sections were cut, stained with uranyl acetate and lead citrate, and examined using a Philips CM100 Transmission Electron Microscope.

**Electrocardiogram Studies**

ECG recordings were made on anesthetized mice (Ketamine/Xylazine/Atropine 80/20/1.2 mg/kg, i.p.) in an R.F. shielded room using a Powerlab System (ADInstruments) and BioAmp (ADInstruments). The sampling frequency was set at 1000 Hz. The recording period for each animal lasted for ~5 min. While anesthetized, animals were kept warm by a heating pad (~37°C). Recordings were made using a standard II lead and carefully scanned for any arrhythmias or abnormalities.

**Statistical Analyses**

Data analysis was undertaken using the SYSTAT program (version 7.0, Systat Corporation). Statistical t tests were performed on the group data. All data are presented as mean  $\pm$  standard deviation. A probability (p) value less than 0.05 was taken to indicate statistical significance (\*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001, unless otherwise noted).

**SUPPLEMENTAL DATA**

Supplemental data include six figures, two tables, and Supplemental Experimental Procedures and can be found online with this article at <http://www.developmentalcell.com/cgi/content/full/15/4/521/DC1/>.

**ACKNOWLEDGMENTS**

Initial stages of this work were supported by an Australian National Health and Medical Research Council (NHMRC) Project Grant (000125), NHMRC R. Douglas Wright Award, and Keith Sheridan Associateship (University of Adelaide Medical Endowment Fund) to T.C.C. J.D.D. was supported by a research fellowship and a project grant from the German Research Council (Deutsche Forschungsgemeinschaft, DFG). D.R.T. was supported by grants and a Senior Research Fellowship from the NHMRC and by the Muscular Dystrophy Association. X.J.D. is a fellow of the NHMRC. We thank Liza Cox and Patrick Tam (Children's Medical Research Institute, Westmead, NSW, Australia) for the D4X reporter mice, and Nigel Wreford (Department of Anatomy and Developmental Biology, Monash University, Melbourne, VIC, Australia) for assistance with the stereology analyses. The authors declare they have no competing financial interests.

Received: December 24, 2007

Revised: August 18, 2008

Accepted: September 17, 2008

Published: October 13, 2008

**REFERENCES**

- Antonicka, H., Mattman, A., Carlson, C.G., Glerum, D.M., Hoffbuhr, K.C., Leary, S.C., Kennaway, N.G., and Shoubbridge, E.A. (2003). Mutations in COX15 produce a defect in the mitochondrial heme biosynthetic pathway, causing early-onset fatal hypertrophic cardiomyopathy. *Am. J. Hum. Genet.* 72, 101–114.
- Avner, P., and Heard, E. (2001). X-chromosome inactivation: counting, choice and initiation. *Nat. Rev. Genet.* 2, 59–67.
- Beltrami, A.P., Barlucchi, L., Torella, D., Baker, M., Limana, F., Chimenti, S., Kasahara, H., Rota, M., Musso, E., Urbanek, K., et al. (2003). Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell* 114, 763–776.
- Bernard, D.G., Gabilly, S.T., Dujardin, G., Merchant, S., and Hamel, P.P. (2003). Overlapping specificities of the mitochondrial cytochrome c and c1 heme lyases. *J. Biol. Chem.* 278, 49732–49742.
- Chung, S., Dzeja, P.P., Faustino, R.S., Perez-Terzic, C., Behfar, A., and Terzic, A. (2007). Mitochondrial oxidative metabolism is required for the cardiac differentiation of stem cells. *Nat. Clin. Pract. Cardiovasc. Med.* 4 (Suppl 1), S60–S67.
- Conlon, I., and Raff, M. (1999). Size control in animal development. *Cell* 96, 235–244.
- Corstius, H.B., Zimanyi, M.A., Maka, N., Herath, T., Thomas, W., van der Laarse, A., Wredford, N.G., and Black, M.J. (2005). Effect of intrauterine growth restriction on the number of cardiomyocytes in rat hearts. *Pediatr. Res.* 57, 796–800.
- deAlmeida, A., McQuinn, T., and Sedmera, D. (2007). Increased ventricular preload is compensated by myocyte proliferation in normal and hypoplastic fetal chick left ventricle. *Circ. Res.* 100, 1363–1370.
- de Lange, F.J., Moorman, A.F.M., Anderson, R.H., Männer, J., Soufan, A.T., de Gier-de Vries, C., Schneider, M.D., Webb, S., van den Hoff, M.J.B., and Christoffels, V.M. (2004). Lineage and morphogenetic analysis of the cardiac valves. *Circ. Res.* 95, 645–654.
- Eisenberg, L.M., and Markwald, R.R. (1995). Molecular regulation of atrioventricular valvuloseptal morphogenesis. *Circ. Res.* 77, 1–6.
- Engel, F.B., Schebesta, M., Duong, M.T., Lu, G., Ren, S., Madwed, J.B., Jiang, H., Wang, Y., and Keating, M.T. (2005). p38 MAP kinase inhibition enables proliferation of adult mammalian cardiomyocytes. *Genes Dev.* 19, 1175–1187.
- Graham, B.H., Waymire, K.G., Cottrell, B., Trounce, I.A., MacGregor, G.R., and Wallace, D.C. (1997). A mouse model for mitochondrial myopathy and cardiomyopathy resulting from a deficiency in the heart/muscle isoform of the adenine nucleotide translocator. *Nat. Genet.* 16, 226–234.
- Hadjantonakis, A.-K., Cox, L.L., Tam, P.P.L., and Nagy, A. (2001). An X-linked GFP transgene reveals unexpected paternal X-chromosome activity in trophoblastic giant cells of the mouse placenta. *Genesis* 29, 133–140.
- Hsieh, P.C., Segers, V.F., Davis, M.E., MacGillivray, C., Gannon, J., Molkentin, J.D., Robbins, J., and Lee, R.T. (2007). Evidence from a genetic fate-mapping study that stem cells refresh adult mammalian cardiomyocytes after injury. *Nat. Med.* 13, 970–974.
- Kiryu-Seo, S., Gamo, K., Tachibana, T., Tanaka, K., and Kiyama, H. (2006). Unique anti-apoptotic activity of EAAC1 in injured motor neurons. *EMBO J.* 25, 3411–3421.
- Kühn, B., del Monte, F., Hajjar, R.J., Chang, Y.S., Lebeche, D., Arab, S., and Keating, M.T. (2007). Periostin induces proliferation of differentiated cardiomyocytes and promotes cardiac repair. *Nat. Med.* 13, 962–969.
- Laflamme, M.A., and Murry, C.E. (2005). Regenerating the heart. *Nat. Biotechnol.* 23, 845–856.
- Laugwitz, K.L., Moretti, A., Lam, J., Gruber, P., Chen, Y., Woodard, S., Lin, L.-Z., Cai, C.-L., Lu, M.M., Reth, M., et al. (2005). Postnatal Isl1+ cardioblasts enter fully differentiated cardiomyocyte lineages. *Nature* 433, 647–653.
- Lavine, K.J., Yu, K., White, A.C., Zhang, X., Smith, C., Partanen, J., and Ornitz, D.M. (2005). Endocardial and epicardial derived FGF signals regulate myocardial proliferation and differentiation in vivo. *Dev. Cell* 8, 85–95.
- Lepilina, A., Coon, A.N., Kikuchi, K., Holdway, J.E., Roberts, R.W., Burns, C.G., and Poss, K.D. (2006). A dynamic epicardial injury response supports progenitor cell activity during zebrafish heart regeneration. *Cell* 127, 607–619.
- Li, K., Li, Y., Shelton, J.M., Richardson, J.A., Spencer, E., Chen, Z.J., Wang, X., and Williams, R.S. (2000). Cytochrome c deficiency causes embryonic lethality and attenuates stress-induced apoptosis. *Cell* 101, 389–399.
- Linke, A., Müller, P., Nurzynska, D., Casarsa, C., Torella, D., Nascimbene, A., Castaldo, C., Cascapera, S., Böhm, M., Quaini, F., et al. (2005). Stem cells in the dog heart are self-renewing, clonogenic, and multipotent and regenerate infarcted myocardium, improving cardiac function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 8966–8971.
- Lyon, M.F. (2002). X-chromosome inactivation and human genetic disease. *Acta Paediatr. Suppl.* 91, 107–112.
- Marin-Garcia, J., Ananthakrishnan, R., Goldenthal, M.J., and Pierpont, M.E. (2000). Biochemical and molecular basis for mitochondrial cardiomyopathy in neonates and children. *J. Inher. Metab. Dis.* 23, 625–633.
- Marin-Garcia, J., Goldenthal, M.J., and Moe, G.W. (2001). Mitochondrial pathology in cardiac failure. *Cardiovasc. Res.* 49, 17–26.
- Meilhac, S.M., Kelly, R.G., Rocancourt, D., Eloy-Trinquet, S., Nicolas, J.-F., and Buckingham, M.E. (2003). A retrospective clonal analysis of the myocardium reveals two phases of clonal growth in the developing mouse heart. *Development* 130, 3877–3889.

- Oh, H., Bradfute, S.B., Gallardo, T.D., Nakamura, T., Gaussen, V., Mishina, Y., Pocius, J., Michael, L.H., Behringer, R.R., Garry, D.J., et al. (2003). Cardiac progenitor cells from adult myocardium: homing, differentiation, and fusion after infarction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 12313–12318.
- Papadopoulou, L.C., Sue, C.M., Davidson, M.M., Tanji, K., Nishino, I., Sadlock, J.E., Krishna, S., Walker, W., Selby, J., Glerum, D.M., et al. (1999). Fatal infantile cardioencephalomyopathy with COX deficiency and mutations in *SCO2*, a COX assembly gene. *Nat. Genet.* **23**, 333–337.
- Poss, K.D., Wilson, L.G., and Keating, M.T. (2002). Heart regeneration in zebrafish. *Science* **298**, 2188–2190.
- Prakash, S.K., Cormier, T.A., McCall, A.E., Garcia, J.J., Sierra, R., Haupt, B., Zoghbi, H.Y., and Van den Veyver, I.B. (2002). Loss of holocytochrome c-type synthetase causes the male lethality of X-linked dominant microphthalmia with linear skin defects (MLS) syndrome. *Hum. Mol. Genet.* **11**, 3237–3248.
- Rahman, S., Blok, R.B., Dahl, H.H., Danks, D.M., Kirby, D.M., Chow, C.W., Christodoulou, J., and Thorburn, D.R. (1996). Leigh syndrome: clinical features and biochemical and DNA abnormalities. *Ann. Neurol.* **39**, 343–351.
- Saiki, Y., Konig, A., Waddell, J., and Rebeyka, I.M. (1997). Hemodynamic alteration by fetal surgery accelerates myocyte proliferation in fetal guinea pig hearts. *Surgery* **122**, 412–419.
- Schaefer, L., Ballabio, A., and Zoghbi, H.Y. (1996). Cloning and characterization of a putative human holocytochrome c-type synthetase gene (*HCCS*) isolated from the critical region for microphthalmia with linear skin defects (MLS). *Genomics* **34**, 166–172.
- Schwarz, Q.P., and Cox, T.C. (2002). Complementation of a yeast *CYC3* deficiency identifies an X-linked mammalian activator of apocytochrome c. *Genomics* **79**, 51–57.
- Sedmera, D., Reckova, M., DeAlmeida, A., Coppen, S.R., Kubalak, S.W., Gourdie, R.G., and Thompson, R.P. (2003). Spatiotemporal pattern of commitment to slowed proliferation in the embryonic mouse heart indicates progressive differentiation of the cardiac conduction system. *Anat. Rec. A Discov. Mol. Cell Evol. Biol.* **274**, 773–777.
- Smeitink, J., van den Heuvel, L., and DiMauro, S. (2001). The genetics and pathology of oxidative phosphorylation. *Nat. Rev. Genet.* **2**, 342–352.
- Stanger, B.Z., Tanaka, A.J., and Melton, D.A. (2007). Organ size is limited by the number of embryonic progenitor cells in the pancreas but not the liver. *Nature* **445**, 886–891.
- Stanley, E.G., Biben, C., Elefanty, A., Barnett, L., Koentgen, F., Robb, L., and Harvey, R.P. (2002). Efficient Cre-mediated deletion in cardiac progenitor cells conferred by a 3'UTR-ires-Cre allele of the homeobox gene *Nkx2-5*. *Int. J. Dev. Biol.* **46**, 431–439.
- Stoick-Cooper, C.L., Moon, R.T., and Weidinger, G. (2007). Advances in signaling in vertebrate regeneration as a prelude to regenerative medicine. *Genes Dev.* **21**, 1292–1315.
- Tan, S.S., Williams, E.A., and Tam, P.P. (1993). X-chromosome inactivation occurs at different times in different tissues of the post-implantation mouse embryo. *Nat. Genet.* **3**, 170–174.
- Visconti, R.P., Ebihara, Y., LaRue, A.C., Fleming, P.A., McQuinn, T.C., Masuya, M., Minamiguchi, H., Markwald, R.R., Ogawa, M., and Drake, C.J. (2006). An in vivo analysis of hematopoietic stem cell potential: hematopoietic origin of cardiac valve interstitial cells. *Circ. Res.* **98**, 690–696.
- Wang, J., Wilhelmsson, H., Graff, C., Li, H., Oldfors, A., Rustin, P., Brünig, J.C., Kahn, C.R., Clayton, D.A., Barsh, G.S., et al. (1999). Dilated cardiomyopathy and atrioventricular conduction blocks induced by heart-specific inactivation of mitochondrial DNA gene expression. *Nat. Genet.* **21**, 133–137.
- Zhou, B., Ma, Q., Rajagopal, S., Wu, S.M., Domian, I., Rivera-Feliciano, J., Jiang, D., von Gise, A., Ikeda, S., Chien, K.R., and Pu, W.T. (2008). Epicardial progenitors contribute to the cardiomyocyte lineage in the developing heart. *Nature* **454**, 109–113.

#### 4.2. Molekulare Stressantwort und Überleben von embryonalen Kardiomyozyten bei mitochondrialer Dysfunktion

Das adulte Herz gilt als terminal-differenziertes Organ ohne nennenswerte Fähigkeit zur Regeneration, so dass der Verlust von Kardiomyozyten bei akutem Gewebeschaden (z.B. Herzinfarkt) oder bei chronischen Erkrankungen (z.B. Bluthochdruck, Diabetes mellitus) und damit letztendlich bei Druck- und Volumenbelastung zu einer Einschränkung der Pumpfunktion führt. Adulte Kardiomyozyten sind sensibel gegenüber verschiedenen pathologischen Bedingungen, wie Ischämie und Hypoxie, kardiotoxischen Substanzen (Medikamente und Drogen), viralen Infektionen oder genetischen Veränderungen (47). So stirbt bei dem akuten Verschluss einer Koronararterie ein Großteil der Kardiomyozyten in dem abhängigen Myokardareal ab. Darüber hinaus sind kardiotoxische Effekte, die den Zelltod in Kardiomyozyten induzieren, eine gravierende Nebenwirkung verschiedener Medikamente in der Tumorbehandlung (z.B. Doxorubicin) oder Immunsuppression (47). Häufig spielen Mitochondrien eine zentrale Rolle bei der Entstehung von zellulärem Stress und bei der Induktion von Zelltod. So führt nach einem Herzinfarkt die Wiedereröffnung des verschlossenen Koronargefäßes mittels Ballondilatation zu einem massiven Anstieg von reaktiven Sauerstoffverbindungen in den Mitochondrien. Dies wiederum induziert eine Welle von apoptotischem und nekrotischem Zelltod in Kardiomyozyten, was auch als Ischämie/Reperfusions-Schaden bezeichnet wird (158). Doxorubicin behindert die Biogenese und Funktion von Mitochondrien und inhibiert antioxidative Enzyme, was zu oxidativem Stress und daraus resultierendem Absterben von Kardiomyozyten führt (155).

Die wichtigsten Konsequenzen einer mitochondrialen Dysfunktion sind die verminderte Bereitstellung des zellulären Energieträgers ATP (Adenosintriphosphat) sowie die Überproduktion von reaktiven Sauerstoffverbindungen („reactive oxygen species“, ROS) (119). Letztere führen zur Oxidation und damit zur Schädigung von DNA und Proteinen, was maßgeblich an der Induktion des Zelltods beteiligt ist. Zellen verfügen über verschiedene protektive Mechanismen, um die negativen Wirkungen von ROS zu vermindern, wie die Umwandlung von ROS in weniger reaktive Verbindungen oder aber die Reparatur von DNA und Proteinen nach oxidativer Schädigung. Übersteigt die ROS Produktion jedoch die kompensatorische Kapazität der Zelle, so führt dies je nach Zelltyp zum apoptotischen oder nekrotischen Zelltod (154).

Bei der Charakterisierung der embryonalen Herzregeneration in *cHccs*<sup>+/-</sup> Mäusen (siehe Kapitel 4.1.) war neben der kompensatorischen Proliferation der gesunden Zellen aufgefallen, dass defekte Kardiomyozyten mit einer mitochondrialen Dysfunktion im Laufe der pränatalen Entwicklung nicht eliminiert werden, sondern auch im postnatalen Herzen noch nachweisbar sind (siehe Abbildung 4). Daraus entwickelte sich die Hypothese, dass embryonale und damit undifferenzierte Kardiomyozyten eine höhere Stresstoleranz gegenüber pathologischen Bedingungen haben als adulte, terminal differenzierte Zellen. Wir untersuchten daher die molekulare Stressantwort von *Hccs*-defizienten Kardiomyozyten im embryonalen *cHccs*<sup>+/-</sup> Herzen *in vivo* auf der Basis einer systematischen, genomweiten Analyse der RNA-Expression mit Hilfe der Mikroarray-Technologie. Dabei konnte gezeigt werden, dass in diesen Zellen zwar initiale Schritte des programmierten Zelltods (Apoptose) aktiviert werden, der Zelltod jedoch nicht ausgeführt wird. Weiterhin fiel auf, dass speziell in den defekten Kardiomyozyten verschiedene Gene und Signalkaskaden induziert bzw. aktiviert sind, die bei der zellulären Stressantwort und Zellprotektion eine Rolle spielen. Dies schließt die Entgiftung von Sauerstoffradikalen, die Regulation der Apoptose bzw. des Zellüberlebens sowie die Aufrechterhaltung einer normalen Protein-Homöostase („unfolded protein response“ (UPR) (342) und „integrated stress response“ (ISR) (343)) ein. Dabei werden auch verschiedene Inhibitoren der Apoptose-Kaskade in *Hccs*-defizienten



Kardiomyozyten hochreguliert, darunter auch ARC (apoptosis repressor with caspase recruitment domaine), ein potenter Inhibitor sowohl des intrinsischen als auch extrinsischen Apoptose-Weges mit wichtiger Funktion beim Überleben adulter Kardiomyozyten unter Stress (162, 163). Um zu untersuchen, ob ARC der entscheidende Faktor ist, der *Hccs*-defiziente Kardiomyozyten im embryonalen Herzen am Leben erhält, generierten wir einen *cHccs*<sup>+/-</sup>/*ARC*-Doppel-Knockout in der Maus. Doch auch beim Fehlen von ARC überleben *Hccs*-defiziente Kardiomyozyten die pränatale Phase und sind weiterhin im adulten *cHccs*<sup>+/-</sup> Herzen nachweisbar. Dies verdeutlicht die enorme Plastizität und Anpassungsfähigkeit embryonaler Kardiomyozyten gegenüber pathologischen Bedingungen: selbst beim Fehlen eines wichtigen Zelltod-Inhibitors sterben die Zellen unter Stress nicht ab, sondern können den Ausfall vermutlich durch die Aktivierung anderer protektiver Mechanismen kompensieren und so überleben.

Zusammenfassend verfügen embryonale im Gegensatz zu adulten Kardiomyozyten über eine beeindruckende Stresstoleranz, die ihr Überleben im Verlaufe der intrauterinen Herzentwicklung auch unter ungünstigen bzw. pathologischen Bedingungen sicherstellt. Die Identifizierung der zugrundeliegenden molekularen und zellulären Mechanismen könnte daher wichtige neue Therapie-Ansätze zur Kardioprotektion im adulten Herzen liefern.

#### **Veröffentlichungen zu den dargestellten Arbeiten:**

Magarin M, Pohl T, Lill A, Schulz H, Blaschke F, Heuser A, Thierfelder L, Donath S, Drenckhahn JD. Embryonic cardiomyocytes can orchestrate various cell protective mechanisms to survive mitochondrial stress. *J Mol Cell Cardiol.* 2016;97:1-14.

Magarin M, Schulz H, Thierfelder L, Drenckhahn JD. Transcriptional profiling of regenerating embryonic mouse hearts. *Genom Data.* 2016;9:145-147.



## Original article

## Embryonic cardiomyocytes can orchestrate various cell protective mechanisms to survive mitochondrial stress



Manuela Magarin<sup>a</sup>, Toni Pohl<sup>a</sup>, Anette Lill<sup>a</sup>, Herbert Schulz<sup>a,b</sup>, Florian Blaschke<sup>a,d</sup>, Arnd Heuser<sup>a</sup>, Ludwig Thierfelder<sup>a</sup>, Stefan Donath<sup>a</sup>, Jörg-Detlef Drenckhahn<sup>a,c,\*</sup>

<sup>a</sup> Max-Delbrück-Center for Molecular Medicine, Berlin, Germany

<sup>b</sup> Cologne Center for Genomics, University of Cologne, Cologne, Germany

<sup>c</sup> Department of Pediatric Cardiology, University Hospital Münster, Münster, Germany

<sup>d</sup> Charité Universitätsmedizin Berlin, Campus Virchow Klinikum, Medizinische Klinik mit Schwerpunkt Kardiologie, Berlin, Germany

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 7 April 2016

Accepted 15 April 2016

Available online 20 April 2016

## Keywords:

Unfolded protein response

Apoptosis

Mitochondrial dysfunction

Cardioprotection

Oxidative stress

## ABSTRACT

Whereas adult cardiomyocytes are highly susceptible to stress, cardiomyocytes in the prenatal heart appear to be rather resistant. To investigate how embryonic cardiomyocytes respond to metabolic stress *in vivo*, we utilized tissue mosaicism for mitochondrial dysfunction in 13.5 dpc mouse hearts. The latter is based on inactivation of the X-linked gene encoding Holocytochrome c synthase (*Hccs*), which is essential for mitochondrial respiration. In heterozygous heart conditional *Hccs* knockout females (*cHccs*<sup>+/-</sup>) random X chromosomal inactivation results in a mosaic of healthy and HCCS deficient cells in the myocardium. Microarray RNA expression analyses identified genes involved in unfolded protein response (UPR) and programmed cell death as differentially expressed in *cHccs*<sup>+/-</sup> versus control embryonic hearts. Activation of the UPR is localized to HCCS deficient cardiomyocytes but does not involve ER stress pathways, suggesting that it is caused by defective mitochondria. Consistently, mitochondrial chaperones, such as HSP10 and HSP60, but not ER chaperones are induced in defective cells. Mitochondrial dysfunction can result in oxidative stress, but no evidence for excessive ROS (reactive oxygen species) production was observed in *cHccs*<sup>+/-</sup> hearts. Instead, the antioxidative proteins SOD2 and PRDX3 are induced, suggesting that ROS detoxification prevents oxidative damage in HCCS deficient cardiomyocytes. Mitochondrial dysfunction and unrestricted UPR can induce cell death, and we detected the initiation of upstream events of both intrinsic as well as extrinsic apoptosis in *cHccs*<sup>+/-</sup> hearts. Cell death is not executed, however, suggesting the activation of antiapoptotic mechanisms. Whereas most apoptosis inhibitors are either unchanged or downregulated in HCCS deficient cardiomyocytes, Bcl-2 and ARC (apoptosis repressor with caspase recruitment domain) are induced. Given that ARC can inhibit both apoptotic pathways as well as necrosis and attenuates UPR, we generated *cHccs*<sup>+/-</sup> embryos on an *Arc* knockout background (*cHccs*<sup>+/-</sup> *Arc*<sup>-/-</sup>). Surprisingly, the absence of ARC does not induce cell death in embryonic or postnatal HCCS deficient cardiomyocytes and adult *cHccs*<sup>+/-</sup> *Arc*<sup>-/-</sup> mice exhibit normal cardiac morphology and function. Taken together, our data demonstrate an impressive plasticity of embryonic cardiomyocytes to respond to metabolic stress, the loss of which might be involved in the high susceptibility of postnatal cardiomyocytes to cell death.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

In humans the irreversible loss of cardiomyocytes upon normal ageing, acute cardiac stress or myocardial injury is inevitably linked to

progressive contractile dysfunction of the left ventricle (LV), ultimately leading to heart failure [1]. Given the limited regenerative capacity of the postnatal mammalian heart and the low rate of cardiomyocyte renewal, extensive efforts have been made to replace cardiomyocytes after myocardial injury [2]. Nevertheless, protection of existing cardiomyocytes by increasing their stress resistance (referred to as cardioprotection) remains a primary goal for the treatment and prevention of heart disease.

Cardiomyocytes in the adult heart are highly susceptible to cell death caused by a variety of unfavorable conditions, such as mechanical, oxidative or metabolic stress, hypoxia and inflammation. Depending on the stimulus, cardiomyocytes undergo different types of cell death, followed by maladaptive myocardial remodeling eventually leading to

**Abbreviations:** ARC, apoptosis repressor with caspase recruitment domain; ATP, adenosine triphosphate; CICD, caspase independent cell death; dpc, days post coitum; ER, endoplasmic reticulum; GFP, green fluorescent protein; HCCS, holocytochrome c synthase; HSP, heat shock protein; KO, knockout; LV, left ventricle; mt, mitochondrial; P1, postnatal day 1; ROS, reactive oxygen species; TUNEL, terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling; UPR, unfolded protein response.

\* Corresponding author at: Department of Pediatric Cardiology, University Hospital Münster, Albert-Schweitzer-Campus 1, 48149 Münster, Germany.

E-mail address: [Joerg.Drenckhahn@ukmuenster.de](mailto:Joerg.Drenckhahn@ukmuenster.de) (J.-D. Drenckhahn).

contractile dysfunction [3–5]. In contrast, prenatal cardiomyocytes are believed to have a much higher stress resistance, and the embryonic heart is capable to fully regenerate [6,7]. Although the latter is mainly attributed to the ability of immature cardiomyocytes to proliferate, more effective cell survival and stress response mechanisms might also contribute. In this regard, fetal cardiomyocytes show better survival and engraftment when transplanted into injured adult myocardium compared to postnatal cardiomyocytes [8,9]. Additionally, dedifferentiation of adult cardiomyocytes towards an immature phenotype to adopt certain fetal characteristics has been proposed to increase their stress resistance [10–12]. Finally, in response to stress the adult heart reactivates a gene expression program normally found in the prenatal heart, which is thought to allow protective changes of cell survival mechanisms, metabolism and contractility [13]. Based on these findings it is tempting to speculate that the loss of prenatal cardioprotection in the postnatal heart might be responsible for the high susceptibility of adult cardiomyocytes to stress. Consequently, the reactivation of fetal survival mechanisms in the adult heart represents an attractive therapeutic goal.

We have recently shown a remarkable regenerative capacity of the prenatal heart using a genetic model of mosaic mitochondrial dysfunction in mice [6]. This model is based on inactivation of the X-linked gene encoding holocytochrome *c* synthase (*Hccs*) specifically in the developing heart. Loss of HCCS activity results in respiratory chain dysfunction, disturbed cardiomyocyte differentiation and reduced cell cycle activity. The *Hccs* gene is subject to X chromosome inactivation, such that in females heterozygous for the cardiac specific *Hccs* knockout (hereafter referred to as *cHccs*<sup>+/-</sup>), approximately 50% of cardiac cells keep the defective X chromosome active and develop mitochondrial dysfunction while the other 50% remain healthy. During heart development, however, the contribution of HCCS deficient cells to the cardiac tissue decreases from 50% at mid gestation to 10% at birth [6]. This regeneration of the prenatal heart is mediated by increased proliferation of the healthy cardiac cell population and allows *cHccs*<sup>+/-</sup> females to survive to adulthood. At the same time, however, HCCS deficient cardiomyocytes do not undergo cell death and are still detectable in the adult *cHccs*<sup>+/-</sup> heart despite the consequences of mitochondrial dysfunction [6]. This raises the possibility that embryonic heart regeneration is not only mediated by hyperproliferation of healthy cells but also requires survival of diseased cells.

Here we aimed at systematically characterizing the stress response of HCCS deficient cardiomyocytes in the embryonic *cHccs*<sup>+/-</sup> heart in vivo. Our study identified a multitude of cell protective and survival mechanisms activated in immature cardiomyocytes upon mitochondrial stress. Even deletion of an important apoptosis repressor does not result in cell death, indicating that the orchestration and plasticity of various stress response mechanisms might be essential for survival of HCCS deficient cardiomyocytes in the postnatal heart.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Mouse strains

The generation and characterization of heart conditional *Hccs* knockout (KO) mice has been described previously [6]. Briefly, “floxed” (fl) *Hccs* mice were bred to mice expressing Cre recombinase under the control of the *Nkx2.5* promoter. All mice were maintained on a mixed 129Sv/C57Bl6 genetic background and all embryo experiments were performed on heterozygous *Hccs* KO females (*Hccs*<sup>fl/+</sup>/*Nkx2.5Cre*, referred to as *cHccs*<sup>+/-</sup>), hemizygous *Hccs* KO males (*Hccs*<sup>fl/y</sup>/*Nkx2.5Cre*, referred to as *cHccs*<sup>-/y</sup>) and their respective Cre positive and negative female and male littermate controls (referred to as *Hccs*<sup>+/+</sup> or *Hccs*<sup>+/y</sup>). The generation and characterization of *Arc* (encoded by the *No13* gene) knockout mice has been described previously [33]. *Arc* knockout mice were maintained on a C57Bl6 background, crossed into the “floxed” *Hccs* and *Nkx2.5Cre* strains, respectively, and bred to homozygosity for the *Arc*

knockout. By mating “floxed” *Hccs* and *Nkx2.5Cre* mice on an *Arc*<sup>-/-</sup> background, a heart conditional *Hccs* and (conventional) *Arc* double knockout was generated (referred to as *cHccs*<sup>+/-</sup>/*Arc*<sup>-/-</sup> or *cHccs*<sup>-/y</sup>/*Arc*<sup>-/-</sup>) and compared to their littermate controls (*Hccs*<sup>+/+</sup>/*Arc*<sup>-/-</sup> and *Hccs*<sup>+/y</sup>/*Arc*<sup>-/-</sup>).

For embryo generation females were mated to the respective males and checked for vaginal plug. The day of an observed plug was defined as 0.5 dpc and embryos/fetuses were dissected at the desired stage. Hearts from neonatal mice were prepared on postnatal day 1 (P1), while adult hearts were taken from 8 week old animals.

### 2.2. Microarray RNA expression analyses

For microarray expression analyses a total of 10 Affymetrix GeneChip Mouse Genome 430 2.0 arrays were used. To purify sufficient RNA amounts and account for interindividual as well as environmental differences during pregnancy, an average of four 13.5 dpc hearts of the same genotype were pooled. Five pooled samples per genotype (i.e. heterozygous cardiac *Hccs* KO and control female embryos) were analyzed. The tissue was homogenized using a micropestle and total RNA was purified using the RNeasy Mini Kit (Qiagen) including a DNase digest on the spin column. RNA purity and quality was tested using spectrophotometric parameters and a Bioanalyzer (Agilent), respectively. cDNA synthesis was performed using Live Technologies SuperScript® One-Cycle cDNA Kit followed by in vitro transcription using the MEGAScript T7 kit. After fragmenting of the cRNA for target preparation using the standard Affymetrix protocol, 15 µg fragmented cRNA was hybridized for 16 h at 45 °C to the Mouse Genome 430 array. Arrays were washed and stained with streptavidin-phycoerythrin in the Affymetrix Fluidics Station 450 and further scanned using the Affymetrix GeneChip Scanner 3000 7G. Arrays have been quantile-normalize using the RMA algorithm. Not or low expressed transcripts were removed by a (log<sub>2</sub>) maximum expression cutoff <6. The data filtering resulted in 18,571 of 45,101 probe sets. After normalization the arrays were checked for outlier using the principal component analysis (PCA), a correlation dispersion matrix and normalized Eigenvector scaling. No outlier has been detected. Differential expression was ascertained using *t*-statistic followed by a FDR multiple testing correction (Supplemental Reference 3). Probes which undergo 5% FDR were further investigated by functional enrichment using G:Profiler (Supplemental Reference 4), with a simulation based analytical threshold for significance estimation. Array data have been deposited in the Gene Expression Omnibus database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) under accession number GSE72054.

### 2.3. Immunofluorescence staining

Paraffin sections were deparaffinized, rehydrated and heat mediated antigen retrieval was performed in sodium citrate buffer (10 mM, pH 6.0) for 20 min. Sections were allowed to cool to room temperature before blocking in antibody solution containing 5% normal goat serum for 1 h. Primary antibodies were applied at 4 °C over night and secondary antibody detection was performed at room temperature for 1 h using Alexa 488 or Alexa 555 goat anti rabbit or goat anti mouse antibodies (Invitrogen). Nuclei were stained with DAPI or TO-PRO-3 (Invitrogen) and sections were mounted in Prolong Gold antifade reagent (Invitrogen). Antibodies against CHOP, Bcl-2, Bax and c-FLIP required immunostaining on cryosections. For these purposes, HCCS deficient cardiomyocytes were detected based on GFP expression, as previously described [6]. Briefly, we used a mouse line in which the “floxed” *Hccs* allele is located in cis with a GFP reporter gene on the same X chromosome. GFP is subjected to X chromosomal inactivation, such that cells keeping the X with the mutated *Hccs* gene active can be identified by GFP expression. We have previously shown that GFP expression indeed reliably correlates with HCCS and cytochrome *c* deficiency in cardiomyocytes of 13.5 dpc *cHccs*<sup>+/-</sup> hearts [6]. As controls, female embryos heterozygous for the X-linked GFP reporter but

wildtype for *Hccs* were used. Cryosections were allowed to adjust to room temperature for 30 min, fixed in 4% paraformaldehyde/PBS for 20 min, rinsed in PBS and processed for blocking and staining as described above.

The following primary antibodies were used: HSP60 (#1724), HSP10 (#3106), SOD2 (#3399), Calreticulin (#2809), AIF (#1020), Bcl-x (#1018) (all from Epitomics), HSP70 (#4876), HSP90 (#4877), phospho-eIF2 $\alpha$  Ser51 (#3398), phospho-p38 MAPK Thr180/Tyr182 (#4511), phospho-SAPK/JNK Thr183/Tyr185 (#9251), I $\kappa$ B $\alpha$  (#4814), NF- $\kappa$ B p65 (#4764), LC3B (#3868) (all from Cell Signaling), Bcl-2 (sc-783), Bax (sc-526), cytochrome c (sc-13156), CHOP/GADD153 (sc-575), c-FLIP (sc-8347), Trx-2 (sc-50336) (all from Santa Cruz), MCL1 (ab32087), GRP78 (ab21685), GFP (ab290), Peroxiredoxin 3 (ab73349), Peroxiredoxin-SO3 (ab16830) (all from Abcam), TIMM17A (#11189-1-AP), YME1L1 (#11510-1-AP), PMPCB (#16064-1-AP) (all from Proteintech), ClpP (Sigma Aldrich WH0008192M1), Survivin (GeneTex GTX100441), XIAP (GeneTex GTX113130), Active/cleaved caspase 8 (Imgenex IMG-5703), ARC (ProSci #2081), troponin T (Developmental Studies Hybridoma Bank, CT3). Antibodies against LC3B, phospho-eIF2 $\alpha$  and phospho-p38 required Tyramide Signal Amplification (TSA<sup>TM</sup> Plus Cyanine 3 System, PerkinElmer) according to the manufacturer's instructions. Images were taken using a Leica SP5 confocal laser scanning microscope or a Keyence BZ-8100E fluorescence microscope.

#### 2.4. Statistical analyses

Statistical analyses were performed using Excel (Microsoft) and SPSS (IBM) software. Differences between two groups were analyzed using unpaired, two-tailed Student's *t*-test. Differences between multiple groups were determined using one-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test. All data are presented as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). A probability value of  $P < 0.05$  was considered to indicate statistical significance (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ ).

Descriptions of additional methods are available in the Supplemental Information.

### 3. Results

#### 3.1. Genes involved in stress response, cell death and survival are induced during embryonic heart regeneration

In order to identify molecular mechanisms driving embryonic heart regeneration we performed genome-wide RNA expression analyses on whole hearts of 13.5 dpc *cHccs*<sup>+/-</sup> embryos and female littermate controls. At this developmental stage the most dramatic changes in tissue composition occur in *cHccs*<sup>+/-</sup> ventricular myocardium, as hyperproliferation of healthy cardiomyocytes is readily

detectable while at the same time a substantial contribution of HCCS deficient cells is still present [6]. This should allow the identification of genes involved in compensatory growth of healthy cells as well as survival of defective cells. Analyses of microarray data revealed 437 genes being differentially expressed in embryonic *cHccs*<sup>+/-</sup> hearts compared to controls. Bioinformatic functional profiling showed enrichment of genes regulating various metabolic and biosynthetic processes (including protein, amino acid and RNA metabolism) and remodeling of cell structures and organelles. Additionally, genes involved in programmed cell death and cellular response to stress were also over-represented (Table 1, for a more detailed list of enriched gene clusters see Supplemental Table 1). Among the genes showing the most dramatic induction in *cHccs*<sup>+/-</sup> hearts compared to controls, the majority is associated with endoplasmic reticulum (ER) stress, unfolded protein response (UPR), protein and amino acid metabolism or apoptosis regulation (for complete gene lists see Supplemental Tables 2–4). These data suggest that whereas various metabolic adaptations in embryonic *cHccs*<sup>+/-</sup> hearts potentially enable compensatory growth of healthy cells, pathways mediating stress response, cell death and survival might rather affect the HCCS deficient cell population to cope with mitochondrial dysfunction.

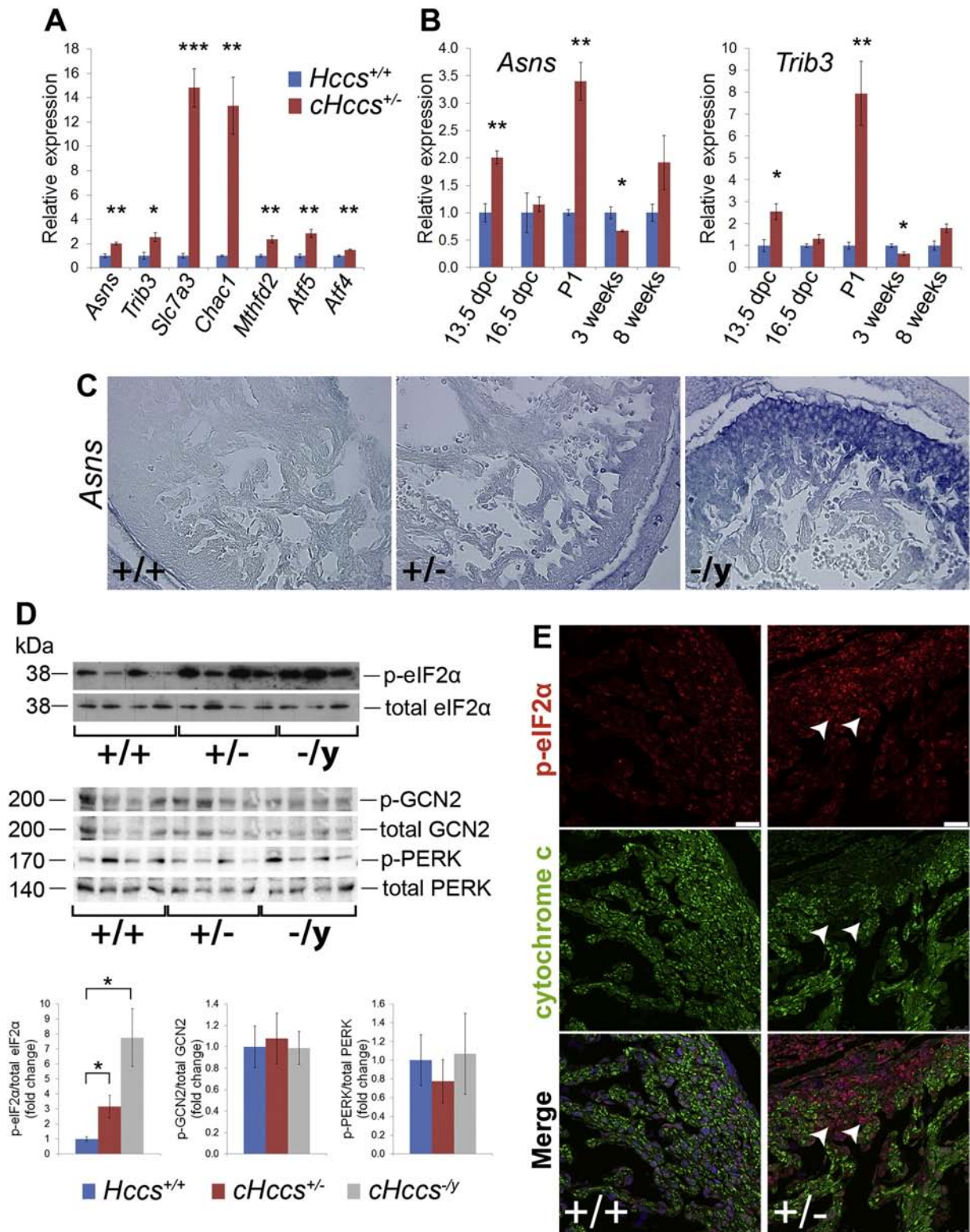
#### 3.2. An unfolded protein response is activated in HCCS deficient cardiomyocytes of embryonic *cHccs*<sup>+/-</sup> hearts

Induction of ER stress and UPR genes identified in the microarray screen was validated by quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR) in 13.5 dpc *cHccs*<sup>+/-</sup> hearts compared to controls (Fig. 1A) and further investigated at different stages of pre- and postnatal development. Interestingly, all genes analyzed showed significantly increased expression in embryonic (13.5 dpc) and neonatal (postnatal day 1) *cHccs*<sup>+/-</sup> hearts, which was no longer observed at later postnatal stages (Fig. 1B and Supplemental Fig. 1A). In the fetal *cHccs*<sup>+/-</sup> heart (i.e. 16.5 dpc) increased expression was observed for some but not all genes. Thus, induction of this group of genes is restricted to the period of prenatal compensatory growth but does not seem to be required for postnatal adaptations of *cHccs*<sup>+/-</sup> hearts. To identify the cardiac cell type in which UPR genes are induced we performed RNA in situ hybridization (ISH) for *Slc7a3* and *Asns* on 13.5 dpc *cHccs*<sup>+/-</sup> and hemizygous *Hccs* KO male (hereafter referred to as *cHccs*<sup>-/-</sup>) embryos. The latter occasionally survive to this stage and represent the complete knockout of *Hccs* in the heart [6], thereby facilitating the assignment of molecular changes to the HCCS deficient cell population within the *cHccs*<sup>+/-</sup> tissue mosaic. Both, *Slc7a3* and *Asns* were induced in cardiomyocytes of the ventricular myocardium in *cHccs*<sup>+/-</sup> hearts (Fig. 1C and Supplemental Fig. 1B) and *Asns* showed fulminant induction in *cHccs*<sup>-/-</sup> males (Fig. 1C), which was furthermore confirmed by qRT-PCR results (Supplemental

**Table 1**  
Enrichment analyses of differentially regulated genes in 13.5 dpc *cHccs*<sup>+/-</sup> compared to control hearts.

| Gene ontology term                            | Term ID    | Term genes [T] | Query genes [Q] | Q&T | Q&T/Q  | Q&T/T | P-value  |
|-----------------------------------------------|------------|----------------|-----------------|-----|--------|-------|----------|
| Cellular metabolic process                    | GO:0044237 | 8325           | 437             | 247 | 0.565  | 0.030 | 5.56E-17 |
| Cellular macromolecule metabolic process      | GO:0044260 | 6225           | 437             | 190 | 0.435  | 0.031 | 6.60E-12 |
| Cellular biosynthetic process                 | GO:0044249 | 4537           | 437             | 152 | 0.3484 | 0.034 | 1.19E-11 |
| Cellular amino acid metabolic process         | GO:0006520 | 328            | 437             | 27  | 0.062  | 0.082 | 2.33E-07 |
| Cellular protein metabolic process            | GO:0044267 | 3208           | 437             | 103 | 0.236  | 0.032 | 1.62E-05 |
| Cellular response to stress                   | GO:0033554 | 1160           | 437             | 47  | 0.108  | 0.041 | 8.42E-04 |
| Regulation of macromolecule metabolic process | GO:0060255 | 4336           | 437             | 124 | 0.284  | 0.029 | 2.79E-04 |
| Protein metabolic process                     | GO:0019538 | 3999           | 437             | 116 | 0.265  | 0.029 | 4.05E-04 |
| Translation                                   | GO:0006412 | 472            | 437             | 26  | 0.059  | 0.055 | 1.81E-03 |
| Programmed cell death                         | GO:0012501 | 1546           | 437             | 56  | 0.128  | 0.036 | 2.23E-03 |
| Cellular amino acid biosynthetic process      | GO:0008652 | 92             | 437             | 11  | 0.025  | 0.120 | 2.25E-03 |
| Amino acid activation                         | GO:0043038 | 44             | 437             | 8   | 0.018  | 0.182 | 2.69E-03 |
| Apoptotic process                             | GO:0006915 | 1515           | 437             | 54  | 0.124  | 0.036 | 5.73E-03 |
| Cell death                                    | GO:0008219 | 1626           | 437             | 56  | 0.128  | 0.034 | 1.03E-02 |
| Intrinsic apoptotic signaling pathway         | GO:0097193 | 228            | 437             | 16  | 0.037  | 0.070 | 1.24E-02 |





**Fig. 1.** HCCS deficient cardiomyocytes in the embryonic heart activate an unfolded protein response. (A) Various UPR genes are induced in 13.5 dpc *cHccs*<sup>+/-</sup> compared to control hearts (qRT-PCR data, *n* = 5). (B) Expression profiling of *Asns* and *Trib3* during pre- and postnatal development revealed induction of UPR genes primarily in embryonic (13.5 dpc) and neonatal (P1) but not fetal (16.5 dpc) or postnatal *cHccs*<sup>+/-</sup> hearts (qRT-PCR data, *n* = 4–5). (C) In situ hybridization in 13.5 dpc hearts show moderately increased *Asns* expression in the ventricular myocardium of *cHccs*<sup>+/-</sup> hearts but a robust induction in hemizygous *cHccs*<sup>-/-</sup> males. (D) Whereas phosphorylation of eIF2α (Ser51) is increased in 13.5 dpc *cHccs*<sup>+/-</sup> and *cHccs*<sup>-/-</sup> hearts compared to controls, activation of the two upstream kinases GCN2 and PERK is not evident (densitometric quantification *n* = 4–5 per genotype). (E) Immunofluorescence analyses revealed phosphorylation of eIF2α (Ser51) primarily in HCCS deficient (and consequently cytochrome c negative) cardiomyocytes (see arrowheads) of the 13.5 dpc *cHccs*<sup>+/-</sup> ventricular myocardium (scale bar = 25 μm, nuclei are stained in blue using DAPI). (\**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01, \*\*\**P* < 0.001 versus controls).

Fig. 1C). This data indicates that UPR genes are induced in embryonic HCCS deficient cardiomyocytes.

The UPR is best characterized in the context of ER stress such that upon accumulation of unfolded proteins within the ER lumen three distinct pathways alleviate the latter by translational inhibition, induction of ER chaperones and enhanced degradation of misfolded proteins [14]. We investigated the three ER stress branches in *cHccs*<sup>+/-</sup> and *cHccs*<sup>-/-</sup> hearts, but did not find evidence for an activation of ATF6 (evident as unaltered cleavage, Supplemental Fig. 2A) or IRE1/XBP1 (evident as undetectable splicing of *Xbp1*, Supplemental Fig. 2B). Consistently, RNA expression of the ER chaperone GRP78 (*Hspa5*), an important transcriptional target of XBP1 and ATF6 [14], was unaltered even in *cHccs*<sup>-/-</sup> male hearts (Supplemental Fig. 2C). Translational inhibition during ER stress is mediated by phosphorylation of eIF2 $\alpha$  by PERK. Indeed, we detected increased eIF2 $\alpha$  phosphorylation in *cHccs*<sup>+/-</sup> hearts (Fig. 1D), which could clearly be assigned to HCCS deficient cardiomyocytes by immunofluorescence staining (Fig. 1E), whereas activation of PERK was not evident (Fig. 1D). Also, we did not detect changes in phosphorylation of GCN2 (Fig. 1D), an important translational regulator in the context of amino acid availability as well as mitochondrial stress and a known upstream kinase of eIF2 $\alpha$  [15,16]. Unresolved ER stress can eventually lead to cell death associated with activation of the stress related MAP-kinases p38 and JNK [14]. Whereas phosphorylation of JNK was unaltered (Supplemental Fig. 3A and B), p38 is activated in *cHccs*<sup>-/-</sup> male hearts (Supplemental Fig. 3C) but not HCCS deficient cardiomyocytes of *cHccs*<sup>+/-</sup> females (Supplemental Fig. 3D). This data suggest that p38 activation is associated with heart failure in *Hccs* KO males rather than being directly induced by mitochondrial dysfunction. Taken together, embryonic HCCS deficient cardiomyocytes activate an unfolded protein response in the absence of classical ER stress, but appear to partially prevent the activation of detrimental mechanisms leading to cell death.

### 3.3. Activation of mitochondrial UPR in HCCS deficient cardiomyocytes

Similar to the molecular mechanisms downstream of ER stress, a mitochondrial UPR (mtUPR) has recently been described, which is proposed to ease the load of unfolded proteins within dysfunctional mitochondria by general translational inhibition, reduced import and induction of mitochondrial chaperones [17,18]. Although the molecular mechanisms of mtUPR have been primarily characterized in *Caenorhabditis elegans*, in mammalian cells CHOP (encoded by the *Ddit3* gene) as emerged as key transcriptional regulator by inducing the expression of a variety of downstream target genes involved in mitochondrial protein import, processing and quality control [18,19]. We found increased RNA and protein expression of CHOP in 13.5 dpc *cHccs*<sup>-/-</sup> male KO hearts (Fig. 2C and D). Although this induction of CHOP is less obvious in total cardiac RNA or protein from *cHccs*<sup>+/-</sup> females, we could show increased expression and nuclear localization of CHOP in HCCS deficient cardiomyocytes by immunofluorescence staining (Fig. 2A). CHOP has been shown to activate the expression of the mitochondrial chaperones HSP60 and HSP10 [17,18] and both indeed exhibit elevated protein levels in HCCS deficient cardiomyocytes of 13.5 dpc *cHccs*<sup>+/-</sup> hearts (Fig. 2B and C, Supplemental Fig. 4A). In contrast, ER resident (i.e. GRP78 and calreticulin) and cytoplasmic (i.e. HSP90) chaperones were not induced (Supplemental Figs. 5 and 6). HSP70, which is located in both the cytoplasm and within mitochondria, is slightly induced in *cHccs*<sup>+/-</sup> hearts (Supplemental Fig. 6A), although this misses statistical significance. HSP60 has recently been proposed to have additional functions in the cytoplasm or at the cell membrane [20], however, using cell fractionation we could show that HSP60 induction is restricted to the mitochondrial compartment in *cHccs*<sup>+/-</sup> hearts (Fig. 2E). We confirmed the cardiomyocyte identity of HCCS deficient cells by showing that cells with elevated HSP60 levels co-express the sarcomere associated protein troponin T (Supplemental Fig. 4B). Interestingly, HCCS deficient cardiomyocytes maintain elevated HSP60 levels

throughout pre- and postnatal development (Supplemental Fig. 4C). We finally investigated expression of additional genes that have been identified as potential CHOP targets during mtUPR in vitro [19], but found mainly unaltered expression or only a mild induction of YME1L1 or ClpP in *cHccs*<sup>+/-</sup> and *cHccs*<sup>-/-</sup> hearts (Supplemental Figs. 7 and 8). In case of the mitochondrial processing peptidase PMPCB (also known as MPP $\beta$ ) expression was in fact reduced in knockout hearts (Supplemental Fig. 8). These data suggest that the regulation and orchestration of mtUPR gene expression is more complex in vivo and not solely dependent on increased CHOP levels. In summary, eIF2 $\alpha$  mediated translational inhibition in the absence of classical ER stress in combination with induction of mitochondrial but not ER chaperones strongly suggest that the UPR in HCCS deficient cardiomyocytes is activated via mitochondria rather than the ER. In support of this notion, we have previously reported ultrastructural changes in mitochondria of HCCS deficient cardiomyocytes, characterized by organelle enlargement and disorganization of the internal membrane [6], which is in agreement with mitochondrial stress.

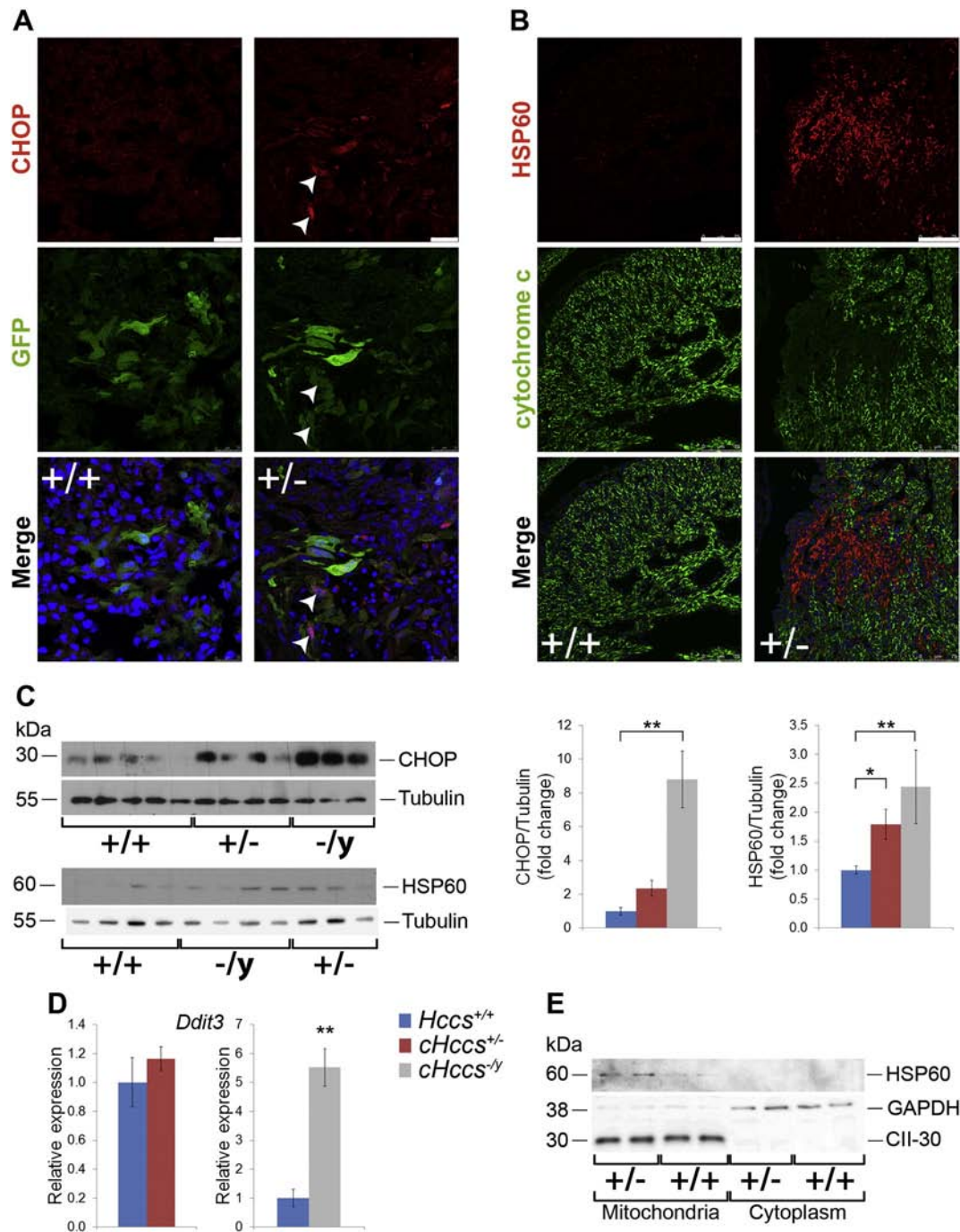
### 3.4. Activation of antioxidative mechanisms in HCCS deficient cardiomyocytes

Impaired mitochondrial respiration can cause oxidative stress due to enhanced production of reactive oxygen species (ROS), primarily generated by respiratory chain complex I and III [21]. Elevated ROS levels in turn lead to oxidative damage of DNA and proteins. Importantly, we have previously shown that HCCS deficiency leads to reduced complex III activity in the embryonic heart [6], a mechanisms that has been shown to boost ROS generation [21]. Furthermore, knockdown of HCCS in fish embryos increases ROS [39]. Cells can alleviate oxidative stress by activating various mechanisms to reduce ROS levels, including the induction of antioxidative enzymes and ROS scavengers [22]. As such, we detected increased protein levels of the mitochondrial manganese superoxide dismutase (SOD2) and peroxiredoxin 3 (PRDX3) in HCCS deficient cardiomyocytes (Fig. 3A–C). SOD2 catalyzes the conversion of superoxide ( $O_2^-$ ) to less reactive  $H_2O_2$  whereas peroxiredoxins detoxify  $H_2O_2$  in a redox reaction resulting in the oxidation of a thiol on a cysteine residue to form a sulfenic acid (SOH) group [22]. Upon sustained oxidative stress, the SOH group can be over-oxidized to a  $SO_3H$  sulfonic acid group. However, we did not detect increased levels of PRDX- $SO_3$  in 13.5 dpc *cHccs*<sup>+/-</sup> and *cHccs*<sup>-/-</sup> hearts (Fig. 3C and Supplemental Fig. 9A), suggesting that excessive ROS levels can be prevented. The detoxification of  $H_2O_2$  as well as the reduction and therefore recycling of peroxiredoxins is mediated by thiols such as thioredoxins and glutathione [22]. Whereas mitochondrial thioredoxin 2 (TRX2) was unaltered in 13.5 dpc *cHccs*<sup>+/-</sup> and *cHccs*<sup>-/-</sup> hearts (Fig. 3C and Supplemental Fig. 9B), we detected slightly decreased levels of reduced glutathione in *cHccs*<sup>+/-</sup> and *cHccs*<sup>-/-</sup> hearts, indicating its consumption due to increased oxidation (Fig. 3D). ROS mediated cell damage is detectable as protein carbonylation. Consistent with the activation of antioxidative mechanisms, no difference in the amount of carbonylated proteins was detected in whole *cHccs*<sup>+/-</sup> and *cHccs*<sup>-/-</sup> hearts compared to controls (Fig. 3E). Moreover, the ROS sensitive dye dihydroethidium did not show altered staining in fresh frozen cardiac tissue sections of *cHccs*<sup>+/-</sup> females (Supplemental Fig. 9C). In conclusion, in 13.5 dpc *cHccs*<sup>+/-</sup> hearts elevated ROS production appears to be paralleled by increased ROS detoxification capacities, such that HCCS deficient cells adapt to oxidative stress and keep ROS at physiological levels.

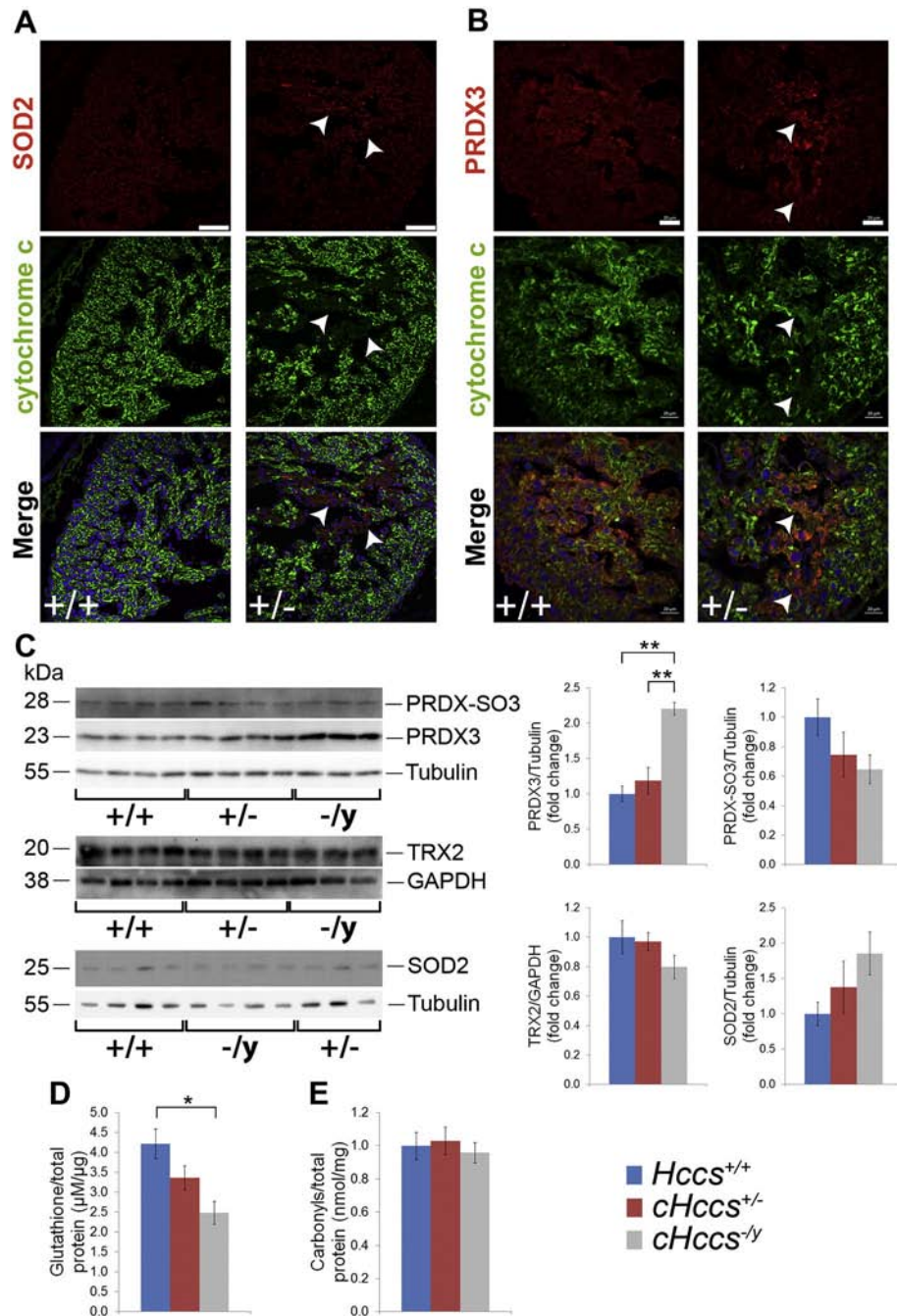
### 3.5. Upstream events of extrinsic and intrinsic apoptosis are activated in embryonic *cHccs*<sup>+/-</sup> hearts

Mitochondrial dysfunction is a strong trigger for apoptosis due to lack of ATP and excessive ROS production [23]. Although HCCS deficient cardiomyocytes do not undergo cell death [6] and appear to control ROS levels, we were still interested whether apoptosis is initiated. Our microarray data revealed induction of the death receptor genes *Fas*









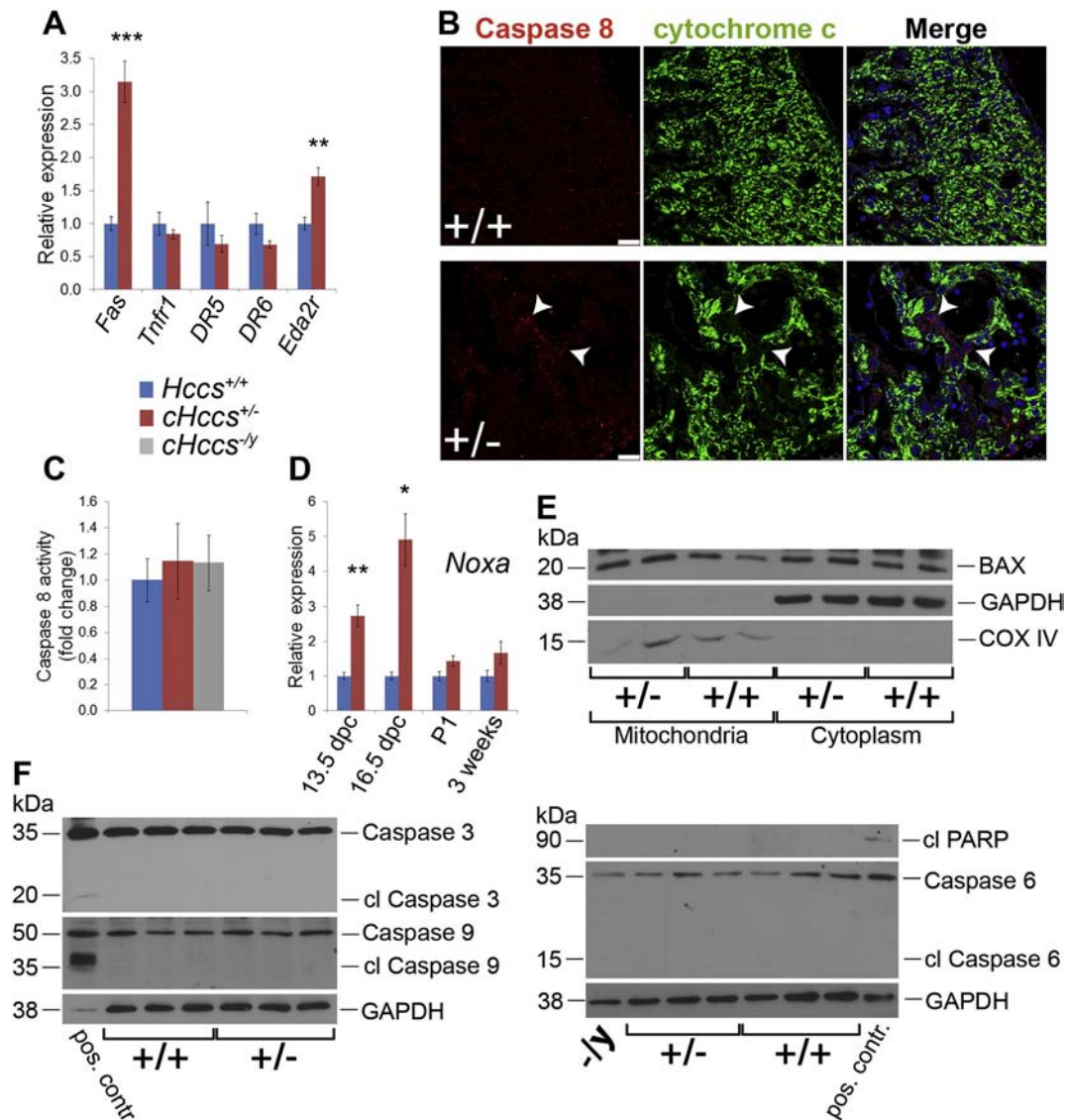
**Fig. 3.** Activation of antioxidative mechanism in HCCS deficient cardiomyocytes of the embryonic heart. (A) Immunofluorescence analyses reveal induction of the antioxidative enzymes SOD2 and (B) peroxiredoxin 3 (PRDX3) specifically in HCCS deficient cardiomyocytes of 13.5 dpc *cHCCS*<sup>+/-</sup> hearts (see arrowheads, scale bar = 75 μm in (A) and 20 μm in (B), nuclei are stained in blue using TO-PRO-3). (C) Western blot analyses confirmed induction of SOD2 and PRDX3 but not thioredoxin 2 (TRX2) in *cHCCS*<sup>-/-</sup> hearts. Over-oxidation of PRDX, evident as formation of SO3 groups, was not evident (*n* = 3–5 per genotype). (D) The amount of reduced glutathione normalized to the overall protein amount is reduced in 13.5 dpc *cHCCS*<sup>+/-</sup> (*n* = 7) and *cHCCS*<sup>-/-</sup> (*n* = 3) hearts compared to controls (*n* = 7). (E) Carbonylation of proteins to indicate oxidative damage in whole 13.5 dpc hearts is not different between genotypes (*HCCS*<sup>+/+</sup> *n* = 8, *cHCCS*<sup>+/-</sup> *n* = 6, *cHCCS*<sup>-/-</sup> *n* = 4). (\**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01).

cell death signal is not transduced to downstream caspase 9 or effector caspases 3 and 6 and does not lead to cleavage of the caspase substrate PARP (Fig. 4F).

Caspase independent cell death (CICD) has been reported, which is characterized by the release of mitochondrial proteins such as apoptosis inducing factor (AIF) and endonuclease G (EndoG) into the cytosol, followed by their nuclear translocation and involvement in DNA degradation in the absence of caspase cleavage [24]. Interestingly, immunostaining revealed accumulation of AIF in HCCS deficient cardiomyocytes of 13.5 dpc *cHCCS*<sup>+/-</sup> hearts without nuclear translocation (Supplemental Fig. 11B). Consistently, cell fractionation did not

show increased amounts of AIF or EndoG in the cytosol of 13.5 dpc *cHCCS*<sup>+/-</sup> hearts compared to controls (Supplemental Fig. 11A). This data suggests that CICD is not activated in HCCS deficient cardiomyocytes, but increased mitochondrial AIF levels might contribute to antioxidative defense as previously reported [25].

A regulated form of necrotic cell death has recently been described (termed necroptosis), which is dependent on receptor interacting protein (RIP) 1 and 3. Both are recruited to the cytoplasmic domain of death receptors (including Fas) and can induce necrosis in case apoptosis progression is inhibited [5]. RIP1 and 3 expression is induced in cardiomyocytes in response to various stress stimuli as well as after



**Fig. 4.** Initial stages of intrinsic and extrinsic apoptosis are activated in 13.5 dpc *cHccs*<sup>+/-</sup> hearts. (A) Expression of death receptors *Fas* and *Eda2r* is increased in 13.5 dpc *cHccs*<sup>+/-</sup> compared to control hearts, whereas other death receptors (*DR5* (*Tnfrsf10b*) and 6 (*Tnfrsf21*), tumor necrosis factor receptor 1 (*Tnfrsf1a*)) are unaffected (qRT-PCR data, *n* = 5 per genotype). (B) An antibody against activated caspase 8 shows enhanced immunofluorescence staining specifically in HCCS deficient cardiomyocytes of 13.5 dpc *cHccs*<sup>+/-</sup> hearts (see arrowheads, scale bar = 25  $\mu$ m, nuclei are stained in blue using DAPI). (C) Measurement of caspase 8 proteolytic activity in 13.5 dpc hearts does not reveal differences between genotypes (*Hccs*<sup>+/+</sup> *n* = 7, *cHccs*<sup>+/-</sup> *n* = 5, *cHccs*<sup>-/-</sup> *n* = 2). (D) Expression of the pro-apoptotic Bcl-2 family member *Noxa* (*Pmaip1*) is increased in prenatal but not postnatal *cHccs*<sup>+/-</sup> compared to control hearts (qRT-PCR data, *n* = 4–5 per genotype). (E) Cell fractionation identified increased amounts of Bax in the mitochondrial compartment of 13.5 dpc *cHccs*<sup>+/-</sup> compared to control hearts. GAPDH and cytochrome c oxidase subunit IV (COXIV) served as loading controls for the cytoplasmic and mitochondrial fraction, respectively. (F) Western blot analyses showed no evidence for cleavage of the initiator caspase 9, the effector caspases 3 and 6 or the caspase 3 substrate PARP in 13.5 dpc *cHccs*<sup>+/-</sup> compared to control hearts. Liver tissue from mice treated with a Fas-agonistic antibody (Supplemental References 2) was used as positive control.

myocardial infarction [26,27], but we did not find altered expression in 13.5 dpc *cHccs*<sup>+/-</sup> hearts compared to controls (Supplemental Fig. 11C and D).

In summary, although certain upstream steps of the intrinsic and extrinsic apoptosis cascade appear to be initiated in 13.5 dpc *cHccs*<sup>+/-</sup> hearts, cell death is not executed, consistent with our previous finding that HCCS deficient cardiomyocytes are not eliminated during development but are still detectable in the postnatal heart [6].

### 3.6. NF- $\kappa$ B signaling and autophagy are not induced in HCCS deficient cardiomyocytes

Death receptor activation is known to induce NF- $\kappa$ B signaling under certain conditions, an important cardioprotective mechanism [28]. Protein expression of various components of the NF- $\kappa$ B pathway was unaltered in 13.5 dpc *cHccs*<sup>+/-</sup> hearts compared to controls, which also

include the inhibitory protein I $\kappa$ B $\alpha$  (Supplemental Fig. 14A). The latter binds the transcriptionally active NF- $\kappa$ B subunits p65/p52 in the cytosol to prevent their nuclear translocation. Upon activation of the pathway, I $\kappa$ B $\alpha$  is phosphorylated and targeted for degradation thereby releasing p65/p52 into the nucleus [28]. Immunofluorescence analyses did not reveal enhanced nuclear localization of p65 in 13.5 dpc *cHccs*<sup>+/-</sup> hearts (Supplemental Fig. 14B). Strikingly however, HCCS deficient cardiomyocytes show cytoplasmic accumulation of I $\kappa$ B $\alpha$ , suggesting that NF- $\kappa$ B signaling is specifically inhibited in these cells (Supplemental Fig. 14C). The latter would be in agreement with downregulation of *c-Flip*, a well characterized transcriptional target of NF- $\kappa$ B [29], in *cHccs*<sup>+/-</sup> hearts (see below).

Autophagy is a catabolic cellular response important to overcome times of nutrient starvation or stress. Upon mitochondrial dysfunction autophagy initially protects against the consequences of oxidative stress by removing unfolded or aggregated proteins and even whole damaged

mitochondria (also referred to as mitophagy). Unrestrained autophagy, however, has been shown to lead to cell death, at least in part utilizing the apoptotic machinery [30]. We did not find evidence for activation of autophagy in 13.5 dpc *cHccs*<sup>+/-</sup> hearts, based on reduced RNA expression of *Atg5* and *Atg12*, both of which are required for induction of autophagosomes, and unaltered protein levels of the initiation complex composed of ATG5/ATG12 (Supplemental Fig. 15A and B). In addition, immunofluorescence analyses did not show accumulation of LC3B punctual staining in HCCS deficient cardiomyocytes (Supplemental Fig. 15D). Surprisingly, when detecting p62, a protein rapidly degraded upon autophagy progression, we found increased p62 levels in *cHccs*<sup>-/-</sup> hearts (Supplemental Fig. 15C), indicating that autophagy appears to be inhibited.

### 3.7. ARC is induced in HCCS deficient cardiomyocytes of the embryonic heart but not required for their survival

The data described above suggest that, in addition to protective UPR and antioxidative defense, more specific anti-apoptotic mechanisms might be induced in HCCS deficient cardiomyocytes. Programmed cell death is an energy consuming process, such that reduced ATP upon mitochondrial dysfunction could inhibit apoptosis progression. ATP levels were normal in 13.5 dpc *cHccs*<sup>+/-</sup> and *cHccs*<sup>-/-</sup> hearts compared to controls (Fig. 5A), however, confirming that ATP production does not primarily depend on oxidative phosphorylation in embryonic cardiomyocytes but can be met by other metabolic processes, such as glycolysis [31].

We then screened for apoptosis inhibitors whose induction might contribute to survival of HCCS deficient cardiomyocytes, but did not find evidence for an involvement of the anti-apoptotic Bcl-2 family members Bcl-x or Mcl-1 based on unaltered protein expression (Fig. 5C) or immunostaining in 13.5 dpc *cHccs*<sup>+/-</sup> compared to control hearts (Supplemental Fig. 12A and B). Also, RNA expression of *Xiap* (X-linked inhibitor of apoptosis), *Birc2* (baculoviral IAP repeat containing 2, cIAP1) and *Birc5* (survivin) was not different between the groups, whereas *c-Flip* (CASP8 and FADD-like apoptosis regulator, *Cflar*) was downregulated in *cHccs*<sup>+/-</sup> embryos on RNA level (Fig. 5B). Furthermore, none of these anti-apoptotic regulators showed differences on the protein level in western blot experiments (Fig. 5C) or when specifically analyzed in HCCS deficient cardiomyocytes by immunostaining (Supplemental Figs. 12 and 13).

Strikingly however, we noticed an induction of Bcl-2 and apoptosis repressor with caspase recruitment domain (ARC, encoded by the *Nol3* gene) in 13.5 dpc *cHccs*<sup>-/-</sup> male hearts (Fig. 5C). Consistently, both proteins were increased in the HCCS deficient cell population of 13.5 dpc *cHccs*<sup>+/-</sup> females (Fig. 5D and E). ARC is the only known protein which can inhibit both extrinsic as well as intrinsic apoptosis [32] and therefore represents an ideal candidate for protecting HCCS deficient cells from cell death, especially considering that despite Bcl-2 the majority of anti-apoptotic proteins were not induced. To functionally prove the role of ARC in our model, we used knockout mice [33] to monitor embryonic heart regeneration in the absence of ARC. We generated *cHccs*<sup>+/-</sup>, *Arc*<sup>-/-</sup> and *cHccs*<sup>-/-</sup>, *Arc*<sup>-/-</sup> double knockout mice and the respective controls (*Hccs*<sup>+/+</sup>, *Arc*<sup>-/-</sup>). The lack of ARC protein was confirmed by western blot (Supplemental Fig. 16A). The absence of ARC does not lead to embryonic lethality but results in normal cardiac morphology in 13.5 dpc *cHccs*<sup>+/-</sup>, *Arc*<sup>-/-</sup> females as well as *cHccs*<sup>-/-</sup>, *Arc*<sup>-/-</sup> males (Fig. 6A). HCCS deficient cardiomyocytes are detectable in those hearts (Fig. 6C), excluding their loss at earlier stages of development. Also, inactivation of ARC does not result in apoptosis of HCCS deficient cardiomyocytes in 13.5 dpc *cHccs*<sup>+/-</sup>, *Arc*<sup>-/-</sup> hearts, as revealed by TUNEL staining (Fig. 6B) and absence of caspase 3 cleavage (Supplemental Fig. 16B). Surprisingly, TUNEL staining is reduced in the ventricular myocardium of 13.5 dpc *cHccs*<sup>+/-</sup>, *Arc*<sup>-/-</sup> female and *cHccs*<sup>-/-</sup>, *Arc*<sup>-/-</sup> male embryos compared to controls (Fig. 6B). These data suggest that HCCS and cytochrome c deficiency in combination with the induction of cell protective mechanisms accomplish apoptosis

inhibition. It furthermore implies functional redundancy between various survival pathways in HCCS deficient cardiomyocytes. However, we did not detect induction of other anti-apoptotic proteins in *cHccs*<sup>+/-</sup>, *Arc*<sup>-/-</sup> hearts to compensate for the absence of ARC (Fig. 6D–F), whereas mitochondrial UPR (Supplemental Fig. 17) and antioxidative defense (Fig. 6C) were still activated in HCCS deficient cells. ARC has been shown to attenuate ER stress in pancreatic  $\beta$  cells [34], but the absence of ARC does not alter the UPR gene program (Supplemental Fig. 16C) and does not induce ER stress (Supplemental Fig. 16D) in the hearts of 13.5 dpc *cHccs*<sup>+/-</sup>, *Arc*<sup>-/-</sup> females or *cHccs*<sup>-/-</sup>, *Arc*<sup>-/-</sup> males. In summary, this data indicates that ARC is not required for survival of embryonic cardiomyocytes experiencing mitochondrial dysfunction.

### 3.8. ARC is not required for survival of HCCS deficient cardiomyocytes after birth

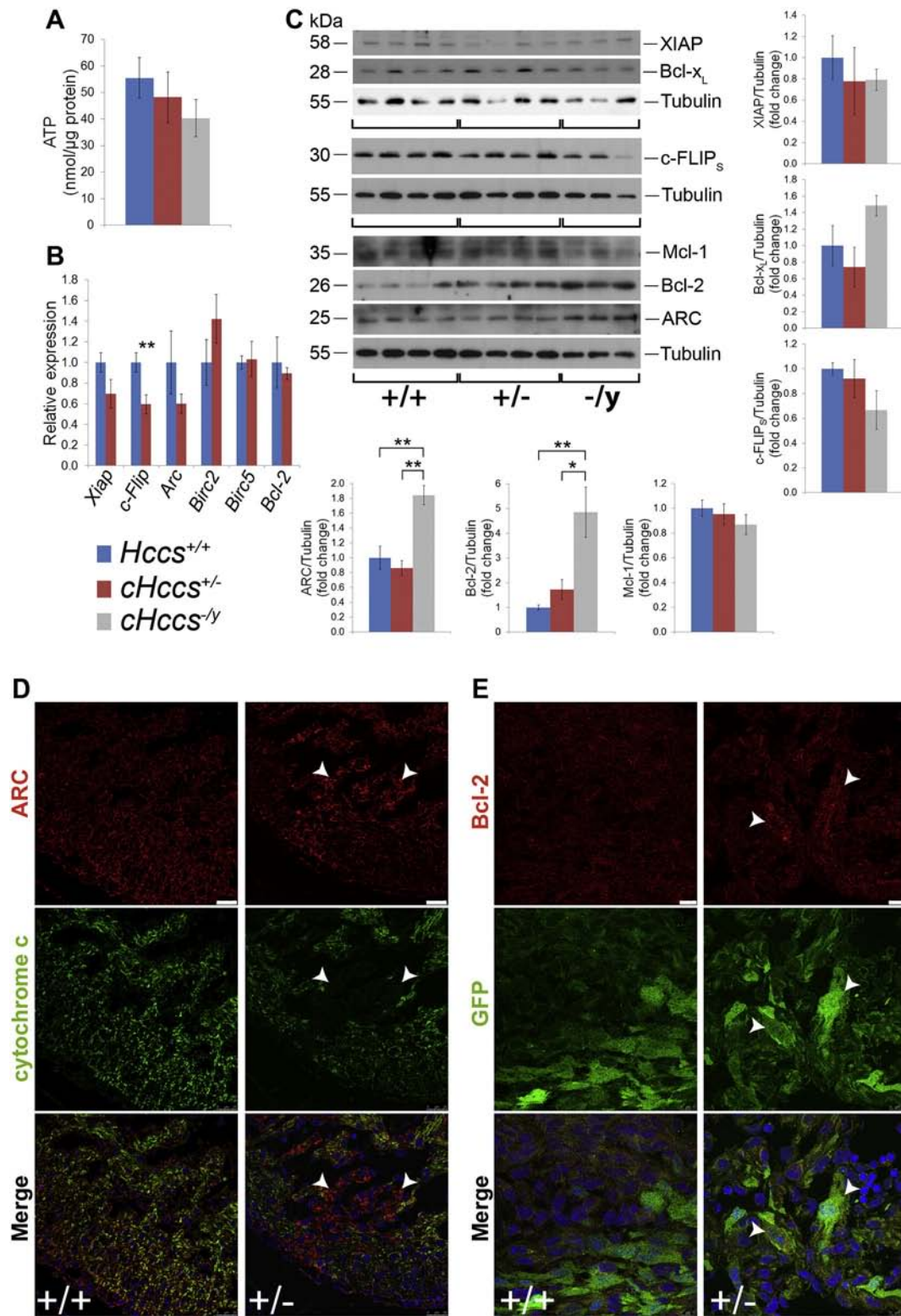
Finally, we investigated postnatal development of *cHccs*<sup>+/-</sup>, *Arc*<sup>-/-</sup> females to monitor a potential loss of HCCS deficient cardiomyocytes at later stages. *cHccs*<sup>+/-</sup>, *Arc*<sup>-/-</sup> females survived to adulthood and exhibit normal heart size (Supplemental Table 5). In addition, echocardiography revealed normal LV dimensions, wall thickness and contractility at the age of 8 weeks (Supplemental Table 5). A small population of HCCS deficient cardiomyocytes was still detectable within the left ventricular myocardium of neonatal (Fig. 7B), 3 week (Supplemental Fig. 18A) and 8 week old *cHccs*<sup>+/-</sup>, *Arc*<sup>-/-</sup> females (Fig. 7C), identified by the lack of cytochrome c and strong HSP60 staining. TUNEL staining was not different between genotypes at birth or after 8 weeks (Fig. 7A), indicating unaltered cell death. Loss of cardiomyocytes in the adult heart is compensated for by myocardial tissue remodeling characterized by increased extracellular matrix deposition resulting in interstitial fibrosis. Although fibrosis is slightly increased in *cHccs*<sup>+/-</sup>, *Arc*<sup>-/-</sup> compared to *Hccs*<sup>+/+</sup>, *Arc*<sup>-/-</sup> hearts (Fig. 7D and Supplemental Fig. 18B), this difference does not reach statistical significance. In agreement, expression of fetal genes (i.e. “heart failure markers” ANF and BNP) was not different between genotypes (Fig. 7E), indicating that adult *cHccs*<sup>+/-</sup>, *Arc*<sup>-/-</sup> females do not experience cardiac stress. Taken together these data indicate that ARC is not required for survival of HCCS deficient cardiomyocytes during postnatal life.

## 4. Discussion

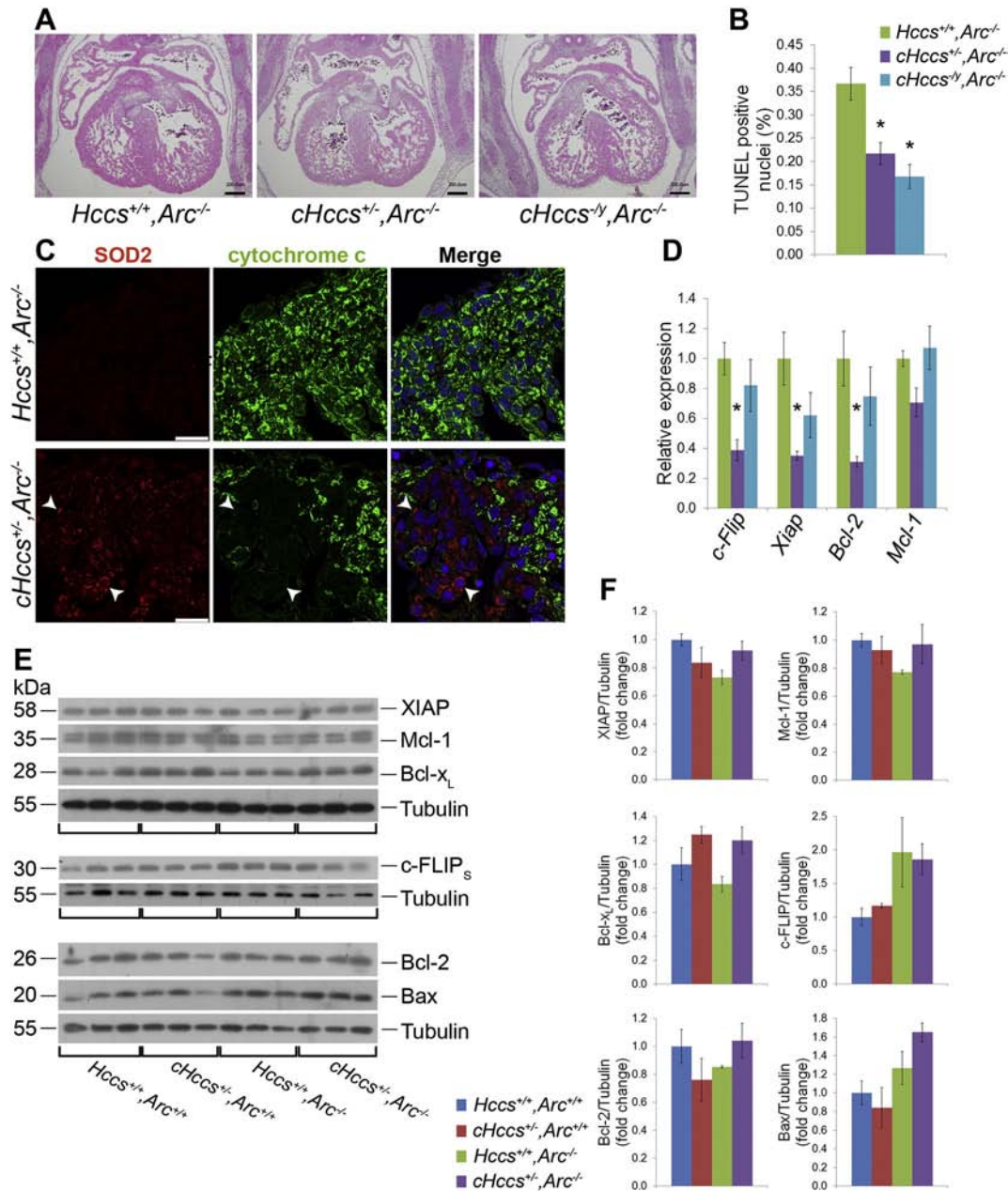
The data presented here demonstrate an impressive ability of embryonic cardiomyocytes to adapt to metabolic stress imposed by mitochondrial dysfunction. The parallel activation of a multitude of cell protective mechanisms regulating protein homeostasis, antioxidative defense and apoptosis is likely to contribute to cell survival. Whereas the response to injury and cell damage is intensively studied in the adult heart to understand the pathogenesis of heart disease, much less is known about adaptations to pathological conditions in embryonic cardiomyocytes. In this regard, our study provides a systematic and comprehensive characterization of stress response mechanisms in the prenatal heart, which might help to better understand intrauterine impairment of heart development by toxins and drugs, congenital heart disease or even prenatal origins of postnatal cardiac dysfunction.

A limitation of our study is the use of whole 13.5 dpc *cHccs*<sup>+/-</sup> hearts containing a tissue mosaic of healthy and HCCS deficient cardiomyocytes for RNA and protein expression analyses. Subtle changes in one of the two cell populations are easily missed if not sufficient to alter expression levels in whole heart samples. For the HCCS deficient cell population we addressed this issue by including *cHccs*<sup>-/-</sup> male hearts, resembling a complete cardiac *Hccs* knockout, as reference. The latter, however, die shortly after 13.5 dpc, most likely due to heart failure, such that certain changes might be associated with cardiac rather than mitochondrial dysfunction. Furthermore, no suitable reference is available to detect gene expression changes specific for the healthy cardiomyocyte population. Consequently,





**Fig. 5.** ARC and Bcl-2 are induced in HCCS deficient cardiomyocytes of the embryonic heart. (A) ATP levels are not altered in whole *cHccs*<sup>+/+</sup> ( $n = 8$ ) and *cHccs*<sup>-/-</sup> ( $n = 3$ ) hearts compared to controls ( $n = 8$ ). (B) RNA expression of various inhibitors of apoptosis is either unchanged or reduced in 13.5 dpc *cHccs*<sup>+/+</sup> compared to control hearts (qRT-PCR data,  $n = 7$ –9 per genotype). (C) Protein levels of the apoptosis inhibitors ARC and Bcl-2 are induced in 13.5 dpc *cHccs*<sup>-/-</sup> hearts compared to controls. In contrast, protein levels of other apoptosis inhibitors are not different between genotypes (densitometric quantification  $n = 3$ –5 per genotype). (D) Immunofluorescence analyses showed induction of ARC specifically in HCCS deficient cardiomyocytes of 13.5 dpc *cHccs*<sup>+/+</sup> hearts (see arrowheads, scale bar = 25 μm, nuclei are stained in blue using DAPI). (E) Bcl-2 is specifically induced in HCCS deficient cardiomyocytes (see arrowheads) of 13.5 dpc *cHccs*<sup>+/+</sup> hearts. HCCS deficient cells are detected based on GFP expression (see Methods) (scale bar = 10 μm, nuclei are stained in blue using DAPI). (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ ).



**Fig. 6.** ARC is not required for survival of HCCS deficient cardiomyocytes in the embryonic heart. (A) Morphologically, hearts of 13.5 dpc *cHccs*<sup>+/+</sup>, *Arc*<sup>-/-</sup> and *cHccs*<sup>-/-</sup>, *Arc*<sup>-/-</sup> embryos are not different compared to *cHccs*<sup>+/+</sup>, *Arc*<sup>-/-</sup> littermates (H&E staining, scale bar = 200  $\mu$ m). (B) TUNEL staining is reduced in 13.5 dpc *cHccs*<sup>+/+</sup>, *Arc*<sup>-/-</sup> and *cHccs*<sup>-/-</sup>, *Arc*<sup>-/-</sup> embryos compared to *cHccs*<sup>+/+</sup>, *Arc*<sup>-/-</sup> hearts ( $n = 3$  per genotype,  $*P < 0.05$  versus *cHccs*<sup>+/+</sup>, *Arc*<sup>-/-</sup>). (C) HCCS deficient cardiomyocytes are readily detectable by immunofluorescence staining in 13.5 dpc *cHccs*<sup>+/+</sup>, *Arc*<sup>-/-</sup> hearts (see arrowheads), and show induction of SOD2 (scale bar = 25  $\mu$ m, nuclei are stained in blue using DAPI). (D) RNA expression of various apoptosis inhibitors is either reduced or unchanged in 13.5 dpc *cHccs*<sup>+/+</sup>, *Arc*<sup>-/-</sup> and *cHccs*<sup>-/-</sup>, *Arc*<sup>-/-</sup> compared to control hearts (qRT-PCR data,  $n = 5$ –6 per genotype,  $*P < 0.05$  versus *cHccs*<sup>+/+</sup>, *Arc*<sup>-/-</sup>). (E) Western blot analyses of apoptosis regulators in 13.5 dpc *Hccs*<sup>+/+</sup> and *cHccs*<sup>+/+</sup> hearts in the presence or absence of ARC (*Arc*<sup>+/+</sup> or *Arc*<sup>-/-</sup>, respectively). (F) Protein levels of apoptosis inhibitors are not altered by the absence of ARC (compare *Hccs*<sup>+/+</sup>, *Arc*<sup>+/+</sup> and *Hccs*<sup>+/+</sup>, *Arc*<sup>-/-</sup>) and also not different in 13.5 dpc *cHccs*<sup>+/+</sup>, *Arc*<sup>-/-</sup> compared to *Hccs*<sup>+/+</sup>, *Arc*<sup>-/-</sup> hearts (densitometric quantification  $n = 3$ ).

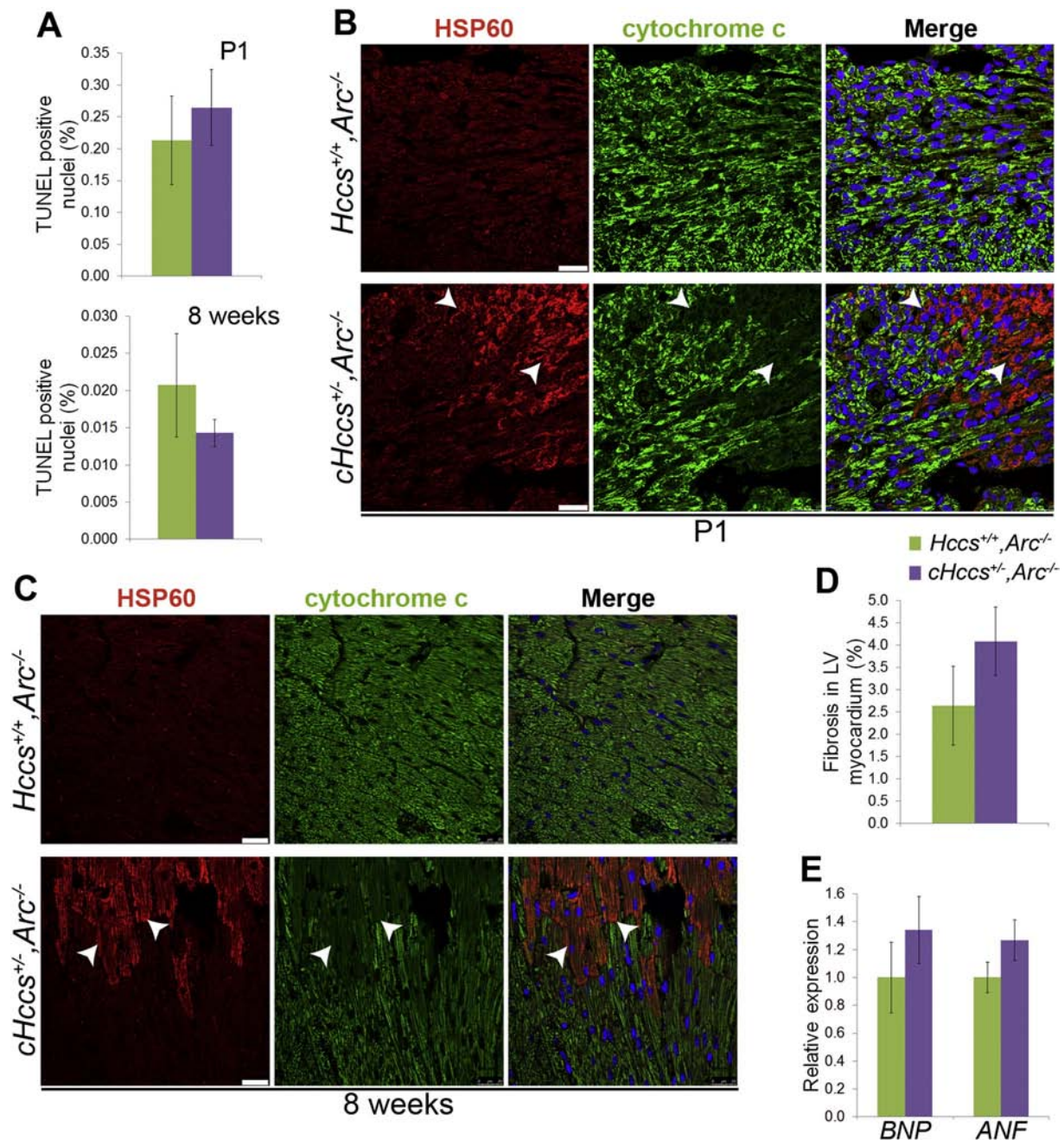
we do not claim to provide a full list of differentially expressed genes in the regenerating *cHccs*<sup>+/+</sup> heart, but further studies will be required to more thoroughly define gene expression changes in the healthy versus HCCS deficient cell population.

Removing the important apoptosis inhibitor ARC from the embryonic *cHccs*<sup>+/+</sup> heart does not result in cell death of HCCS deficient cardiomyocytes. This points to functional redundancy between apoptosis inhibitors, such that other factors might compensate for the loss of ARC. We did not find evidence for induction of other apoptosis inhibitors in *cHccs*<sup>+/+</sup>, *Arc*<sup>-/-</sup> compared to *cHccs*<sup>+/+</sup>, *Arc*<sup>+/+</sup> hearts on the RNA or protein level, but this certainly does not exclude a functional compensation. Additionally, other factors not investigated in this study could play a

role. Similar to ARC, Bcl-2 is induced in HCCS deficient cardiomyocytes, such that it is well possible that Bcl-2 but not ARC fulfills the main anti-apoptotic function. We considered ARC more likely to be essential, given its ability to inhibit extrinsic as well as intrinsic apoptosis, necrosis and attenuate ER stress [32,34,35]. In contrast, Bcl-2 mainly acts as inhibitor of intrinsic apoptosis without appreciable functions within the extrinsic pathway [36]. Bcl-2 has recently emerged as an important regulator of autophagy in the heart by inhibiting Beclin1 mediated autophagosome formation [37], which could be its main function in HCCS deficient cells, given that autophagy is not induced in *cHccs*<sup>+/+</sup> hearts.

An important consideration when assessing survival of HCCS deficient cardiomyocytes in the embryonic heart is their lack of cytochrome





**Fig. 7.** HCCS deficient cardiomyocytes survive in the postnatal heart in the absence of ARC. (A) Apoptosis rates (assessed by TUNEL staining) in the LV myocardium are not different between *cHccs*<sup>+/+</sup>*Arc*<sup>-/-</sup> and *Hccs*<sup>+/+</sup>*Arc*<sup>-/-</sup> females at birth (P1, *n* = 5) or at the age of 8 weeks (*n* = 5). (B) HCCS deficient cardiomyocytes are readily detectable in the LV myocardium of neonatal *cHccs*<sup>+/+</sup>*Arc*<sup>-/-</sup> hearts and identified by strong HSP60 expression (see arrowheads, scale bar = 25  $\mu$ m). (C) HCCS deficient cardiomyocytes (see arrowheads) are identified in the LV myocardium of adult *cHccs*<sup>+/+</sup>*Arc*<sup>-/-</sup> females (scale bar = 25  $\mu$ m, nuclei are stained in blue using TO-PRO-3 in (B) and (C)). (D) At the age of 8 weeks, *cHccs*<sup>+/+</sup>*Arc*<sup>-/-</sup> (*n* = 6) hearts show slightly increased fibrosis within the LV myocardium compared to *cHccs*<sup>+/+</sup>*Arc*<sup>-/-</sup> (*n* = 5) females, although this difference does not reach statistical significance. (E) RNA expression of heart failure marker genes *Nppb* (BNP, brain natriuretic peptide) and *Nppa* (ANF, atrial natriuretic factor) is not different in *Hccs*<sup>+/+</sup>*Arc*<sup>-/-</sup> (*n* = 6) compared to *cHccs*<sup>+/+</sup>*Arc*<sup>-/-</sup> (*n* = 4) adult hearts (qRT-PCR data).

c, a key mediator of mitochondrial apoptosis [23]. Cytochrome c deficient cells are resistant to intrinsic but hypersensitive to extrinsic apoptotic stimuli [38]. Although initial events of extrinsic apoptosis are induced in HCCS deficient cardiomyocytes, cell death is not executed, arguing against a sensitizing role of cytochrome c deficiency in this model. Also, various caspase-independent cell death (CICD) mechanisms have been characterized, which do not depend on cytochrome c release from mitochondria. Therefore, although the lack of cytochrome c might contribute to survival of HCCS deficient cardiomyocytes, given the multitude of protective mechanisms activated in these cells the underlying mechanism is likely to be more complex. Upon other CICD

mechanisms, we excluded release and nuclear translocation of mitochondrial proteins such as AIF and EndoG [24]. This argues against a loss of mitochondrial membrane integrity, as seen upon opening of the mitochondrial membrane transition pore, loss of mitochondrial membrane potential and rupture of the organelle [5]. The latter chain of events can lead to necrotic cell death, which we did not directly investigate in this study. Furthermore, a non-canonical cell death pathway in HCCS deficient cells of the brain and eye depending on caspase 9 activation inside mitochondria has recently been described in fish [39]. We did not find evidence for such a mechanism in the embryonic mouse heart, and consistently, *Hccs* knockdown does not induce apoptosis in

the fish heart [39]. Finally, we have previously shown that HCCS deficient tissue volume is not reduced but stays constant during heart development of *cHccs*<sup>+/-</sup> females [6]. Here we show that HCCS deficient cardiomyocytes are detectable in the adult heart. This clearly indicates that any type of cell death is not executed but HCCS deficient cardiomyocytes are protected during pre- and postnatal life.

HCCS deficient cardiomyocytes appear to be exposed to mild oxidative stress, as indicated by the induction of SOD2 and PRDX3 as well as the oxidation of glutathione in *cHccs*<sup>-/-</sup> male hearts. Carbonylation of proteins, an indication for ROS mediated damage, was not detected, however, suggesting that the antioxidative defense is sufficient to keep ROS at low levels. It has previously been proposed that moderate mitochondrial dysfunction can indeed be cell protective by inducing a range of adaptive mechanisms, similar to those identified in this study [16,18]. Such adaptations to mitochondrial dysfunction mediate life span extension in worms [40], supporting certain beneficial effects. Interestingly, the latter appears to require the intrinsic apoptosis pathway [41]. The protection of metabolically impaired cardiomyocytes in the embryo and fetus might ensure a maximal growth plasticity of the developing heart to respond to endogenous, environmental or maternal conditions. On the other hand, the survival of HCCS deficient cardiomyocytes might come at the expense of maintaining a suboptimal cell population in the heart, which could have consequences for the peri- or postnatal heart by leading to structural defects or increased disease susceptibility in adulthood. In this regard, a subset of *cHccs*<sup>+/-</sup> females develops arrhythmias and cardiomyopathies upon ageing [6]. Apart from maintaining tissue integrity, the survival of HCCS deficient cardiomyocytes might also be directly required for embryonic heart regeneration by signaling to the healthy cell population. Cells harboring defective mitochondria have been shown to secrete soluble factors (referred to as “mitokines”) to signal to neighbouring cells or even distant organs. For example, FGF21 is secreted from various organs in response to mitochondrial dysfunction, including the heart, and can alter systemic metabolism [42,43]. Also, life span expansion in worms can be achieved by disturbing mitochondrial function in a tissue specific manner, thereby inducing a cell-non-autonomous response in distant organs [40]. Finally, defective and dying cells can induce compensatory proliferation in neighbouring healthy cells to restore tissue homeostasis or allow wound healing [44,45]. It is therefore conceivable that HCCS deficient cardiomyocytes fulfill a similar function in embryonic *cHccs*<sup>+/-</sup> hearts.

The fact that death receptors Fas and Eda2r as well as caspase 8 appear to be induced in HCCS deficient cardiomyocytes of the embryonic heart without pro-apoptotic caspase 8 activation raises the question about the purpose of such response. Death receptor signaling can result in various cellular outcomes including apoptosis, necroptosis, NFκB activation and cell survival. Upon ligand binding, several proteins, including pro-caspase 8, are recruited to the cytoplasmic domain of death receptors and subsequent cell fate decisions will depend on intracellular signaling, metabolism and redox status [5], but do not necessarily require pro-apoptotic caspase 8 cleavage [46]. So the lack of caspase 8 activation in HCCS deficient cardiomyocytes does not exclude the initiation of death receptor signaling. Furthermore, apart from its well characterized role as initiator caspase, caspase 8 is essential for embryonic development and serves pro-survival functions by inhibiting RIP1/RIP3 dependent programmed necrosis [47,48], and these two roles appear to be functionally distinct [49]. Nevertheless, both seem to require caspase 8 proteolytic activity, which we found not to be increased in *cHccs*<sup>+/-</sup> hearts. Interestingly, scaffolding but not catalytic functions of caspase 8 mediate certain inflammatory responses [50] and Fas mediated chemokine production of apoptotic cells has been shown to require a complex of pro-caspase 8, FADD and RIP1 independent of caspase 8 proteolytic activity [51]. Such a mechanism could be involved in the secretion of “mitokines” from HCCS deficient cardiomyocytes, as discussed above.

Our data support the notion that embryonic and fetal cardiomyocytes are resistant to various stress stimuli. In contrast, disruption of

mitochondrial function and increased ROS production in the adult heart often causes cell death, as observed upon ischemia/reperfusion injury or doxorubicin induced cardiotoxicity [21,52]. Strikingly, the latter appears to induce different apoptotic mechanisms in immature versus adult cardiomyocytes [53]. Such data support the hypothesis that a protective signaling network in prenatal cardiomyocytes is altered upon maturation and terminal differentiation. Interestingly, we observed sustained induction of HSP60 in HCCS deficient cardiomyocytes of the adult *cHccs*<sup>+/-</sup> heart, suggesting that once programmed during prenatal development, at least certain factors of the protective machinery remain activated during postnatal life. Reactivation of such embryonic stress response in the adult or ageing heart might therefore provide new therapeutic strategies for cardioprotection.

## Disclosures

None.

## Acknowledgements

We thank Anja Conrad, Beatrice Leip, Gabriele Born, Sabine Schmidt and Simon Pyschny for technical assistance and Martin Taube for performing echocardiography measurements. This work was supported by the German Research Foundation (Deutsche Forschungsgemeinschaft, grant number DR 446/3-1).

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.yjmcc.2016.04.007>.

## References

- [1] R.S. Whelan, V. Kaplinskiy, R.N. Kitsis, Cell death in the pathogenesis of heart disease: mechanisms and significance, *Annu. Rev. Physiol.* 72 (2010) 19–44.
- [2] M.A. Laflamme, C.E. Murry, Heart regeneration, *Nature* 473 (2011) 326–335.
- [3] S. Kostin, L. Pool, A. Elsässer, S. Hein, H.C. Drexler, E. Arnon, Y. Hayakawa, R. Zimmermann, E. Bauer, W.P. Klövekorn, J. Schaper, Myocytes die by multiple mechanisms in failing human hearts, *Circ. Res.* 92 (2003) 715–724.
- [4] H. Nakayama, X. Chen, C.P. Baines, R. Klevisky, X. Zhang, H. Zhang, N. Jaleel, B.H. Chua, T.E. Hewett, J. Robbins, S.R. Houser, J.D. Molkentin, Ca<sup>2+</sup>- and mitochondrial-dependent cardiomyocyte necrosis as a primary mediator of heart failure, *J. Clin. Invest.* 117 (2007) 2431–2444.
- [5] G. Kung, K. Konstantinidis, R.N. Kitsis, Programmed necrosis, not apoptosis, in the heart, *Circ. Res.* 108 (2011) 1017–1036.
- [6] J.D. Drenckhahn, Q.P. Schwarz, S. Gray, A. Laskowski, H. Kiriazis, Z. Ming, R.P. Harvey, X.J. Du, D.R. Thorburn, T.C. Cox, Compensatory growth of healthy cardiac cells in the presence of diseased cells restores tissue homeostasis during heart development, *Dev. Cell* 15 (2008) 521–533.
- [7] A.C. Sturzu, K. Rajarajan, D. Passer, K. Plonowska, A. Riley, T.C. Tan, A. Sharma, A.F. Xu, M.C. Engels, R. Feistritz, G. Li, M.K. Seli, R. Geissler, K.D. Robertson, M. Scherrer-Crosbie, I.J. Domian, S.M. Wu, Fetal mammalian heart generates a robust compensatory response to cell loss, *Circulation* 132 (2015) 109–121.
- [8] K.L. Fujimoto, K.C. Clause, L.J. Liu, J.P. Tinney, S. Verma, W.R. Wagner, B.B. Keller, K. Tobita, Engineered fetal cardiac graft preserves its cardiomyocyte proliferation within postinfarcted myocardium and sustains cardiac function, *Tissue Eng. A* 17 (2011) 585–596.
- [9] H. Reinecke, M. Zhang, T. Bartosek, C.E. Murry, Survival, integration, and differentiation of cardiomyocyte grafts: a study in normal and injured rat hearts, *Circulation* 100 (1999) 193–202.
- [10] T. Kubin, J. Pöling, S. Kostin, P. Gajawada, S. Hein, W. Rees, A. Wietelmann, M. Tanaka, H. Lörchner, S. Schimanski, M. Szibor, H. Warnecke, T. Braun, Oncostatin M is a major mediator of cardiomyocyte dedifferentiation and remodeling, *Cell Stem Cell* 9 (2011) 420–432.
- [11] J. Ausma, F. Thoné, G.D. Dispersyn, W. Flameng, J.L. Vanoverschelde, F.C. Ramaekers, M. Borgers, Dedifferentiated cardiomyocytes from chronic hibernating myocardium are ischemia-tolerant, *Mol. Cell. Biochem.* 186 (1998) 159–168.
- [12] G.D. Dispersyn, L. Mesotten, B. Meuris, A. Maes, L. Mortelmans, W. Flameng, F. Ramaekers, M. Borgers, Dissociation of cardiomyocyte apoptosis and dedifferentiation in infarct border zones, *Eur. Heart J.* 23 (2002) 849–857.
- [13] M. Rajabi, C. Kassiotis, P. Razeghi, H. Taegtmeyer, Return to the fetal gene program protects the stressed heart: a strong hypothesis, *Heart Fail. Rev.* 12 (2007) 331–343.
- [14] C. Hetz, The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13 (2012) 89–102.



- [15] J. Gallinetti, E. Harputlugil, J.R. Mitchell, Amino acid sensing in dietary-restriction-mediated longevity: roles of signal-transducing kinases GCN2 and TOR, *Biochem. J.* 449 (2013) 1–10.
- [16] B.M. Baker, A.M. Nargund, T. Sun, C.M. Haynes, Protective coupling of mitochondrial function and protein synthesis via the eIF2 $\alpha$  kinase GCN-2, *PLoS Genet.* 8 (2012), e1002760.
- [17] Q. Zhao, J. Wang, I.V. Levichkin, S. Stasinopoulos, M.T. Ryan, N.J. Hoogenraad, A mitochondrial specific stress response in mammalian cells, *EMBO J.* 21 (2002) 4411–4419.
- [18] M.W. Pellegrino, A.M. Nargund, C.M. Haynes, Signaling the mitochondrial unfolded protein response, *Biochim. Biophys. Acta* 1833 (2013) 410–416.
- [19] J.E. Aldridge, T. Horibe, N.J. Hoogenraad, Discovery of genes activated by the mitochondrial unfolded protein response (mtUPR) and cognate promoter elements, *PLoS ONE* 2 (2007), e874.
- [20] S.C. Kim, J.P. Stice, L. Chen, J.S. Jung, S. Gupta, Y. Wang, G. Baumgarten, J. Trial, A.A. Knowlton, Extracellular heat shock protein 60, cardiac myocytes, and apoptosis, *Circ. Res.* 105 (2009) 1186–1195.
- [21] Y.R. Chen, J.L. Zweier, Cardiac mitochondria and reactive oxygen species generation, *Circ. Res.* 114 (2014) 524–537.
- [22] X.G. Lei, J.H. Zhu, W.H. Cheng, Y. Bao, Y.S. Ho, A.R. Reddi, A. Holmgren, E.S. Amér, Paradoxical roles of antioxidant enzymes: basic mechanisms and health implications, *Physiol. Rev.* 96 (2016) 307–364.
- [23] S.W. Tait, D.R. Green, Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11 (2010) 621–632.
- [24] L.A. Pradelli, M. Bénétteau, J.E. Ricci, Mitochondrial control of caspase-dependent and -independent cell death, *Cell. Mol. Life Sci.* 67 (2010) 1589–1597.
- [25] V.P. van Empel, A.T. Bertrand, R. van der Nagel, S. Kostin, P.A. Doevendans, H.J. Crijns, E. de Wit, W. Sluiter, S.L. Ackerman, L.J. De Windt, Downregulation of apoptosis-inducing factor in harlequin mutant mice sensitizes the myocardium to oxidative stress-related cell death and pressure overload-induced decompensation, *Circ. Res.* 96 (2005) e92–e101.
- [26] T. Zhang, Y. Zhang, M. Cui, L. Jin, Y. Wang, F. Lv, Y. Liu, W. Zheng, H. Shang, J. Zhang, M. Zhang, H. Wu, J. Guo, X. Zhang, X. Hu, C.M. Cao, R.P. Xiao, CaMKII is a RIP3 substrate mediating ischemia- and oxidative stress-induced myocardial necroptosis, *Nat. Med.* 22 (2016) 175–182.
- [27] V. Budhram-Mahadeo, R. Fujita, S. Bitsi, P. Sicard, R. Heads, Co-expression of POU4F2/Brn-3b with p53 may be important for controlling expression of pro-apoptotic genes in cardiomyocytes following ischaemic/hypoxic insults, *Cell Death Dis.* 5 (2014), e1503.
- [28] J.W. Gordon, J.A. Shaw, L.A. Kirshenbaum, Multiple facets of NF- $\kappa$ B in the heart: to be or not to NF- $\kappa$ B, *Circ. Res.* 108 (2011) 1122–1132.
- [29] O. Micheau, S. Lens, O. Gaide, K. Alevizopoulos, J. Tschoep, NF-kappaB signals induce the expression of c-FLIP, *Mol. Cell. Biol.* 21 (2001) 5299–5305.
- [30] G. Mariño, M. Niso-Santano, E.H. Baehrecke, G. Kroemer, Self-consumption: the interplay of autophagy and apoptosis, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15 (2014) 81–94.
- [31] H. Taegtmeyer, S. Sen, D. Vela, Return to the fetal gene program: a suggested metabolic link to gene expression in the heart, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1188 (2010) 191–198.
- [32] Y.J. Nam, K. Mani, A.W. Ashton, C.F. Peng, B. Krishnamurthy, Y. Hayakawa, P. Lee, S.J. Korsmeyer, R.N. Kitsis, Inhibition of both the extrinsic and intrinsic death pathways through nonhomotypic death-fold interactions, *Mol. Cell* 15 (2004) 901–912.
- [33] S. Donath, P. Li, C. Willenbockel, N. Al-Saadi, V. Gross, T. Willnow, M. Bader, U. Martin, J. Bauersachs, K.C. Wollert, R. Dietz, R. von Harsdorf, German Heart Failure Network, Apoptosis repressor with caspase recruitment domain is required for cardioprotection in response to biomechanical and ischemic stress, *Circulation* 113 (2006) 1203–1212.
- [34] W.M. McKimpson, J. Weinberger, L. Czerski, M. Zheng, M.T. Crow, J.E. Pessin, S.C. Chua Jr., R.N. Kitsis, The apoptosis inhibitor ARC alleviates the ER stress response to promote  $\beta$ -cell survival, *Diabetes* 62 (2013) 183–193.
- [35] G. Kung, P. Dai, L. Deng, R.N. Kitsis, A novel role for the apoptosis inhibitor ARC in suppressing TNF $\alpha$ -induced regulated necrosis, *Cell Death Differ.* 21 (2014) 634–644.
- [36] P.E. Czabotar, G. Lessene, A. Strasser, J.M. Adams, Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15 (2014) 49–63.
- [37] Y. Maejima, S. Kyo, P. Zhai, T. Liu, H. Li, A. Ivesa, S. Sciarretta, D.P. Del Re, D.K. Zablocki, C.P. Hsu, D.S. Lim, M. Isobe, J. Sadoshima, Mst1 inhibits autophagy by promoting the interaction between Beclin1 and Bcl-2, *Nat. Med.* 19 (2013) 1478–1488.
- [38] K. Li, Y. Li, J.M. Shelton, J.A. Richardson, E. Spencer, Z.J. Chen, X. Wang, R.S. Williams, Cytochrome c deficiency causes embryonic lethality and attenuates stress-induced apoptosis, *Cell* 101 (2000) 389–399.
- [39] A. Indrieri, I. Conte, G. Chesi, A. Romano, J. Quartararo, R. Tatè, D. Ghezzi, M. Zeviani, P. Goffrini, I. Ferrero, P. Bovolenta, B. Franco, The impairment of HCCS leads to MLS syndrome by activating a non-canonical cell death pathway in the brain and eyes, *EMBO Mol. Med.* 5 (2013) 280–293.
- [40] J. Durieux, S. Wolff, A. Dillin, The cell-non-autonomous nature of electron transport chain-mediated longevity, *Cell* 144 (2011) 79–91.
- [41] C. Yee, W. Yang, S. Hekimi, The intrinsic apoptosis pathway mediates the pro-longevity response to mitochondrial ROS in *C. elegans*, *Cell* 157 (2014) 897–909.
- [42] K.H. Kim, Y.T. Jeong, H. Oh, S.H. Kim, J.M. Cho, Y.N. Kim, S.S. Kim, d.H. Kim, K.Y. Hur, H.K. Kim, T. Ko, J. Han, H.L. Kim, J. Kim, S.H. Back, M. Komatsu, H. Chen, D.C. Chan, M. Konishi, N. Itoh, C.S. Choi, M.S. Lee, Autophagy deficiency leads to protection from obesity and insulin resistance by inducing Fgf21 as a mitokine, *Nat. Med.* 19 (2013) 83–92.
- [43] S.A. Dogan, C. Pujol, P. Maiti, A. Kukut, S. Wang, S. Hermans, K. Senft, R. Wibom, E.I. Rugari, A. Trifunovic, Tissue-specific loss of DARS2 activates stress responses independently of respiratory chain deficiency in the heart, *Cell Metab.* 19 (2014) 458–469.
- [44] T. Nishina, S. Komazawa-Sakon, S. Yanaka, X. Piao, D.M. Zheng, J.H. Piao, Y. Kojima, S. Yamashina, E. Sano, T. Putoczki, T. Doi, T. Ueno, J. Ezaki, H. Ushio, M. Ernst, K. Tsumoto, K. Okumura, H. Nakano, Interleukin-11 links oxidative stress and compensatory proliferation, *Sci. Signal.* (2012) 5:ra5.
- [45] F. Li, Q. Huang, J. Chen, Y. Peng, D.R. Roop, J.S. Bedford, C.Y. Li, Apoptotic cells activate the "phoenix rising" pathway to promote wound healing and tissue regeneration, *Sci. Signal.* (2010) 3:ra13.
- [46] A. Oberst, D.R. Green, It cuts both ways: reconciling the dual roles of caspase 8 in cell death and survival, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12 (11) (Oct 21 2011) 757–763.
- [47] W.J. Kaiser, J.W. Upton, A.B. Long, D. Livingston-Rosanoff, L.P. Daley-Bauer, R. Hakem, T. Caspary, E.S. Mocarski, RIP3 mediates the embryonic lethality of caspase-8-deficient mice, *Nature* 471 (2011) 368–372.
- [48] A. Oberst, C.P. Dillon, R. Weinlich, L.L. McCormick, P. Fitzgerald, C. Pop, R. Hakem, G.S. Salvesen, D.R. Green, Catalytic activity of the caspase-8-FLIP(L) complex inhibits RIPK3-dependent necrosis, *Nature* 471 (2011) 363–367.
- [49] T.B. Kang, G.S. Oh, E. Scandella, B. Bolinger, B. Ludewig, A. Kovalenko, D. Wallach, Mutation of a self-processing site in caspase-8 compromises its apoptotic but not its nonapoptotic functions in bacterial artificial chromosome-transgenic mice, *J. Immunol.* 181 (2008) 2522–2532.
- [50] S. Kang, T. Fernandes-Alnemri, C. Rogers, L. Mayes, Y. Wang, C. Dillon, L. Roback, W. Kaiser, A. Oberst, J. Sagara, K.A. Fitzgerald, D.R. Green, J. Zhang, E.S. Mocarski, E.S. Alnemri, Caspase-8 scaffolding function and MLKL regulate NLRP3 inflammasome activation downstream of TLR3, *Nat. Commun.* 6 (2015) 7515.
- [51] S.P. Cullen, C.M. Henry, C.J. Kearney, S.E. Logue, M. Feoktistova, G.A. Tynan, E.C. Lavelle, M. Leverkus, S.J. Martin, Fas/CD95-induced chemokines can serve as "find-me" signals for apoptotic cells, *Mol. Cell* 49 (2013) 1034–1048.
- [52] F.S. Carvalho, A. Burgeiro, R. Garcia, A.J. Moreno, R.A. Carvalho, P.J. Oliveira, Doxorubicin-induced cardiotoxicity: from bioenergetic failure and cell death to cardiomyopathy, *Med. Res. Rev.* 34 (2014) 106–135.
- [53] E.A. Konorev, S. Vanamala, B. Kalyanaraman, Differences in doxorubicin-induced apoptotic signaling in adult and immature cardiomyocytes, *Free Radic. Biol. Med.* 45 (2008) 1723–1728.



## Data in brief

## Transcriptional profiling of regenerating embryonic mouse hearts

Manuela Magarin<sup>a</sup>, Herbert Schulz<sup>a,b</sup>, Ludwig Thierfelder<sup>a</sup>, Jörg-Detlef Drenckhahn<sup>a,c,\*</sup><sup>a</sup> Max-Delbrück-Center for Molecular Medicine, Berlin, Germany<sup>b</sup> Cologne Center for Genomics, University of Cologne, Cologne, Germany<sup>c</sup> Department of Pediatric Cardiology, University Hospital Münster, Münster, Germany

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 5 August 2016

Accepted 11 August 2016

Available online 12 August 2016

## Keywords:

Heart development

Cardiac regeneration

Cardiomyocyte proliferation

Mitochondrial dysfunction

Cellular stress response

## ABSTRACT

The postnatal mammalian heart is considered a terminally differentiated organ unable to efficiently regenerate after injury. In contrast, we have recently shown a remarkable regenerative capacity of the prenatal heart using myocardial tissue mosaicism for mitochondrial dysfunction in mice. This model is based on inactivation of the X-linked gene encoding holocytochrome c synthase (*Hccs*) specifically in the developing heart. Loss of HCCS activity results in respiratory chain dysfunction, disturbed cardiomyocyte differentiation and reduced cell cycle activity. The *Hccs* gene is subjected to X chromosome inactivation, such that in females heterozygous for the heart conditional *Hccs* knockout approximately 50% of cardiac cells keep the defective X chromosome active and develop mitochondrial dysfunction while the other 50% remain healthy. During heart development the contribution of HCCS deficient cells to the cardiac tissue decreases from 50% at mid-gestation to 10% at birth. This regeneration of the prenatal heart is mediated by increased proliferation of the healthy cardiac cell population, which compensates for the defective cells allowing the formation of a fully functional heart by birth. Here we performed microarray RNA expression analyses on 13.5 dpc control and heterozygous *Hccs* knockout hearts to identify molecular mechanisms that drive embryonic heart regeneration. Array data have been deposited in the Gene Expression Omnibus (GEO) database under accession number [GSE72054](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE72054).

© 2016 Published by Elsevier Inc. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

| Specifications            |                                                                                                                                                                                                                                                            |
|---------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Organism/cell line/tissue | <i>Mus musculus</i> (129Sv/C57Bl6 mixed genetic background)/embryonic hearts (13.5 days post coitum)                                                                                                                                                       |
| Sex                       | female                                                                                                                                                                                                                                                     |
| Sequencer or array type   | Affymetrix GeneChip Mouse Genome 430 2.0 arrays                                                                                                                                                                                                            |
| Data format               | Raw and processed                                                                                                                                                                                                                                          |
| Experimental factors      | Heterozygous heart conditional <i>Hccs</i> (Holocytochrome c synthase) knockout ( <i>cHccs</i> <sup>+/-</sup> ) versus littermate control female embryos                                                                                                   |
| Experimental features     | Total RNA was isolated from whole 13.5 dpc embryonic hearts and processed for hybridization to Affymetrix arrays. 5 biological replicates per genotype (i.e. <i>cHccs</i> <sup>+/-</sup> versus controls) each containing 4–5 pooled hearts were analyzed. |
| Consent                   | Not applicable                                                                                                                                                                                                                                             |
| Sample source location    | Münster, Germany                                                                                                                                                                                                                                           |

## 1. Direct link to deposited data

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE72054>

\* Corresponding author.

E-mail address: [Joerg.Drenckhahn@ukmuenster.de](mailto:Joerg.Drenckhahn@ukmuenster.de) (J.-D. Drenckhahn).

## 2. Experimental design, materials and methods

## 2.1. Experimental design

The prenatal mammalian heart has a remarkable regenerative capacity and can compensate for the presence of diseased cells or cardiomyocyte loss to build fully functional hearts by birth [1,2]. In order to identify molecular mechanisms that drive embryonic heart regeneration, we utilized a genetic mouse model based on inactivation of the X-linked gene encoding holocytochrome c synthase (*Hccs*) in the developing heart [1]. Heterozygous heart conditional *Hccs* knockout female embryos (*cHccs*<sup>+/-</sup>) develop a tissue mosaic of mitochondrial dysfunction at 10.5 dpc, such that the myocardium is composed of 50% healthy and diseased cardiomyocytes, respectively. During heart development the contribution of HCCS deficient cells to the cardiac tissue decreases from 50% at mid-gestation to 10% at birth. This regeneration of the prenatal heart is mediated by increased proliferation of the healthy cardiac cell population, allowing the formation of a fully functional heart at birth. Nevertheless, HCCS deficient cardiomyocytes do not undergo cell death but survive embryonic and fetal development and are still detectable in the postnatal heart. Here we performed microarray RNA expression analyses on 13.5 dpc control and *cHccs*<sup>+/-</sup> hearts. At this developmental stage the most dramatic changes in tissue composition occur in *cHccs*<sup>+/-</sup> ventricular myocardium, as hyperproliferation of

healthy cardiomyocytes is readily detectable while at the same time a substantial contribution of HCCS deficient cells is still present (Fig. 1). This should allow the identification of genes involved in compensatory growth of healthy cells as well as survival of defective cells.

## 2.2. Mice

The generation and characterization of heart conditional *Hccs* knock-out (KO) mice has been described previously [1]. Briefly, “floxed” (fl) *Hccs* mice were bred to mice expressing Cre recombinase under the control of the *Nkx2.5* promoter. All mice were maintained on a mixed 129Sv/C57Bl6 genetic background and all embryo experiments were performed on heterozygous *Hccs* KO females (*Hccs*<sup>fl/+</sup>/*Nkx2.5*Cre, referred to as *cHccs*<sup>+/-</sup>) and their respective Cre positive female littermate controls (*Hccs*<sup>+/+</sup>/*Nkx2.5*Cre, referred to as *Hccs*<sup>+/+</sup>).

## 2.3. Preparation of embryonic hearts

For embryo generation females were mated to the respective males and checked for vaginal plug the next morning. The day of an observed plug was defined as 0.5 dpc and embryos were prepared at 13.5 dpc. Dams were sacrificed by cervical dislocation and embryos were quickly dissected from the uterus into cold PBS. Whole hearts (including ventricles, atria and parts of the outflow tract) were removed from the thoracic cavity, rinsed in cold PBS to wash out blood and snap frozen in liquid nitrogen. Tail tissue was used for DNA preparation and PCR genotyping [1].

## 2.4. RNA isolation

Given the small size of 13.5 dpc mouse hearts, to purify sufficient RNA amounts suitable for microarray analyses an average of 4 to 5 hearts of the same genotype were pooled. This procedure furthermore accounts for interindividual as well as environmental or maternal differences during pregnancy. RNA was purified using the RNeasy Mini Kit (Qiagen). The tissue was homogenized in RLT buffer supplemented with  $\beta$ -mercaptoethanol using a micropestle. Total RNA was isolated

via spin columns according to the manufacturer's instructions, including digestion of genomic DNA on the column using the RNase-Free DNase Set (Qiagen). RNA purity and quality was tested using spectrophotometric parameters and a Bioanalyzer (Agilent), respectively. All samples used for subsequent microarray analyses had RNA integrity numbers (RIN) of  $\geq 8.8$ .

## 2.5. Microarray RNA expression analyses

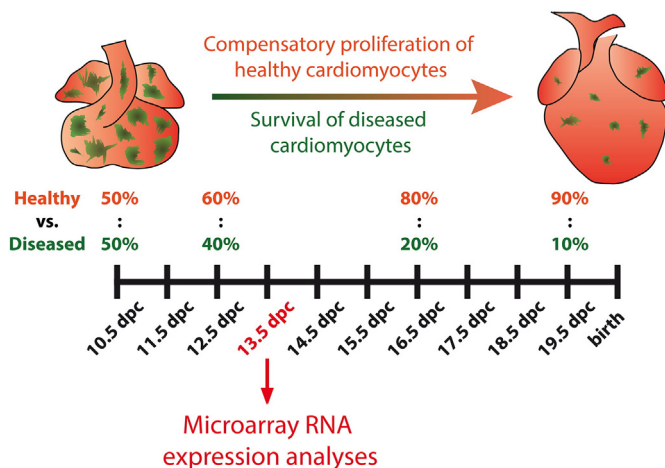
For microarray expression analyses a total of 10 Affymetrix GeneChip Mouse Genome 430 2.0 arrays were used. Five pooled samples per genotype (i.e. *cHccs*<sup>+/-</sup> and control female embryos) were analyzed. cDNA synthesis was performed using Live Technologies SuperScript® One-Cycle cDNA Kit followed by in vitro transcription using the MEGAScript T7 Kit. After fragmenting of the cRNA for target preparation using the standard Affymetrix protocol, 15  $\mu$ g fragmented cRNA was hybridized for 16 h at 45 °C to the Mouse Genome 430 array. Arrays were washed and stained with streptavidin-phycoerythrin in the Affymetrix Fluidics Station 450 following standard procedures and further scanned using the Affymetrix GeneChip Scanner 3000 7G.

## 2.6. Data processing and analysis

Arrays have been quantile-normalized using the RMA algorithm. RMA normalization was performed using Partek Genomic Suite version 6.3, RMA background correction, quantile normalization and median polish probeset summarization. Not or low expressed transcripts were removed by a ( $\log_2$ ) maximum expression cutoff  $< 6$ . The data filtering resulted in 18,571 of 45,101 probe sets. After normalization the arrays were checked for outlier using the principal component analysis (PCA), a correlation dispersion matrix and normalized Eigenvector scaling. No outlier has been detected. Differential expression was ascertained using t-statistic followed by a FDR multiple testing correction [3]. Probes which undergo 5% FDR were further investigated by functional enrichment using g:Profiler [4], with a simulation based analytical threshold for significance estimation.

## 3. Discussion

The microarray RNA expression analyses described above revealed 437 genes differentially expressed in 13.5 dpc *cHccs*<sup>+/-</sup> compared to control hearts, the majority of which are involved in protein and amino acid metabolism, unfolded protein response (UPR), translational control, cellular stress response and cell death regulation (for details see (5)). Most of the genes and pathways regulating cell stress, UPR and apoptosis could be assigned to HCCS deficient cardiomyocytes, which likely contributes to their survival within the myocardium [5]. In contrast, the transcriptional signature of the healthy cardiomyocyte population is less clear. In this regard it is important to note that we used whole 13.5 dpc *cHccs*<sup>+/-</sup> hearts containing a tissue mosaic of healthy and HCCS deficient cardiomyocytes for microarray analyses. Subtle changes in one of the two cell populations are easily missed if not sufficient to alter expression levels in RNA samples isolated from whole hearts. Although the cellular response to mitochondrial dysfunction in the diseased cardiomyocyte population is the dominating outcome of our analyses, the microarray data is likely to also contain genes specifically regulated in the healthy cardiomyocyte population. Identification of the latter would be most relevant for cardiomyocyte cell cycle regulation and cardiac regeneration. Consequently, we do not claim to provide a full list of differentially expressed genes in the regenerating *cHccs*<sup>+/-</sup> heart [5], but future studies using laser microdissection or fluorescence activated cell sorting (FACS) will be required to separate the two cell populations. This would allow to more thoroughly define gene expression changes specific for healthy and HCCS deficient cardiomyocytes, respectively.



**Fig. 1.** Regeneration of the embryonic heart in *cHccs*<sup>+/-</sup> female mice. The prenatal *cHccs*<sup>+/-</sup> heart is composed of healthy (depicted in red) and diseased (i.e. HCCS deficient) cardiomyocytes harboring a defect in the mitochondrial respiratory chain (depicted in green). At mid-gestation (i.e. 10.5 dpc) a 50:50 ratio of healthy versus diseased cells is observed in the myocardium, whereas the contribution of diseased tissue progressively declines to just 10% prior to birth. This embryonic heart regeneration is mediated by increased proliferation of healthy cardiomyocytes, which compensate for the defective cells to build a fully functional heart by birth. Nevertheless, HCCS deficient cells survive fetal development and are still detectable in the postnatal heart. Transcriptional profiling of regenerating *cHccs*<sup>+/-</sup> hearts has been performed at 13.5 dpc.

## Acknowledgments

This work was supported by the German Research Foundation (Deutsche Forschungsgemeinschaft, grant number DR 446/3-1). We thank Sabine Schmidt and Gabriele Born for technical assistance with microarray hybridization procedures.

## References

- [1] J.D. Drenckhahn, Q.P. Schwarz, S. Gray, A. Laskowski, H. Kiriazis, Z. Ming, R.P. Harvey, X.J. Du, D.R. Thorburn, T.C. Cox, Compensatory growth of healthy cardiac cells in the presence of diseased cells restores tissue homeostasis during heart development. *Dev. Cell.* 15 (2008) 521–533.
- [2] A.C. Sturzu, K. Rajarajan, D. Passer, K. Plonowska, A. Riley, T.C. Tan, A. Sharma, A.F. Xu, M.C. Engels, R. Feistritz, G. Li, M.K. Selig, R. Geissler, K.D. Robertson, M. Scherrer-Crosbie, I.J. Domian, S.M. Wu, Fetal mammalian heart generates a robust compensatory response to cell loss. *Circulation.* 132 (2015) 109–121.
- [3] Y. Benjamini, Y. Hochberg, Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J. R. Stat. Soc. B* 57 (1995) 289–300.
- [4] J. Reimand, M. Kull, H. Peterson, J. Hansen, J. Vilo, g:profiler—a web-based toolset for functional profiling of gene lists from large-scale experiments. *Nucleic Acids Res.* 35 (Web Server issue) (2007) W193–W200.
- [5] M. Magarin, T. Pohl, A. Lill, H. Schulz, F. Blaschke, A. Heuser, L. Thierfelder, S. Donath, J.D. Drenckhahn, Embryonic cardiomyocytes can orchestrate various cell protective mechanisms to survive mitochondrial stress. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 97 (2016) 1–14.

#### 4.3. Die Folgen einer kardialen Hypoplasie bei der Geburt auf das Wachstum und die Stress-Anfälligkeit des adulten Maus-Herzens

Mit Hilfe des herzspezifischen *Hccs*-Knockouts konnte die Regenerationsfähigkeit des embryonalen und fetalen Herzens erstmals im Mausmodell demonstriert werden (siehe Kapitel 4.1.). Allerdings scheint es trotz dieser erstaunlichen Wachstumsplastizität schwer vorstellbar, dass die Entwicklung des Herzens aus nur der Hälfte der ursprünglich dafür vorgesehenen Zellen ohne Folgen bei der Geburt oder im Erwachsenenalter bleibt. Wie bereits in Kapitel 4.1. erläutert, entwickeln 15% der *cHccs*<sup>+/-</sup> Mäuse im fortgeschrittenen Alter Kardiomyopathien und Arrhythmien, was zumindest in einem Teil der Tiere auf eine erhöhte Krankheitsanfälligkeit hindeutet. Um eine mögliche Grundlage hierfür zu identifizieren, wurden die Herzen von *cHccs*<sup>+/-</sup> Mäusen direkt nach der Geburt und im frühen Erwachsenenalter (12 Wochen) auf ihre Morphologie, Gewebezusammensetzung und Funktion hin untersucht. Darüber hinaus wurden adulte *cHccs*<sup>+/-</sup> Herzen einer experimentell induzierten Belastung ausgesetzt, um ihre Stresstoleranz unter pathologischen Bedingungen zu überprüfen.

Es zeigte sich, dass die Herzen von *cHccs*<sup>+/-</sup> Mäusen bei der Geburt im Vergleich zu Wildtyp-Wurfgeschwistern ein geringeres Gewicht aufweisen (sowohl absolut als auch normalisiert auf das Körpergewicht). Morphologisch fällt dabei in der Histologie vor allem eine reduzierte Wanddicke des linken Ventrikels auf. Die verringerte Herzgröße ist durch eine deutlich reduzierte Kardiomyozytenzahl in neugeborenen *cHccs*<sup>+/-</sup> Mäusen im Vergleich zu Kontrollen bedingt, während die Größe der Zellen unverändert ist. Interessanterweise haben die neugeborenen *cHccs*<sup>+/-</sup> Mäusen trotz der verringerten Organgröße in der Echokardiographie eine normale Herzfunktion mit adäquatem Herzminutenvolumen und normaler Kontraktilität. Diese Daten verdeutlichen, dass die embryonale Herzregeneration in diesem Mausmodell zwar bis zur Geburt ein funktionsfähiges Organ, nicht aber eine adäquate Kardiomyozytenzahl und damit eine normale myokardiale Masse aufbauen kann. *cHccs*<sup>+/-</sup> Herzen sind bei der Geburt demnach hypoplastisch. Interessanterweise normalisieren sich das Herzgewicht und die Morphologie der Ventrikel bis ins junge Erwachsenenalter bedingt durch eine überproportionale Größenzunahme der Kardiomyozyten während des postnatalen Wachstums. Diese Daten deuten darauf hin, dass das bei der Geburt hypoplastische Herz im postnatalen Verlauf durch eine kompensatorische Hypertrophie der Kardiomyozyten, vermutlich jedoch nicht durch eine Normalisierung der Zellzahl, eine normale Organgröße etablieren kann. Mit dem Akt/FoxO3a-Signalweg konnten wir darüber hinaus einen möglichen molekularen Mechanismus identifizieren, der an der kompensatorischen Hypertrophie der Kardiomyozyten im adulten *cHccs*<sup>+/-</sup> Herzen beteiligt sein könnte.

Echokardiographisch zeigen adulte *cHccs*<sup>+/-</sup> Mäusen unter Basal-Bedingungen eine normale Morphologie und Funktion des Herzens. Um ihre Stress-Anfälligkeit zu testen, wurde den Tieren eine osmotische Minipumpe subkutan implantiert, über die für einen Zeitraum von 14 Tagen Angiotensin II (Ang II) appliziert wurde. Dies führt zum einen über eine direkte Wirkung an den Kardiomyozyten und zum anderen über einen Blutdruckanstieg und damit eine Erhöhung der kardialen Nachlast zu einer chronischen Druckbelastung des Herzens. Nach 14-tägiger Ang II Gabe zeigten *cHccs*<sup>+/-</sup> Mäuse echokardiographisch ähnliche Parameter der Herzfunktion und Kontraktilität wie Ang II behandelte Kontrollen. Allerdings entwickelten sie eine überschießende Hypertrophie, die sich in einer im Vergleich zu Kontrollen deutlichen Erhöhung der linksventrikulären Masse, der Wanddicke und der Kardiomyozytengröße äußerte. Diese überproportionale Hypertrophie ist dabei transient, da sie nach einer 4-wöchigen Ang II Behandlung in *cHccs*<sup>+/-</sup> Mäuse zumindest teilweise reversibel ist und sich dem Level der Kontrolltiere annähert.

Auf molekularer Ebene konnten wir Veränderungen im JAK/STAT3 und p38 MAP-Kinase Signalweg im Herzen von Ang II behandelten *cHccs*<sup>+/-</sup> Mäuse im Vergleich zu Kontrollen nachweisen. In der Tat ist die überschießende Hypertrophie der *cHccs*<sup>+/-</sup> Herzen STAT3 abhängig, da sie bei einer 14-tägigen Ang II Infusion bei gleichzeitiger Behandlung der Mäuse mit einem pharmakologischen Inhibitor des JAK/STAT-Signalwegs unterdrückt wird, was zu einer Einschränkung der Herzfunktion im Vergleich zu gleichartig behandelten Kontrollen führt. Interessanterweise beeinflusst die Inhibierung des JAK/STAT-Signalwegs in Ang II gestressten Kontroll-Tieren vor allem die Bildung von myokardialer Fibrose, während sie in *cHccs*<sup>+/-</sup> Herzen die überproportionale Hypertrophie der Kardiomyozyten unterdrückt. Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass die embryonale Herzregeneration in *cHccs*<sup>+/-</sup> Mäuse zu hypoplastischen Herzen bei der Geburt führt, deren Größe sich bis ins Erwachsenenalter durch eine kompensatorische Hypertrophie der Kardiomyozyten normalisiert. Dennoch zeigen diese Herzen unter kardialer Belastung auf molekularer, zellulärer, morphologischer und funktioneller Ebene eine deutlich veränderte Stressantwort und ein verändertes Wachstum im Vergleich zu Kontrollen.

In einer zweiten Studie wurde bei adulten *cHccs*<sup>+/-</sup> Mäusen eine Verengung der abdominalen Aorta auf 50% ihres Durchmessers über einen Zeitraum von 4 Wochen durchgeführt, ein weiteres kardiales Stressmodell, das zu einer Druckbelastung und damit einer Erhöhung der linksventrikulären Nachlast führt. Hier zeigten sich in Kontrolltieren die erwarteten stressbedingten Veränderungen am Herzen in Form einer leichten Dilatation und einer Abnahme der Kontraktilität des linken Ventrikels. Im Gegensatz dazu entwickeln *cHccs*<sup>+/-</sup> Mäusen keinerlei Zeichen einer beginnenden Herzinsuffizienz. Vier Wochen nach dem Eingriff haben sie dickere Wände und einen geringeren Durchmesser des linken Ventrikels sowie eine deutlich bessere Kontraktilität im Vergleich zu Kontroll-Tieren. Auf histologischer Ebene geht dies mit Unterschieden der Kardiomyozytengröße einher: während diese in Kontrolltieren im Verlaufe der Belastung deutlich ansteigt, ist die Hypertrophie der Kardiomyozyten in *cHccs*<sup>+/-</sup> Mäusen weniger prominent. Gleichzeitig gibt es keinen Unterschied im stressbedingten Anstieg der myokardialen Fibrose zwischen den Gruppen. Auf molekularer Ebene konnte, im Gegensatz zum oben beschriebenen Ang II Modell, keine Aktivierung des JAK/STAT3-Signalwegs in den *cHccs*<sup>+/-</sup> Herzen nachgewiesen werden. Zusammenfassend scheint die kardiale Hypoplasie bei der Geburt im *cHccs*<sup>+/-</sup> Mausmodell die Anfälligkeit des adulten Herzens gegenüber Belastung nicht zu erhöhen. Im Gegenteil führen die veränderten zellulären Wachstumsverhältnisse und die Anpassung der molekularen Stressantwort zu einem vollständigen Erhalt der Morphologie und Kontraktilität des *cHccs*<sup>+/-</sup> Herzens. Dies führt unter Aorten-Banding am Ende zu einer besseren Pumpfunktion im Vergleich zu Kontrollen, die eine beginnende Herzinsuffizienz entwickeln.

#### **Veröffentlichungen zu den dargestellten Arbeiten:**

Drenckhahn JD, Strasen J, Heinecke K, Langner P, Yin KV, Skole F, Hennig M, Spallek B, Fischer R, Blaschke F, Heuser A, Cox TC, Black MJ, Thierfelder L. Impaired myocardial development resulting in neonatal cardiac hypoplasia alters postnatal growth and stress response in the heart. *Cardiovasc Res.* 2015;106:43-54.

Heinecke K, Heuser A, Blaschke F, Jux C, Thierfelder L, Drenckhahn JD. Preserved heart function after left ventricular pressure overload in adult mice subjected to neonatal cardiac hypoplasia. *J Dev Orig Health Dis.* 2018;9:112-124.



# Impaired myocardial development resulting in neonatal cardiac hypoplasia alters postnatal growth and stress response in the heart

Jörg-Detlef Drenckhahn<sup>1\*†</sup>, Jette Strasen<sup>1</sup>, Kirsten Heinecke<sup>1</sup>, Patrick Langner<sup>1</sup>, Kom Voy Yin<sup>2</sup>, Friederike Skole<sup>1</sup>, Maria Hennig<sup>1</sup>, Bastian Spallek<sup>3</sup>, Robert Fischer<sup>3</sup>, Florian Blaschke<sup>1,4</sup>, Arnd Heuser<sup>1</sup>, Timothy C. Cox<sup>2,5,6</sup>, Mary Jane Black<sup>2</sup>, and Ludwig Thierfelder<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Max-Delbrück-Center for Molecular Medicine, Robert-Rössle-Straße 10, Berlin 13125, Germany; <sup>2</sup>Department of Anatomy and Developmental Biology, Monash University, Melbourne, Australia; <sup>3</sup>Experimental and Clinical Research Center, Charité Medical Faculty, Max-Delbrück-Center for Molecular Medicine, Berlin, Germany; <sup>4</sup>Charité Universitätsmedizin Berlin, Medizinische Klinik mit Schwerpunkt Kardiologie, Berlin, Germany; <sup>5</sup>Department of Pediatrics, University of Washington, Seattle, USA; and <sup>6</sup>Center of Developmental Biology and Regenerative Medicine, Seattle Children's Research Institute, Seattle, USA

Received 20 November 2014; revised 21 January 2015; accepted 30 January 2015; online publish-ahead-of-print 6 February 2015

Time for primary review: 47 days

## Aims

Foetal growth has been proposed to influence cardiovascular health in adulthood, a process referred to as foetal programming. Indeed, intrauterine growth restriction in animal models alters heart size and cardiomyocyte number in the perinatal period, yet the consequences for the adult or challenged heart are largely unknown. The aim of this study was to elucidate postnatal myocardial growth pattern, left ventricular function, and stress response in the adult heart after neonatal cardiac hypoplasia in mice.

## Methods and results

Utilizing a new mouse model of impaired cardiac development leading to fully functional but hypoplastic hearts at birth, we show that myocardial mass is normalized until early adulthood by accelerated physiological cardiomyocyte hypertrophy. Compensatory hypertrophy, however, cannot be maintained upon ageing, resulting in reduced organ size without maladaptive myocardial remodelling. Angiotensin II stress revealed aberrant cardiomyocyte growth kinetics in adult hearts after neonatal hypoplasia compared with normally developed controls, characterized by reversible overshooting hypertrophy. This exaggerated growth mainly depends on STAT3, whose inhibition during angiotensin II treatment reduces left ventricular mass in both groups but causes contractile dysfunction in developmentally impaired hearts only. Whereas JAK/STAT3 inhibition reduces cardiomyocyte cross-sectional area in the latter, it prevents fibrosis in control hearts, indicating fundamentally different mechanisms of action.

## Conclusion

Impaired prenatal development leading to neonatal cardiac hypoplasia alters postnatal cardiac growth and stress response *in vivo*, thereby linking foetal programming to organ size control in the heart.

## Keywords

Cardiac growth • Fetal programming • Hypertrophy

## 1. Introduction

The intrauterine environment is believed to significantly impact postnatal health in humans.<sup>1,2</sup> According to this concept, unfavourable intrauterine growth conditions induce permanent physiological adaptations in the foetus.<sup>3</sup> This developmental or foetal programming is thought to increase disease susceptibility in adulthood such that the impact of

lifestyle-related risk factors would ultimately result in clinical manifestation. Cardiovascular disease was among the first conditions proposed to be influenced by intrauterine growth.<sup>4</sup> To identify cellular and molecular mechanisms causing developmental programming, intrauterine growth restriction (IUGR) is the most commonly used animal model. Indeed, IUGR changes cardiomyocyte proliferation, number, size, and differentiation in the perinatal heart.<sup>5–10</sup> Importantly, adverse

\* Corresponding author. Tel: +49 30 9406 3319; fax: +49 30 94063233, Email: drenckhahn@mdc-berlin.de

† Present address. Department of Pediatric Cardiology, University Hospital Muenster, Muenster, Germany.

consequences for cardiac morphology, tissue composition, as well as function and stress resistance have been proposed in the adult heart after IUGR, supporting the basic concept of developmental programming.<sup>11,12</sup>

A low-protein diet fed to female rats throughout pregnancy results in lower heart weights caused by a reduction in cardiomyocyte number at birth compared with pups on a normal protein diet.<sup>13</sup> These differences were no longer evident at weaning, suggesting postnatal compensatory cardiac growth.<sup>14</sup> Importantly, prenatal protein restriction leads to myocardial fibrosis in adulthood associated with diastolic dysfunction and impaired recovery after ischaemia.<sup>15,16</sup> Similarly, placental insufficiency in rats results in reduced heart weight and cardiomyocyte number at birth, which can be restored if postnatal nutrition is normalized.<sup>17</sup> These studies demonstrate that postnatal restoration of cardiac organ size occurs after IUGR, although the underlying cellular mechanism (i.e. proliferative or hypertrophic growth) is poorly understood. Moreover, accelerated postnatal growth after IUGR ('catch-up growth') has been proposed to contribute to increased disease susceptibility in adulthood rather than being beneficial.<sup>18–20</sup> Indeed, recuperated rats after prenatal protein restriction show signs of altered stress response in the heart.<sup>21</sup> Thus, the intrauterine environment impacts on the postnatal heart, but how impaired prenatal development influences postnatal cardiac growth, organ size, and stress response thereby ultimately regulating disease susceptibility is largely unknown.

We have recently shown a remarkable regenerative capacity of the prenatal heart using a genetic model of mosaic mitochondrial dysfunction in mice.<sup>22</sup> This model is based on inactivation of the X-linked gene encoding holocytochrome c synthase (*Hccs*) specifically in the developing heart. Loss of *HCCS* activity results in respiratory chain dysfunction, disturbed cardiomyocyte differentiation, and reduced cell cycle activity.<sup>22</sup> The *Hccs* gene is subject to X chromosome inactivation, such that in females heterozygous for the cardiac *Hccs* knockout (hereafter referred to as *cHccs*<sup>+/-</sup>), ~50% of cardiomyocytes keep the defective X chromosome active and develop mitochondrial dysfunction while the other 50% remain healthy. During heart development, however, the contribution of *HCCS*-deficient cells to the cardiac tissue decreases from 50% at mid-gestation to 10% at birth. This regeneration of the prenatal heart is mediated by increased proliferation of the healthy cardiac cell population and allows *cHccs*<sup>+/-</sup> females to survive to adulthood.<sup>22</sup>

We reasoned, however, that formation of the heart from a tissue mosaic of normal and defective embryonic cardiomyocytes might have consequences for postnatal life. Indeed, here we provide new insights into cardiac organ size control and stress response after impaired prenatal development and identify potential targets of foetal programming in the heart.

## 2. Methods

### 2.1 Heart conditional *Hccs* knockout (KO) mice

The generation and characterization of heart conditional *Hccs* knockout mice have been described previously.<sup>22</sup> Further details are available in Supplementary material online.

### 2.2 Evaluation of cardiomyocyte cross-sectional area and number

To determine cardiomyocyte cross-sectional area (CSA), paraffin sections were stained with fluorescence-conjugated wheat germ agglutinin (WGA Alexa Fluor 488 or 555, Invitrogen) to visualize cell membranes while

nuclei were stained with DAPI (Invitrogen). Subendocardial areas of the left ventricle from two non-adjacent sections per heart were imaged at  $\times 40$  magnification using fluorescence microscopy (Keyence BZ-8100E). For each heart, 200 circular or symmetrically shaped cardiomyocytes with visible nuclei were selected to measure their CSA (using Keyence BZ image analysis software), and the mean was calculated for each heart. Cardiomyocyte CSA in neonatal hearts was determined using confocal microscopy (Leica SPE) and ImageJ software.

The total number of cardiomyocyte nuclei in neonatal hearts was determined using an optical disector–fractionator stereological approach as previously described.<sup>13,17</sup>

### 2.3 Echocardiography measurements

Echocardiography was performed using a VisualSonics Vevo 2100 high-frequency ultrasound system. Measurements on neonates were performed on awake pups while adult mice were anaesthetized by 2% Isoflurane. Body temperature was kept constant at 37°C using a heat lamp and a rectal temperature probe.

Investigators performing echocardiography were blinded for mouse genotypes and treatment groups during data acquisition and analysis. All animal procedures were performed following institutional guidelines and had previously been approved by the responsible authorities ('Landesamt für Gesundheit und Soziales' (LaGeSo) Berlin).

### 2.4 Angiotensin II infusion and JAK/STAT inhibitor treatment

Angiotensin II (Calbiochem) was dissolved in saline (supplemented with 0.01 N acetic acid) and administered to 10-week-old mice at a dose of 1.44 mg per kg body weight per day via osmotic minipumps (Alzet), while control animals received pumps containing saline only. Loaded pumps were subcutaneously implanted on the back of anaesthetized (2% Isoflurane inhalation) mice through a mid-scapular incision that was subsequently closed. During 2 weeks of Ang II treatment (using Alzet model 1002), echocardiography was performed at baseline as well as after 1 and 2 weeks while ECG was recorded at baseline and after 2 weeks. During 4 weeks of Ang II treatment (using Alzet model 2002), echocardiography was performed at baseline as well as after 2 and 4 weeks. To inhibit JAK/STAT signalling during 2 weeks of Ang II treatment, mice received the JAK2 inhibitor AG490 (500 µg per mouse per day, Calbiochem) dissolved in vehicle (50:50% DMSO/saline) while controls received vehicle only. AG490 treatment by daily subcutaneous injections was initiated 5 days after pump implantation for the remaining 10 days.

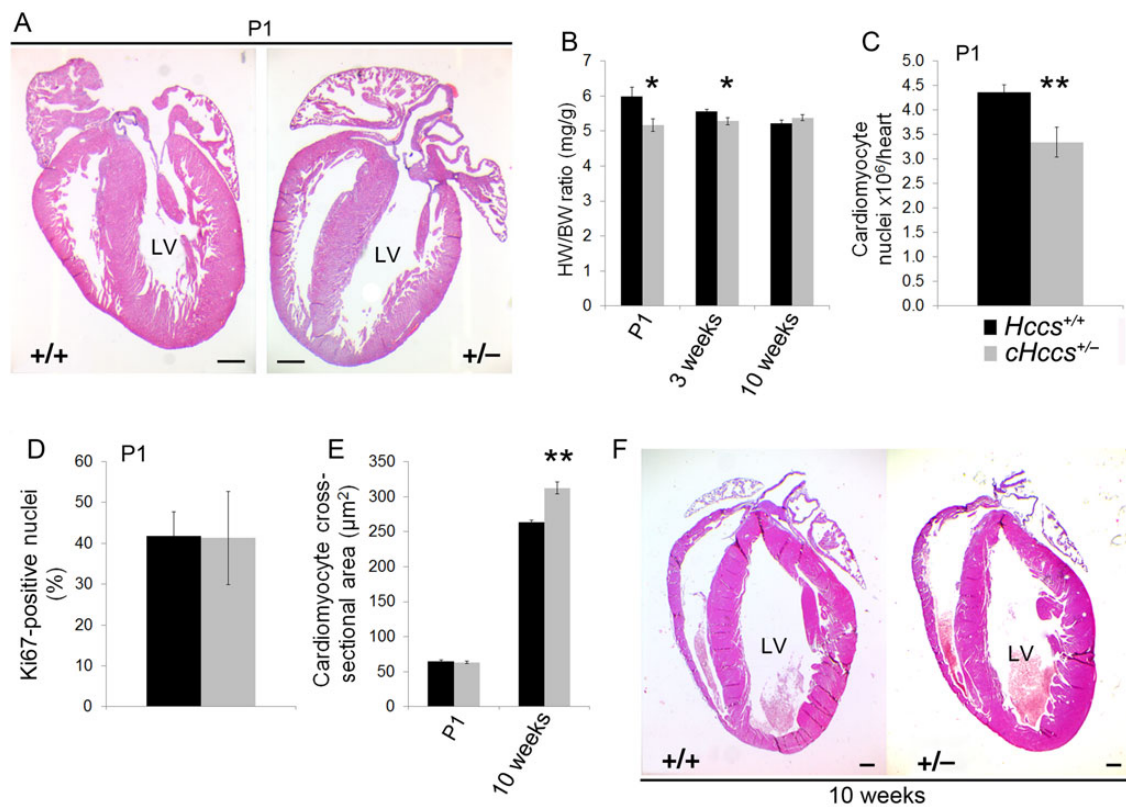
### 2.5 Statistical analyses

Differences between two groups were analysed using unpaired, two-tailed Student's *t*-test. Differences between multiple groups were determined using one-way ANOVA followed by Bonferroni's *post hoc* test. Echocardiography and ECG data from the same groups of animals at different time points were analysed using two-way ANOVA for repeated measures. All data are presented as mean  $\pm$  SEM. A probability value of  $P < 0.05$  was considered to indicate statistical significance (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ ).

## 3. Results

### 3.1 Embryonic heart regeneration results in functional but hypoplastic hearts at birth

Investigating the immediate consequences of embryonic heart regeneration revealed that *cHccs*<sup>+/-</sup> females on postnatal day 1 (P1) exhibit thinning of the left ventricular (LV) wall (Figure 1A) and a reduced heart weight to body weight (HW/BW) ratio (Figure 1B) compared with littermate controls, indicating that the ventricular myocardium is hypoplastic in these animals. Indeed, neonatal *cHccs*<sup>+/-</sup> hearts contain a significantly



**Figure 1** Postnatal normalization of heart size in *cHccs*<sup>+/-</sup> females. (A) Reduced LV wall thickness in neonatal (P1) *cHccs*<sup>+/-</sup> hearts compared with controls. (B) Reduced HW/BW ratio in neonatal ( $n = 8$  per group) and 3-week-old (*Hccs*<sup>+/+</sup>  $n = 13$ , *cHccs*<sup>+/-</sup>  $n = 11$ ) *cHccs*<sup>+/-</sup> females completely normalizes until adulthood (*Hccs*<sup>+/+</sup>  $n = 14$ , *cHccs*<sup>+/-</sup>  $n = 12$ ). (C) Reduced number of cardiomyocyte nuclei in neonatal *cHccs*<sup>+/-</sup> hearts compared with controls ( $n = 8$  per group). (D) The number of Ki67-positive cells in the neonatal LV myocardium is not different between *cHccs*<sup>+/-</sup> and control females ( $n = 5$  per group). (E) Whereas cardiomyocyte CSA is not different between genotypes at birth, it is increased in *cHccs*<sup>+/-</sup> hearts compared with controls at the age of 10 weeks ( $n = 5$  per group). (F) Normal overall morphology and LV wall thickness in 10-week-old *cHccs*<sup>+/-</sup> females compared with controls. (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , scale bar = 300  $\mu\text{m}$  in A and F).

reduced number of cardiomyocyte nuclei compared with controls (Figure 1C), whereas proliferation rates (Figure 1D and see Supplementary material online, Figure S1A–C) and CSA (Figure 1E) were not different between the groups. We had previously shown that apoptosis is not increased in embryonic *cHccs*<sup>+/-</sup> hearts,<sup>22</sup> and TUNEL staining in neonates (see Supplementary material online, Figure S1D) confirmed that increased cell death does not contribute to cardiac hypoplasia in *cHccs*<sup>+/-</sup> females.

IUGR has been reported to alter cardiomyocyte maturation within the perinatal period.<sup>7–10</sup> In rodents, terminal differentiation occurs shortly after birth, resulting in binucleation of the majority of postnatal cardiomyocytes.<sup>23</sup> In neonatal *cHccs*<sup>+/-</sup> and control hearts, however, all cardiomyocytes were mononucleated (data not shown), excluding a premature transition to postnatal growth pattern. Also, these data allow the conclusion that nuclear number equals cell number (Figure 1C). To investigate whether hypoplasia in newborn *cHccs*<sup>+/-</sup> hearts alters cardiac function, we performed echocardiography. Surprisingly, LV contractility was normal compared with littermate controls (see Supplementary material online, Table S1). We therefore conclude that embryonic heart regeneration results in cardiac hypoplasia at birth, which is not compensated by increased cell size or proliferation but still allows normal cardiac function in *cHccs*<sup>+/-</sup> neonates.

### 3.2 Left ventricular mass normalizes in *cHccs*<sup>+/-</sup> females until early adulthood

We next studied the consequences of myocardial hypoplasia for postnatal development of *cHccs*<sup>+/-</sup> hearts. In mice, cardiomyocytes withdraw from the cell cycle within the first week of life,<sup>23</sup> such that postnatal proliferative growth could serve to restore cell number and normalize heart size in *cHccs*<sup>+/-</sup> females. Detection of mitotic cells by phospho-histone H3 immunostaining (see Supplementary material online, Figure S2A), however, did not reveal any difference in overall or cardiomyocyte proliferation between genotypes at P4 (see Supplementary material online, Figure S2B). To evaluate whether the proliferative period is extended in *cHccs*<sup>+/-</sup> females, we investigated their hearts at P10. At this age, *cHccs*<sup>+/-</sup> hearts are still considerably smaller compared with littermate controls (see Supplementary material online, Figure S2C). Importantly, there was no difference in overall proliferation rates (assessed by Ki67 immunostaining; see Supplementary material online, Figure S2D) or cardiomyocyte cell cycle activity (see Supplementary material online, Figure S2E) between genotypes, suggesting that cardiomyocyte number is not normalized in *cHccs*<sup>+/-</sup> hearts during early postnatal life.

Nevertheless, while the reduction in HW/BW ratio was still detectable in *cHccs*<sup>+/-</sup> females after 3 weeks, it was no longer evident in

adulthood (Figure 1B and F). This postnatal normalization of heart size is mediated by cardiomyocyte hypertrophy (Figure 1E), whereas proliferation (assessed by BrdU incorporation in 10-week-old animals; see Supplementary material online, Figure S3A) was not altered in adult  $cHccs^{+/-}$  compared with littermate control hearts. Moreover, we did not detect BrdU-positive cardiomyocytes in  $cHccs^{+/-}$  hearts (see Supplementary material online, Figure S3B and C), again suggesting that the reduced set of cardiomyocytes at birth is not restored during postnatal cardiac growth. Echocardiography of 3- and 10-week-old mice revealed normal LV contractility, wall thickness, and diameter (see Supplementary material online, Table S1) in  $cHccs^{+/-}$  mice, confirming normalization of myocardial mass. As cardiac function is normal in the majority of ageing (~1 year old)  $cHccs^{+/-}$  females,<sup>22</sup> we conclude that postnatal compensatory growth mediated by cardiomyocyte hypertrophy normalizes organ size after neonatal hypoplasia, thereby potentially allowing normal cardiac function throughout lifetime.

We had previously reported atrioventricular (AV) and bundle branch blocks in 40% of 1-year-old  $cHccs^{+/-}$  females.<sup>22</sup> ECG measurements on 10-week-old animals under baseline conditions and after  $\beta$ -adrenergic stimulation, however, revealed no alterations in ECG parameters (see Supplementary material online, Table S2). Consequently, conduction defects in  $cHccs^{+/-}$  females represent an age-related phenotype which is not evident in young adults.

### 3.3 Ageing $cHccs^{+/-}$ hearts exhibit a reduced heart weight

As developmental programming is believed to exert its effects later in life, we investigated the hearts of  $cHccs^{+/-}$  mice upon ageing. Consistent with our previous studies,<sup>22</sup> rare cases of premature death occurred within the group of  $cHccs^{+/-}$  females (1 out of 20) but not controls (0 out of 21). When investigating the remaining healthy animals, we did not observe major changes in gross morphology (see Supplementary material online, Figure S4A) or cardiac fibrosis (see Supplementary material online, Figure S4B) within the LV myocardium after 1 year. Surprisingly, however, heart weight was significantly reduced in 6-month-old and 1-year-old  $cHccs^{+/-}$  females compared with age-matched controls (see Supplementary material online, Figure S4C). Consequently, 6-month-old and 1-year-old  $cHccs^{+/-}$  females show a significantly reduced heart weight to tibia length ratio compared with littermate controls (see Supplementary material online, Figure S4D and E). At the cellular level, cardiomyocyte CSA was no longer different between genotypes at the age of 1 year (see Supplementary material online, Figure S4F). These data indicate that cardiomyocytes in  $cHccs^{+/-}$  hearts show an accelerated growth phase within the first weeks of life compared with controls to compensate for the reduction in cell number, but exhibit reduced growth kinetics thereafter (see Supplementary material online, Figure S4G). Because the cardiomyocyte deficit in  $cHccs^{+/-}$  hearts is not corrected postnatally, this ultimately reduces myocardial mass with age.

### 3.4 Postnatal normalization of heart size in $cHccs^{+/-}$ females is mediated by physiological cardiomyocyte hypertrophy

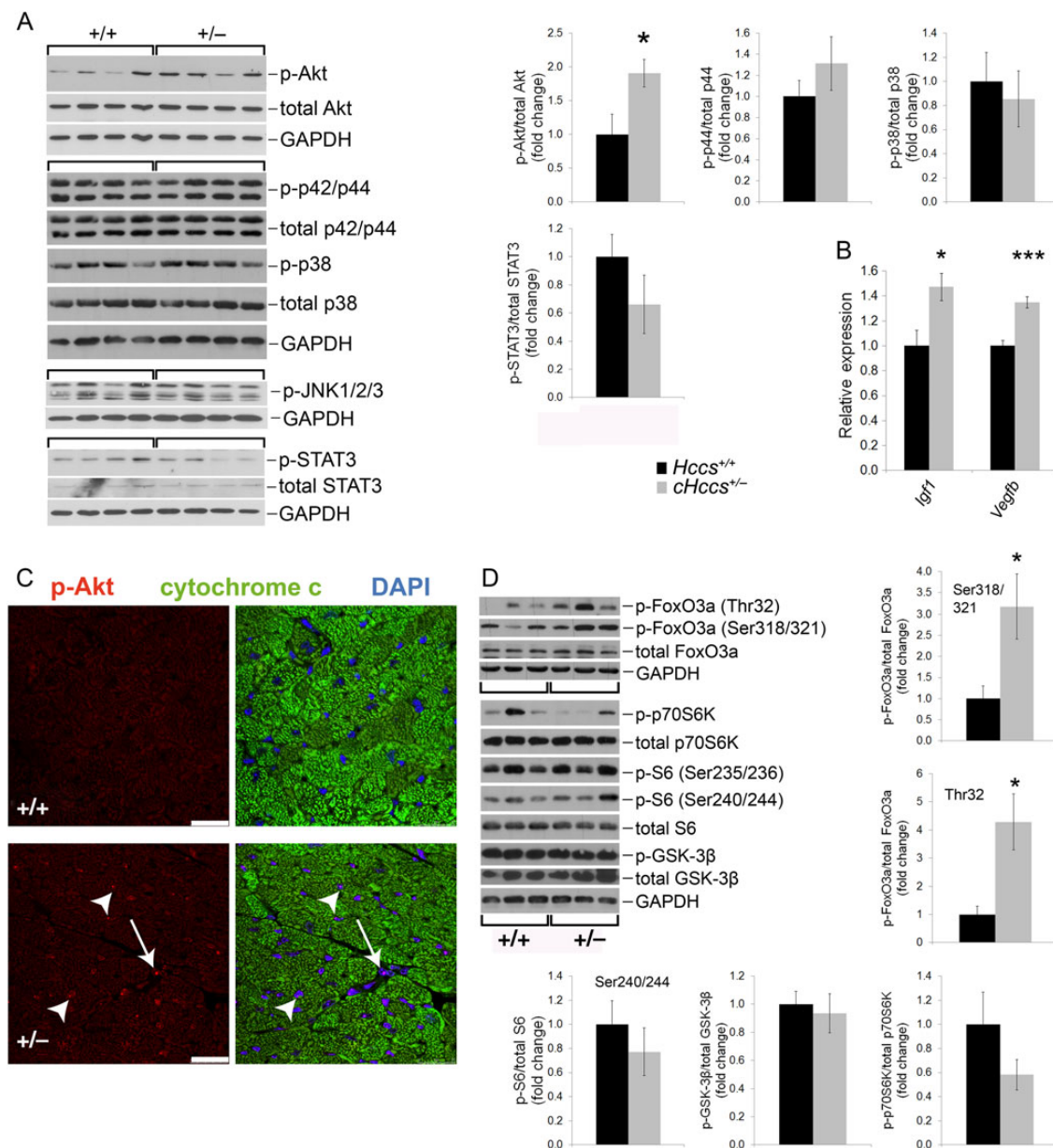
Cardiomyocyte hypertrophy is a feature of physiological cardiac growth during postnatal life or in response to enduring exercise,<sup>24</sup> but it can also be induced by pathological conditions. To test whether postnatal  $cHccs^{+/-}$  hearts show molecular signs of maladaptive remodelling, we determined the RNA expression levels of atrial natriuretic factor

(ANF), brain natriuretic peptide (BNP), and  $\beta$ -myosin heavy chain (*Myh7*). None of these foetal genes is induced in  $cHccs^{+/-}$  females compared with age-matched controls at any postnatal stage analysed (see Supplementary material online, Figure S5A), strongly suggesting that cardiomyocyte hypertrophy is not a response to pathological stimuli in these hearts. Consistently, 10-week-old (compare saline-treated animals in Figure 7B) and 1-year-old mice (see Supplementary material online, Figure S4B) do not show differences in myocardial fibrosis, another hallmark of pathological remodelling. Investigation of various signalling pathways involved in cardiac growth and organ size control revealed increased activation of Akt in 10-week-old  $cHccs^{+/-}$  hearts compared with controls, whereas p42/p44 (ERK1/2), JNK, and p38 MAP-kinases as well as JAK/STAT3 signalling appeared unaltered (Figure 2A). Interestingly, 10-week-old  $cHccs^{+/-}$  hearts also showed increased RNA expression of *Vegfb* and *Igf1*, important upstream regulators of Akt (Figure 2B), all of which have been shown to regulate cardiac organ size.<sup>24</sup> Activation of Akt in  $cHccs^{+/-}$  hearts was confirmed by IF analyses showing nuclear localization of phosphorylated Akt in both cardiomyocytes and non-myocytes (Figure 2C). Furthermore, characterization of potential Akt downstream targets revealed increased phosphorylation of FoxO3a in  $cHccs^{+/-}$  hearts compared with controls, whereas GSK-3 $\beta$  and the mTOR pathway components p70S6 kinase and S6 ribosomal protein appeared unaltered (Figure 2D). In contrast, no differences in Akt or other growth pathway activation were observed in 1-year-old hearts (see Supplementary material online, Figure S5B and C). We therefore conclude that neonatal cardiac hypoplasia can be transiently compensated for by accelerated physiological cardiomyocyte hypertrophy during early postnatal life, which cannot be maintained upon ageing.

### 3.5 Short-term angiotensin II stress results in overshooting hypertrophy and activation of STAT3 in $cHccs^{+/-}$ hearts

Although baseline cardiac function is normal in  $cHccs^{+/-}$  hearts, the reduced complement of cardiomyocytes might alter their response to stress. We therefore applied 2-week Angiotensin II (Ang II) infusion delivered by subcutaneous osmotic minipumps in 10-week-old animals. Echocardiography revealed that cardiac contractility and LV diameter were not different between the groups throughout the 2-week period (see Supplementary material online, Table S3). However,  $cHccs^{+/-}$  females showed a more rapid and enhanced hypertrophic response to Ang II, resulting in a significantly increased LV mass compared with controls when normalized to body weight (Figure 3A and B). ECG measurements after 2 weeks of Ang II treatment revealed no major differences between the groups (see Supplementary material online, Table S2), indicating that stress does not unmask cardiac conduction defects in  $cHccs^{+/-}$  females in early adulthood. Histological analyses showed no difference in myocardial fibrosis (compare vehicle groups in Figure 7B) or cell death (Figure 3C). However,  $cHccs^{+/-}$  hearts exhibit an overshooting cardiomyocyte hypertrophy in response to Ang II, resulting in a 61% increase in CSA compared with baseline conditions vs. 34% in controls (Figure 3D and E). Furthermore, we detected increased cell cycle activity (assessed by Ki67 staining) in the LV myocardium of Ang II-stressed  $cHccs^{+/-}$  hearts compared with controls (Figure 3F). Detailed characterization identified the majority of Ki67-positive cells as (myo-) fibroblasts, evident by co-localization with  $\alpha$ -smooth muscle actin (see Supplementary material online, Figure S6A). In contrast, we did not detect increased numbers of Ki67-positive cardiomyocytes (see



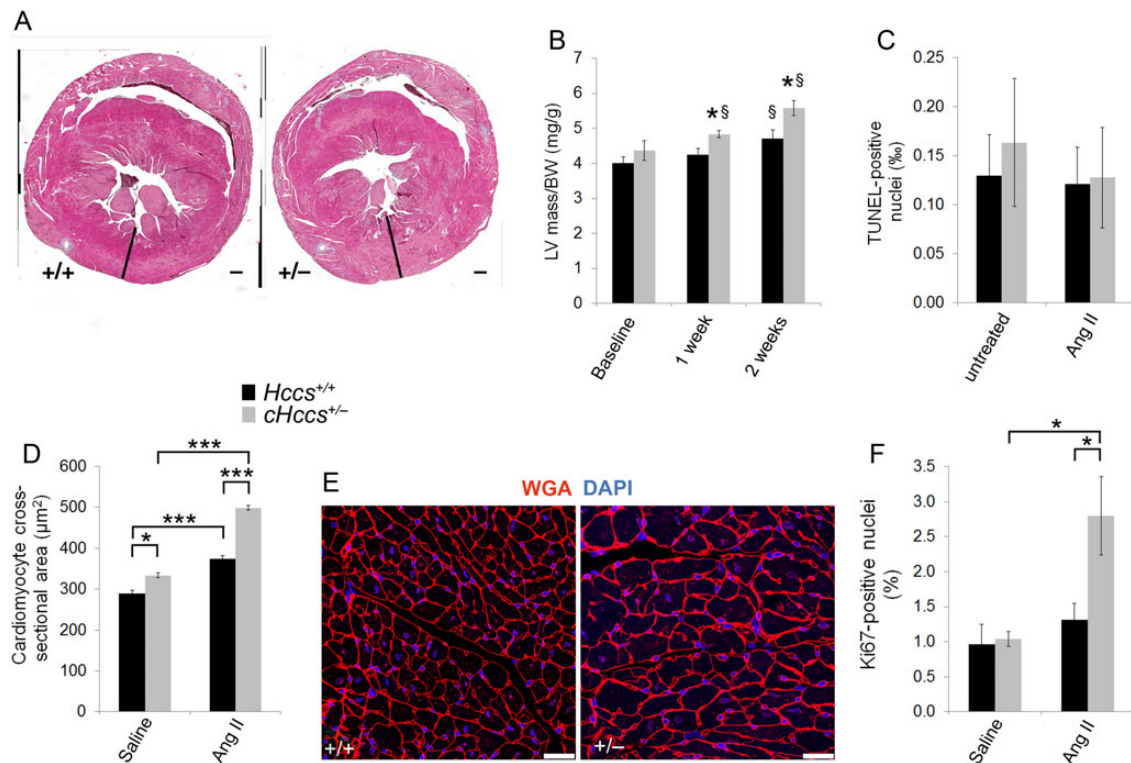


**Figure 2** Activation of Akt signalling in adult *cHccs*<sup>+/-</sup> hearts. (A) 10-week-old *cHccs*<sup>+/-</sup> hearts show increased activation of Akt but not MAP-kinases or JAK/STAT3 signalling compared with controls (densitometric quantifications of western blots: *Hccs*<sup>+/+</sup> *n* = 8, *cHccs*<sup>+/-</sup> *n* = 10). (B) *cHccs*<sup>+/-</sup> hearts at the age of 10 weeks show increased RNA expression of *Igf1* and *Vegfb* (qRT-PCR data, *n* = 5–6 per group). (C) IF analyses showed increased Akt (Ser473) phosphorylation in normal (i.e. cytochrome c positive) cardiomyocytes (arrowheads) and non-myocytes (arrows) of *cHccs*<sup>+/-</sup> hearts compared with controls (scale bar = 25 μm). (D) Characterization of Akt downstream targets revealed increased phosphorylation of FoxO3a in *cHccs*<sup>+/-</sup> hearts, whereas GSK-3β and mTOR pathway components (i.e. p70S6 kinase and S6 ribosomal protein) appeared unaltered compared with controls (densitometric quantification: *n* = 5 per group). (\**P* < 0.05, \*\*\**P* < 0.001).

Supplementary material online, Figure S6B) in Ang II-stressed *cHccs*<sup>+/-</sup> hearts, suggesting that *de novo* cardiomyogenesis is unlikely to contribute to their stress response. Moreover, no difference in the number of Ki67-positive endothelial cells was observed between genotypes (see Supplementary material online, Figure S6C), suggesting that angiogenesis is not differentially activated in *cHccs*<sup>+/-</sup> hearts upon stress. The latter was furthermore confirmed by unaltered expression of the major proangiogenic factor *Vegfa* (Figure 4B).

The exaggerated growth response in Ang II-treated *cHccs*<sup>+/-</sup> hearts coincide with a similar induction of the foetal gene programme compared

with controls (compare saline and vehicle groups in Figure 7D). However, we identified activation of STAT3 accompanied by inactivation of p38 MAP-kinase (Figure 4A) in Ang II-stressed *cHccs*<sup>+/-</sup> hearts, while the activation status of Akt, p42/44 MAP-kinase (Figure 4A), JNK (see Supplementary material online, Figure S7A), and other STAT family members (see Supplementary material online, Figure S7B) was unaltered. These data were subsequently confirmed in large and independent groups of Ang II-infused mice (see Supplementary material online, Figure S7A). Increased transcriptional activity of STAT3 could be confirmed by up-regulation of various target genes (Figure 4B), which were not differentially expressed in



**Figure 3** Short-term Ang II infusion results in overshooting cardiomyocyte hypertrophy in  $cHccs^{+/-}$  hearts. (A) Increased LV wall thickness (compare black lines) in  $cHccs^{+/-}$  vs. control hearts after 2 weeks of Ang II infusion (scale bar = 300  $\mu m$ ). (B) LV mass (determined by echocardiography) normalized to body weight more rapidly increases in  $cHccs^{+/-}$  females compared with controls ( $n = 11$  per group, \* $P < 0.05$  vs.  $Hccs^{+/+}$ , § $P < 0.05$  vs. baseline). (C) Apoptosis rates are not different in the LV myocardium of untreated or Ang II-stressed  $cHccs^{+/-}$  females compared with the respective controls ( $n = 4$  per group). (D) Overshooting cardiomyocyte hypertrophy in Ang II-treated  $cHccs^{+/-}$  hearts compared with controls after 2 weeks (saline  $n = 4$ , Ang II  $n = 8$  per group, \* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$ ). (E) Increased cardiomyocyte CSA in Ang II-treated  $cHccs^{+/-}$  compared with control hearts (scale bar = 25  $\mu m$ ). (F) Cell cycle activity is increased in  $cHccs^{+/-}$  compared with control hearts after 2 weeks of Ang II infusion (saline  $n = 4$ , Ang II  $n = 9$  per group, \* $P < 0.05$ ).

unstressed hearts (see Supplementary material online, Figure S7C). Phosphorylated STAT3 is localized to cardiomyocyte nuclei in Ang II-stressed  $cHccs^{+/-}$  hearts by IF analyses (Figure 4C). Importantly, HCCS-deficient cardiomyocytes are specifically spared from STAT3 activation (see Supplementary material online, Figure S8A), excluding that STAT3 acts as a survival factor within this small cell population. IF analyses furthermore confirmed reduced nuclear staining of phosphorylated p38 in cardiomyocytes of Ang II-stressed  $cHccs^{+/-}$  hearts (Figure 4D). Interestingly, various cytokines known to induce JAK/STAT signalling showed normal expression levels in unstressed hearts and after 2 weeks of Ang II stimulation between the groups (see Supplementary material online, Figure S8B and C). In summary,  $cHccs^{+/-}$  hearts respond to Ang II stimulation by an overshooting cardiomyocyte hypertrophy, potentially mediated by activation of STAT3 and inhibition of p38 MAP-kinase.

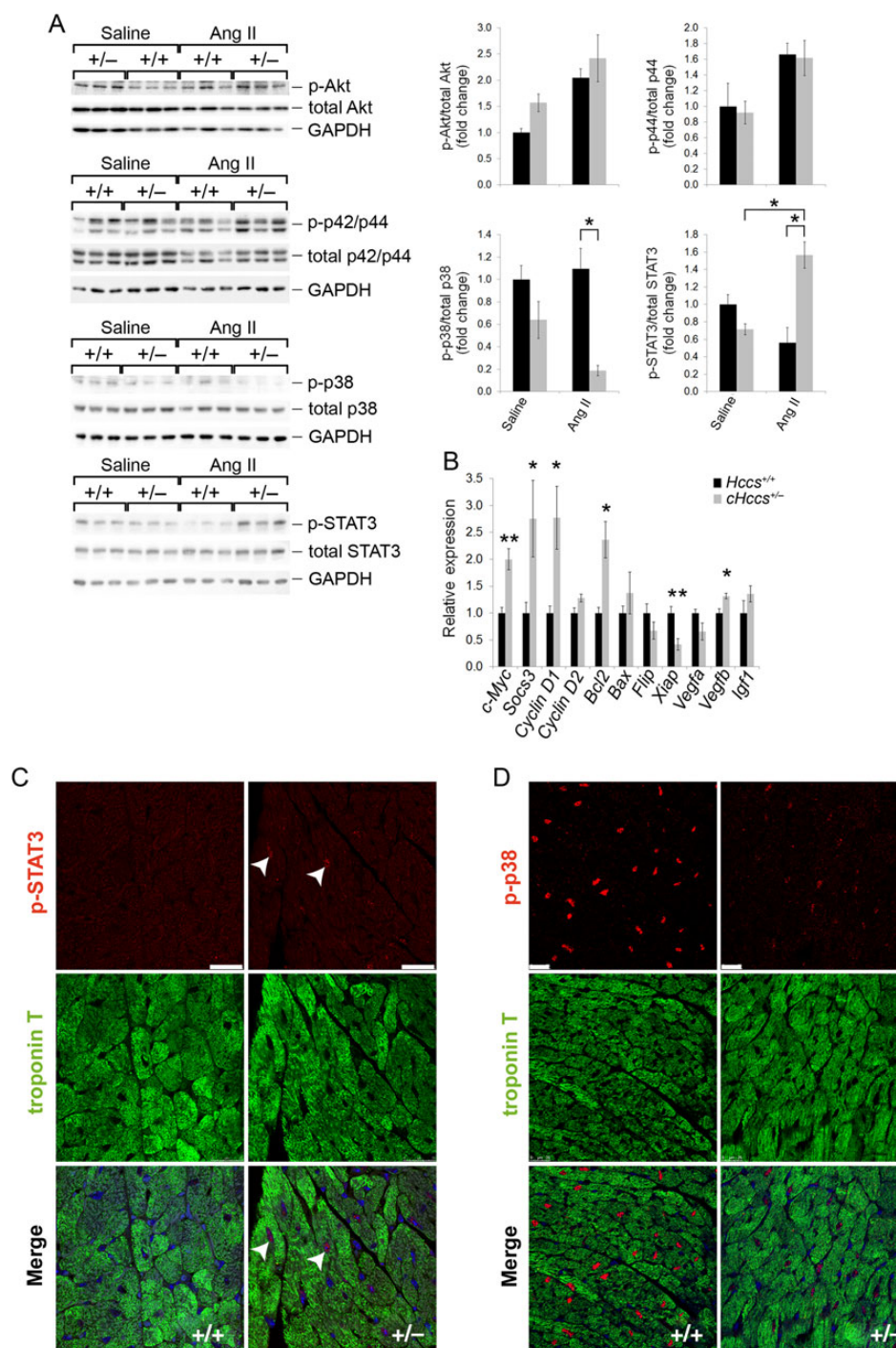
### 3.6 Cardiomyocyte hypertrophy is partially reversed in $cHccs^{+/-}$ hearts after long-term Ang II stimulation

The enhanced hypertrophic response in  $cHccs^{+/-}$  hearts after 2 weeks of Ang II treatment might eventually result in contractile dysfunction if stress is extended. Surprisingly, no differences in HW/BW ratio or cardiac morphology were observed between  $cHccs^{+/-}$  and control females after 4 weeks of Ang II infusion (see Supplementary material

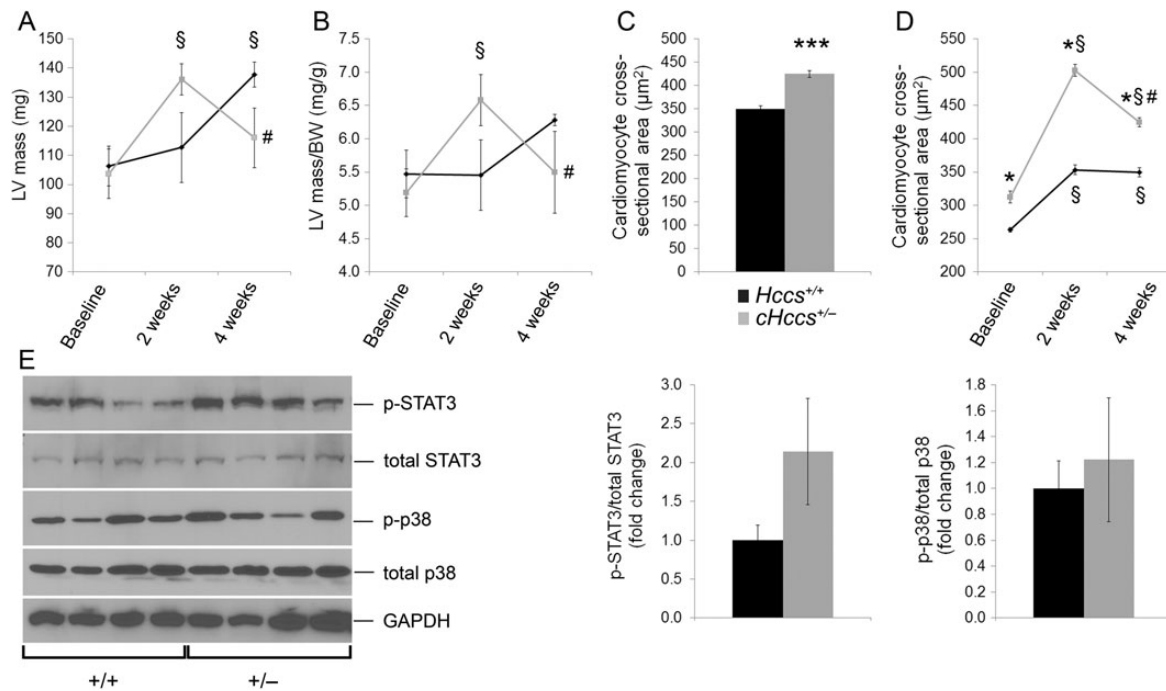
online, Figure S9A). Echocardiography revealed adequate LV wall thickness, diameter, and contractility in  $cHccs^{+/-}$  hearts (see Supplementary material online, Table S4). However, LV wall thickness and mass in  $cHccs^{+/-}$  hearts peak after 2 weeks but decline again thereafter (Figure 5A and B). This reversal of cardiac growth during the second half of Ang II stress results in a significantly reduced LV mass compared with the 2-week time point. Strikingly, after 4 weeks of Ang II stimulation cardiomyocyte CSA is still increased in  $cHccs^{+/-}$  hearts compared with controls (Figure 5C), but significantly reduced compared with  $cHccs^{+/-}$  hearts after 2 weeks of Ang II stress (Figure 5D). Whereas in unstressed  $cHccs^{+/-}$  hearts, cells are 18.7% larger compared with controls, this increases to 42.3% after 2 weeks of Ang II stimulation but returns to unstressed levels (i.e. 21.5%) after 4 weeks. Thus, the heart seems to sense a reduction in overall cell number even under stress conditions such that organ size is tightly controlled by maintaining a certain degree of compensatory hypertrophy. It is important to note, that cardiomyocyte CSA is not completely reversed in  $cHccs^{+/-}$  females after 4 weeks of Ang II treatment, but remains elevated compared with baseline levels. This indicates that Ang II is still effectively released, which is furthermore confirmed by sustained hypertrophy in control mice over the 4-week period.

Expression of the foetal genes was not different in  $cHccs^{+/-}$  compared with control hearts after 4 weeks of Ang II treatment (see Supplementary material online, Figure S9B). Therefore, neither short- nor





**Figure 4** Inactivation of p38 MAP-kinase but activation of STAT3 in Ang II-treated *cHccs*<sup>+/-</sup> hearts. (A) No difference in Akt or p42/44 MAP-kinase phosphorylation is observed between genotypes after 2 weeks of Ang II treatment. In contrast, *cHccs*<sup>+/-</sup> hearts show decreased phosphorylation of p38 MAP-kinase and increased phosphorylation of STAT3 compared with controls (densitometric quantifications:  $n = 3$  per group,  $*P < 0.05$ ). (B) The expression of STAT3 target genes [e.g. *c-Myc*, *Socs3*, *Cyclin D1* (but not *D2*), *Bcl2* (but not other apoptosis regulators such as *Bax*, *Flip* or *Xiap*)] is significantly induced in *cHccs*<sup>+/-</sup> compared with control hearts after 2 weeks of Ang II infusion. The main proangiogenic STAT3 target *Vegfa* is not induced, whereas *Vegfb* does show slightly increased expression. Increased baseline expression of *Igf1* is no longer detectable in *cHccs*<sup>+/-</sup> hearts after Ang II stimulation (qRT-PCR data,  $n = 5-6$  per group,  $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$ ). (C) IF analyses of Ang II-stressed hearts revealed nuclear localization of phosphorylated STAT3 primarily in cardiomyocytes (see arrowheads) of *cHccs*<sup>+/-</sup> hearts (scale bar = 25  $\mu$ m). (D) Immunostaining of phosphorylated p38 is reduced in *cHccs*<sup>+/-</sup> compared with control hearts after Ang II infusion (scale bar = 25  $\mu$ m).



**Figure 5** Overshooting hypertrophy of *cHccs*<sup>+/-</sup> hearts is partially reversed during long-term Ang II treatment. (A) Absolute LV mass determined by echocardiography and (B) LV mass normalized to body weight rapidly increase in *cHccs*<sup>+/-</sup> females within the first 2 weeks of Ang II treatment but return to near baseline levels after 4 weeks. In contrast, LV mass in control females continuously increases. (C) After 4 weeks of Ang II treatment cardiomyocyte CSA is increased in *cHccs*<sup>+/-</sup> hearts compared with controls (\*\**P* < 0.001). (D) Cardiomyocytes in *cHccs*<sup>+/-</sup> hearts initially show accelerated growth in response to Ang II, which is partially reversed thereafter. The hypertrophic response in control cardiomyocytes is slower but constant between 2 and 4 weeks (diagram summarizes data from Figures 1E, 3D, and 5C). (E) Whereas STAT3 phosphorylation is slightly increased in *cHccs*<sup>+/-</sup> hearts compared with controls after 4-week Ang II stress, inactivation of p38 MAP-kinase is not evident. (*n* = 5 per genotype for A–C and E, §*P* < 0.05 vs. baseline, #*P* < 0.05 vs. 2 weeks, \**P* < 0.001 vs. *Hccs*<sup>+/+</sup>).

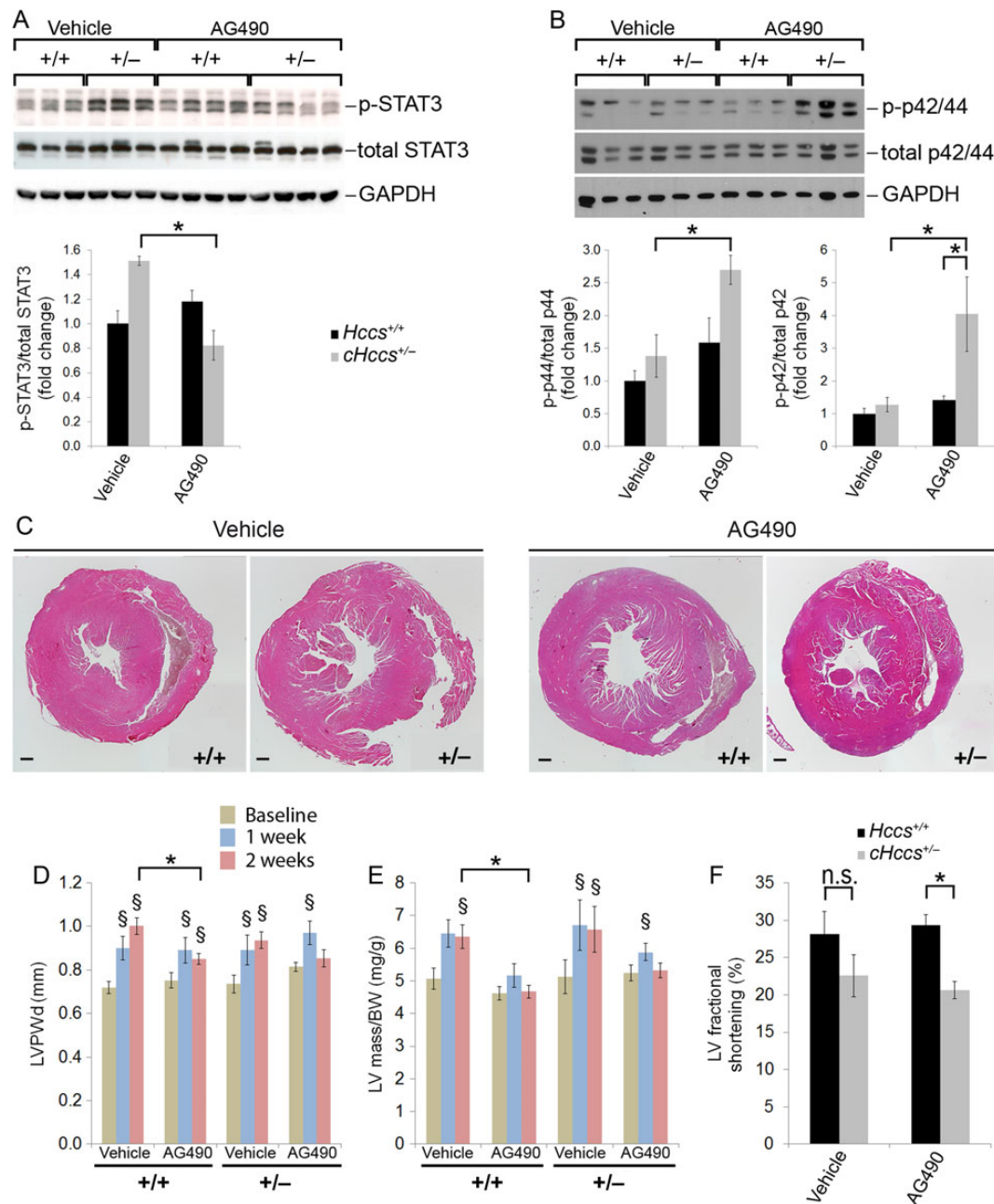
long-term Ang II stress provokes a molecular signature of more severe pathological remodelling. Interestingly, while a slight increase in STAT3 phosphorylation was detectable in *cHccs*<sup>+/-</sup> compared with control hearts after 4 weeks of Ang II treatment, inhibition of p38 MAP-kinase was no longer evident (Figure 5E). Other cardiac growth pathways do not show altered activation between the groups (see Supplementary material online, Figure S9C). Taken together, a rapid and overshooting hypertrophic response in *cHccs*<sup>+/-</sup> hearts immediately after the onset of stress is partially normalized after prolonged Ang II treatment.

### 3.7 STAT3 is required for normal cardiac function in *cHccs*<sup>+/-</sup> females in response to Ang II

To functionally prove the role of STAT3 in altered stress response and growth of *cHccs*<sup>+/-</sup> hearts, we applied the JAK2 inhibitor AG490 during 2-week Ang II stimulation (see Supplementary material online, Figure S10A). AG490 results in reduced STAT3 (Tyr705) phosphorylation primarily in Ang II-stressed *cHccs*<sup>+/-</sup> but not control hearts (Figure 6A), while inactivation of p38 as well as Akt signalling were unaffected (see Supplementary material online, Figure S10B and C). Strikingly, whereas AG490 treatment had no effect on p42/44 MAP-kinases in Ang II-stressed controls, it increased p42/44 phosphorylation specifically in Ang II-treated *cHccs*<sup>+/-</sup> hearts (Figure 6B). STAT3 inhibition reversed the Ang II-mediated increase in LV mass in both *cHccs*<sup>+/-</sup>

and control mice (Figure 6C and E). Echocardiography confirmed that LV wall thickness returned to baseline levels in AG490-treated *cHccs*<sup>+/-</sup> animals (Figure 6D and see Supplementary material online, Table S5). Importantly, LV wall thickness in AG490-treated control females is still increased after 2 weeks compared with baseline levels but reduced compared with the respective vehicle group (Figure 6D). Therefore, while JAK/STAT inhibition impairs cardiac growth in response to Ang II in both genotypes, this effect is more pronounced in *cHccs*<sup>+/-</sup> females. As a consequence, STAT3 inhibition leads to a slight but significant reduction of LV contractility in the latter (Figure 6F). Thus, maintaining cardiac function under Ang II stress conditions is critically dependent on activation of STAT3 signalling in *cHccs*<sup>+/-</sup> hearts.

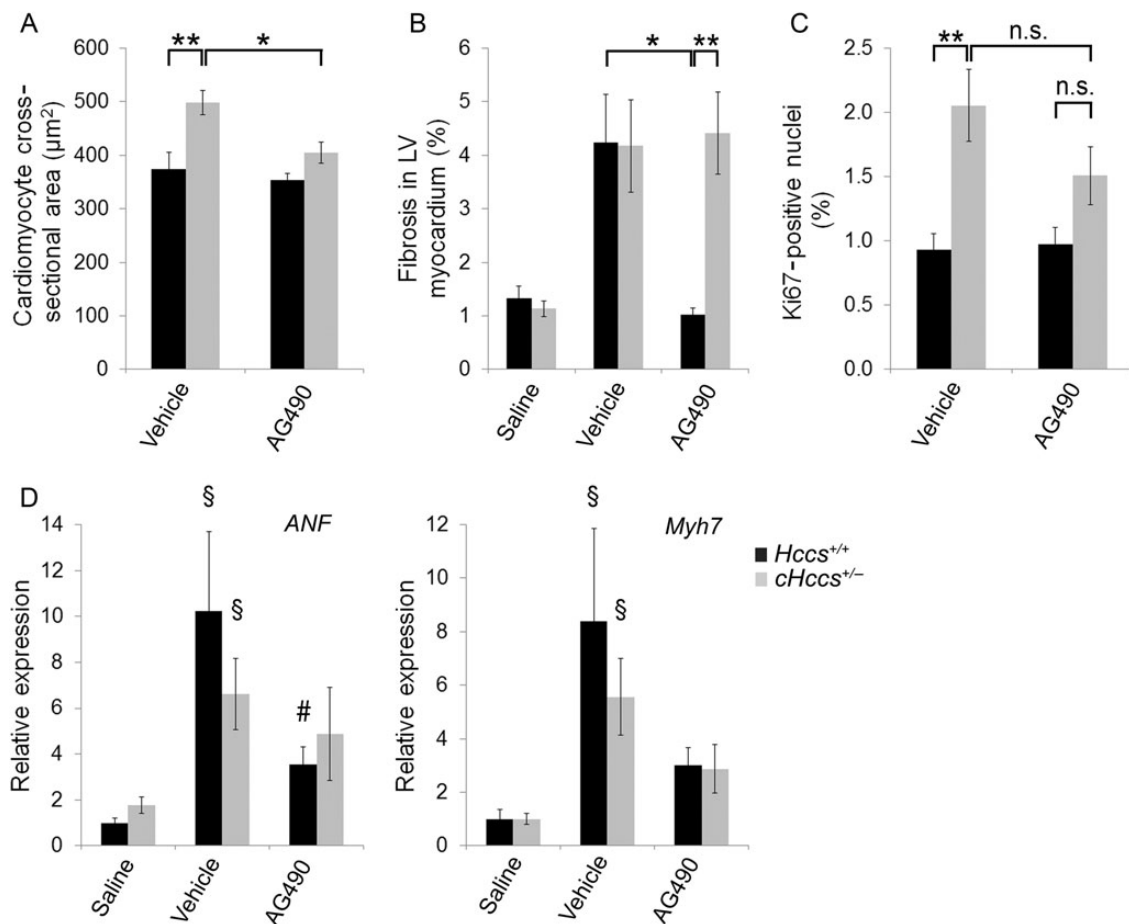
Intriguingly, the Ang II-mediated increase in cardiomyocyte CSA is inhibited by AG490 treatment in *cHccs*<sup>+/-</sup> but not control hearts (Figure 7A). In contrast, interstitial fibrosis in the LV myocardium is reversed by AG490 in control but not *cHccs*<sup>+/-</sup> hearts (Figure 7B). These data suggest that STAT3 regulates two fundamental cardiac stress adaptations differently between the groups. Furthermore, proliferation rates of non-myocytes were only partially reversed in AG490-treated *cHccs*<sup>+/-</sup> hearts (Figure 7C), suggesting that cardiomyocyte hypertrophy is indeed the main target of STAT3 activation. Although STAT3 has proangiogenic functions in the heart, we did not detect reduced capillary density in either genotype upon AG490 treatment (see Supplementary material online, Figure S10D), excluding that



**Figure 6** Inhibition of JAK/STAT signalling reverses LV growth upon Ang II treatment. (A) AG490-mediated reduction of STAT3 phosphorylation was more pronounced in Ang II-stressed *cHccs*<sup>+/-</sup> hearts compared with controls (densitometric quantification:  $n = 3-4$  per group,  $*P < 0.05$ ). (B) AG490 treatment results in enhanced p42/44 MAP-kinase phosphorylation specifically in Ang II-stressed *cHccs*<sup>+/-</sup> but not control hearts (densitometric quantification:  $n = 6$  per group). (C) Reduced heart size in Ang II-stressed *cHccs*<sup>+/-</sup> females treated with AG490 compared with vehicle-treated animals (scale bar = 300  $\mu$ m). (D) Echocardiography revealed that JAK/STAT inhibition reverses the Ang II-mediated increase in LV wall thickness in AG490-treated *cHccs*<sup>+/-</sup> females. In AG490-treated controls, LV wall thickness is still increased compared with baseline but reduced compared with vehicle-treated animals. (E) LV mass normalized to body weight is reversed to baseline levels in both *cHccs*<sup>+/-</sup> and control females when treated with AG490 compared with the respective vehicle group ( $^{\S}P < 0.05$  vs. baseline,  $*P < 0.05$ ,  $n$  for D to F: see Supplementary material online, Table S5). (F) LV fractional shortening is not different in vehicle-treated animals after 2 weeks of Ang II, but AG490 results in significantly reduced contractility in *cHccs*<sup>+/-</sup> hearts ( $*P < 0.05$ , n.s.: not significant).

inhibition of Ang II-induced cardiac growth is a secondary effect caused by impaired angiogenesis. The latter is furthermore supported by unaltered expression of the proangiogenic STAT3 target gene *Vegfa* after AG490 treatment (see Supplementary material online, Figure S10E). Finally, evaluation of the foetal gene programme showed that JAK/STAT

inhibition partially reversed the Ang II-mediated induction of *ANF* and *Myh7* in both genotypes (Figure 7D), although this effect was more pronounced in control hearts. In conclusion, whereas inhibition of STAT3 upon Ang II stress seems to prevent adverse myocardial remodelling in controls, it rather appears to be detrimental for *cHccs*<sup>+/-</sup> hearts.



**Figure 7** Cardiomyocyte CSA and fibrosis are differentially affected by JAK/STAT inhibition in Ang II-stressed *cHccs*<sup>+/-</sup> vs. control hearts. (A) JAK/STAT inhibition reverses Ang II-mediated cardiomyocyte hypertrophy in *cHccs*<sup>+/-</sup> hearts but not controls (vehicle: *Hccs*<sup>+/+</sup> *n* = 5, *cHccs*<sup>+/-</sup> *n* = 4; AG490: *Hccs*<sup>+/+</sup> *n* = 8, *cHccs*<sup>+/-</sup> *n* = 6). (B) LV interstitial fibrosis was induced in both *cHccs*<sup>+/-</sup> and control females upon 2 weeks of Ang II treatment, but reversed by AG490 treatment in controls only (saline: *Hccs*<sup>+/+</sup> *n* = 5, *cHccs*<sup>+/-</sup> *n* = 4; vehicle: *Hccs*<sup>+/+</sup> *n* = 4, *cHccs*<sup>+/-</sup> *n* = 6; AG490: *Hccs*<sup>+/+</sup> *n* = 8, *cHccs*<sup>+/-</sup> *n* = 7). (C) Increased proliferation rates observed in *cHccs*<sup>+/-</sup> females after 2 weeks of Ang II stress are partially reversed by AG490 treatment (vehicle: *Hccs*<sup>+/+</sup> *n* = 6, *cHccs*<sup>+/-</sup> *n* = 6; AG490: *Hccs*<sup>+/+</sup> *n* = 8, *cHccs*<sup>+/-</sup> *n* = 7). (D) Ang II stress induces the expression of ANF and *Myh7* in vehicle-treated *cHccs*<sup>+/-</sup> and control hearts compared with the respective saline group, but AG490 treatment reduces their expression primarily in controls (qRT-PCR data, <sup>§</sup>*P* < 0.05 vs. saline, <sup>#</sup>*P* < 0.05 vs. vehicle; saline: *Hccs*<sup>+/+</sup> *n* = 5, *cHccs*<sup>+/-</sup> *n* = 4; vehicle: *Hccs*<sup>+/+</sup> *n* = 6, *cHccs*<sup>+/-</sup> *n* = 6; AG490: *Hccs*<sup>+/+</sup> *n* = 7, *cHccs*<sup>+/-</sup> *n* = 7). (\**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01, n.s.: not significant).

## 4. Discussion

Postnatal adaptations of organs in response to impaired intrauterine growth remain obscure. Their characterization, however, appears imperative to understand the pathogenesis of adult disease programmed during prenatal life and discover therapeutic or preventive strategies. Here, we demonstrate remarkable growth plasticity and altered organ size control of the postnatal heart as a potential mechanism ensuring normal cardiac function after impaired development. Despite the impressive regenerative capacity of prenatal *cHccs*<sup>+/-</sup> hearts,<sup>22</sup> compensatory proliferation of healthy cells is insufficient to completely restore cell number until birth resulting in reduced organ size. Heart size completely normalizes in *cHccs*<sup>+/-</sup> females by early adulthood, however, mediated by enhanced physiological cardiomyocyte hypertrophy. In this regard, cardiomyocytes in postnatal *cHccs*<sup>+/-</sup> hearts are *per se* healthy and able to utilize the complete programme of adaptive growth or stress

response mechanisms. This likely explains their ability to maintain LV contractility throughout adulthood and ageing,<sup>22</sup> in contrast to other genetic models of cardiac hypoplasia.<sup>25</sup> Therefore, *cHccs*<sup>+/-</sup> hearts resemble the situation after IUGR, where the insult is released at birth such that the full adaptive machinery can be applied postnatally.<sup>14,17</sup>

Cellular growth pathways are likely to be modified in the adult heart after impaired prenatal development. Consistently, expression of *Igf1* and activation of Akt were increased in adult *cHccs*<sup>+/-</sup> hearts under baseline conditions, and various components of this pathway have been proposed to be affected by developmental programming.<sup>26,27</sup> Among established downstream targets of Akt signalling, we identified the transcription factor FoxO3a as a potential effector in *cHccs*<sup>+/-</sup> hearts. Upon phosphorylation by Akt, FoxO3a transcriptional activity is repressed due to its nuclear exclusion, and such inhibition of a FoxO3a-mediated atrophic gene programme allows cardiomyocyte



hypertrophy.<sup>28,29</sup> Although other Akt downstream targets such as GSK-3 $\beta$  or mTOR signalling appeared unaltered in adult *cHccs*<sup>+/-</sup> hearts, they might still be involved in compensatory cardiac growth at earlier postnatal stages.

Importantly, we observed remarkable cellular and molecular alterations in response to Ang II infusion in adult *cHccs*<sup>+/-</sup> hearts, suggesting their hypersensitivity towards such stimulation. Ang II mediates its functions on the heart by both pressure overload and direct neurohormonal stimulation via angiotensin type 1 and 2 (AT1/2) receptors expressed on cardiomyocytes. Intriguingly, the renin–angiotensin system (RAS) has been shown to be affected by foetal programming.<sup>30,31</sup> Such programming of RAS components could therefore contribute to an altered disease susceptibility of the heart. Although *cHccs*<sup>+/-</sup> hearts functionally tolerate the impact of Ang II stimulation, in humans the combination of multiple cardiovascular risk factors (such as obesity, hypertension, diabetes, smoking, or drugs) could exceed the compensatory threshold of the heart which was subjected to impaired prenatal development.

We identified STAT3 and p38 MAP-kinase as potential new targets of developmental programming. STAT3 signalling exerts multiple functions in the heart regulating hypertrophy, fibrosis, angiogenesis, cell survival, and inflammation.<sup>32</sup> In Ang II-stimulated *cHccs*<sup>+/-</sup> hearts, activation of STAT3 in cardiomyocytes is required for compensatory hypertrophy to maintain LV contractility in the acute stages of cardiac stress. Since p38 is generally considered to exert antihypertrophic and cardiodepressive functions,<sup>33,34</sup> it is tempting to speculate that its inhibition might be required to allow overshooting cardiomyocyte hypertrophy and sustain contractility. Given the transient nature of p38 inhibition, its reactivation upon long-term Ang II stress could be essential to restrict and even partially reverse cardiomyocyte growth.

JAK/STAT3 inhibition during Ang II stress reduces LV mass by decreasing cardiomyocyte CSA in *cHccs*<sup>+/-</sup> hearts but inhibition of fibrosis in controls. The latter is in agreement with previous studies.<sup>35–37</sup> Interestingly, fibrosis is not reduced by STAT3 inhibition in Ang II-stressed *cHccs*<sup>+/-</sup> hearts, pointing to fundamentally different STAT3-mediated stress response mechanisms in normal and developmentally impaired hearts in adulthood. We did not observe increased expression of cytokines known to activate JAK/STAT3 signalling in Ang II-stressed *cHccs*<sup>+/-</sup> hearts compared with controls,<sup>32</sup> suggesting that STAT3 is directly activated via AT1/2 receptors.<sup>38,39</sup> Therefore, developmental programming of a hypersensitive RAS would also alter JAK/STAT signalling in the adult heart. Finally, STAT3 inhibition appears to be detrimental in adult *cHccs*<sup>+/-</sup> females when subjected to cardiac stress. Given that JAK2 inhibitors have recently entered the clinic for the treatment of myeloproliferative neoplasias as well as autoimmune diseases,<sup>40</sup> our data urge for a close monitoring of cardiac function in patients with a known history of IUGR, preterm birth, or low birth weight.

When applying pharmacological inhibitors *in vivo*, specificity of the agent and potential off-target effects are always an issue. As such, the JAK2 inhibitor AG490 is no exception given that it has been shown to interfere with EGF and ErbB receptor signalling.<sup>41</sup> On the other hand, AG490 is rather specific to JAK2 and does not significantly inhibit other JAK family members.<sup>42</sup> EGF and ErbB signalling mainly utilize PI3K/Akt or MAP-kinases for intracellular signal transduction, and we show that both are unaffected by AG490 treatment in Ang II-stressed control mice. Surprisingly, p42/44 MAP-kinases (ERK1/2) show increased phosphorylation specifically in Ang II-stressed *cHccs*<sup>+/-</sup> but not control hearts upon AG490 treatment, adding another level of complexity to the altered stress response after impaired heart development. JAK2 has been proposed to mediate Ang II-dependent inactivation of

ERK2.<sup>43</sup> Similarly, STAT3 inhibits p42/44 activity in proximal tubular cells of murine kidneys upon oxidative stress and this can be reversed by AG490 treatment.<sup>44</sup> It is tempting to speculate that a similar mechanism is acting in Ang II-stressed *cHccs*<sup>+/-</sup> hearts, even though it is more widely accepted that JAK activates rather than inhibits p42/44 in the heart.<sup>45</sup> In addition, we cannot exclude that AG490-mediated p42/44 activation in Ang II-stressed *cHccs*<sup>+/-</sup> hearts is a secondary effect due to contractile dysfunction.

There are considerable differences between *cHccs*<sup>+/-</sup> mice and the classical models of foetal growth restriction. Consequently, the *Hccs* knockout model is not intended to mimic classical IUGR models but rather provide an organ-specific impairment of heart development resulting in a phenotype very similar to IUGR, i.e. cardiac hypoplasia at birth.<sup>13,17</sup> Certainly, foetal growth restriction in other organs impacts on the heart (as for example by the induction of hypertension<sup>30</sup>), making foetal programming a complex and systemic process. The latter is difficult to dissect, however, evident from the lack of mechanistic insights despite pioneering studies >20 years ago.<sup>2,4</sup> In an attempt to unravel the basic mechanisms of the heart to adapt to impaired prenatal development, we believe that the *Hccs* knockout model might serve as a novel tool to improve our understanding of developmental programming.

In summary, we propose that foetal programming in the heart is inevitably linked to cardiac growth control. Cardiac hypoplasia at birth can be compensated postnatally by a remarkable plasticity in cardiomyocyte size which allows normal cardiac function throughout lifetime even under stress conditions. If adaptive growth is inhibited, however, this results in clinical manifestation of disease. In humans subjected to IUGR, cardiovascular risk factors might impair postnatal compensatory cardiac growth in the first place, thereby promoting adult heart disease. Consequently, whereas catch-up growth after IUGR is generally considered to contribute to developmental programming,<sup>18–20</sup> our data suggest that for the heart such compensatory growth is essential to prevent contractile dysfunction.

## 5. Study limitations

Due to the nature of the heart conditional *Hccs* knockout model and the X chromosomal localization of the *Hccs* gene, only females could be investigated in this study. Given that developmental programming has been shown to be influenced by gender,<sup>15,16</sup> it is uncertain whether the altered cardiac growth and stress response might be different in males. Furthermore, Ang II treatment has been applied in 10-week-old and therefore relatively young mice. As cardiovascular disease susceptibility caused by foetal programming is believed to increase with age, it is possible that older *cHccs*<sup>+/-</sup> hearts show a different functional, cellular, or molecular response to Ang II, which might be even more relevant for human subjects. Finally, we did not monitor blood pressure in Ang II-treated animals throughout the present study. We have previously shown by catheter-based measurements of intracardiac haemodynamics that blood pressure is not different in *cHccs*<sup>+/-</sup> compared with control females at baseline as well as after  $\beta$ -adrenergic stimulation.<sup>22</sup> Nevertheless, we cannot exclude that differences specific for the Ang II-mediated blood pressure response might contribute to the findings of this study. Along these lines, different effects of AG490 in extracardiac tissues (as for example the vasculature, kidney, and adrenal glands) between genotypes cannot be formally ruled out, although the heart conditional knockout of *Hccs* should leave these organs unaffected in *cHccs*<sup>+/-</sup> females.

## Supplementary material

Supplementary material is available at *Cardiovascular Research* online.

## Acknowledgements

We thank Martin Taube and Stefanie Schelenz for performing echocardiography, Anja Conrad for technical assistance, Christina Eichhorn for advice regarding statistical analyses, and the Microscopy Core Facility at the Max-Delbrück-Center for technical support.

**Conflict of interest:** none declared.

## Funding

This work was supported by the German Research Foundation (Deutsche Forschungsgemeinschaft) [grant number DR 446/3-1].

## References

- Langley-Evans SC, McMullen S. Developmental origins of adult disease. *Med Princ Pract* 2010;**19**:87–98.
- Barker DJ, Hales CN, Fall CH, Osmond C, Phipps K, Clark PM. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus, hypertension and hyperlipidaemia (syndrome X): relation to reduced fetal growth. *Diabetologia* 1993;**36**:62–67.
- Warner MJ, Ozanne SE. Mechanisms involved in the developmental programming of adulthood disease. *Biochem J* 2010;**427**:333–347.
- Barker DJ, Winter PD, Osmond C, Margetts B, Simmonds SJ. Weight in infancy and death from ischaemic heart disease. *Lancet* 1989;**2**:577–580.
- Drenckhahn JD. Growth plasticity of the embryonic and fetal heart. *Bioessays* 2009;**31**:1288–1298.
- Murotsuki J, Challis JR, Han VK, Fraher LJ, Gagnon R. Chronic fetal placental embolization and hypoxemia cause hypertension and myocardial hypertrophy in fetal sheep. *Am J Physiol* 1997;**272**:R201–R207.
- Louey S, Jonker SS, Giraud GD, Thornburg KL. Placental insufficiency decreases cell cycle activity and terminal maturation in fetal sheep cardiomyocytes. *J Physiol* 2007;**580**:639–648.
- Bubb KJ, Cock ML, Black MJ, Dodic M, Boon WM, Parkinson HC, Harding R, Tare M. Intrauterine growth restriction delays cardiomyocyte maturation and alters coronary artery function in the fetal sheep. *J Physiol* 2007;**578**:871–881.
- Morrison JL, Botting KJ, Dyer JL, Williams SJ, Thornburg KL, McMillen IC. Restriction of placental function alters heart development in the sheep fetus. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2007;**293**:R306–R313.
- Bae S, Xiao Y, Li G, Casiano CA, Zhang L. Effect of maternal chronic hypoxic exposure during gestation on apoptosis in fetal rat heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003;**285**:H983–H990.
- Rueda-Clausen CF, Morton JS, Davidge ST. Effects of hypoxia-induced intrauterine growth restriction on cardiopulmonary structure and function during adulthood. *Cardiovasc Res* 2009;**81**:713–722.
- Li G, Xiao Y, Estrella JL, Ducas CA, Gilbert RD, Zhang L. Effect of fetal hypoxia on heart susceptibility to ischemia and reperfusion injury in the adult rat. *J Soc Gynecol Invest* 2003;**10**:265–274.
- Corstius HB, Zimanyi MA, Maka N, Herath T, Thomas W, van der Laarse A, Wreford NG, Black MJ. Effect of intrauterine growth restriction on the number of cardiomyocytes in rat hearts. *Pediatr Res* 2005;**57**:796–800.
- Lim K, Zimanyi MA, Black MJ. Effect of maternal protein restriction during pregnancy and lactation on the number of cardiomyocytes in the postproliferative weanling rat heart. *Anat Rec (Hoboken)* 2010;**293**:431–437.
- Xu Y, Williams SJ, O'Brien D, Davidge ST. Hypoxia or nutrient restriction during pregnancy in rats leads to progressive cardiac remodeling and impairs postischemic recovery in adult male offspring. *FASEB J* 2006;**20**:1251–1253.
- Elmes MJ, Gardner DS, Langley-Evans SC. Fetal exposure to a maternal low-protein diet is associated with altered left ventricular pressure response to ischaemia-reperfusion injury. *Br J Nutr* 2007;**98**:93–100.
- Black MJ, Siebel AL, Gezmish O, Moritz KM, Wlodek ME. Normal lactational environment restores cardiomyocyte number after uteroplacental insufficiency: implications for the preterm neonate. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2012;**302**:R1101–R1110.
- Hales CN, Ozanne SE. The dangerous road of catch-up growth. *J Physiol* 2003;**547**:5–10.
- Singhal A, Cole TJ, Fewtrell M, Deanfield J, Lucas A. Is slower early growth beneficial for long-term cardiovascular health? *Circulation* 2004;**109**:1108–1113.
- Eriksson JG, Forsén T, Tuomilehto J, Winter PD, Osmond C, Barker DJ. Catch-up growth in childhood and death from coronary heart disease: longitudinal study. *BMJ* 1999;**318**:427–431.
- Tarry-Adkins JL, Martin-Gronert MS, Fernandez-Twinn DS, Hargreaves I, Alfaradhi MZ, Land JM, Aiken CE, Ozanne SE. Poor maternal nutrition followed by accelerated postnatal growth leads to alterations in DNA damage and repair, oxidative and nitrosative stress, and oxidative defense capacity in rat heart. *FASEB J* 2013;**27**:379–390.
- Drenckhahn JD, Schwarz QP, Gray S, Laskowski A, Kiriazis H, Ming Z, Harvey RP, Du XJ, Thorburn DR, Cox TC. Compensatory growth of healthy cardiac cells in the presence of diseased cells restores tissue homeostasis during heart development. *Dev Cell* 2008;**15**:521–533.
- Soonpaa MH, Kim KK, Pajak L, Franklin M, Field LJ. Cardiomyocyte DNA synthesis and binucleation during murine development. *Am J Physiol* 1996;**271**:H2183–H2189.
- Maillet M, van Berlo JH, Molken JD. Molecular basis of physiological heart growth: fundamental concepts and new players. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2013;**14**:38–48.
- Levkau B, Schäfers M, Wohlschlaeger J, von Wnuck Lipinski K, Keul P, Hermann S, Kawaguchi N, Kirchhof P, Fabritz L, Stypmann J, Stegger L, Flögel U, Schrader J, Fischer JW, Hsieh P, Ou YL, Mehrhof F, Tiemann K, Ghanem A, Matus M, Neumann J, Heusch G, Schmid KW, Conway EM, Baba HA. Survivin determines cardiac function by controlling total cardiomyocyte number. *Circulation* 2008;**117**:1583–1593.
- Wang KC, Zhang L, McMillen IC, Botting KJ, Duffield JA, Zhang S, Suter CM, Brooks DA, Morrison JL. Fetal growth restriction and the programming of heart growth and cardiac insulin-like growth factor 2 expression in the lamb. *J Physiol* 2011;**589**:4709–4722.
- Dong F, Ford SP, Fang CX, Nijland MJ, Nathanielsz PW, Ren J. Maternal nutrient restriction during early to mid gestation up-regulates cardiac insulin-like growth factor (IGF) receptors associated with enlarged ventricular size in fetal sheep. *Growth Horm IGF Res* 2005;**15**:291–299.
- Skurk C, Izumiya Y, Maatz H, Razeghi P, Shiojima I, Sandri M, Sato K, Zeng L, Schiekofer S, Pimentel D, Lecker S, Taegtmeyer H, Goldberg AL, Walsh K. The FOXO3a transcription factor regulates cardiac myocyte size downstream of AKT signaling. *J Biol Chem* 2005;**280**:20814–20823.
- Ni YG, Berenji K, Wang N, Oh M, Sachan N, Dey A, Cheng J, Lu G, Morris DJ, Castrillon DH, Gerard RD, Rothermel BA, Hill JA. Foxo transcription factors blunt cardiac hypertrophy by inhibiting calcineurin signaling. *Circulation* 2006;**114**:1159–1168.
- Bogdarina I, Welham S, King PJ, Burns SP, Clark AJ. Epigenetic modification of the renin-angiotensin system in the fetal programming of hypertension. *Circ Res* 2007;**100**:520–526.
- Xue Q, Dasgupta C, Chen M, Zhang L. Foetal hypoxia increases cardiac AT(2)R expression and subsequent vulnerability to adult ischaemic injury. *Cardiovasc Res* 2011;**89**:300–308.
- Haghikia A, Stapel B, Hoch M, Hilfiker-Kleiner D. STAT3 and cardiac remodeling. *Heart Fail Rev* 2011;**16**:35–47.
- Vahebi S, Ota A, Li M, Warren CM, de Tombe PP, Wang Y, Solaro RJ. p38-MAPK induced dephosphorylation of alpha-tropomyosin is associated with depression of myocardial sarcomeric tension and ATPase activity. *Circ Res* 2007;**100**:408–415.
- Braz JC, Bueno OF, Liang Q, Wilkins BJ, Dai YS, Parsons S, Braunwart J, Glascock BJ, Klevitsky R, Kimball TF, Hewett TE, Molken JD. Targeted inhibition of p38 MAPK promotes hypertrophic cardiomyopathy through upregulation of calcineurin-NFAT signaling. *J Clin Invest* 2003;**111**:1475–1486.
- Skoumal R, Tóth M, Serpi R, Rysä J, Leskinen H, Ulvila J, Saiho T, Aro J, Ruskoaho H, Szokodi I, Kerkelä R. Parthenolide inhibits STAT3 signaling and attenuates angiotensin II-induced left ventricular hypertrophy via modulation of fibroblast activity. *J Mol Cell Cardiol* 2011;**50**:634–641.
- Mir SA, Chatterjee A, Mitra A, Pathak K, Mahata SK, Sarkar S. Inhibition of signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) attenuates interleukin-6 (IL-6)-induced collagen synthesis and resultant hypertrophy in rat heart. *J Biol Chem* 2012;**287**:2666–2677.
- Beckles DL, Mascareno E, Siddiqui MA. Inhibition of Jak2 phosphorylation attenuates pressure overload cardiac hypertrophy. *Vascul Pharmacol* 2006;**45**:350–357.
- Kodama H, Fukuda K, Pan J, Makino S, Sano M, Takahashi T, Hori S, Ogawa S. Biphasic activation of the JAK/STAT pathway by angiotensin II in rat cardiomyocytes. *Circ Res* 1998;**82**:244–250.
- McWhinney CD, Hunt RA, Conrad KM, Dostal DE, Baker KM. The type I angiotensin II receptor couples to Stat1 and Stat3 activation through Jak2 kinase in neonatal rat cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 1997;**29**:2513–2524.
- Quintás-Cardama A, Kantarjian H, Cortes J, Verstovsek S. Janus kinase inhibitors for the treatment of myeloproliferative neoplasias and beyond. *Nat Rev Drug Discov* 2011;**10**:127–140.
- Oshero N, Gazit A, Gilon C, Levitzki A. Selective inhibition of the epidermal growth factor and HER2/neu receptors by tyrphostins. *J Biol Chem* 1993;**268**:11134–11142.
- Miyamoto N, Sugita K, Goi K, Inukai T, Lijima K, Tezuka T, Kojika S, Nakamura M, Kagami K, Nakazawa S. The JAK2 inhibitor AG490 predominantly abrogates the growth of human B-precursor leukemic cells with t(11q23) translocation or Philadelphia chromosome. *Leukemia* 2001;**15**:1758–1768.
- Sandberg EM, Ma X, VonDerLinden D, Godeny MD, Sayeski PP. Jak2 tyrosine kinase mediates angiotensin II-dependent inactivation of ERK2 via induction of mitogen-activated protein kinase phosphatase 1. *J Biol Chem* 2004;**279**:1956–1967.
- Arany I, Megyesi JK, Nelkin BD, Safirstein RL. STAT3 attenuates EGFR-mediated ERK activation and cell survival during oxidant stress in mouse proximal tubular cells. *Kidney Int* 2006;**70**:669–674.
- Kurdi M, Booz GW. JAK redux: a second look at the regulation and role of JAKs in the heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009;**297**:H1545–H1556.



# Preserved heart function after left ventricular pressure overload in adult mice subjected to neonatal cardiac hypoplasia

K. Heinecke<sup>1</sup>, A. Heuser<sup>1</sup>, F. Blaschke<sup>1</sup>, C. Jux<sup>2</sup>, L. Thierfelder<sup>1</sup> and J.-D. Drenckhahn<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Max-Delbrück-Center for Molecular Medicine, Berlin, Germany

<sup>2</sup>Department of Pediatric Cardiology, University Hospital Münster, Münster, Germany

Intrauterine growth restriction in animal models reduces heart size and cardiomyocyte number at birth. Such incomplete cardiomyocyte endowment is believed to increase susceptibility toward cardiovascular disease in adulthood, a phenomenon referred to as developmental programming. We have previously described a mouse model of impaired myocardial development leading to a 25% reduction of cardiomyocyte number in neonates. This study investigated the response of these hypoplastic hearts to pressure overload in adulthood, applied by abdominal aortic constriction (AAC). Echocardiography revealed a similar hypertrophic response in hypoplastic hearts compared with controls over the first 2 weeks. Subsequently, control mice develop mild left ventricular (LV) dilation, wall thinning and contractile dysfunction 4 weeks after AAC, whereas hypoplastic hearts fully maintain LV dimensions, wall thickness and contractility. At the cellular level, controls exhibit increased cardiomyocyte cross-sectional area after 4 weeks pressure overload compared with sham operated animals, but this hypertrophic response is markedly attenuated in hypoplastic hearts. AAC mediated induction of fibrosis, apoptosis or cell cycle activity was not different between groups. Expression of fetal genes, indicative of pathological conditions, was similar in hypoplastic and control hearts after AAC. Among various signaling pathways involved in cardiac hypertrophy, pressure overload induces p38 MAP-kinase activity in hypoplastic hearts but not controls compared with the respective sham operated animals. In summary, based on the mouse model used in this study, our data indicates that adult hearts after neonatal cardiac hypoplasia show an altered growth response to pressure overload, eventually resulting in better functional outcome compared with controls.

Received 9 November 2016; Revised 7 June 2017; Accepted 15 June 2017; First published online 24 July 2017

**Key words:** cardiac growth, cardiomyocyte number, developmental programming, heart size, pressure overload

## Introduction

Intrauterine growth restriction (IUGR) is generally regarded to increase susceptibility toward cardiovascular disease in adulthood,<sup>1</sup> a phenomenon referred to as fetal or developmental programming.<sup>2</sup> Various animal models of IUGR have been established to study the underlying mechanisms, including fetal hypoxia, placental insufficiency or maternal undernutrition during pregnancy.<sup>3</sup> In sheep, chronic hypoxia resulting from placental insufficiency reduces the number of cardiomyocytes in the heart.<sup>4</sup> Studies in rats have shown that IUGR induced by maternal low-protein diet (LPD) during pregnancy or placental insufficiency reduces heart weight and cardiomyocyte number in neonatal offspring.<sup>5,6</sup> Such cardiac hypoplasia is likely due to impaired cardiomyocyte proliferation in the fetal or neonatal heart upon IUGR.<sup>7–9</sup> Although heart weight and cardiomyocyte number appear to normalize during early postnatal cardiac growth in rodents,<sup>6,10</sup> the reduced complement of cells at birth is considered an important determinant of cardiovascular health in adulthood.<sup>11</sup> Indeed, rat hearts exposed to prenatal

protein restriction show various alterations during postnatal life and in adulthood under baseline conditions, including reduced left ventricular (LV) function and altered myocardial tissue composition,<sup>12</sup> increased apoptosis, increased LV wall thickness and reduced output,<sup>13</sup> and increased LV stiffening.<sup>14</sup> Importantly, isolated adult rat hearts after intrauterine LPD are more susceptible to ischemia and reperfusion (I/R) injury compared with controls on a standard diet, resulting in impaired recovery of LV contractility and increased infarct size.<sup>14,15</sup> Similarly, increased susceptibility to I/R injury was observed in offspring after fetal hypoxia.<sup>16,17</sup> Although such studies generally confirm the concept of developmental programming in the heart, the available data mainly relies on isolated and *ex vivo* perfused hearts, whereas *in vivo* data were sparse. In addition, most studies concentrate on I/R injury to investigate disease susceptibility, whereas other pathological conditions such as pressure overload or pharmacological challenges have rarely been applied.

We have previously characterized a mouse model of embryonic heart regeneration based on the heart conditional knockout (KO) of the X-linked Holocytochrome c synthase (*Hccs*) gene.<sup>18</sup> HCCS is required for normal function of the electron transport chain in mitochondria,<sup>19</sup> such that loss of HCCS activity in the developing heart results in respiratory

\*Address for correspondence: J.-D. Drenckhahn, Department of Pediatric Cardiology, University Hospital Münster, Albert-Schweitzer-Campus 1, 48149 Münster, Germany.  
 (Email Joerg.Drenckhahn@ukmuenster.de)

chain dysfunction, disturbed cardiomyocyte differentiation and reduced cell cycle activity.<sup>18</sup> The *Hccs* gene is subject to random X chromosome inactivation, a process that permanently and irreversibly silences one of the two X chromosomes in mammalian female cells in order to normalize gene dosage compared with males.<sup>20</sup> Consequently, in female mice heterozygous for the cardiac *Hccs* KO (hereafter referred to as *cHccs*<sup>+/-</sup>), approximately 50% of cardiomyocytes keep the defective X chromosome active and develop mitochondrial dysfunction while the other 50% inactivate the mutated X and remain unaffected. This leads to a tissue mosaic of 50% healthy and 50% HCCS deficient cardiomyocytes in the mid-gestational *cHccs*<sup>+/-</sup> myocardium, but the contribution of HCCS deficient cells decreases to 10% at birth. This regeneration of the pre-natal heart is mediated by increased proliferation of the healthy cardiac cell population, which compensate for the defective cells and build up a fully functional organ.<sup>18</sup> It is important to note that the vast majority ( $\geq 90\%$ ) of cardiomyocytes in the postnatal *cHccs*<sup>+/-</sup> heart is uncompromised. Inactivation of one X chromosome is the physiological state in female cells, such that silencing of the defective X does not affect *Hccs* gene dosage. We have subsequently shown that prenatal compensatory proliferation of healthy cells is insufficient to completely build up a heart. Neonatal *cHccs*<sup>+/-</sup> females exhibit cardiac hypoplasia characterized by reduced heart size and a 25% reduction in cardiomyocyte numbers compared with controls.<sup>21</sup> Although heart size is normalized until early adulthood, we did not find evidence for a postnatal normalization of cardiomyocyte number. The latter would require increased cardiomyocyte proliferation, which was not detected in *cHccs*<sup>+/-</sup> hearts at any postnatal stage.<sup>21</sup> Furthermore, cardiomyocyte size is increased in adult *cHccs*<sup>+/-</sup> hearts in the absence of increased heart weight or LV mass, and this compensatory cardiomyocyte hypertrophy cannot be maintained in ageing *cHccs*<sup>+/-</sup> hearts resulting in reduced heart weight with age, likely due to a persistently reduced cardiomyocyte number throughout life.<sup>21</sup> We therefore concluded that postnatal normalization of heart weight in *cHccs*<sup>+/-</sup> hearts is mediated by accelerated hypertrophic growth of cardiomyocytes but not normalization of cell number.

Given that a reduced cardiomyocyte complement after IUGR is proposed to contribute to developmental programming in the heart, we speculated that the *cHccs*<sup>+/-</sup> mouse model might help to better understand the latter. Importantly, however, there are considerable differences between conditional genetic models, like *cHccs*<sup>+/-</sup> mice, and animal models of IUGR. Maternal LPD during pregnancy, fetal hypoxia or placental insufficiency all have systemic effects on the fetal organism, such that alterations in other organs impact on the heart (as e.g. by inducing hypertension in adulthood).<sup>2,3</sup> Instead, the *cHccs*<sup>+/-</sup> model provides an organ-specific impairment of heart development. Birth weight is normal in *cHccs*<sup>+/-</sup> mice,<sup>21</sup> such that growth and stress response in the adult heart can be investigated without confounding secondary effects induced by other organ systems. We therefore believe that the heart conditional *Hccs* KO model could complement classical IUGR animal studies to better understand fetal

programming specifically in the heart. We have previously shown that adult *cHccs*<sup>+/-</sup> females show significant cellular and molecular alterations when challenged by chronic angiotensin II (Ang II) infusion.<sup>21</sup> To further clarify how hypoplastic *cHccs*<sup>+/-</sup> hearts cope with different challenges in adulthood, in the current study we applied LV pressure overload by abdominal aortic constriction (AAC).

## Materials and methods

### Heart conditional *Hccs* KO mice

The generation and characterization of heart conditional *Hccs* KO mice has been described previously.<sup>18</sup> In brief, 'floxed' (fl) *Hccs* mice were bred to mice expressing Cre recombinase under the control of the *Nkx2.5* promoter. All mice were maintained on a mixed 129Sv/C57Bl6 genetic background and all experiments were performed on heterozygous *Hccs* KO females (*Hccs*<sup>fl/+</sup>/*Nkx2.5Cre*, referred to as *cHccs*<sup>+/-</sup>) and Cre positive female controls (*Hccs*<sup>+/+</sup>/*Nkx2.5Cre*, referred to as *Hccs*<sup>+/+</sup>).

### Surgery and echocardiography

AAC was performed on 10-week-old mice for a period of 4 weeks with echocardiographic measurements immediately before the intervention (baseline) as well as after 2 and 4 weeks [*Hccs*<sup>+/+</sup> *n* = 6 (three pairs of littermates from three different litters), *cHccs*<sup>+/-</sup> *n* = 6 (each mouse from a different litter)]. For surgery, animals were anaesthetized by 2% isoflurane inhalation. The abdominal cavity was opened by a midline incision, the abdominal organs placed to the right and the aorta dissected from the retroperitoneum. The constriction was placed at the suprarenal level by a 6.0 silk suture tied around a blunt 27-gauge needle. The needle was then removed immediately to restore blood flow. Ultrasound measurements of the aortic diameter 2 weeks after surgery confirmed a ~50% narrowing at the site of ligation in all animals. Sham operated animals underwent all surgical and echocardiography procedures but did not receive a ligature [*Hccs*<sup>+/+</sup> *n* = 3 (each mouse from a different litter), *cHccs*<sup>+/-</sup> *n* = 3 (one individual mouse and one pair of littermates from two different litters)]. The same three sham operated mice per genotype were used for all experiments throughout the study. For analgesia, animals received Carprofen [5 mg/kg body weight (BW)] before surgery as well as for the following 3 days. Mice were euthanized by cervical dislocation and hearts prepared 1 day after the final echocardiography.

Echocardiography was performed using a VisualSonics Vevo 2100 high frequency ultrasound system. Measurements were performed on anesthetized mice (2% isoflurane inhalation) and body temperature was kept constant at 37°C using a heat lamp and a rectal temperature probe.

Investigators performing echocardiography and surgery were blinded for mouse genotypes and treatment groups during data acquisition and analysis. All animal procedures were performed following institutional guidelines and had previously been

approved by the responsible authorities [Landesamt für Gesundheit und Soziales (LaGeSo), Berlin, approval number G 0191/06].

### **Histology and assessment of myocardial fibrosis**

Hearts were excised, rinsed in cold phosphate buffered saline (PBS) and fixed in 4% paraformaldehyde/PBS for 48 h. The tissue was subsequently dehydrated through an increasing ethanol series, cleared in toluol and embedded in paraffin; 5 µm paraffin sections were stained with hematoxylin & eosin (Roth) to assess overall cardiac morphology and tissue composition or with Sirius Red (Sigma) to visualize myocardial fibrosis. For quantification of interstitial fibrosis the entire LV myocardium of two non-adjacent sections was imaged at 5× magnification (using a Keyence BZ-8100E microscope) and the fibrotic (i.e. pink) area was measured using ImageJ analyses software (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Perivascular fibrosis was excluded. Fibrosis was calculated as the percentage of the fibrotic area in relation to the total area of myocardial tissue.

### **Evaluation of cardiomyocyte size**

To determine cardiomyocyte size, paraffin sections were stained with fluorescence conjugated wheat germ agglutinin (WGA Alexa Fluor 555; Invitrogen) to visualize cell membranes while nuclei were stained with 4',6-Diamidino-2-Phenylindole (DAPI) (Invitrogen). Subendocardial areas of the left ventricle from two non-adjacent sections per heart were imaged at 20× magnification using fluorescence microscopy (Keyence BZ-8100E). For each heart, 200 circular or symmetrically shaped cardiomyocytes with visible nuclei were selected to measure their cross-sectional area (CSA) (using Keyence BZ image analysis software) and the mean cell size was calculated for each heart.

### **Evaluation of cell death**

Apoptotic cells were detected on paraffin sections using Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) assay (ApopTag Fluorescein Apoptosis Detection Kit; Merck Millipore) according to the manufacturer's instructions. Nuclei were stained with DAPI. The LV myocardium of two non-adjacent sections per heart was imaged at 2.5× magnification using an Axio Scope.A1 fluorescence microscope (Zeiss) and the entire LV tissue area was measured using ZEN blue software (Zeiss). The average nuclear density per mm<sup>2</sup> tissue was calculated for each section by manually counting the number of nuclei on three randomly selected high-powered fields (40× magnification) within a defined LV tissue area (using ImageJ). Based on nuclear density per mm<sup>2</sup> and the overall LV tissue area, the total number of LV nuclei could be estimated for each section. TUNEL positive nuclei were counted manually and related to the total number of nuclei.

### **Evaluation of cell proliferation**

Paraffin sections were deparaffinized, rehydrated and heat mediated antigen retrieval was performed in sodium citrate buffer (10 mM, pH 6.0) for 20 min. After blocking in antibody

solution containing 5% normal goat serum for 1 h, Ki67 (Thermo Scientific RM-9106) and troponin T (Developmental Studies Hybridoma Bank, CT3) primary antibodies were applied at 4°C over night. Secondary antibody detection was performed at room temperature for 1 h using Alexa 555 goat anti-rabbit and Alexa 488 goat anti-mouse antibodies (Invitrogen). Nuclei were stained with DAPI and sections were mounted in Prolong Gold antifade reagent (Invitrogen). The LV and interventricular septum (IVS) myocardium of two non-adjacent cross-sections was imaged at 20× magnification (resulting in ~40 random fields per heart). Ki67 positive nuclei were manually counted using ImageJ software and related to the total number of DAPI stained nuclei.

### **Western blot analyses and quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR)**

Western blot and qRT-PCR procedures have been described previously<sup>21</sup> and are furthermore available in the Supplementary Material (including details about antibodies and primer sequences).

### **Statistical analyses**

Differences between two groups were analyzed using unpaired, two-tailed Student's *t*-test. Differences between multiple groups were determined using one-way ANOVA followed by Bonferroni's *post-hoc* test. Echocardiography data from the same groups of animals at different time points were analyzed using two-way ANOVA for repeated measures. For animal studies of developmental programming it is recommended to use only one representative male and/or female per litter in order to compensate for differences in intrauterine or postnatal conditions between mice from different litters or within the same litter.<sup>22</sup> If more than one mouse per litter is used, this should be accounted for in the statistical analyses.<sup>22</sup> Thus, for all echocardiography and histological data additional analyses using mean values per litter were performed (see Supplementary Tables S4 and S5). All data are presented as mean ± standard error of the mean (S.E.M.). A probability value of *P* < 0.05 was considered to indicate statistical significance (\**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01, \*\*\**P* < 0.001).

## **Results**

### **Pressure overload results in increased LV mass and wall thickness in *cHccs*<sup>+/-</sup> hearts compared with controls**

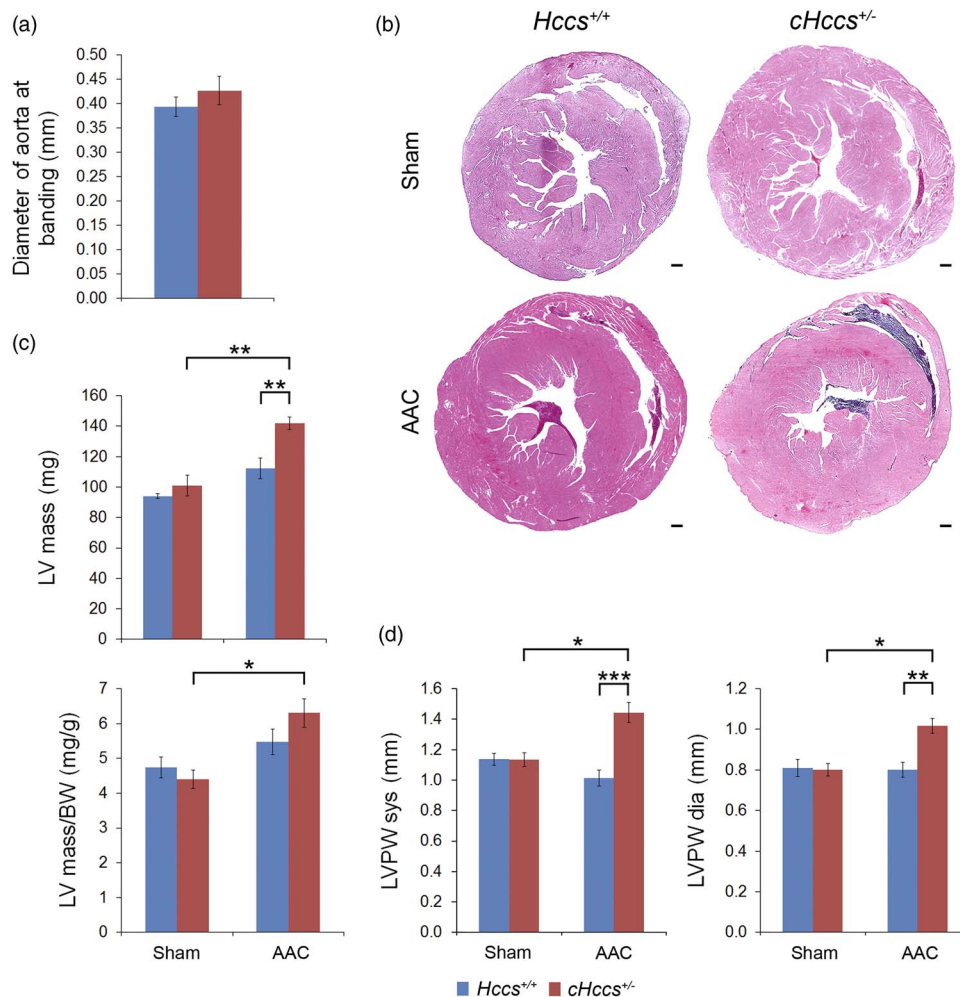
We applied pressure overload by suprarenal constriction of the abdominal aorta in 10-week-old *cHccs*<sup>+/-</sup> and control female mice for the duration of 4 weeks. Sham operated animals of both genotypes were included in the study to account for changes induced by the operation procedure. Echocardiography was recorded before as well as 2 and 4 weeks after the intervention. At the 2 week time point we furthermore assessed the degree of aortic constriction by ultrasound measurements, which confirmed that the aortic diameter at the site of banding was identical in both groups (Fig. 1a and Supplementary

Fig. S1). After 4 weeks AAC  $cHccs^{+/-}$  females showed significantly increased LV mass (calculated from echocardiography data) as well as LV mass normalized to BW when compared with their respective sham group (Fig. 1b and 1c and Supplementary Table S2). Interestingly, LV mass and LV mass/BW ratio were mainly unchanged in AAC *v.* sham controls, resulting in increased LV mass in  $cHccs^{+/-}$  compared with control females after AAC (Fig. 1c). These differences in heart size were also reflected by LV wall thickness, which was significantly increased in  $cHccs^{+/-}$  hearts 4 weeks after AAC compared with controls as well as compared with the  $cHccs^{+/-}$  sham group (Fig. 1b and 1d and Supplementary Table S1). In contrast, wall thickness was not different in AAC compared with sham controls after 4 weeks. Thus, in response to pressure overload

$cHccs^{+/-}$  females exhibit a more pronounced or sustained hypertrophic response of the LV myocardium compared with control animals.

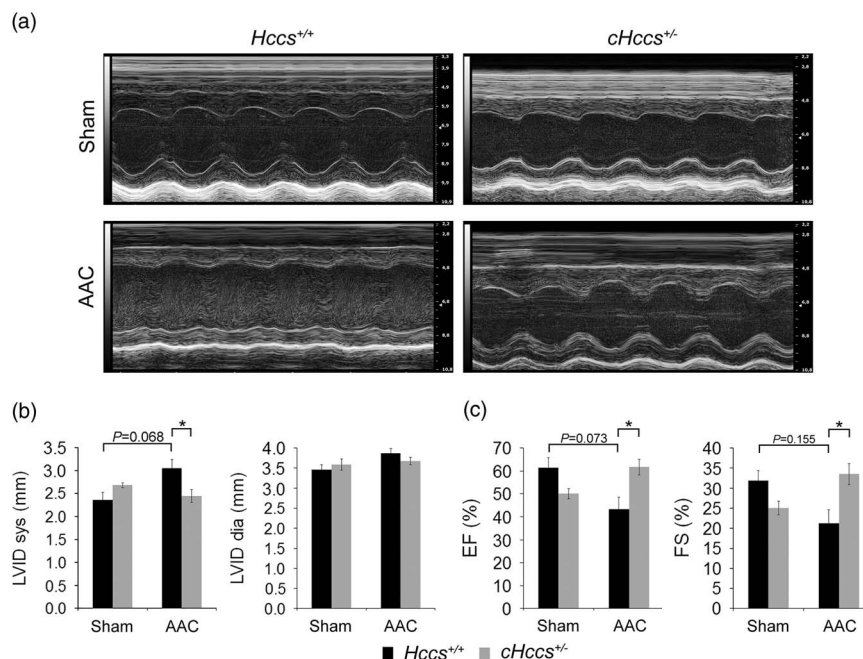
**Pressure overload reduces LV contractility in controls but not  $cHccs^{+/-}$  hearts**

Given the marked differences in LV mass and wall thickness between control and  $cHccs^{+/-}$  females 4 weeks after AAC, we investigated LV internal diameter (LVID) and contractility in echocardiography recordings. Compared with sham operated animals, control hearts developed a slight increase in systolic but not diastolic LVID after 4 weeks AAC, which, however, did not reach statistical significance. In contrast, LVID was not altered in  $cHccs^{+/-}$  hearts after AAC when compared with the



**Fig. 1.** Left ventricular (LV) mass and wall thickness are increased in heterozygous cardiac Holocytochrome c synthase knockout ( $cHccs^{+/-}$ ) hearts compared with controls 4 weeks after abdominal aortic constriction (AAC). (a) Ultrasound measurements 2 weeks after AAC revealed a similar diameter of the abdominal aorta at the site of banding in both genotypes ( $n = 6$ ). (b) Cardiac cross-sections revealed increased LV wall thickness in  $cHccs^{+/-}$  hearts compared with controls 4 weeks after AAC. Total cardiac dimensions are mainly preserved in all groups (hematoxylin & eosin staining, scale bar = 300  $\mu$ m). (c) LV mass calculated from echocardiography data as well as LV mass normalized to body weight is increased in  $cHccs^{+/-}$  females after 4 weeks AAC when compared with the respective sham group. In controls both parameters are only slightly increased after AAC compared with sham operated mice. (d) Echocardiography revealed that LV wall thickness [LV posterior wall (LVPW)] in systole (sys) as well as diastole (dia) is increased in  $cHccs^{+/-}$  females 4 weeks after AAC compared with controls as well as the respective sham group ( $n = 3$  for sham groups and  $n = 6$  for AAC groups in (c) and (d), \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ ).





**Fig. 2.** Preserved left ventricular (LV) contractility and diameter in heterozygous cardiac Holocytochrome c synthase knockout (*cHccs*<sup>+/-</sup>) hearts compared with controls 4 weeks after abdominal aortic constriction (AAC). (a) M-mode echocardiography recordings 4 weeks after AAC or sham operation, respectively, indicate reduced LV contractility in controls but not *cHccs*<sup>+/-</sup> females when exposed to pressure overload. (b) LV internal diameter (LVID) in systole (sys) but not diastole (dia) is increased in controls compared with *cHccs*<sup>+/-</sup> females after AAC. (c) Reduced LV function assessed by ejection fraction (EF) and fractional shortening (FS) in control animals compared with *cHccs*<sup>+/-</sup> females 4 weeks after AAC ( $n = 3$  for sham groups and  $n = 6$  for AAC groups in (b) and (c),  $*P < 0.05$ ).

respective sham group (Fig. 2a and 2b), resulting in a significantly smaller systolic but not diastolic LVID in *cHccs*<sup>+/-</sup> females compared with controls after AAC. These data suggest that neither control nor *cHccs*<sup>+/-</sup> animals exhibit overall cardiac dilation associated with heart failure, which normally coincides with increased diastolic LVID. In contrast, control but not *cHccs*<sup>+/-</sup> mice appear to develop systolic contractile dysfunction as a result of pressure overload, as inferred from increased systolic LVID when comparing AAC groups (Fig. 2b and Supplementary Table S3). Indeed, whereas control animals show a clear trend toward reduced ejection fraction (EF) and fractional shortening (FS) 4 weeks after AAC compared with their respective sham group, both parameters were not altered (or even slightly increased) in *cHccs*<sup>+/-</sup> females (Fig. 2a and 2c and Supplementary Table S3). Consequently, the latter show a significantly better LV function after AAC compared with controls (Fig. 2c). Taken together, whereas control hearts develop systolic dysfunction after 4 weeks of pressure overload, *cHccs*<sup>+/-</sup> females fully maintain LV dimensions resulting in uncompromised contractility.

#### ***LV hypertrophy, internal diameter and contractility are well maintained in *cHccs*<sup>+/-</sup> females during pressure overload***

To more dynamically investigate the response of control and *cHccs*<sup>+/-</sup> hearts to pressure overload over time, we performed longitudinal analyses of echocardiography data before as well as 2 and 4 weeks after AAC on the same group of animals. These

data revealed that hypertrophic growth of both control and *cHccs*<sup>+/-</sup> hearts is similar over the first 2 weeks, resulting in significantly increased LV mass and LV mass/BW ratios compared with baseline levels (Fig. 3a and Supplementary Table S2). However, LV mass as well as wall thickness decline in controls between 2 and 4 weeks, such that wall thickness returns to baseline values (Fig. 3b). The latter might indicate wall thinning at the onset of LV dilation as a result of persistent pressure overload. In contrast, hypertrophy parameters are well maintained or even further increase in *cHccs*<sup>+/-</sup> females during the same period, resulting in significant differences between genotypes 4 weeks after AAC (Fig. 3a and 3b). Similarly, LVID as well as contractility do not differ between genotypes over the first 2 weeks of pressure overload, but both FS and EF significantly deteriorate in controls between 2 and 4 weeks. In contrast, LVID and LV contractility is constant in *cHccs*<sup>+/-</sup> females over the full 4-week period (Fig. 3c and 3d and Supplementary Table S3). In summary, whereas control hearts show mild but significant LV dysfunction after 4 weeks AAC, *cHccs*<sup>+/-</sup> females can fully compensate cardiac stress by pressure overload resulting in significantly better outcome.

#### ***Cardiomyocyte hypertrophy is attenuated in *cHccs*<sup>+/-</sup> females in response to LV pressure overload***

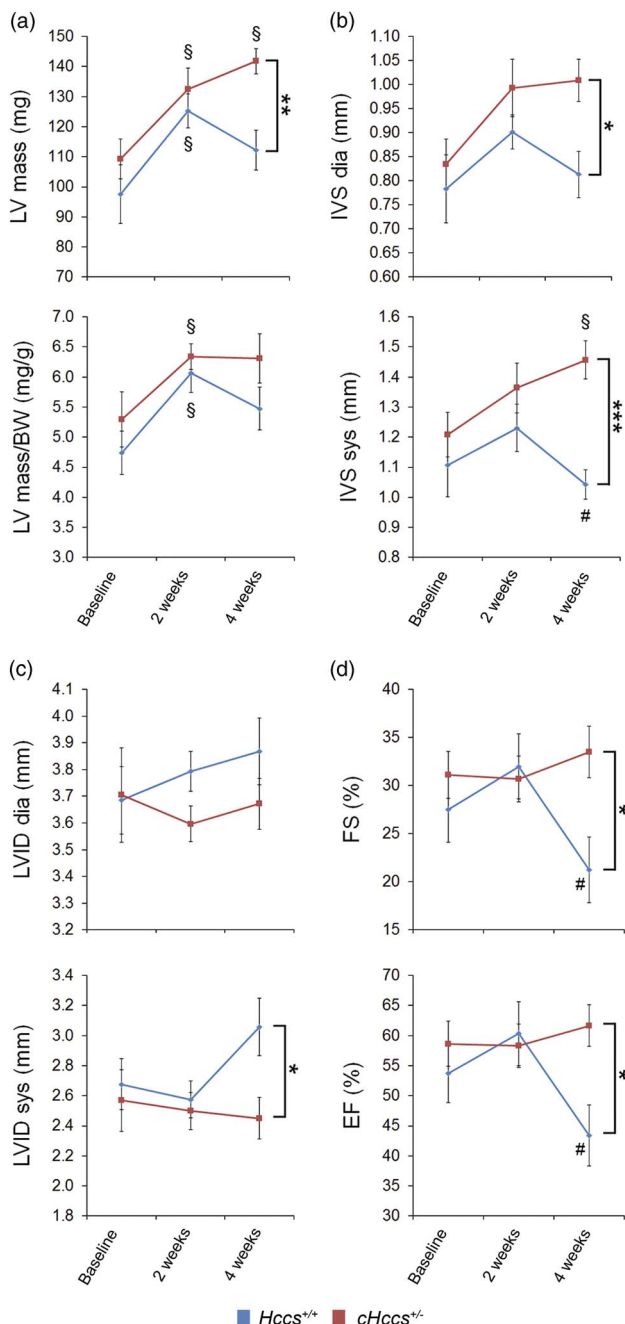
To investigate whether the better functional outcome of *cHccs*<sup>+/-</sup> females compared with controls 4 weeks after AAC is

reflected by differences in myocardial tissue composition or remodeling, we analysed cardiomyocyte size in LV tissue sections by determining their CSA. In sham operated mice, cell size is increased in  $cHccs^{+/-}$  hearts compared with controls, as previously reported for untreated animals.<sup>21</sup> Surprisingly, this difference is no longer observed after AAC, such that CSA is similar between the genotypes (Fig. 4a and 4b). This is due to an attenuated hypertrophic response in  $cHccs^{+/-}$  hearts, which show a slight but non-significant increase in cell size when comparing AAC and sham operated animals. In contrast, CSA significantly increases in control hearts after pressure overload

(Fig. 4a and 4b). To further evaluate pathological myocardial remodeling in both genotypes after AAC, we visualized extracellular matrix deposition and quantified interstitial fibrosis within the LV myocardium. Sham operated animals did not show differences between genotypes and AAC induces LV fibrosis to a similar extent and to comparable levels in both  $cHccs^{+/-}$  and control hearts (Fig. 5a and 5b). In conclusion, reduced LV function in controls after AAC coincides with a more pronounced cardiomyocyte hypertrophy compared with  $cHccs^{+/-}$  hearts, whereas fibrosis as a parameter of pathological myocardial tissue remodeling is not different between genotypes.

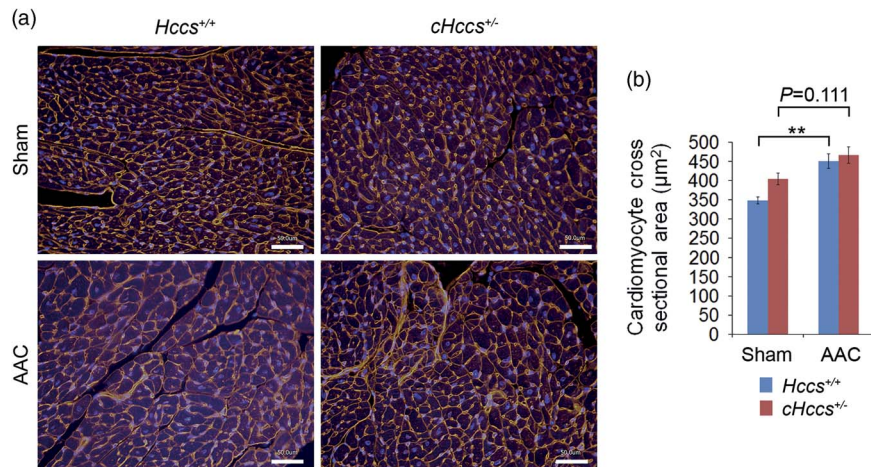
### Programmed cell death and proliferation are unaltered in $cHccs^{+/-}$ hearts upon pressure overload

The seemingly contradictory findings of increased LV mass and wall thickness (Fig. 1) but similar cardiomyocyte size in  $cHccs^{+/-}$  hearts compared with controls after AAC (Fig. 4) could indicate a progressive cardiomyocyte loss in controls but not  $cHccs^{+/-}$  females over the 4-week period. This might also explain a regression in LV mass in AAC controls between 2 and 4 weeks to the level of sham controls despite a significantly increased cell size after 4 weeks pressure overload. To address this question, we determined programmed cell death (apoptosis) by TUNEL staining in the LV myocardium. No differences in apoptosis rates were detected between genotypes or treatment groups (Fig. 6a). In addition, we have previously shown that cardiac stress imposed by chronic Ang II infusion increases proliferation of the non-myocyte cell population in  $cHccs^{+/-}$  hearts compared with controls.<sup>21</sup> Here we show that such proliferative response is not observed upon pressure overload, as revealed by unaltered numbers of cycling (determined by immunofluorescence for Ki67) interstitial cells in both  $cHccs^{+/-}$  and control hearts after AAC compared with sham operated controls (Fig. 6b). These data furthermore suggest that AAC

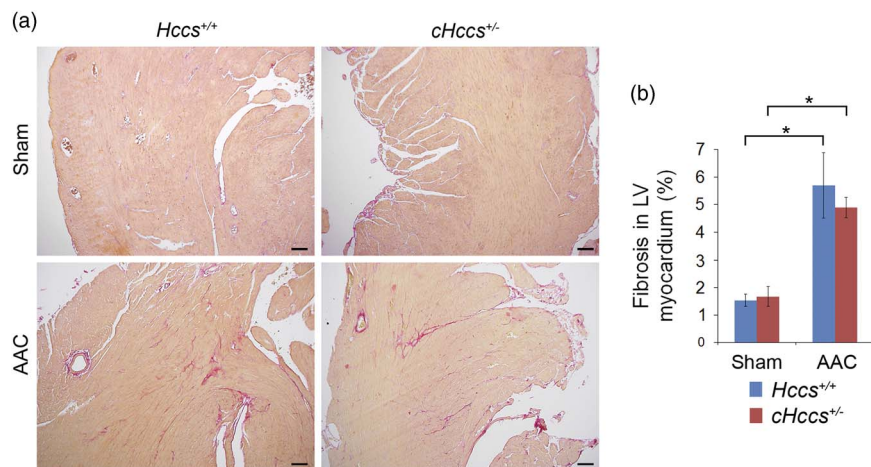


**Fig. 3.** Longitudinal echocardiography measurements of left ventricular (LV) dimensions and function over the 4 weeks abdominal aortic constriction (AAC) period. (a) Absolute LV mass and LV mass normalized to body weight similarly increase in both genotypes during the first 2 weeks after AAC compared with baseline levels. Between 2 and 4 weeks LV mass declines in controls but not heterozygous cardiac Holocytochrome c synthase knockout ( $cHccs^{+/-}$ ) females. (b) In parallel to LV mass, interventricular septum (IVS) thickness increases in both genotypes over the first 2 weeks after AAC, but declines thereafter in controls only. (c) Whereas LV internal diameter (LVID) in diastole (dia) is not different between genotypes or compared with baseline levels over the full 4-week period, LVID in systole (sys) increases in controls but not  $cHccs^{+/-}$  females between 2 and 4 weeks of AAC. (d) LV contractility is fully preserved in  $cHccs^{+/-}$  hearts during the 4-week period of pressure overload. In contrast, LV function is maintained in controls over the first 2 weeks but significantly decreases thereafter ( $n = 6$  per genotype, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , § $P < 0.05$  compared with baseline, # $P < 0.05$  compared with 2 weeks).





**Fig. 4.** Cardiomyocyte hypertrophy is attenuated in heterozygous cardiac Holocytochrome c synthase knockout (*cHccs*<sup>+/-</sup>) hearts compared with controls 4 weeks after abdominal aortic constriction (AAC). (a) Fluorescence microscopy images of cross-sectioned cardiomyocytes within the left ventricular (LV) myocardium 4 weeks after AAC or sham operation, respectively. Cell membranes are stained in red (using wheat germ agglutinin) and nuclei are stained in blue (scale bar = 50 μm). (b) Cardiomyocyte cross-sectional area is significantly increased in control hearts after AAC when compared with the respective sham group. In contrast, cell size slightly increases in *cHccs*<sup>+/-</sup> females in response to pressure overload, but this does not reach statistical significance when compared with the sham group (*n* = 3 for sham groups and *n* = 5 for AAC groups, \*\**P* < 0.01).



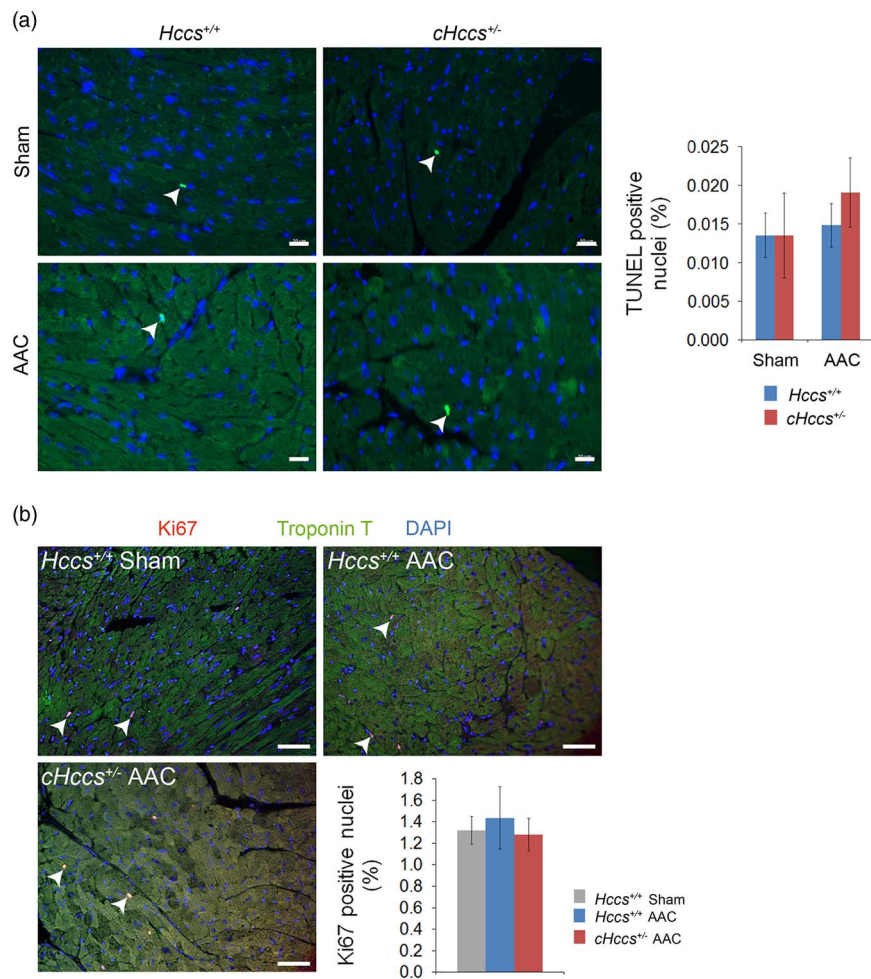
**Fig. 5.** Induction of myocardial fibrosis in response to pressure overload is not different between heterozygous cardiac Holocytochrome c synthase knockout (*cHccs*<sup>+/-</sup>) and control hearts. (a) 4 weeks after abdominal aortic constriction (AAC) or sham operation fibrosis within the left ventricular (LV) myocardium is detected using Sirius Red staining, which marks extracellular matrix and collagen deposition in pink while the remaining myocardium is stained in yellow (scale bar = 100 μm). (b) Quantification of interstitial fibrosis in the LV myocardium revealed that it is significantly induced in both *cHccs*<sup>+/-</sup> and control hearts in response to pressure overload (when comparing AAC and sham groups), but no difference was observed between genotypes (*n* = 3 for sham groups and *n* = 6 for AAC groups, \**P* < 0.05).

induced differences in LV mass between controls and *cHccs*<sup>+/-</sup> mice are unlikely to be caused by excessive proliferation of a non-myocyte cell population.

#### Activation of p38 MAP-kinase in *cHccs*<sup>+/-</sup> hearts after AAC

Altered tissue remodeling in response to pressure overload might be accompanied by differential expression of the fetal gene program that is reactivated by pathological conditions in

the heart. We therefore analysed RNA expression of atrial natriuretic factor (*Nppa*), brain natriuretic peptide (*Nppb*) and β-myosin heavy chain (*Mylh7*) in hearts 4 weeks after AAC, but did not find differences between *cHccs*<sup>+/-</sup> and control females (Fig. 7a). In combination with a similar induction of myocardial fibrosis by AAC in both genotypes (Fig. 5), certain aspects of the response of *cHccs*<sup>+/-</sup> hearts to pressure overload appear to be comparable to controls, but differences occur in the regulation of cardiomyocyte hypertrophy (Fig. 4).



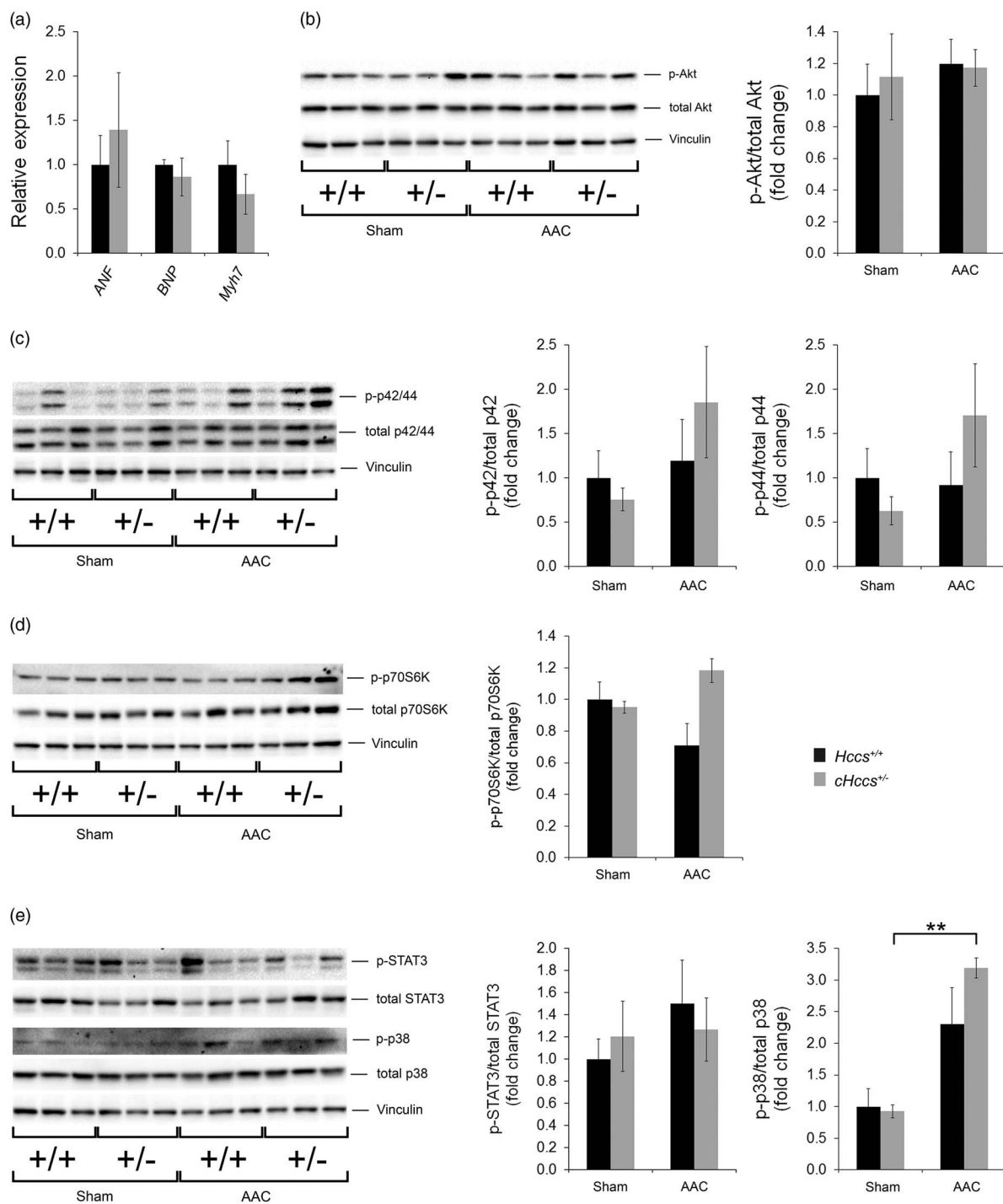
**Fig. 6.** Apoptosis and cell proliferation are not differentially regulated by pressure overload in heterozygous cardiac Holocytochrome c synthase knockout (*cHccs*<sup>+/-</sup>) compared with control hearts. (a) Apoptosis in the left ventricular (LV) myocardium was detected by TUNEL staining 4 weeks after abdominal aortic constriction (AAC) or sham operation. Nuclei are stained in blue using 4',6-Diamidino-2-Phenylindole (DAPI). Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) positive nuclei were identified by green fluorescence co-localized with DAPI staining (see arrowheads). Apoptosis rates were not different between genotypes or treatment groups ( $n = 3$  for sham groups and  $n = 5$  for AAC groups, scale bar = 20  $\mu$ m). (b) Immunofluorescence staining for the cell cycle marker Ki67 (in red) and the cardiomyocyte marker troponin T (in green) detected proliferating cells within the LV myocardium 4 weeks after AAC or sham operation. Cycling cells are located between troponin T positive cardiomyocytes, indicating their non-myocyte identity (see arrowheads, nuclei are stained in blue, scale bar = 50  $\mu$ m). Quantification of Ki67 positive cells revealed no difference between AAC or sham operated controls or between *cHccs*<sup>+/-</sup> and control hearts 4 weeks after AAC ( $n = 3$  for sham controls and  $n = 6$  for AAC groups).

Differences in the cardiomyocyte growth response upon pressure overload could be due to alterations in intracellular signaling associated with cardiac hypertrophy. Consequently, we analysed a subset of the underlying pathways with a special focus on those that have previously been shown to be differentially regulated in *cHccs*<sup>+/-</sup> *v.* control hearts.<sup>21</sup> Whereas phosphorylation of Akt (Fig. 7b), p42/p44 MAP-kinases (Erk1/2) (Fig. 7c) and the mTORC1 downstream target p70S6K (Fig. 7d) was not different between genotypes 4 weeks after AAC, phosphorylation of p38 MAP-kinase was increased in *cHccs*<sup>+/-</sup> hearts compared with the respective sham operated group (Fig. 7e). We have previously shown that exaggerated cardiomyocyte growth in *cHccs*<sup>+/-</sup> hearts upon Ang II infusion

depends on JAK/STAT3 signaling.<sup>21</sup> Here we show that STAT3 phosphorylation in the heart is not different between genotypes 4 weeks after AAC (Fig. 7e, see Supplementary Discussion). In conclusion, activation of p38 MAP-kinase might be involved in restricting cardiomyocyte growth in *cHccs*<sup>+/-</sup> hearts in response to pressure overload.

## Discussion

The intrauterine environment determines susceptibility toward cardiovascular disease in adulthood, which is proposed to involve a reduced cardiomyocyte complement in growth restricted neonates. Using heart conditional *Hccs* KO mice,



**Fig. 7.** Investigation of signaling pathways involved in cardiomyocyte growth in heterozygous cardiac Holocytochrome c synthase knockout (*cHccs*<sup>+/-</sup>) compared with control hearts after abdominal aortic constriction (AAC). (a) RNA expression of the fetal genes atrial natriuretic factor (ANF, *Nppa*), brain natriuretic peptide (BNP, *Nppb*) and  $\beta$ -myosin heavy chain (*Myh7*) is not different in *cHccs*<sup>+/-</sup> compared with control hearts after AAC (quantitative real-time PCR data,  $n = 6$ /genotype). (b) Phosphorylation of Akt Ser473 ( $n = 4$ –6/group), (c) p42/44 MAP-kinase Thr202/Tyr204 ( $n = 3$ –4) and (d) the mTORC1 downstream target p70 S6 kinase Thr389 ( $n = 3$ ) is not significantly different between genotypes or treatment groups. (e) Whereas phosphorylation of STAT3 Tyr705 ( $n = 4$ –6/group) is not different between groups, phosphorylation of p38 MAP-kinase Thr180/Tyr182 ( $n = 3$ ) is significantly increased in *cHccs*<sup>+/-</sup> hearts 4 weeks after AAC compared to sham operated animals (\*\* $P < 0.01$ ).



which exhibit a 25% reduction in cardiomyocyte number at birth,<sup>21</sup> we show here that such hypoplastic hearts have a better functional outcome after pressure overload in adulthood compared with controls. We certainly do not claim the *Hccs* KO model to mimic or replace other IUGR models. *cHccs*<sup>+/-</sup> mice are not generally growth restricted and exhibit normal birth weight,<sup>21</sup> thereby lacking a hallmark of IUGR. Nevertheless, the impairment of heart development results in a phenotype very similar to IUGR, that is cardiac hypoplasia at birth. Given the various organism-wide alterations induced by IUGR and the resulting complexity of adult outcomes, animal models of organ-specific growth impairment could be useful to dissect the mechanisms of developmental programming. We therefore believe that the heart conditional *Hccs* KO model could help to generate new hypotheses regarding fetal programming in the heart which should subsequently be validated in classical IUGR animal studies.

Our previous study has shown that in adult *cHccs*<sup>+/-</sup> hearts the consequences of neonatal cardiac hypoplasia can be functionally compensated, such that upon Ang II stress LV contractility is not different from controls.<sup>21</sup> Using chronic LV pressure overload we show here, that control mice exhibit reduced LV contractility after 4 weeks, whereas LV function was unaltered in *cHccs*<sup>+/-</sup> hearts over the full AAC period. This unexpected finding raises the interesting hypothesis, that the *cHccs*<sup>+/-</sup> heart might be preconditioned and better equipped to response to pressure overload than the normally developed heart. Alterations in stress response of the hypoplastic *cHccs*<sup>+/-</sup> heart in adulthood appear to converge on cardiomyocyte growth control but not pathological tissue remodeling, given that no differences in fibrosis or fetal gene expression were observed compared with controls after AAC (this study) or Ang II.<sup>21</sup> Therefore, in *cHccs*<sup>+/-</sup> mice aberrant prenatal cardiac development potentially preserves or programs a beneficial growth plasticity which allows a better outcome after pressure overload. Certainly, it will have to be established whether such 'fetal preconditioning' is also observed in classical IUGR models or whether it is specific to *cHccs*<sup>+/-</sup> hearts. Preconditioning has been well established in the context of myocardial ischemia, where short exposures of the heart to hypoxic conditions reduce myocardial damage after a subsequent prolonged ischemic period.<sup>23</sup> IUGR does not seem to provide ischemic protection, given that a multitude of studies have shown increased susceptibility of restricted offspring to I/R injury in adulthood.<sup>14-17</sup> But this might be different for challenges not primarily associated with acute and large scale tissue damage and cell loss. Programming of cardiomyocyte growth plasticity could allow for better adaptation to challenges requiring a hypertrophic response. In this regard, disturbing cell growth by certain postnatal risk factors or drugs might be fatal in the developmentally impaired heart. Given that fetal programming has been proposed to permanently alter cellular metabolism after birth,<sup>24,25</sup> it is also possible that IUGR induces a metabolic profile in the adult heart that is beneficial under certain stress conditions. In this regard, the postnatal

heart switches from fatty acid and glucose oxidation to glycolysis upon stress, thereby returning to a fetal metabolic program that is thought to be protective.<sup>26</sup> In summary, alterations of intrauterine development and growth could precondition the heart for certain pathological stimuli during postnatal life, thereby mediating a beneficial effect. Such an idea would certainly contradict the basic principles of fetal programming, which assume that disease susceptibility is increased by intrauterine insults. Nevertheless, our data urge for future studies investigating this hypothesis in classical animal models of IUGR.

A reduced cardiomyocyte complement in the postnatal heart is believed to increase disease susceptibility by decreasing the ability to respond and adapt to pathological conditions.<sup>11</sup> In support of this notion, heart conditional inactivation of the mitochondrial apoptosis regulator survivin (BIRC5) results in a reduction in cardiomyocyte number and survivin KO mice develop spontaneous heart failure in adulthood even without a specific challenge.<sup>27</sup> Similarly, mice heterozygous for a KO of the cardiac transcription factor GATA4 show a cardiomyocyte deficit in the fetal heart and postnatally develop mild LV dysfunction under physiological conditions. Importantly, upon pressure overload these mice exhibit more severe contractile dysfunction compared with controls.<sup>28</sup> It is important to consider, however, that in KO models of autosomal genes described above the functional consequences of the genetic alteration persists in cardiomyocytes throughout life. Even in heterozygous KO animals permanently reduced gene dosage (e.g. haploinsufficiency) or dominant-negative effects could disturb the adaptive capacity of the heart upon pathological conditions. In contrast, transcriptional silencing of one X chromosome occurs physiologically in mammalian female cells in order to compensate gene dosage compared with males.<sup>20</sup> One active copy of the *Hccs* gene is the normal state, such that cardiomyocytes in *cHccs*<sup>+/-</sup> hearts, which inactivated the X chromosome harboring the mutated *Hccs* allele, are uncompromised. Therefore, the vast majority (≥90%) of cardiomyocytes in *cHccs*<sup>+/-</sup> females are *per se* healthy and able to utilize the complete program of adaptive growth or stress response. This resembles the situation in most IUGR models, in which the prenatal insult is released after birth such that programming of a more flexible metabolism and growth plasticity could be beneficial under certain conditions.

We acknowledge certain limitations of the data reported here. Due to the X chromosomal localization of the *Hccs* gene, it is not possible to include *Hccs* KO males in postnatal studies. The latter are hemizygous for the mutated *Hccs* allele, resulting in the complete lack of HCCS in all cardiomyocytes and embryonic lethality at mid-gestation.<sup>18</sup> Given that gender has been shown to have an influence on developmental programming<sup>2,3</sup> with IUGR males often being more susceptible to cardiac stress in adulthood,<sup>15,17</sup> it is possible that hypoplastic male hearts respond differently to pressure overload as compared with *cHccs*<sup>+/-</sup> females. Furthermore, despite a clear hypertrophic response in control mice 2 weeks after AAC

surgery, LV mass partially regresses thereafter and wall thickness returns to normal levels after 4 weeks. It is unclear whether this represents an adaptation to pressure overload or a beginning wall thinning due to LV dilation. It has previously been reported, that AAC in wild-type mice might not significantly alter LV mass if determined by echocardiography.<sup>29</sup> AAC is a relatively mild challenge compared with the more widely used thoracic aortic constriction. A variety of different outcomes has been reported for both models, ranging from mild hypertrophy with fully sustained contractility<sup>30</sup> to LV dilation and heart failure.<sup>31</sup> Such differences are likely caused by the species used (rats *v.* mice), different strains and genetic background,<sup>31</sup> gender,<sup>32</sup> the duration of pressure overload (ranging from 1 to 20 weeks), differences in the surgical procedure and the localization and degree of the aortic constriction. Given the reduced LV contractility and increased LVID (even though statistically not significant in diastole) in control mice 4 weeks after AAC we would favor an interpretation of the partial normalization of LV mass and wall thickness as the onset of LV dilation rather than adaptation.

Along these lines, cardiomyocyte CSA and myocardial fibrosis significantly increase in control mice 4 weeks after AAC compared with the sham group, whereas LV mass is only marginally (and non-significantly) increased. This could potentially be explained by a progressive cardiomyocyte loss upon pressure overload, such that a compensatory increase in cell size is insufficient to elevate LV mass due to a parallel increase in cell death. However, we did not detect differences in apoptosis between groups 4 weeks after AAC, similar to previously published data.<sup>33</sup> Therefore, a potential apoptotic cardiomyocyte loss might occur earlier during the AAC period but is no longer observed after 4 weeks. Alternatively, other cell death mechanisms not detectable by TUNEL staining might be involved (as e.g. necrosis). A peak in cardiomyocyte apoptosis has been reported a few days after the onset of pressure overload, and cell death returns to baseline levels thereafter.<sup>34,35</sup> Others, however, show a continuous induction or even increasing apoptosis after aortic banding with time.<sup>36</sup> Therefore, potential differences in cell death between AAC controls, sham controls and AAC *cHccs*<sup>+/-</sup> hearts, respectively, will have to be determined at different time points after surgery. Interestingly, p38 has been proposed to be primarily required for cardiomyocyte survival rather than hypertrophy upon pressure overload.<sup>37</sup> Given that p38 is activated in *cHccs*<sup>+/-</sup> hearts upon AAC, it is tempting to speculate that it might be involved in an altered cell death regulation compared with controls. At the same time, cardiomyocyte CSA significantly increases in control hearts after AAC compared with the sham operated group, whereas this response is markedly attenuated in *cHccs*<sup>+/-</sup> mice. Given the proposed anti-hypertrophic effects of p38,<sup>38</sup> its activation could alternatively be required to restrict cardiomyocyte growth upon pressure overload in the latter. Thereby, *cHccs*<sup>+/-</sup> hearts potentially prevent excessive pathological hypertrophy and concomitant maladaptive cellular alterations to maintain LV contractility. Another possible explanation for a

significantly increased LV mass in *cHccs*<sup>+/-</sup> hearts compared with controls after AAC despite similar cardiomyocyte CSA are differences in cell length. Interestingly, in heterozygous GATA4 KO mice, which exhibit a cardiomyocyte deficit in the heart (as described above), pressure overload induces an overproportional increase in cardiomyocyte length rather than width compared with controls.<sup>28</sup> Similarly, cardiomyocyte volume might be increased in *cHccs*<sup>+/-</sup> hearts compared with controls after AAC due to differences in cell length but not CSA.

The data presented in our current and previous<sup>21</sup> study indicate, that the stress response of the hypoplastic heart in adulthood differs depending on the type of the pathological stimulus. This suggests that various cardiovascular risk factors can have very different impacts on the developmentally programmed heart in humans. Whereas an increased disease susceptibility of the adult heart after IUGR is primarily studied in regard of ischemia and myocardial infarction, the impact of other conditions such as pressure overload, Ang II or  $\beta$ -adrenergic stimulation is largely unknown. Most investigators choose to study fetal programming by applying I/R injury to *ex vivo* perfused IUGR hearts, thereby showing an increased susceptibility of the adult heart after prenatal dietary protein restriction, placental insufficiency or fetal hypoxia.<sup>14-17</sup> Although this approach has led to important breakthroughs in the field, its general impact is clearly limited, given that it only allows studying the acute and short-term consequences of a single insult in an artificial system (i.e. the explanted, retrogradely perfused heart). In addition, myocardial ischemia only covers a fraction of the possible conditions that can impact on the developmentally programmed heart in humans. Challenges imposed by arterial hypertension, neuro-humoral stimulation, drug induced cardiotoxicity or metabolic syndrome appear to be neglected instead. Consequently, long-term *in vivo* studies using different pathological insults in different animal models of IUGR would greatly enhance our understanding how altered intrauterine development causes heart disease in adulthood.

### Acknowledgments

The authors thank Martin Taube and Stefanie Schelenz for performing echocardiography, Friederike Skole, Saskia Fiedler and Simon Pyschny for technical assistance and Christina Eichhorn for advice regarding statistical analyses.

### Financial Support

This work was partially supported by the German Research Foundation (Deutsche Forschungsgemeinschaft DFG, grant number DR 446/3-1)

### Conflicts of Interest

None.



## Ethical Standards

The authors assert that all procedures contributing to this work comply with the ethical standards of the relevant national guides on the care and use of laboratory animals (GV-SOLAS) and has been approved by the responsible authorities [Landesamt für Gesundheit und Soziales (LaGeSo), Berlin, approval number G 0191/06].

## Supplementary material

To view supplementary material for this article, please visit <https://doi.org/10.1017/S2040174417000514>

## References

- Barker DJ, Winter PD, Osmond C, Margetts B, Simmonds SJ. Weight in infancy and death from ischaemic heart disease. *Lancet*. 1989; 2, 577–580.
- Alexander BT, Dasinger JH, Intapad S. Fetal programming and cardiovascular pathology. *Compr Physiol*. 2015; 5, 997–1025.
- Blackmore HL, Ozanne SE. Programming of cardiovascular disease across the life-course. *J Mol Cell Cardiol*. 2015; 83, 122–130.
- Botting KJ, McMillen IC, Forbes H, Nyengaard JR, Morrison JL. Chronic hypoxemia in late gestation decreases cardiomyocyte number but does not change expression of hypoxia-responsive genes. *J Am Heart Assoc*. 2014; 3, e000531.
- Corstius HB, Zimanyi MA, Maka N, *et al*. Effect of intrauterine growth restriction on the number of cardiomyocytes in rat hearts. *Pediatr Res*. 2005; 57, 796–800.
- Black MJ, Siebel AL, Gezmish O, Moritz KM, Wlodek ME. Normal lactational environment restores cardiomyocyte number after uteroplacental insufficiency: implications for the preterm neonate. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2012; 302, R1101–R1110.
- Aroutiounova N, Fandrich R, Kardami E, Tappia PS. Prenatal exposure to maternal low protein diet suppresses replicative potential of myocardial cells. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2009; 19, 707–712.
- Louey S, Jonker SS, Giraud GD, Thornburg KL. Placental insufficiency decreases cell cycle activity and terminal maturation in fetal sheep cardiomyocytes. *J Physiol*. 2007; 580, 639–648.
- Paradis AN, Gay MS, Wilson CG, Zhang L. Newborn hypoxia/anoxia inhibits cardiomyocyte proliferation and decreases cardiomyocyte endowment in the developing heart: role of endothelin-1. *PLoS One*. 2015; 10, e0116600.
- Lim K, Zimanyi MA, Black MJ. Effect of maternal protein restriction during pregnancy and lactation on the number of cardiomyocytes in the postproliferative weanling rat heart. *Anat Rec (Hoboken)*. 2010; 293, 431–437.
- Botting KJ, Wang KC, Padhee M, *et al*. Early origins of heart disease: low birth weight and determinants of cardiomyocyte endowment. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2012; 39, 814–823.
- Menendez-Castro C, Toka O, Fahlbusch F, *et al*. Impaired myocardial performance in a normotensive rat model of intrauterine growth restriction. *Pediatr Res*. 2014; 75, 697–706.
- Cheema KK, Dent MR, Saini HK, Aroutiounova N, Tappia PS. Prenatal exposure to maternal undernutrition induces adult cardiac dysfunction. *Br J Nutr*. 2005; 93, 471–477.
- Xu Y, Williams SJ, O'Brien D, Davidge ST. Hypoxia or nutrient restriction during pregnancy in rats leads to progressive cardiac remodeling and impairs postischemic recovery in adult male offspring. *FASEB J*. 2006; 20, 1251–1253.
- Elmes MJ, Gardner DS, Langley-Evans SC. Fetal exposure to a maternal low-protein diet is associated with altered left ventricular pressure response to ischaemia-reperfusion injury. *Br J Nutr*. 2007; 98, 93–100.
- Rueda-Clausen CF, Morton JS, Lopaschuk GD, Davidge ST. Long-term effects of intrauterine growth restriction on cardiac metabolism and susceptibility to ischaemia/reperfusion. *Cardiovasc Res*. 2011; 90, 285–294.
- Xue Q, Zhang L. Prenatal hypoxia causes a sex-dependent increase in heart susceptibility to ischemia and reperfusion injury in adult male offspring: role of protein kinase C epsilon. *J Pharmacol Exp Ther*. 2009; 330, 624–632.
- Drenckhahn JD, Schwarz QP, Gray S, *et al*. Compensatory growth of healthy cardiac cells in the presence of diseased cells restores tissue homeostasis during heart development. *Dev Cell*. 2008; 15, 521–533.
- Babbitt SE, Sutherland MC, San Francisco B, Mendez DL, Kranz RG. Mitochondrial cytochrome c biogenesis: no longer an enigma. *Trends Biochem Sci*. 2015; 40, 446–455.
- Payer B. Developmental regulation of X-chromosome inactivation. *Semin Cell Dev Biol*. 2016; 56, 88–99.
- Drenckhahn JD, Strasen J, Heinecke K, *et al*. Impaired myocardial development resulting in neonatal cardiac hypoplasia alters postnatal growth and stress response in the heart. *Cardiovasc Res*. 2015; 106, 43–54.
- Dickinson H, Moss TJ, Gatford KL, *et al*. A review of fundamental principles for animal models of DOHaD research: an Australian perspective. *J Dev Orig Health Dis*. 2016; 7, 449–472.
- Hausenloy DJ, Yellon DM. Ischaemic conditioning and reperfusion injury. *Nat Rev Cardiol*. 2016; 13, 193–209.
- Martínez D, Pentinat T, Ribó S, *et al*. In utero undernutrition in male mice programs liver lipid metabolism in the second-generation offspring involving altered Lxra DNA methylation. *Cell Metab*. 2014; 19, 941–951.
- Keating ST, El-Osta A. Epigenetics and metabolism. *Circ Res*. 2015; 116, 715–736.
- Kolwicz SC Jr, Tian R. Glucose metabolism and cardiac hypertrophy. *Cardiovasc Res*. 2011; 90, 194–201.
- Levkau B, Schäfers M, Wohlschlaeger J, *et al*. Survivin determines cardiac function by controlling total cardiomyocyte number. *Circulation*. 2008; 117, 1583–1593.
- Bisping E, Ikeda S, Kong SW, *et al*. Gata4 is required for maintenance of postnatal cardiac function and protection from pressure overload-induced heart failure. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006; 103, 14471–14476.
- Wu JH, Hagaman J, Kim S, Reddick RL, Maeda N. Aortic constriction exacerbates atherosclerosis and induces cardiac dysfunction in mice lacking apolipoprotein E. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002; 22, 469–475.
- Hu P, Zhang D, Swenson L, *et al*. Minimally invasive aortic banding in mice: effects of altered cardiomyocyte insulin signaling during pressure overload. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003; 285, H1261–H1269.
- Barrick CJ, Rojas M, Schoonhoven R, Smyth SS, Threadgill DW. Cardiac response to pressure overload in 129S1/SvImJ and

- C57BL/6J mice: temporal- and background-dependent development of concentric left ventricular hypertrophy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007; 292, H2119–H2130.
32. Douglas PS, Katz SE, Weinberg EO, *et al.* Hypertrophic remodeling: gender differences in the early response to left ventricular pressure overload. *J Am Coll Cardiol.* 1998; 32, 1118–1125.
  33. Uozumi H, Hiroi Y, Zou Y, *et al.* gp130 plays a critical role in pressure overload-induced cardiac hypertrophy. *J Biol Chem.* 2001; 276, 23115–23119.
  34. Teiger E, Than VD, Richard L, *et al.* Apoptosis in pressure overload-induced heart hypertrophy in the rat. *J Clin Invest.* 1996; 97, 2891–2897.
  35. Hang T, Huang Z, Jiang S, *et al.* Apoptosis in pressure overload-induced cardiac hypertrophy is mediated, in part, by adenine nucleotide translocator-1. *Ann Clin Lab Sci.* 2006; 36, 88–95.
  36. Li XM, Ma YT, Yang YN, *et al.* Downregulation of survival signalling pathways and increased apoptosis in the transition of pressure overload-induced cardiac hypertrophy to heart failure. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2009; 36, 1054–1061.
  37. Nishida K, Yamaguchi O, Hirotani S, *et al.* p38alpha mitogen-activated protein kinase plays a critical role in cardiomyocyte survival but not in cardiac hypertrophic growth in response to pressure overload. *Mol Cell Biol.* 2004; 24, 10611–10620.
  38. Yokota T, Wang Y. p38 MAP kinases in the heart. *Gene.* 2016; 575, 369–376.

#### **4.4. Molekulare und zelluläre Mechanismen einer intrauterinen Wachstumsrestriktion und Folgen für das neonatale und adulte Herz der Maus**

Verschiedene Tiermodelle zur Induktion einer intrauterinen Wachstumsrestriktion (IUGR) sind beschrieben worden und werden routinemäßig angewendet (siehe Kapitel 1.4.4.). Dazu gehören so unterschiedliche Konzepte wie eine Veränderung der mütterlichen Ernährung während der Trächtigkeit, chirurgische Interventionen zur Simulation einer Plazentainsuffizienz oder die Haltung trächtiger Muttertiere unter reduziertem Luftsauerstoff zur Induktion einer fetalen Hypoxie. Für diese Modelle wurde zumeist gezeigt, dass sie eine IUGR und damit ein reduziertes Geburtsgewicht der Nachkommen zur Folge haben. Oft wurden auch Auswirkungen der verschiedenen IUGR-Modelle auf das Herz bei der Geburt, im Erwachsenenalter oder unter pathologischen Bedingungen beschrieben, um daraus Konzepte für das Developmental Programming bei kardiovaskulären Erkrankungen abzuleiten. Welche molekularen und zellulären Mechanismen bei den verschiedenen Tiermodellen aber tatsächlich für eine Verlangsamung des intrauterinen Wachstums der Embryonen und Föten sowie damit verbundene Veränderungen am Herzen verantwortlich sind, ist nahezu komplett unbekannt. Ein genaues Verständnis dieser Zusammenhänge erscheint jedoch essentiell, um Risikofaktoren einer IUGR zu identifizieren und so Rückschlüsse auf eine Prävention bereits im Uterus oder aber das Management der Konsequenzen bei der Geburt und im Erwachsenenalter ziehen zu können.

Ein zentraler Regulator von sowohl proliferativem als auch hypertrophem Zellwachstum ist der „mechanistic target of rapamycin complex 1“ (mTORC1). Dieser Multi-Protein-Komplex reguliert in Abhängigkeit des zellulären Energielevels, des Angebots an Nährstoffen (besonders von Aminosäuren) und des Einflusses von Wachstumsfaktoren die Translation und damit die Proteinbiosynthese (262). Begünstigende Verhältnisse sind dabei durch ein hohes intrazelluläres ATP-Level, reichlich extrazelluläre Nährstoffe sowie die Bindung von extrazellulären Wachstumsfaktoren an membranständige Rezeptoren und Aktivierung der intrazellulären Signaltransduktion charakterisiert. Unter diesen Bedingungen aktiviert mTORC1 die Proteinbiosynthese, was abhängig vom Zelltyp zur Zellzyklus-Aktivierung und Teilung oder zu Größenzunahme führen kann. Viele der etablierten IUGR-Tiermodelle beeinflussen einen oder mehrere der genannten Einflussfaktoren des mTORC1-Signalwegs. Daraus ergab sich die Hypothese, dass eine Inhibierung von mTORC1 während der intrauterinen Entwicklung maßgeblich an einer Wachstumsrestriktion beteiligt sein könnte.

Um dies zu überprüfen, behandelten wir trächtige Mäuse im letzten Viertel der Gestationszeit mit dem pharmakologischen mTORC1-Inhibitor Rapamycin. Dies führt in den Nachkommen bei der Geburt zu einer deutlichen Reduktion des Körpergewichts, wobei auch das Gewicht der meisten Organe verringert, in Relation zum Körpergewicht aber normal ist. Das Herz hingegen zeigt unter Rapamycin-Behandlung eine überproportionale Wachstumsrestriktion, was zu einem reduzierten Herzgewicht/Körpergewicht-Verhältnis bei der Geburt führt. Die geringe Herzgröße ist dabei vor allem auf eine Reduktion der Kardiomyozytengröße und die Induktion von Apoptose, nicht aber auf eine Inhibierung der Zellzyklus-Aktivität bei der Geburt zurückzuführen. In der Echokardiographie bestätigt sich in neonatalen Mäusen nach Rapamycin-Behandlung im Vergleich zu Kontrollen die verringerte linksventrikuläre Masse und ein reduziertes Schlagvolumen, was zu einem reduzierten Herzminutenvolumen bei jedoch erhaltener Kontraktilität führt. Bis zum Alter von 12 Wochen bleiben Mäuse, die pränatal einer Rapamycin-Behandlung ausgesetzt waren, kleiner als Kontrollen, wobei sich das Herzgewicht weitestgehend normalisiert. Echokardiographisch besteht aber auch im Erwachsenenalter noch eine Reduktion der linksventrikulären Masse aufgrund von dünneren Wänden, was aber keine Auswirkungen auf Herzminutenvolumen oder Kontraktilität hat. Interessanterweise ist die Zahl der Kardiomyozyten in adulten Herzen nach pränataler

Rapamycin-Behandlung im Vergleich zu Kontrollen reduziert, was jedoch durch ein deutlich größeres Zellvolumen kompensiert wird.

Zusammenfassend konnte in dieser Studie mit dem mTORC1-Signalweg erstmals ein molekularer Mechanismus identifiziert werden, der einen wichtigen Regulator des intrauterinen Wachstums darstellt und möglicherweise bei verschiedenen Szenarien einer IUGR involviert ist. Darüber hinaus ist die pränatale mTORC1-Aktivität essentiell für die Entwicklung eines normal großen und funktionstüchtigen Herzens bis zur Geburt. Die Folgen einer intrauterinen mTORC1-Inhibierung sind dabei bis ins Erwachsenenalter nachweisbar und im Herzen vor allem durch eine reduzierte Kardiomyozytenzahl bedingt.

#### **Veröffentlichung zu den dargestellten Arbeiten:**

Hennig M, Fiedler S, Jux C, Thierfelder L, Drenckhahn JD. Prenatal Mechanistic Target of Rapamycin Complex 1 (mTORC1) Inhibition by Rapamycin Treatment of Pregnant Mice Causes Intrauterine Growth Restriction and Alters Postnatal Cardiac Growth, Morphology, and Function. J Am Heart Assoc. 2017;6:e005506.

# Prenatal Mechanistic Target of Rapamycin Complex 1 (mTORC1) Inhibition by Rapamycin Treatment of Pregnant Mice Causes Intrauterine Growth Restriction and Alters Postnatal Cardiac Growth, Morphology, and Function

Maria Hennig, PhD; Saskia Fiedler; Christian Jux, MD; Ludwig Thierfelder, MD; Jörg-Detlef Drenckhahn, MD

**Background**—Fetal growth impacts cardiovascular health throughout postnatal life in humans. Various animal models of intrauterine growth restriction exhibit reduced heart size at birth, which negatively influences cardiac function in adulthood. The mechanistic target of rapamycin complex 1 (mTORC1) integrates nutrient and growth factor availability with cell growth, thereby regulating organ size. This study aimed at elucidating a possible involvement of mTORC1 in intrauterine growth restriction and prenatal heart growth.

**Methods and Results**—We inhibited mTORC1 in fetal mice by rapamycin treatment of pregnant dams in late gestation. Prenatal rapamycin treatment reduces mTORC1 activity in various organs at birth, which is fully restored by postnatal day 3. Rapamycin-treated neonates exhibit a 16% reduction in body weight compared with vehicle-treated controls. Heart weight decreases by 35%, resulting in a significantly reduced heart weight/body weight ratio, smaller left ventricular dimensions, and reduced cardiac output in rapamycin- versus vehicle-treated mice at birth. Although proliferation rates in neonatal rapamycin-treated hearts are unaffected, cardiomyocyte size is reduced, and apoptosis increased compared with vehicle-treated neonates. Rapamycin-treated mice exhibit postnatal catch-up growth, but body weight and left ventricular mass remain reduced in adulthood. Prenatal mTORC1 inhibition causes a reduction in cardiomyocyte number in adult hearts compared with controls, which is partially compensated for by an increased cardiomyocyte volume, resulting in normal cardiac function without maladaptive left ventricular remodeling.

**Conclusions**—Prenatal rapamycin treatment of pregnant dams represents a new mouse model of intrauterine growth restriction and identifies an important role of mTORC1 in perinatal cardiac growth. (*J Am Heart Assoc.* 2017;6:e005506. DOI: 10.1161/JAHA.117.005506.)

**Key Words:** cardiac function • cardiac growth • cardiac mass • fetal programming • heart development • intrauterine growth restriction • mechanistic target of rapamycin

The intrauterine environment is a major determinant of embryonic and fetal development. Various maternal or environmental conditions can impair fetal growth, resulting in

intrauterine growth restriction (IUGR), which often presents with low birth weight and reduced organ size.<sup>1</sup> Maternal under- or malnutrition, placental insufficiency, fetal hypoxia, or drugs (eg, glucocorticoids) are among the factors causing IUGR in humans and animal models.<sup>2</sup> IUGR is considered a major risk factor for various chronic diseases later in life and thereby contributes to developmental (or fetal) programming.<sup>3</sup> Hence, it appears imperative to uncover cellular and molecular mechanisms that regulate intrauterine growth. Relatively little is known about the underlying mechanisms, however, but signaling pathways regulating cell growth and proliferation are likely to be involved.

IUGR can be induced in animal models by caloric or protein restriction in the maternal diet during pregnancy,<sup>2</sup> which suggests that a sufficient nutritional supply to the embryo and fetus is required for normal intrauterine growth. The mechanistic (or previously named “mammalian”) target of rapamycin

From the Max-Delbrück-Center for Molecular Medicine, Berlin, Germany (M.H., S.F., L.T., J.-D.D.); Department of Pediatric Cardiology, University Hospital Münster, Münster, Germany (C.J., J.-D.D.).

Accompanying Data S1, Tables S1 through S3, and Figures S1 through S6 are available at <http://jaha.ahajournals.org/content/6/8/e005506/DC1/embed/inline-supplementary-material-1.pdf>

**Correspondence to:** Jörg-Detlef Drenckhahn, MD, Department of Pediatric Cardiology, University Hospital Münster, Albert-Schweitzer-Campus 1, 48149 Münster, Germany. E-mail: joerg.drenckhahn@ukmuenster.de

Received January 6, 2017; accepted June 15, 2017.

© 2017 The Authors. Published on behalf of the American Heart Association, Inc., by Wiley. This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited and is not used for commercial purposes.



## Clinical Perspective

### What Is New?

- Pharmacological inhibition of the mechanistic target of rapamycin complex 1 (mTORC1) pathway in late gestation by rapamycin treatment of pregnant mice causes intrauterine growth restriction, thereby reducing body and organ size in the offspring at birth.
- Rapamycin-sensitive mTORC1 functions are required for perinatal cardiac growth, primarily impacting cardiomyocyte size and survival but not proliferation in the neonatal heart.
- Prenatal mTORC1 inhibition reduces cardiac output at birth due to diminished left ventricular dimensions, but contractility is not affected.
- After prenatal mTORC1 inhibition body and heart weight partially normalize until early adulthood, and cardiac output fully recovers despite a reduced number of cardiomyocytes in the adult heart.

### What Are the Clinical Implications?

- Prenatal mTORC1 inhibition could play a role in intrauterine growth restriction caused by various maternal or environmental conditions, such as maternal mal- or undernutrition, placental insufficiency, or fetal hypoxia.
- mTORC1 function is required for fetal cardiac growth, and its inhibition might be involved in developmental programming of heart disease in adulthood.

(mTOR) pathway is an important sensor of the metabolic and nutritional state of a cell and thereby integrates energy homeostasis and amino acid availability with cell size and proliferation.<sup>4</sup> mTOR is a serine/threonine kinase present in 2 multiprotein complexes, mTORC1 and mTORC2, which differ in the composition of regulatory and adaptor protein binding partners. Whereas mTORC2 is best characterized for its involvement in cell survival, growth, cytoskeletal organization, and cell polarity, mTORC1 is a master regulator of cell growth by activating protein, lipid, and nucleic acid biosynthesis while inhibiting catabolic mechanisms such as autophagy.<sup>4</sup> One of the best characterized mTORC1 functions is the activation of cap-dependent mRNA translation by phosphorylating its downstream targets eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1 (4E-BP1) and ribosomal S6 kinase (S6K1). 4E-BP1 phosphorylation results in its dissociation from eukaryotic translation initiation factor 4E, thereby releasing its inhibitory effect and allowing translation initiation. In addition, phosphorylation and activation of S6K1 and its downstream target S6 ribosomal protein favor mRNA biogenesis as well as translation initiation and elongation. Upstream inputs that regulate mTORC1 activity include cellular energy status (ie, glucose and ATP levels), oxygen, growth factors, and amino acid availability.<sup>4</sup> Importantly, some (but not all) downstream

effects of mTORC1 (in contrast to mTORC2) can be efficiently inhibited by the immunosuppressive drug rapamycin.

In various model organisms the mTOR pathway has been shown to control organ size,<sup>5</sup> which also includes the mammalian heart. Although its role during postnatal physiological as well as pathological cardiac hypertrophic growth has been studied extensively,<sup>6</sup> much less is known about the involvement of mTOR signaling in prenatal cardiac development. The heart conditional knockout of the gene encoding mTOR in mice using Cre/loxP recombination mediated by different cardiac Cre drivers has been shown to be lethal during late gestation or at early postnatal stages.<sup>7-9</sup> Efficient inhibition of mTORC1 signaling in the heart, however, appears to be either transiently restricted to a period shortly after midgestation<sup>9</sup> or is only achieved after birth,<sup>7,8</sup> which hampers final conclusions about its role in the fetal heart. In addition, inactivating the mTOR gene affects both mTORC1 and mTORC2, such that precisely defining the role of one versus the other is not feasible. Similarly, the heart conditional knockout of the upstream mTORC1 activator Ras homolog enriched in brain (Rheb) causes mTORC1 inhibition only after birth, subsequently leading to postnatal lethality.<sup>10</sup> Thus, the role of mTORC1 during embryonic and fetal cardiac growth is incompletely understood.

Restricting amino acid availability in the maternal diet or lowering ambient oxygen concentration during pregnancy as well as reducing blood supply to the placenta cause IUGR in animal models.<sup>1,2</sup> Given that mTORC1 is inhibited by amino acid starvation, hypoxia, and low cellular energy levels, thereby impairing cell growth and proliferation,<sup>4</sup> we hypothesized that it might be involved in the IUGR phenotype. In addition, most IUGR conditions reduce heart size at birth and cause neonatal cardiac hypoplasia, which is considered a major cardiovascular risk factor in adulthood.<sup>3</sup> In this regard we have recently described a mouse model of embryonic heart regeneration based on inactivation of the X-linked gene encoding holocytochrome c synthase (*Hccs*) specifically in the developing heart.<sup>11</sup> The HCCS enzyme is required for electron transport along the mitochondrial respiratory chain. Heterozygous heart conditional *Hccs* knock-out (KO) females (hereafter referred to as *cHccs*<sup>+/-</sup>) develop a tissue mosaic in the ventricular myocardium composed of 50% cardiomyocytes harboring mitochondrial dysfunction and 50% healthy cells at midgestation. Compensatory proliferation of the healthy cardiomyocyte population allows embryonic heart regeneration, however, such that the neonatal *cHccs*<sup>+/-</sup> heart is composed of 90% healthy cells and contains only 10% diseased cells.<sup>11</sup> Nevertheless, embryonic heart regeneration is not sufficient to completely build up the myocardium, resulting in *cHccs*<sup>+/-</sup> hearts being hypoplastic at birth due to a reduced number of cardiomyocytes.<sup>12</sup> This reduction in cell number is postnatally compensated for by accelerated and

augmented cardiomyocyte hypertrophic growth, such that heart size normalizes by early adulthood.<sup>12</sup> Given the established role of mTORC1 in heart and organ size control,<sup>5,6</sup> we speculated that mTORC1 activity might be important for fetal cardiac growth and regulation of neonatal heart size in general as well as for compensatory growth of *cHccs*<sup>+/-</sup> hearts in particular.

Here we show that inhibiting mTORC1 in the final quarter of gestation by rapamycin treatment of pregnant mice causes IUGR and reduces heart size and cardiac output at birth. Body and heart size partially normalize during postnatal life, and despite a reduction in cardiomyocyte number, cardiac function is not compromised in adult mice after prenatal mTORC1 inhibition. *cHccs*<sup>+/-</sup> mice after prenatal rapamycin treatment exhibit cellular differences in the myocardium at birth compared with controls but no major alterations of postnatal heart size or function.

## Methods

### Mice

The generation and characterization of heart conditional *Hccs* KO mice have been described previously.<sup>11</sup> Briefly, floxed (fl) *Hccs* mice were bred to mice expressing *Cre* recombinase under the control of the *Nkx2.5* promoter. All mice were maintained on a mixed 129Sv/C57Bl6 genetic background, and all experiments throughout the study were performed on heterozygous *Hccs* KO females (*Hccs*<sup>fl/+</sup>/*Nkx2.5Cre*, referred to as *cHccs*<sup>+/-</sup>) and their respective *Cre* positive female littermate controls (*Hccs*<sup>+/+</sup>/*Nkx2.5Cre*, referred to as *Hccs*<sup>+/+</sup>). The latter were furthermore used to compare the effects of rapamycin versus vehicle treatment in control animals, implying that all mice used in the study were carrying the *Nkx2.5Cre* knock-in.<sup>13</sup> Unless specifically annotated, all results refer to control mice, whereas data of *cHccs*<sup>+/-</sup> mice are explicitly labeled in figures or figure legends. The total number of mice included in the different experiments of this study is as follows: vehicle-treated neonates, *Hccs*<sup>+/+</sup> n=31, *cHccs*<sup>+/-</sup> n=30; rapamycin-treated neonates, *Hccs*<sup>+/+</sup> n=39, *cHccs*<sup>+/-</sup> n=41; vehicle-treated adults, *Hccs*<sup>+/+</sup> n=9, *cHccs*<sup>+/-</sup> n=15; rapamycin-treated adults, *Hccs*<sup>+/+</sup> n=9, *cHccs*<sup>+/-</sup> n=11. All animal procedures were performed following institutional guidelines and had previously been approved by the responsible authorities (Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin, approval number G 0027/10).

### Rapamycin Injection

Female mice were mated to the respective males for 1 night and separated the next morning (ie, at 0.5 days postconception [dpc]). Dams with visible pregnancy at 14.5 dpc were

randomly assigned to vehicle or rapamycin treatment starting in the morning at 15.5 dpc. Rapamycin (Cayman Chemical Co, Ann Arbor, MI) was dissolved as stock solution (20 mg/mL) in dimethylacetamide (DMA, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Pregnant dams were treated with rapamycin or vehicle by subcutaneous injections every 12 hours from 15.5 dpc until delivery. Each injection contained 5 mg rapamycin/kg body weight diluted in 200  $\mu$ L vehicle (10% PEG 300 [Sigma], 17% Tween 80 [Sigma] in 0.9% NaCl solution) or DMA-containing vehicle only. Injections were administered alternating into the loose skin of the interscapular or the right and left femoral area.

### Echocardiography

Adult mice (11 weeks old) were anesthetized by inhalation of a 2.5% isoflurane/oxygen mixture using the Vevo compact dual anesthesia system (VisualSonics, Toronto, ON, Canada). Body temperature was kept constant at 37°C using a heat lamp and a rectal temperature probe. Measurements on neonates were performed on awake pups. Echocardiography was recorded using the Vevo 2100 high-frequency ultrasound system (VisualSonics, Toronto, ON, Canada) with a Micro-ScanTM transducer MS400 set to 30 MHz for adult mice or MS700 set to 50 MHz for neonatal mice. Operators were blinded for mouse genotypes and treatment groups during echocardiographic recordings as well as data analyses.

### Organ Preparation and Histology

Hearts, kidneys, and lungs from neonatal mice were prepared on postnatal day 1, and hearts, livers, kidneys, and spleens from adult mice were prepared at the age of 11 weeks. Adult mice were euthanized by cervical dislocation, and neonates were decapitated. Organs were excised, rinsed in cold PBS, weighed, snap-frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C. If organs were used for histological analyses, they were fixed in 4% paraformaldehyde/PBS (Sigma) for 24 to 48 hours. The tissue was subsequently dehydrated through an increasing ethanol series, cleared in toluol, and embedded in paraffin. Five-micrometer paraffin sections were stained with hematoxylin and eosin (Carl Roth, Karlsruhe, Germany) to assess overall cardiac morphology and tissue composition or with Sirius Red (Direct Red 80, Sigma) to visualize myocardial fibrosis.

### Quantification of Fibrosis in Adult Hearts

Light microscopy images of Sirius Red-stained heart sections from 11-week-old adult mice were taken using the Biozero BZ-8100 microscope (Keyence, Osaka, Japan). Under  $\times 5$  optical magnification, 6 random fields of the left ventricular (LV) myocardium, including free wall and interventricular septum,

were imaged, thereby covering the entire LV tissue. Two nonadjacent cross sections per heart were used. The percentage of interstitial fibrotic tissue was quantified using the color-threshold plugin of ImageJ software (<https://imagej.nih.gov/ij/>), which measures the red-stained area in relation to the total LV myocardial area. Values of all 12 images were averaged to give the mean fibrotic tissue content for each heart. Perivascular fibrosis was excluded and deleted from the images before analysis.

## Evaluation of Cell Proliferation

To assess proliferation rates in neonatal hearts, immunofluorescence staining for Ki67 was performed. Paraffin sections were deparaffinized and rehydrated, and heat-mediated antigen retrieval was performed in sodium citrate buffer (10 mmol/L, pH 6.0) for 20 minutes. After blocking in antibody solution containing 5% normal goat serum (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) for 1 hour, sections were incubated overnight with a rabbit monoclonal anti-Ki67 antibody (RM-9106, Thermo Scientific, Waltham, MA) at 4°C. Secondary antibody detection was performed at room temperature for 1 hour using a goat anti-rabbit Alexa Fluor 555-conjugated secondary antibody (Invitrogen, Carlsbad, CA). Nuclei were stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Invitrogen). Longitudinal sections were imaged with  $\times 40$  optical magnification using the Biozero BZ-8100 fluorescence microscope (Keyence, Osaka, Japan), and 10 random fields per section were taken within the LV myocardium, including the free wall and interventricular septum. Cells that exhibited colocalization of Ki67 and DAPI were considered to be cycling. Ki67-positive nuclei and the total number of DAPI-stained nuclei were manually quantified using the cell counter plugin of the ImageJ software. A total number of  $\approx 5000$  nuclei per heart were evaluated, and data from all 10 images were averaged to give the mean proliferation rate for each heart.

## Evaluation of Cell Death

Apoptotic cells were detected in cardiac paraffin sections using a terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) assay (ApopTag<sup>®</sup> Fluorescein Apoptosis Detection Kit, Merck Millipore, Billerica, MA) according to the manufacturer's instructions. Nuclei were stained with DAPI (Invitrogen). Two longitudinal nonadjacent TUNEL-stained sections per heart and 6 random fields per section were imaged using the Biozero BZ-8100 fluorescence microscope (Keyence) with  $\times 15$  optical magnification. Cells that exhibited colocalization of TUNEL and DAPI staining were considered apoptotic. TUNEL staining as well as the total number of DAPI-stained nuclei were manually counted using ImageJ. A total number of  $\approx 15\,000$  nuclei per neonatal heart were analyzed,

and data from all 12 images were averaged to give the mean apoptosis rate for each heart.

## Cardiomyocyte Cross-Sectional Area, Length, and Volume

To evaluate cardiomyocyte cross-sectional area (CSA), cardiac paraffin sections were stained with fluorochrome-conjugated wheat germ agglutinin (WGA, Alexa Fluor 555; Invitrogen) to visualize cell membranes. Nuclei were stained with DAPI or TO-PRO-3 (Invitrogen). For neonates, images were taken with the confocal laser scanning microscope TSC SPE (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) applying  $\times 120$  optical magnification, whereas adult hearts were imaged with the Biozero BZ-8100 fluorescence microscope (Keyence) applying  $\times 20$  optical magnification. Fifteen random fields of the LV myocardium including free wall and interventricular septum were imaged per section, and 2 nonadjacent WGA-stained sections per heart were used. At least 200 cardiomyocytes per heart were measured using the area measurement tool of the Biozero BZ image analysis application software (Keyence). Only cardiomyocytes that were cut along their transverse axis and matched the following selection criteria were included: visible central nucleus, cell shape close to circular, clear cell borders discernible, and visible cytoplasm. Values of all cardiomyocytes were averaged to give a mean estimate of cardiomyocyte CSA for each heart.

Cardiomyocyte length was measured in adult hearts following immunofluorescence staining of paraffin sections with WGA and an antibody against N-cadherin (sc-7939, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX) to identify intercalated disks (general staining procedure same as for evaluation of proliferation described above). Two nonadjacent sections per heart were imaged at  $\times 40$  magnification using a Zeiss Axio Scope.A1 fluorescence microscope. Ten to 15 images per section were taken from areas of the LV myocardium (free wall and interventricular septum) that showed cardiomyocytes in their longitudinal orientation. Rod-shaped cardiomyocytes with clearly visible cell borders, nuclei and intercalated disks were included. The distance between intercalated disks of  $\approx 70$  to 100 cardiomyocytes per heart was measured using the ZEN blue software (Zeiss), and the average cardiomyocyte length was calculated.

Calculation of cardiomyocyte volume was based on the simplified assumption that cardiomyocytes are of cylindrical shape (as previously described<sup>14</sup>), such that mean CSA was multiplied by mean cardiomyocyte length for each adult heart.

## Calculation of Cardiomyocyte Number Per Heart

Cardiomyocyte number per adult heart was estimated based on previously published protocols<sup>15</sup> with minor modifications.

Heart volume was calculated by multiplying cardiac wet weight or LV mass (determined by echocardiography) with the tissue density of rat myocardium, ie, 1.048 g/mm<sup>3</sup>.<sup>15</sup> The relative contribution of cardiomyocytes to the cardiac tissue was estimated by determining cardiomyocyte area fraction on WGA-stained paraffin sections (staining as described above for CSA). Briefly, LV myocardium of 2 nonadjacent sections was imaged at ×40 magnification, resulting in 20 to 30 images per heart. For each image the WGA-positive area (including nonmyocytes, extracellular matrix, and cell membranes) was measured using the color threshold plug-in in ImageJ and related to the overall tissue area. The remaining WGA-negative tissue area was considered to represent cardiomyocytes. Cardiomyocyte area fraction was averaged from all images per heart. Cardiomyocyte (CM) number was calculated according to the following equation:

$$\text{CM number} = \frac{\text{heart volume} \times \text{CM area fraction}}{\text{CM volume}}$$

## Western Blot Analyses

For isolation of total protein extracts fresh or snap-frozen tissue samples (heart, lung, kidney) were homogenized in RIPA buffer supplemented with protease (Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) and phosphatase inhibitors (PhosSTOP Phosphatase Inhibitor Cocktail Tablets, Roche Diagnostics) and incubated at 4°C for 2 hours with gentle agitation. For samples on the same gel, equal protein amounts were loaded (20 to 50 µg), separated using denaturing SDS-PAGE and blotted onto nitrocellulose (GE Healthcare, Chicago, IL) or polyvinylidene fluoride (Merck Millipore) membranes. Membranes were blocked for 1 hour in 5% nonfat dry milk (Carl Roth) in Tris-buffered saline with Tween 20 and incubated with the following primary antibodies at 4°C overnight: phospho-S6K1 Thr389 (#9234), total S6K1 (#2708), phospho-S6 Ser235/236 (#4858), phospho-S6 Ser240/244 (#4838), total S6 (#2217), phospho-4E-BP1 Thr37/46 (#2855), phospho-4E-BP1 Ser65 (#9451), total 4E-BP1 (#9644), phospho-mTOR Ser2448 (#2971), phospho-mTOR Ser2481 (#2974), total mTOR (#2983), RICTOR (#2114), RAPTOR (#2280), phospho-AMPKα Thr172 (#4188), total AMPKα (#2532), phospho-ULK1 Ser555 (#5869), phospho-ULK1 Ser757 (#6888), total ULK1 (#8054), LC3B (#3868), p62 (#5114), phospho-Akt Thr308 (#13038), phospho-Akt Ser473 (#4060), total Akt (#4691) (all from Cell Signaling Technology, Danvers, MA). Antibodies against GAPDH (MA1-22670, Thermo Scientific, Waltham, MA), α-tubulin (T9026, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), and vinculin (V9131, Sigma-Aldrich) were used for loading control. Secondary detection was performed using horseradish peroxidase-linked secondary antibodies (Cell Signaling

Technology). Enhanced chemiluminescence reaction was performed and detected with the imaging system Odyssey Fc (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE) or by exposure of the membrane to chemiluminescence-sensitive CL-XPosure films (Thermo Scientific). Intensity of detected protein bands was quantified by densitometry using ImageJ.

## Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction

Fresh or snap frozen cardiac tissue samples were homogenized in TRIzol reagent (Invitrogen), and total RNA was isolated according to the manufacturer's instructions. RNA was subsequently purified using RNeasy spin columns (Qiagen, Hilden, Germany), including digestion of genomic DNA on the column (RNase-free DNase set, Qiagen). Isolated cardiac RNA was reversely transcribed into cDNA using M-MuLV reverse transcriptase (New England BioLabs, Ipswich, MA) and random hexamer primers. Quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) was performed using the Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA) on the ViiA™ 7 real-time PCR system (Applied Biosystems). Primers were obtained from BioTeZ (Berlin, Germany), and sequences are as follows: *Nppa* forward 5'-CAGCATGGGC TCCTCTCCAT-3', *Nppa* reverse 5'-TGTACACAGGATTGCTC-CAATATG-3', *Myh7* forward 5'-CTAGAGTCAAAGTGGGCAACG-3', *Myh7* reverse 5'-GTGTACCATCCAGTTGAACA-3', *Nppb* forward 5'-AGGACCAAGGCCTCACAAA-3', *Nppb* reverse 5'-TTGAGATATGTGTACCTTGAATT-3'. Target gene expression was normalized against *Gapdh*: *Gapdh* forward 5'-AGGTT GTCTCTGCGACTTCA-3', *Gapdh* reverse 5'-CCAGGAAAT-GAGCTTGACAAAGTT-3'. All primers and PCR conditions were optimized to PCR efficiencies between 90% and 110% and a correlation coefficient ≥0.990 using cDNA dilution series. All samples were analyzed in triplicate. Relative expression differences between groups were determined using the ΔΔCT method.

## Statistical Analyses

All data are presented as mean±standard error of the mean. Data sets were tested for normal distribution by the Kolmogorov-Smirnov test, and homogeneity of variances between groups was assessed by the Levene test using SPSS (IBM, Armonk, NY). If these criteria were met, differences between 2 groups were evaluated with an unpaired, 2-sided Student t test using Excel 2010 (Microsoft, Redmond, WA) and those among multiple groups with 1-way ANOVA followed by Bonferroni post hoc test using SPSS (IBM). Differences among multiple groups with unequal variances were evaluated with nonparametric Kruskal-Wallis 1-way analysis of variance followed by Mann-Whitney post hoc test using SPSS (IBM).



Genotype distributions were compared to expected Mendelian distribution by a chi-squared test using Microsoft Excel. Kaplan-Meier survival curves were plotted using SPSS, and differences between groups were determined by a Log Rank (Mantel-Cox) test. A probability (*P*) value less than 0.05 was considered to indicate statistical significance.

## Results

### Efficient Inhibition of mTORC1 in Neonatal Mice by Rapamycin Treatment of Pregnant Dams

In order to inhibit mTORC1 in fetal mice, we treated pregnant dams during the final quarter of gestation (starting at 15.5 dpc until delivery) by subcutaneous injections of rapamycin (5 mg/kg body weight) or vehicle every 12 hours (Figure S1). mTORC1 activity was tested by Western blot analyses on different tissues harvested from newborn mice on postnatal day 1 (P1). Prenatal rapamycin treatment efficiently reduced phosphorylation of the mTORC1 downstream targets S6K1 and S6 ribosomal protein in the offspring heart, lung, and kidney (Figure 1A). 4E-BP1 was unaffected, consistent with previous reports showing different responsiveness of mTORC1 targets to rapamycin.<sup>16,17</sup>

mTORC1 regulates autophagy in concert with AMP-activated protein kinase (AMPK) by phosphorylating ULK1, a kinase important for the initiation of autophagy.<sup>18</sup> Phosphorylation of AMPK $\alpha$  was increased in rapamycin- compared with vehicle-treated neonatal hearts (Figure S2A), as previously described in the mouse liver.<sup>19</sup> Importantly, total ULK1 protein amounts are elevated in the P1 heart by prenatal rapamycin treatment (Figure S2B). In agreement with AMPK activation, ULK1 phosphorylation at the AMPK-dependent residue Ser555 (which promotes autophagy) was increased in rapamycin- compared with vehicle-treated hearts, even after normalization to total ULK1 (Figure S2B). In contrast, phosphorylation of the mTOR-sensitive Ser757, which inhibits autophagy, was unaltered when normalized to total ULK1 (Figure S2B). In conclusion, besides opposing phosphorylation by AMPK and mTOR, regulation of ULK1 activity in rapamycin-treated neonatal hearts seems furthermore to involve altered ULK1 protein stability and/or synthesis (as previously proposed).<sup>20,21</sup>

To investigate the net effect of these interactions, we tested protein levels of p62 (SQSTM1), which is rapidly degraded if autophagy is activated,<sup>22</sup> and found reduced p62 in hearts of rapamycin- compared with vehicle-treated neonates (Figure 1B). In addition, we detected reduced LC3B-I but unaltered LC3B-II protein amounts in rapamycin-compared to vehicle-treated hearts (Figure 1B), a pattern also observed in heart conditional Rheb KO mice.<sup>10</sup> Consequently, the LC3B-II/LC3B-I ratio is increased in rapamycin-treated

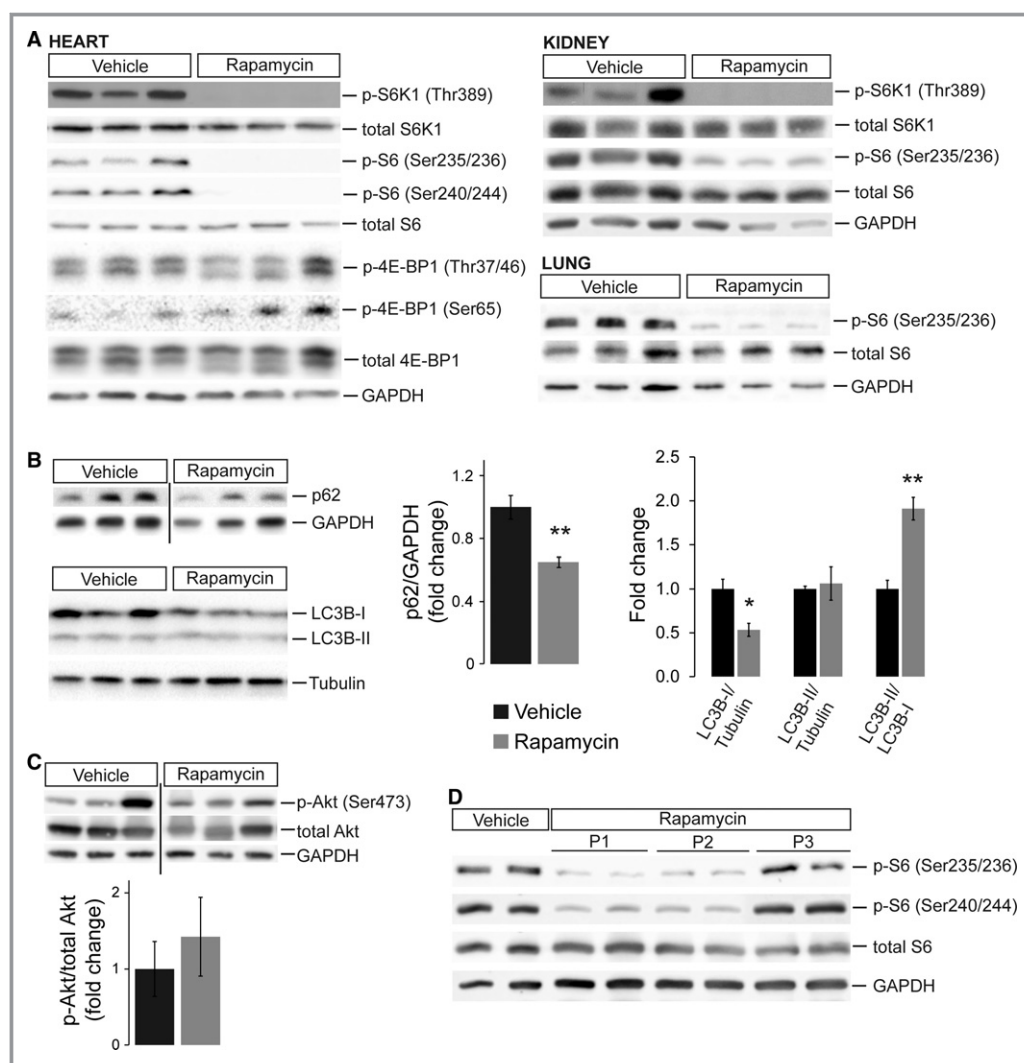
hearts, a parameter widely used to indicate activation of autophagy. The fact that LC3B-II levels are not elevated, as often reported, could indicate accelerated autophagic flux such that, after conversion of LC3B-I to LC3B-II, the latter is rapidly degraded via lysosomal turnover.<sup>22</sup> Based on these data we conclude that autophagy is activated in neonatal hearts after prenatal rapamycin treatment.

It has been proposed that rapamycin can inhibit mTORC2 if applied in high doses or for prolonged treatment periods.<sup>23,24</sup> We did not detect differences in Akt phosphorylation at Ser473 (Figure 1C), a well-established mTORC2 phosphorylation site, thereby excluding major inhibitory effects of rapamycin on mTORC2 in the neonatal heart. Finally, given that newborn pups did not receive further treatment after birth, we wanted to know at what postnatal stage mTORC1 activity is fully restored. Western blot analyses revealed that S6 phosphorylation in the heart is still reduced on postnatal day 2 (P2) but returns to normal levels at P3 (Figure 1D). In summary, rapamycin treatment of pregnant mice during late gestation results in efficient inhibition of rapamycin-sensitive mTORC1 functions in the offspring at birth, which in the heart is restored by P3.

### Prenatal Rapamycin Treatment Causes IUGR and Reduces Heart Size at Birth

Prenatal rapamycin treatment in late gestation (starting at 15.5 dpc) does not cause fetal lethality, evident as unaltered litter size in rapamycin- compared to vehicle-treated dams on postnatal day 1 (Figure 2A). In contrast, initiation of rapamycin treatment at 11.5 dpc resulted in spontaneous abortions around 16.5 dpc and fetal lethality with severe growth restriction and malformations. Consequently, all further analyses were performed with treatment commencing at 15.5 dpc (as depicted in Figure S1). Pups born from rapamycin-treated females were smaller in size at birth compared to vehicle-treated pups, resulting in a 16.4% reduction in body weight (BW) (Figure 2B). Similarly, a reduction in heart size was already evident upon dissection and was furthermore confirmed by histological examination (Figure 2C). The latter does not reveal any major structural or morphological cardiac defects after prenatal mTORC1 inhibition, however. Strikingly, heart weight (HW) was reduced by 34.5%, resulting in a significantly reduced HW/BW ratio in rapamycin- versus vehicle-treated pups (Figure 2D). In contrast, kidney weight (KW) was reduced in accordance with BW by 19.7%, resulting in unaltered KW/BW ratios between groups (Figure 2E). In conclusion, rapamycin treatment during late gestation causes IUGR evident as reduced body and organ size. Heart size is disproportionately affected, suggesting that fetal cardiac growth is specifically sensitive to mTORC1 inhibition.



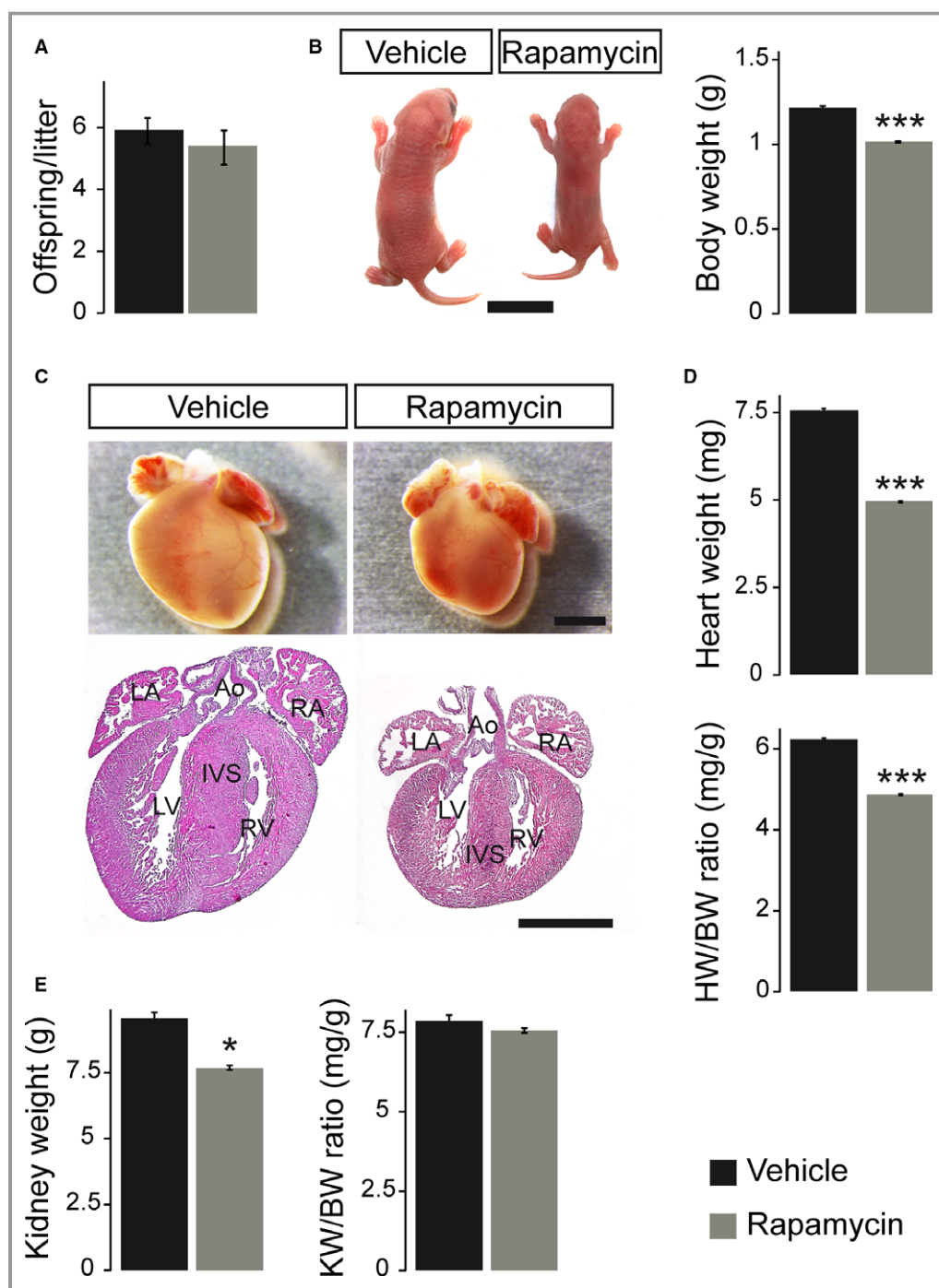


**Figure 1.** Efficient inhibition of mTORC1 in neonatal mice by rapamycin treatment of pregnant dams. A, Western blots of protein extracts from neonatal (P1) heart, kidney, and lung tissue after prenatal vehicle or rapamycin treatment. Reduced phosphorylation of the mTORC1 downstream targets S6K1 and S6 ribosomal protein confirmed successful mTORC1 inhibition by rapamycin in all 3 organs. In contrast, phosphorylation of 4E-BP1 was unaffected in the neonatal heart. B, Western blots revealed reduced p62 (SQSTM1) and LC3B-I protein levels, resulting in an increased LC3B-II/LC3B-I ratio in hearts of rapamycin-treated compared to vehicle-treated neonates (densitometric quantification  $n=6$  per group for p62,  $n=4$  for LC3B,  $*P<0.05$ ,  $**P<0.01$ ). C, Western blots of Akt Ser473 phosphorylation normalized to total Akt revealed no significant differences between hearts of rapamycin- and vehicle-treated neonates (densitometric quantification  $n=5$  per group). D, Western blots of heart protein extracts from vehicle-treated neonates at P1 and rapamycin-treated littermates at P1, P2, and P3 illustrating phosphorylation status of S6 ribosomal protein. mTORC1 activity is still inhibited at P2 but restored by P3. B and C, Samples were detected on the same membrane but were noncontiguous, indicated by a black line.

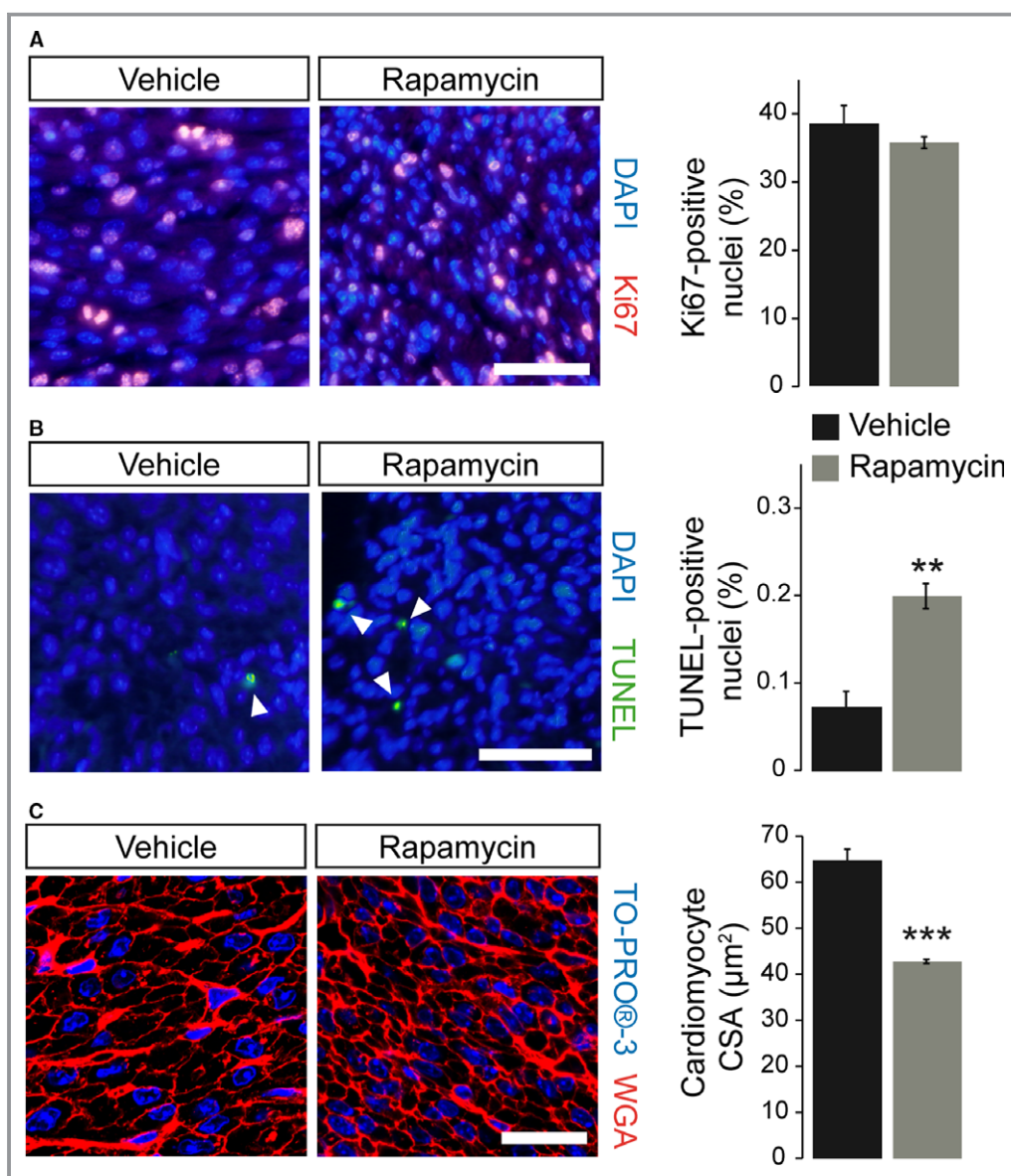
## Prenatal Rapamycin Treatment Reduces Cardiomyocyte Size and Induces Apoptosis but Does Not Affect Proliferation in the Neonatal Heart

The rapamycin-induced reduction in neonatal heart size can be the result of different cellular mechanisms: a reduction in cardiomyocyte size or number, and the

latter can be caused by induction of cell death or by inhibition of proliferation. We determined cell cycle activity in neonatal (P1) hearts of rapamycin- compared to vehicle-treated pups by Ki67 immunostaining but did not find differences between the groups (Figure 3A). In contrast, when we assayed programmed cell death (apoptosis) by TUNEL staining, a significant increase in the number of TUNEL-positive cells was observed in rapamycin-treated



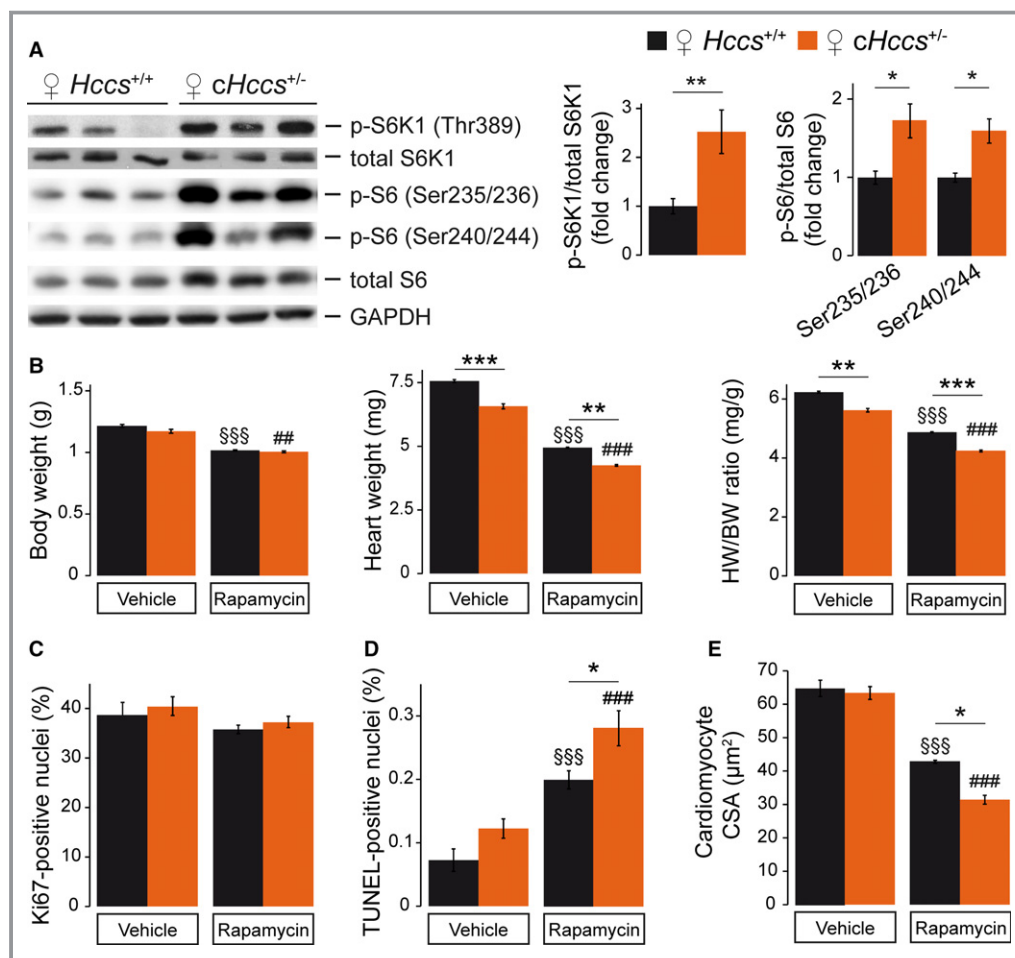
**Figure 2.** Prenatal rapamycin treatment causes IUGR and reduces heart size at birth. A, Average litter size of vehicle- and rapamycin-treated dams did not differ on postnatal day 1 ( $n=9$  litters per treatment group). B, Newborn offspring after prenatal rapamycin treatment were smaller compared to vehicle-treated controls (scale bar=1 cm), resulting in significantly reduced body weight (BW). C, Neonatal mice after prenatal rapamycin treatment had smaller hearts compared to their vehicle controls but did not exhibit major structural or morphological cardiac defects (hematoxylin and eosin staining in lower panel, scale bars=1 mm; Ao indicates aorta; IVS, interventricular septum; IUGR, intrauterine growth restriction; LA, left atrium; LV, left ventricle; RA, right atrium; RV, right ventricle). D, Rapamycin-treated neonates demonstrated significantly lower heart weight (HW) and HW/BW ratio compared to vehicle-treated animals. E, Even though kidney weight (KW) of rapamycin-treated neonates was significantly reduced compared to vehicle-treated animals, the KW/BW ratio was not altered. B, D, and E, Vehicle  $n=9$ , rapamycin  $n=10$ . (\*\* $P<0.001$ , \* $P<0.05$ ).



**Figure 3.** Prenatal rapamycin treatment reduces cardiomyocyte size and induces apoptosis but does not affect proliferation in the postnatal day-1 heart. A, Quantification of immunofluorescence images of Ki67-labeled nuclei (red) revealed unchanged proliferation rates within the left ventricular (LV) myocardium of vehicle- and rapamycin-treated neonatal hearts. Nuclei were stained in blue with DAPI (scale bar=50  $\mu\text{m}$ , vehicle n=6, rapamycin n=12). B, Quantification of TUNEL-positive nuclei (green, see arrowheads) revealed significantly increased apoptosis within the LV myocardium of neonatal hearts after prenatal mTORC1 inhibition compared to vehicle-treated controls. Nuclei were stained in blue with DAPI (scale bar=50  $\mu\text{m}$ , vehicle n=4, rapamycin n=6). C, Fluorescence staining of cardiomyocyte membranes with wheat germ agglutinin (WGA, red) within the LV myocardium revealed a significantly reduced cardiomyocyte cross-sectional area (CSA) in rapamycin- compared to vehicle-treated neonates. Nuclei were stained in blue with TO-PRO-3 (confocal microscopy, scale bar=25  $\mu\text{m}$ , vehicle n=5, rapamycin n=3). (\*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$ ). TUNEL indicates terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling.

P1 hearts (Figure 3B). Most strikingly, cardiomyocyte CSA was significantly reduced in the latter compared to vehicle-treated pups, indicating a reduction in cell size (Figure 3C). Taken together, these data suggest that

prenatal rapamycin treatment reduces cardiac organ size primarily by reducing cardiomyocyte size in combination with induction of apoptosis but not by interfering with proliferation.



**Figure 4.** Impact of fetal mTORC1 inhibition on a mouse model of prenatal compensatory cardiac growth. A, Western blots illustrating the phosphorylation status of S6K1 and S6 ribosomal protein revealed enhanced mTORC1 activity in neonatal (P1)  $cHccs^{+/-}$  hearts compared to littermate controls (densitometric quantification for S6K1:  $Hccs^{+/+}$  n=15,  $cHccs^{+/-}$  n=14, for S6: n=6 per group). B, Body weight (BW) of rapamycin-treated neonates was significantly reduced compared to vehicle-treated animals, but no difference was observed between genotypes. Rapamycin-treated  $Hccs^{+/+}$  and  $cHccs^{+/-}$  neonates demonstrated similar reductions in heart weight (HW) and HW/BW ratio compared to vehicle-treated animals. Note that the reduced HW and HW/BW ratio in  $cHccs^{+/-}$  compared to  $Hccs^{+/+}$  newborns reported previously<sup>12</sup> persisted after prenatal mTORC1 inhibition (vehicle groups n=9, rapamycin groups n=10). C, Quantification of Ki67-positive nuclei revealed unchanged proliferation rates within the LV myocardium of vehicle- and rapamycin-treated hearts and between genotypes (vehicle groups n=6, rapamycin  $Hccs^{+/+}$  n=12, rapamycin  $cHccs^{+/-}$  n=13). D, Quantification of TUNEL-positive nuclei revealed significantly increased apoptosis in hearts after prenatal mTORC1 inhibition, with apoptosis in rapamycin-treated  $cHccs^{+/-}$  hearts being significantly higher than in rapamycin-treated  $Hccs^{+/+}$  controls (vehicle  $Hccs^{+/+}$  n=4, all other groups n=6). E, Prenatal rapamycin treatment significantly reduced cardiomyocyte cross-sectional area (CSA) in both genotypes, and CSA in rapamycin-treated  $cHccs^{+/-}$  hearts was significantly smaller compared to rapamycin-treated  $Hccs^{+/+}$  controls (vehicle groups n=5, rapamycin groups n=3). B through E, Note that data used for  $Hccs^{+/+}$  animals are the same as depicted in Figures 2 and 3, respectively. (\* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01, \*\*\* $P$ <0.001, \$\$\$ $P$ <0.001 vs vehicle  $Hccs^{+/+}$ ; ## $P$ <0.01, ### $P$ <0.001 vs vehicle  $cHccs^{+/-}$ ). mTORC1 indicates mechanistic target of rapamycin complex 1; TUNEL, terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling.

### Impact of Fetal mTORC1 Inhibition on a Mouse Model of Prenatal Compensatory Cardiac Growth

Given the importance of mTOR for cardiac growth and organ size control,<sup>5,6</sup> it might be specifically required for embryonic

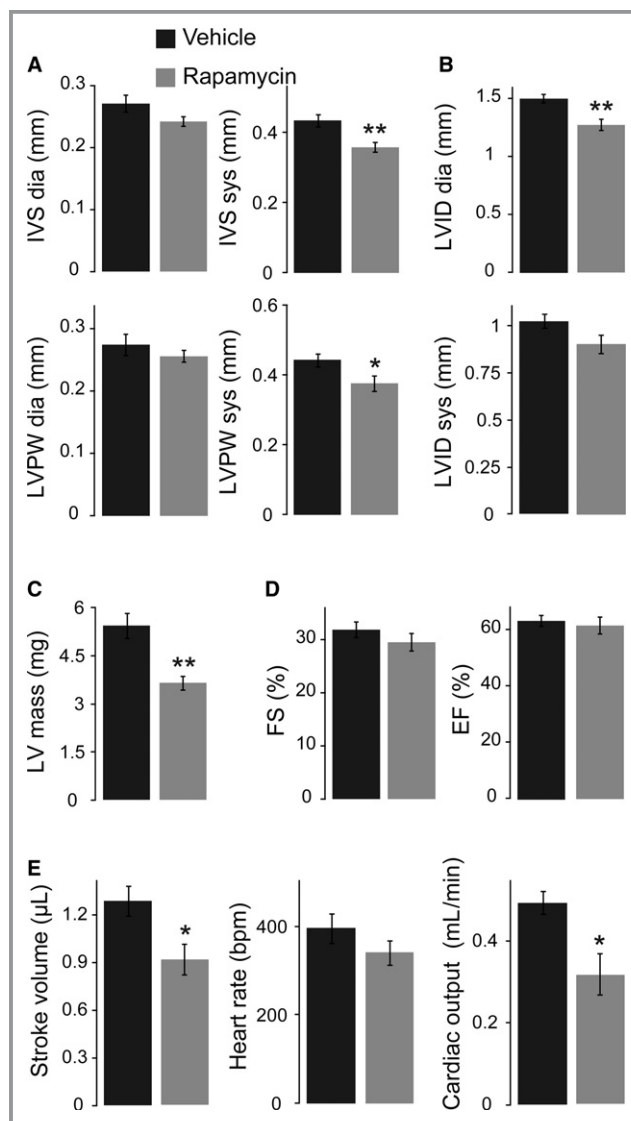
heart regeneration in  $cHccs^{+/-}$  mice.<sup>11</sup> Interestingly, neonatal  $cHccs^{+/-}$  hearts show increased phosphorylation of S6K1 and S6 ribosomal protein (Figure 4A) but not of mTORC1 (ie, 4E-BP1, ULK1) or mTORC2 (ie, Akt) (Figure S3) downstream targets compared to controls. This suggests that perinatal



compensatory cardiac growth, maturation, or cell survival in *cHccs*<sup>+/-</sup> mice might depend on mTORC1 signaling to S6K1, which has been shown to fulfill various functions in the heart.<sup>6</sup> To address this question, we subjected *cHccs*<sup>+/-</sup> fetuses to the same regime of prenatal rapamycin treatment as described above (ie, starting at 15.5 dpc). Similarly to control hearts, rapamycin efficiently inhibited mTORC1 activity in *cHccs*<sup>+/-</sup> hearts on postnatal day P1 (Figure S4A). In litters from rapamycin-treated dams, genotype distribution at P1 was as expected for X-chromosomal inheritance of *Hccs* and not different from vehicle-treated litters (Figure S4B), excluding prenatal lethality of *cHccs*<sup>+/-</sup> females upon mTORC1 inhibition. Importantly, the rapamycin-induced reduction in BW, HW, and HW/BW ratio was similar in *cHccs*<sup>+/-</sup> females compared to rapamycin-treated controls (*Hccs*<sup>+/+</sup>) (Figure 4B). The reduction in heart weight in neonatal *cHccs*<sup>+/-</sup> compared to *Hccs*<sup>+/+</sup> females due to the reduced number of cardiomyocytes described previously<sup>12</sup> was evident in both treatment groups but was not aggravated by rapamycin. At the cellular level, rapamycin does not specifically impair proliferation in *cHccs*<sup>+/-</sup> hearts at P1 (Figure 4C) but further induces apoptosis (Figure 4D) and reduces cardiomyocyte CSA (Figure 4E) when compared to rapamycin-treated *Hccs*<sup>+/+</sup> females. In summary, whereas rapamycin does not seem to affect late-gestational regulation of overall heart size specifically in *cHccs*<sup>+/-</sup> females, it does have more pronounced effects on cardiomyocyte size and cell survival. The latter implies that rapamycin-sensitive mTORC1 functions control certain cellular aspects of perinatal compensatory growth and tissue homeostasis in *cHccs*<sup>+/-</sup> hearts, which could impact on their morphology and function in adulthood (see Discussion in Data S1).

### Normal Contractility but Reduced Stroke Volume and Cardiac Output in Neonatal Hearts After Rapamycin Treatment

Considering the significant effects of prenatal mTORC1 inhibition on neonatal heart size, we performed echocardiography on rapamycin- and vehicle-treated pups at P1 in order to evaluate cardiac function. In agreement with the heart weight and morphology data described above, rapamycin-treated neonates had a significantly reduced systolic LV wall thickness (Figure 5A), a reduced LV internal diameter (Figure 5B), and a reduced calculated LV mass (Figure 5C). LV contractility, however, was not affected by prenatal rapamycin treatment (Figure 5D). The smaller LV dimensions result in a significantly reduced LV stroke volume and cardiac output in rapamycin- versus vehicle-treated pups, given that heart rate was not different between groups (Figure 5E). In addition, prenatal mTORC1 inhibition does not have more severe effects on cardiac dimensions or function in *cHccs*<sup>+/-</sup>



**Figure 5.** Echocardiography revealed normal contractility but reduced cardiac output in neonatal hearts after rapamycin treatment. A, Interventricular septum (IVS) and left ventricular posterior wall (LVPW) thickness in end-diastole (dia) and end-systole (sys) were reduced after prenatal rapamycin treatment, even though only systolic wall thickness reached statistical significance. B, End-diastolic and end-systolic left ventricular internal diameter (LVID) was reduced in neonatal mice after prenatal mTORC1 inhibition, whereas only diastolic LVID was significantly different. C, Neonatal LV mass calculated from echocardiography data was significantly reduced after prenatal rapamycin treatment. D, LV contractility at birth, measured as fractional shortening (FS) and ejection fraction (EF), was not affected by prenatal rapamycin treatment. E, The smaller LV dimensions result in significantly reduced LV stroke volume and consequently cardiac output in rapamycin- vs vehicle-treated pups, given that heart rate was not different between groups. A through E, Vehicle n=7, rapamycin n=6. \**P*<0.05, \*\**P*<0.01.

compared to *Hccs*<sup>+/+</sup> females (Table S1). In summary, prenatal rapamycin treatment reduces LV size and cardiac output at birth.



## Body and Organ Weights Partially Normalize After Prenatal Rapamycin Treatment Until Adulthood

To monitor the postnatal fate of pups born after prenatal mTORC1 inhibition, we analyzed rapamycin- and vehicle-treated animals at the age of 11 weeks. As shown above, mTORC1 activity is restored in the rapamycin-treated heart 3 days after birth (Figure 1D), suggesting that body and organ growth should be uncompromised thereafter. Nevertheless, we noticed postnatal lethality in a subset of rapamycin-treated pups within the first 12 days after birth, resulting in 67.3% survival compared with 95.8% in vehicle-treated mice (Figure 6A). After day 12 no further deaths were recorded, and all animals survived to early adulthood. Comparison of genotype distribution at weaning (ie, at 21 days of age) revealed no evidence for preferential lethality of rapamycin-treated *cHccs*<sup>+/-</sup> mice after birth (Figure S5). At the age of 11 weeks, rapamycin-treated animals still had a significantly reduced BW and tibia length (TL) compared with vehicle-treated mice (Figure 6B). BW was reduced by 10% compared with 16% at birth, indicating a certain degree of postnatal catch-up growth, however. Importantly, HW completely normalizes in rapamycin- compared with vehicle-treated mice, resulting in normal HW/BW and HW/TL ratios after 11 weeks (Figure 6C). Histological examination confirmed mainly normal cardiac morphology, although hearts appeared slightly smaller, and LV walls slightly thinner, compared with the vehicle group (Figure 6D). Liver and spleen weights were not different in adult rapamycin- versus vehicle-treated mice, whereas KW was significantly reduced (Figure 6E). Nevertheless, organ weights normalized to BW or TL were not different between treatment groups (Figure 6F and Table S2). Moreover, no specific effect of rapamycin treatment on body or organ size was observed in *cHccs*<sup>+/-</sup> compared to *Hccs*<sup>+/+</sup> females (Table S2). Taken together, after prenatal rapamycin treatment, pups that survived the early postnatal period showed incomplete catch-up growth of body and kidney size, whereas heart, liver, and spleen weights all normalized until adulthood.

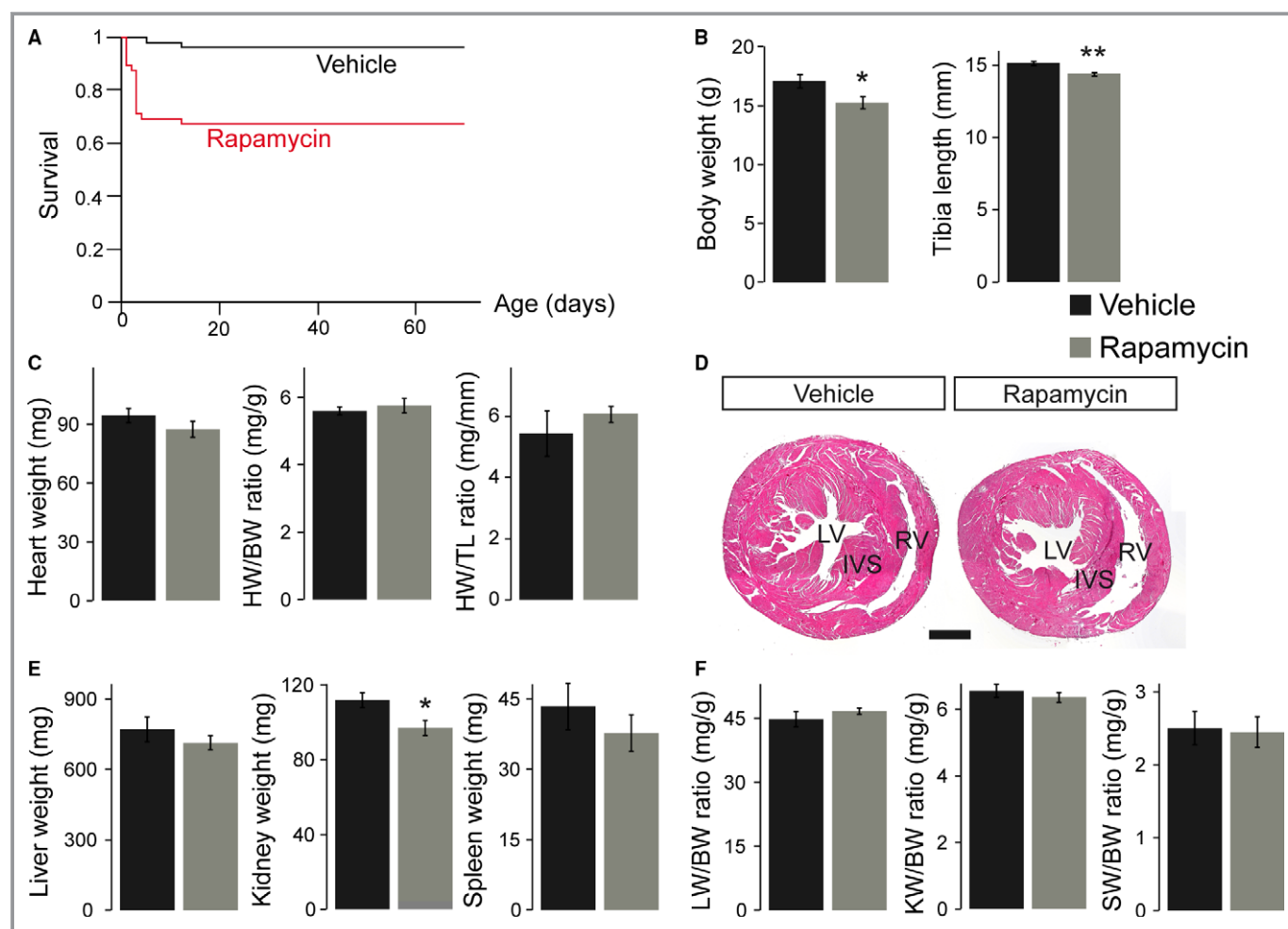
## Reduced LV Mass but Normal Cardiac Contractility and Output in Adult Mice After Prenatal Rapamycin Treatment

Long-term consequences of prenatal rapamycin treatment on postnatal heart morphology and function were evaluated by echocardiography at the age of 11 weeks. As suggested by histological examinations (Figure 6D), rapamycin-treated animals had a significantly reduced LV wall thickness compared with vehicle-treated controls (Figure 7A). The fact that LV diameter was not different between the groups (Figure 7B) resulted in a significantly reduced LV mass in rapamycin-

treated mice calculated from echo data, whereas the LV mass/BW ratio was unaffected (Figure 7C). Similar to neonatal stages, rapamycin-treated adults did not show impairment of LV contractility (Figure 7D). Interestingly and in contrast to newborns, LV stroke volume, heart rate, and cardiac output were normal in rapamycin- compared with vehicle-treated adults (Figure 7E). The latter suggests functional recovery during postnatal life, considering reduced cardiac output in rapamycin-treated animals at birth (Figure 5E). No major impairment of cardiac morphology and function was observed in rapamycin-treated *cHccs*<sup>+/-</sup> compared to *Hccs*<sup>+/+</sup> females (Table S3), indicating that prenatal mTORC1 inhibition does not negatively influence the long-term outcome specifically in *cHccs*<sup>+/-</sup> females despite their reliance on compensatory cardiac growth. In summary, prenatal inhibition of rapamycin-sensitive mTORC1 functions results in a sustained reduction of LV mass until early adulthood. Despite unaltered overall cardiac wet weight (Figure 6C), we conclude that LV dimensions are not completely restored in rapamycin-treated mice within the first 11 weeks of life, although heart size (ie, wet weight and LV mass) appears largely appropriate when normalized to BW.

## Reduced Cardiomyocyte Number but No Maladaptive Remodeling in Adult Hearts After Prenatal Rapamycin Treatment

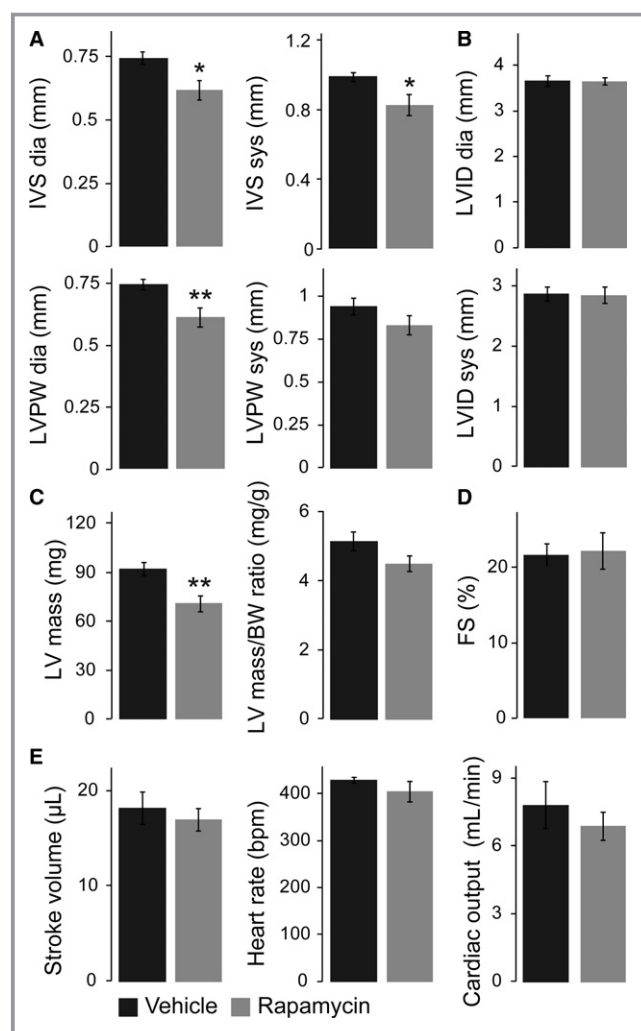
The reduced LV wall thickness and mass in adult hearts after prenatal rapamycin treatment could be caused by a reduction in cardiomyocyte number or size. Surprisingly, cardiomyocyte CSA was increased in rapamycin- compared with vehicle-treated mice (Figure 8A), suggesting an increase in cell size. In addition, we measured cardiomyocyte length in tissue sections by N-cadherin immunofluorescence staining of the intercalated disks between longitudinally oriented cells (Figure 8B). Cardiomyocyte length was not different between rapamycin- and vehicle-treated adult hearts (Figure 8B). Assuming a simplistic model of cardiomyocytes being of cylindrical shape, multiplying CSA by cell length allowed us to calculate the average cardiomyocyte volume per heart. This revealed a significant increase in cardiomyocyte volume in rapamycin- compared with vehicle-treated adult hearts (Figure 8C). Considering reduced LV mass in echocardiography and unchanged cardiac wet weight in rapamycin-treated animals, the latter would argue for compensatory cardiomyocyte hypertrophy to account for a reduction in cell number. To estimate cardiomyocyte number per heart, we first determined the relative contribution of cardiomyocytes to the myocardium in WGA-stained LV tissue sections. These data revealed a slightly but significantly reduced cardiomyocyte area fraction in rapamycin- compared with vehicle-treated adult hearts (Figure 8D). Based on LV mass or cardiac wet weight, cardiomyocyte area



**Figure 6.** Body and organ weights partially normalize after prenatal rapamycin treatment until adulthood. A, Survival curves show death of some rapamycin-treated pups within the first 12 days after birth but not thereafter. Consequently, postnatal survival after 70 days is significantly reduced in rapamycin- ( $n=55$ ) vs vehicle-treated ( $n=48$ ) animals ( $P<0.0005$ ). Survival curves include all possible genotypes and both sexes. B, Body weight (BW) and tibia length (TL) in 11-week-old adult mice after prenatal rapamycin treatment were reduced compared with vehicle-treated animals, indicating incomplete postnatal catch-up growth. C, Heart weight (HW) in adult rapamycin-treated animals completely normalizes during postnatal life, resulting in normal HW/BW and HW/TL ratios. D, Slightly reduced left ventricular (LV) wall thickness, but no major morphological changes within the LV, interventricular septum (IVS) or right ventricle (RV), were observed after prenatal mTORC1 inhibition compared to vehicle-treated animals (hematoxylin and eosin staining, scale bar=1 mm). E, Kidney weight (KW), but not liver (LW) or spleen weight (SW), was significantly reduced in rapamycin- vs vehicle-treated 11-week-old mice. F, LW/BW, KW/BW and SW/BW ratios in adult mice displayed no significant differences between the treatment groups. B, C, E, and F, Vehicle  $n=7$ , rapamycin  $n=9$ . (\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ ). mTORC1 indicates mechanistic target of rapamycin complex 1.

fraction, and cardiomyocyte volume, we were able to calculate the number of cardiomyocytes per heart (see Methods). Although this allows only a rough assessment and likely underestimates the absolute cardiomyocyte number, it should be suitable for relative comparisons between treatment groups. The results indeed revealed a significantly reduced number of cardiomyocytes per heart in rapamycin- compared with vehicle-treated mice in adulthood (Figure 8E). The reduction in cell number could be compensated for by excessive deposition of extracellular matrix and therefore result in maladaptive myocardial remodeling. We did not detect differences in interstitial fibrosis within the LV myocardium between

rapamycin- and vehicle-treated mice, however (Figure 8F). Furthermore, RNA expression of fetal genes to indicate a molecular signature of pathological conditions was not different between groups (Figure 8G). Finally, prenatal rapamycin treatment does not have more severe consequences on CSA, fibrosis, or fetal gene expression in adult  $cHccs^{+/-}$  compared to  $Hccs^{+/+}$  females (Figure S6), indicating that prenatal mTORC1 inhibition can be compensated in  $cHccs^{+/-}$  hearts. Taken together, prenatal rapamycin treatment reduces the number of cardiomyocytes in the postnatal heart, which can be partially compensated by increased cell volume to achieve a near normal organ size.



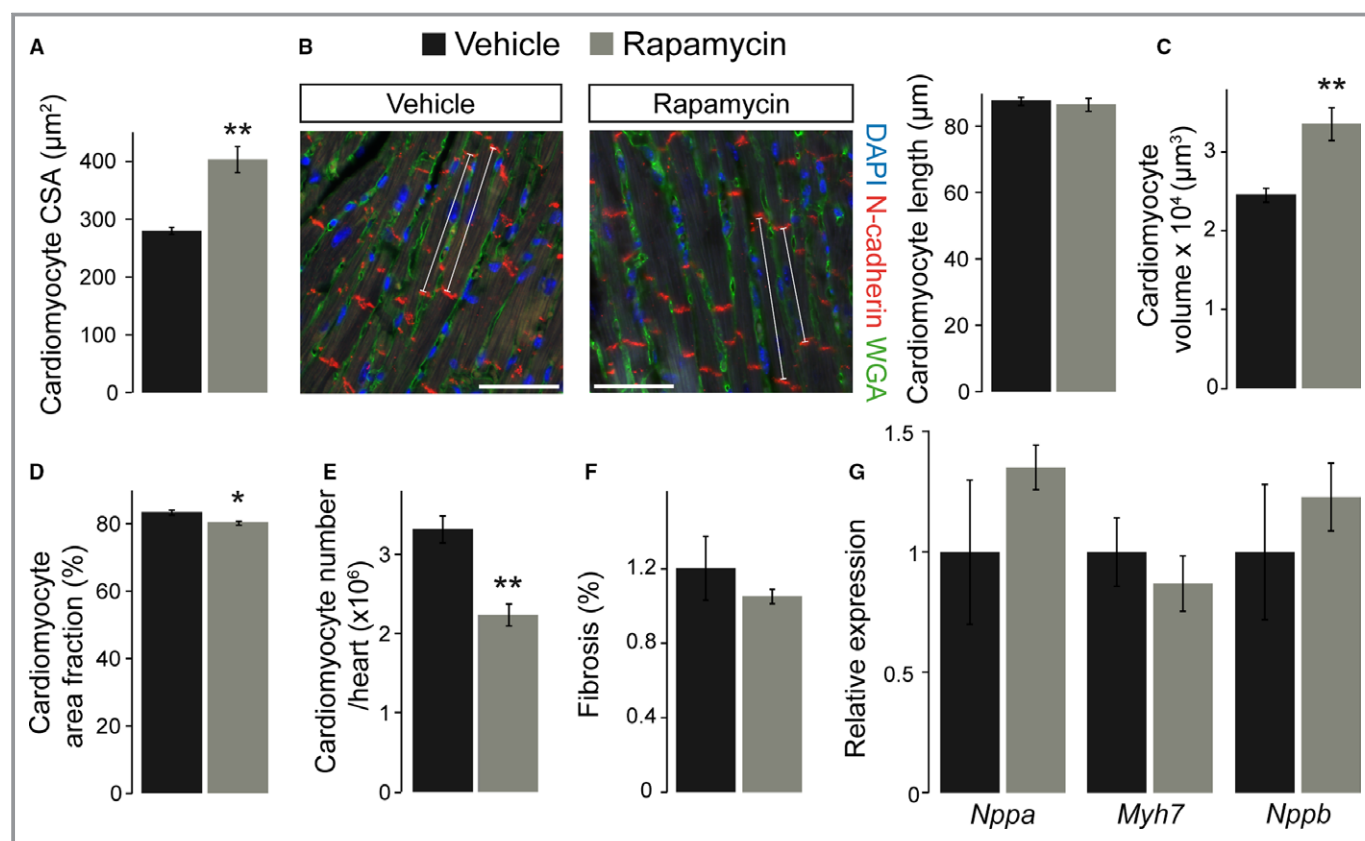
**Figure 7.** Echocardiography revealed reduced left ventricular (LV) mass but normal cardiac function in adult mice after prenatal rapamycin treatment. A, Interventricular septum (IVS) and left ventricular posterior wall (LVPW) thickness in end-diastole (dia) and end-systole (sys) were reduced in adult hearts after prenatal rapamycin compared with vehicle treatment, even though systolic LVPW missed statistical significance. B, End-diastolic and end-systolic left ventricular internal diameter (LVID) was not different between the groups. C, LV mass calculated from echocardiography data was significantly reduced in adult mice after prenatal mTORC1 inhibition compared with vehicle-treated animals, whereas the LV mass/BW ratio was unaffected. D, Rapamycin-treated adults did not show impairment of LV contractility, as indicated by normal fractional shortening (FS). E, LV stroke volume, heart rate, and cardiac output were normal in rapamycin-compared with vehicle-treated adults. A through E, Vehicle n=7, rapamycin n=9. (\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ ). mTORC1 indicates mechanistic target of rapamycin complex 1.

## Discussion

Intrauterine growth restriction can be induced by a variety of maternal or environmental conditions, most of which converge on the (single or combined) restriction of nutrients, energy, or

oxygen to the fetus.<sup>1</sup> The cellular mechanisms that sense such shortage and slow down intrauterine growth, however, are not well understood. Here we show that rapamycin-sensitive mTORC1 function regulates fetal growth and determines body and organ size at birth. Given that mTORC1 integrates nutrient, amino acid, and oxygen availability with cell growth and proliferation,<sup>4</sup> it seems likely that inhibition of mTORC1 by different IUGR conditions is causally involved in fetal growth restriction and aberrant organ maturation. Indeed, a low-protein diet (LPD) fed to female mice throughout pregnancy reduces pancreatic  $\beta$ -cell mass in the newborn offspring, eventually leading to impaired insulin secretion and glucose intolerance.<sup>25</sup> LPD causes reduced mTORC1 activity in  $\beta$ -cells at birth, and transiently restoring mTORC1 function rescues  $\beta$ -cell mass and prevents the diabetic phenotype in the offspring.<sup>25</sup> In addition, food restriction in pregnant baboons or sheep reduces mTORC1 activity in the fetal liver and skeletal muscle, respectively.<sup>26,27</sup> Although corresponding data for the growth-restricted fetal or newborn heart are missing, it is tempting to speculate that mTORC1 inhibition is a general consequence of IUGR in various organs, thereby contributing to developmental programming of adult disease.

Rapamycin treatment of pregnant dams represents a new IUGR model in rodents, which could prove useful to study developmental programming in various organ systems. We have shown efficient inhibition of rapamycin-sensitive (ie, S6K1, S6) but not rapamycin-insensitive (ie, 4E-BP1) mTORC1 downstream targets in the newborn heart, kidney, and liver and a concomitant reduction in heart and kidney weight. For animal studies of developmental programming, however, it has been recommended to use only 1 representative male and/or female offspring per litter in order to account for differences in the intrauterine or postnatal environment specific for certain pregnancies or dams. A limitation of the current study in this regard is that we included several *Hccs*<sup>+/+</sup> and *cHccs*<sup>+/-</sup> females from the same litter, which is common practice when analyzing genetically modified mice. Consequently, we cannot exclude that the close relationship of littermates in contrast to randomly chosen mice might have an effect on certain study results. The rapamycin treatment protocol applied in this study (ie, starting at 15.5 dpc) results in a quite stable  $\approx 16\%$  reduction in neonatal body weight, the degree of which is comparable to other IUGR studies.<sup>28-30</sup> In contrast, the widely used maternal protein restriction during pregnancy has shown quite remarkable variations in neonatal body weight between different studies and investigators, which are likely to be influenced by the mouse or rat strain used, the exact diet composition, the precise onset of LPD, the duration of LPD after birth, and other variables (reviewed by Zohdi et al<sup>31</sup>). In this regard we believe that rapamycin treatment of pregnant dams is easy to control and can be standardized to achieve consistent degrees of growth



**Figure 8.** Cardiomyocyte number is reduced, but cell volume is increased in adult hearts after prenatal rapamycin treatment. A, Cardiomyocyte cross-sectional area (CSA) was significantly larger in adult hearts exposed to prenatal rapamycin treatment compared with vehicle (vehicle  $n=6$ , rapamycin  $n=7$ ). B, Immunofluorescence staining for N-cadherin to visualize intercalated disks (red), WGA to detect cell membranes (green), and DAPI to stain nuclei (blue) in adult hearts. White lines indicate representative longitudinally oriented cardiomyocytes used to measure the distance between 2 intercalated disks (scale bar=50  $\mu\text{m}$ ). Cardiomyocyte length was not different between vehicle- and rapamycin-treated adult hearts. C, Calculated cardiomyocyte volume is significantly increased in adult hearts after prenatal rapamycin vs vehicle treatment. D, Cardiomyocyte area fraction is slightly but significantly lower in rapamycin- vs vehicle-treated adult hearts. E, Calculation of cardiomyocyte number revealed a significant reduction in adult hearts after prenatal rapamycin treatment compared with vehicle controls ( $n=5$  per group in B through E). F, Quantification of interstitial fibrosis within the left ventricle myocardium of adult mice did not reveal differences between the treatment groups (vehicle  $n=6$ , rapamycin  $n=8$ ). G, RNA expression of *Nppa* (natriuretic peptide type A), *Myh7* ( $\beta$ -myosin heavy chain 7) and *Nppb* (natriuretic peptide type B) was determined in adult hearts by quantitative real-time polymerase chain reaction. For all 3 genes no significant difference was observed after prenatal rapamycin compared to vehicle treatment ( $n=8$  per group). (\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ ).

restriction and therefore reproducible results when studying fetal programming in adulthood. Furthermore, the rapamycin dose can potentially be adjusted to regulate the degree of IUGR, and an adapted treatment regime might even allow to precisely time the period of mTORC1 inhibition by starting and terminating rapamycin application at the desired gestational stage. Such a protocol could determine time windows during embryonic or fetal development that are most susceptible to growth restriction and therefore most relevant for developmental programming.

An important consideration in assessing the new IUGR model described here is the effect of rapamycin on the maternal organism. Because it is applied systemically to pregnant mice, it is likely to interfere with placental growth and function, even though placental development is already

well established at the onset of treatment (ie, 15.5 dpc in this study).<sup>32</sup> Nevertheless, mTORC1 signaling has been shown to play an important role in placental nutrient sensing and consequently maternal-to-fetal nutrient exchange.<sup>33</sup> Interestingly, however, mTORC1 activity is reduced in the placenta by maternal protein or nutrient restriction in rats and baboons, respectively,<sup>28,29</sup> as well as in human placentas upon IUGR.<sup>34,35</sup> Systemic rapamycin administration to pregnant dams could furthermore interfere with mammary gland development, thereby impairing lactation and milk intake of newborn offspring. Indeed, treatment of pregnant mice with the mTORC1 inhibitor RAD001 or rapamycin starting on the day before delivery and continuing for 5 or 12 days, respectively, disturbs mammary gland tissue architecture and reduces organ size, milk protein production, and pup



weight.<sup>36,37</sup> Rapamycin furthermore reduces milk protein production in murine and bovine mammary epithelial cells in vitro, which was also observed upon amino acid starvation.<sup>38</sup> Importantly, maternal LPD during pregnancy in rats impairs late gestation mammary gland development,<sup>39</sup> and uteroplacental insufficiency induced by uterine artery ligation in rats impairs mammary gland development and function as well as milk production and composition, thereby restraining postnatal pup growth.<sup>30</sup> These studies indicate that impaired mammary gland function as well as placental mTORC1 inhibition appear to be general features of various IUGR animal models, such that a potential maternal impact by rapamycin treatment would not be fundamentally different. The degree of the latter will have to be compared to other IUGR models in future studies, however. This appears furthermore warranted considering lethality in  $\approx 30\%$  of rapamycin-treated pups during the first 12 postnatal days (Figure 6A). The latter could well be caused by lactation insufficiency or metabolic alterations in the maternal organism, resulting in undernourishment of the offspring. Alternatively, postnatal lethality could be independent of maternal factors and might be the result of variable severity of rapamycin-induced IUGR and organ dysfunction or impaired postnatal compensatory processes (eg, insufficient catch-up growth) in some pups.

Our data show that full mTORC1 activity is essential for fetal heart growth during late gestation, given that neonates after prenatal rapamycin treatment have small hearts and a reduced HW/BW ratio compared with vehicle-treated controls. The latter is the result of a disproportional (34.5%) reduction in HW compared with BW (16.4%). These findings are in contrast to maternal LPD or placental insufficiency in rats, in which reduction in offspring HW parallels the reduction in BW, such that HW/BW ratio is normal.<sup>30,31</sup> Interestingly, the reduction in KW (19.7%) in rapamycin-treated pups was proportional to body weight, resulting in normal KW/BW ratios. These data suggest that fetal heart growth more heavily depends on rapamycin-sensitive mTORC1 activity as compared with other organs and that the prenatal heart might be specifically susceptible to fetal programming involving mTORC1 inhibition.

Decreased neonatal heart size after prenatal rapamycin treatment is primarily caused by a reduction in cardiomyocyte size, whereas proliferation is unaffected at birth. This is in agreement with rapamycin inhibiting phosphorylation of S6K1 but not 4E-BP1 in the neonatal heart, as it has been shown that 4E-BP1 primarily mediates the proliferative effects downstream of mTORC1, whereas S6K1 regulates cell size.<sup>40,41</sup> It is furthermore consistent with the heart conditional knockout of mTOR and the upstream mTORC1 activator Rheb, both of which result in full mTORC1 inhibition shortly after birth with reduced cardiomyocyte size by days 8 and 15,

respectively,<sup>7,10</sup> whereas proliferation rates were not directly determined. We furthermore detected increased apoptotic cell death within the myocardium of rapamycin-treated neonates, which is in agreement with previous studies showing cardiomyocyte apoptosis upon mTORC1 inhibition in the embryonic or early postnatal heart.<sup>7-9</sup> It is tempting to speculate that in addition to diminished cell size a reduced cardiomyocyte number due to rapamycin-induced cell death might also contribute to the reduction in heart size. A limitation of our study, however, is that we did not differentiate between cell types when determining proliferation and apoptosis, so we cannot exclude that primarily a nonmyocyte cell population is undergoing cell death. Similarly, unaltered overall proliferation rates in the myocardium could obscure slight differences between cardiac cell types. Nevertheless, when studying adult hearts after prenatal rapamycin treatment, morphometric calculations revealed a reduced cardiomyocyte number in rapamycin- versus vehicle-treated hearts in adulthood. An intriguing question is whether this cardiomyocyte deficit is solely due to increased cardiomyocyte apoptosis in the perinatal phase or whether impaired proliferation in the prenatal period also contributes. In addition, given that murine cardiomyocytes can proliferate during the first postnatal week,<sup>42</sup> and mTORC1 activity is only restored by day 3, cardiomyocyte proliferation could also be impaired shortly after birth. A limitation of our study in this regard is that we did not investigate fetal hearts or placental morphology and function between commencement of rapamycin treatment at 15.5 dpc and birth. Therefore, we cannot exclude that rapamycin induces metabolic alterations in the mother or molecular changes in the placenta that generally impair nutrient supply to the fetus, thereby potentially inhibiting fetal (cardiac) growth beyond the rapamycin-sensitive functions of mTORC1. For example, impaired placental amino acid exchange<sup>28,29,34</sup> could potentially result in full mTOR inhibition, which in turn could inhibit cardiomyocyte proliferation in the fetus. Given that such rapamycin-independent inhibitory effects would be restored quickly after birth, our current study might be unable to detect the molecular and cellular consequences when investigating hearts on postnatal day 1. So whether rapamycin-treated neonates are born with a reduced cardiomyocyte number or whether this develops after birth will have to be determined in future studies, in parallel with investigations of placental function.

The reduction in body and organ weight in rapamycin-treated mice at birth is partially normalized until early adulthood. Body weight and tibia length remain slightly reduced at the age of 11 weeks, which is in agreement with persistent weight reduction in other IUGR rodent models.<sup>31,43</sup> Interestingly, the ability for postnatal catch-up growth appears to vary among organs. Although absolute heart, liver, and



spleen weights are mainly normal in 11-week-old rapamycin-compared with vehicle-treated animals, kidney weight is still reduced, although not different when normalized to body weight or tibia length. Nevertheless, these data suggest that the kidney has an impaired postnatal growth plasticity in response to IUGR (as previously proposed by human as well as animal studies<sup>43,44</sup>), which might contribute to developmental programming of hypertension and kidney disease. For the heart, we observed a discrepancy between overall gravimetric wet weight and LV mass calculated from echocardiography data. Whereas the latter was reduced in rapamycin- versus vehicle-treated mice in adulthood, wet weight was unchanged. These differences are likely caused by the impact of blood or fluids in the cardiac cavities as well as right ventricular and atrial myocardium on wet weight but not LV mass calculations. Given that histological examinations and echocardiography data confirmed slightly reduced LV wall thickness in rapamycin- versus vehicle-treated adult mice, we conclude that heart dimensions are not fully normalized until early adulthood after prenatal mTORC1 inhibition. This is in contrast to other IUGR animal models, which mainly revealed unaltered heart size in adulthood, although it was often determined as wet weight at later stages.<sup>31,43</sup> Therefore, it is quite possible that LV mass completely normalizes in rapamycin-treated mice with further aging.

Neonates after prenatal rapamycin treatment show reduced cardiac output caused by smaller LV dimensions and stroke volume but not impaired contractility when compared with vehicle-treated controls. This is in contrast to mice with an inducible, heart conditional knockout of mTOR or Raptor in adulthood, which develop contractile dysfunction and heart failure under baseline conditions,<sup>45,46</sup> although over a period of 4 to 6 weeks. Importantly, it is also different from heart conditional Rheb KO mice, which show efficient mTORC1 inhibition by postnatal day 5 and contractile dysfunction by day 8.<sup>10</sup> Similarly, heart conditional mTOR KO mice that exhibit efficient mTOR protein depletion by postnatal day 7 develop contractile dysfunction by day 15.<sup>7</sup> The latter 2 genetic models, however, cause a broad inhibition of mTORC1 (and also mTORC2 in case of the mTOR knockout) in the heart beyond rapamycin-sensitive functions, evident as decreased phosphorylation of 4E-BP1, which was unaffected in our current study. These data suggest that LV contractility in fetal and neonatal hearts is relatively insensitive toward rapamycin-dependent mTORC1 inhibition, and cardiac output is primarily determined by LV volume. Within the first few weeks after birth, however, mTORC1 activity becomes essential to establish and maintain normal LV function. The latter coincides with various milestones of postnatal cardiac maturation, such as changes in cardiomyocyte metabolism, growth pattern, tissue composition, and myocardial workload.<sup>47</sup> Thus, it is

tempting to speculate that mTORC1 plays an important role in the transition from fetal to postnatal cardiac growth and function.

Despite slightly reduced LV mass and wall thickness and a reduced number of cardiomyocytes, adult hearts after prenatal rapamycin treatment exhibit normal contractility and complete recovery of cardiac output as compared with neonatal stages without signs of maladaptive myocardial remodeling. This is consistent with some rodent studies showing unaltered LV contractility after IUGR under baseline conditions in adulthood,<sup>31,48</sup> but others have reported reduced heart function at 10 to 12 weeks of age.<sup>49,50</sup> Similarly, most IUGR animal models eventually show increased myocardial fibrosis with age, whereas the onset of tissue remodeling in early adulthood is less clear.<sup>31,49,51</sup> In addition, maternal LPD during pregnancy has recently been proposed to alter the biochemical composition of myocardial tissue in adult offspring.<sup>51</sup> Whether this represents a general effect of IUGR or whether it is specific to the LPD model needs to be confirmed, such that characterizing the cardiac lipid, proteoglycan, and carbohydrate profile in rapamycin-treated hearts might add valuable information to this question. So although prenatal rapamycin treatment obviously results in an IUGR phenotype at birth, it will have to be established whether it furthermore represents a suitable model for fetal programming in adulthood. In this regard it will be interesting to determine the long-term cardiac outcome of adult mice after prenatal rapamycin treatment upon aging as well as their response to various challenges (such as ischemia, pressure overload, or neurohumoral stimulation) in future studies. Such data would have important implications for both fetal programming in general as well as for the specific role of mTORC1 in long-term cardiovascular health and disease susceptibility.

## Acknowledgments

We thank Martin Taube and Stefanie Schelenz for performing echocardiography, Anja Conrad and Michaela Tirre for technical assistance, and the Microscopy Core Facility at the Max-Delbrück-Center for technical support.

## Sources of Funding

This work was supported by institutional funds of the Max-Delbrück-Center for Molecular Medicine Berlin and the University Hospital Münster but received no specific grant from other funding agencies.

## Disclosures

None.

## References

- Gaccioli F, Lager S. Placental nutrient transport and intrauterine growth restriction. *Front Physiol*. 2016;7:40.
- Warner MJ, Ozanne SE. Mechanisms involved in the developmental programming of adulthood disease. *Biochem J*. 2010;427:333–347.
- Thornburg KL. The programming of cardiovascular disease. *J Dev Orig Health Dis*. 2015;6:366–376.
- Dibble CC, Manning BD. Signal integration by mTORC1 coordinates nutrient input with biosynthetic output. *Nat Cell Biol*. 2013;15:555–564.
- Tumaneng K, Russell RC, Guan KL. Organ size control by Hippo and TOR pathways. *Curr Biol*. 2012;22:R368–R379.
- Sciarretta S, Volpe M, Sadoshima J. Mammalian target of rapamycin signaling in cardiac physiology and disease. *Circ Res*. 2014;114:549–564.
- Mazelin L, Panthu B, Nicot AS, Belotti E, Tintignac L, Teixeira G, Zhang Q, Risson V, Baas D, Delaune E, Derumeaux G, Taillandier D, Ohlmann T, Ovize M, Gangloff YG, Schaeffer L. mTOR inactivation in myocardium from infant mice rapidly leads to dilated cardiomyopathy due to translation defects and p53/JNK-mediated apoptosis. *J Mol Cell Cardiol*. 2016;97:213–225.
- Zhang P, Shan T, Liang X, Deng C, Kuang S. Mammalian target of rapamycin is essential for cardiomyocyte survival and heart development in mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014;452:53–59.
- Zhu Y, Pires KM, Whitehead KJ, Olsen CD, Wayment B, Zhang YC, Bugger H, Ilkun O, Litwin SE, Thomas G, Kozma SC, Abel ED. Mechanistic target of rapamycin (mTOR) is essential for murine embryonic heart development and growth. *PLoS One*. 2013;8:e54221.
- Tamai T, Yamaguchi O, Hikoso S, Takeda T, Taneike M, Oka T, Oyabu J, Murakawa T, Nakayama H, Uno Y, Horie K, Nishida K, Sonenberg N, Shah AM, Takeda J, Komuro I, Otsu K. Rheb (Ras homologue enriched in brain)-dependent mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) activation becomes indispensable for cardiac hypertrophic growth after early postnatal period. *J Biol Chem*. 2013;288:10176–10187.
- Drenckhahn JD, Schwarz QP, Gray S, Laskowski A, Kiriazis H, Ming Z, Harvey RP, Du XJ, Thorburn DR, Cox TC. Compensatory growth of healthy cardiac cells in the presence of diseased cells restores tissue homeostasis during heart development. *Dev Cell*. 2008;15:521–533.
- Drenckhahn JD, Strasen J, Heinecke K, Langner P, Yin KV, Skole F, Hennig M, Spallek B, Fischer R, Blaschke F, Heuser A, Cox TC, Black MJ, Thierfelder L. Impaired myocardial development resulting in neonatal cardiac hypoplasia alters postnatal growth and stress response in the heart. *Cardiovasc Res*. 2015;106:43–54.
- Stanley EG, Biben C, Elefanti A, Barnett L, Koentgen F, Robb L, Harvey RP. Efficient Cre-mediated deletion in cardiac progenitor cells conferred by a 3'UTR-ires-Cre allele of the homeobox gene Nkx2-5. *Int J Dev Biol*. 2002;46:431–439.
- Bal MP, de Vries WB, Steendijk P, Homoet-van der Kraak P, van der Leij FR, Baan J, van Oosterhout MF, van Bel F. Histopathological changes of the heart after neonatal dexamethasone treatment: studies in 4-, 8-, and 50-week-old rats. *Pediatr Res*. 2009;66:74–79.
- Buzello M, Boehm C, Orth S, Fischer B, Ehmke H, Ritz E, Mall G, Amann K. Myocyte loss in early left ventricular hypertrophy of experimental renovascular hypertension. *Virchows Arch*. 2003;442:364–371.
- Choo AY, Yoon SO, Kim SG, Roux PP, Blenis J. Rapamycin differentially inhibits S6Ks and 4E-BP1 to mediate cell-type-specific repression of mRNA translation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008;105:17414–17419.
- Kang SA, Pacold ME, Cervantes CL, Lim D, Lou HJ, Ottina K, Gray NS, Turk BE, Yaffe MB, Sabatini DM. mTORC1 phosphorylation sites encode their sensitivity to starvation and rapamycin. *Science*. 2013;341:1236566.
- Kim J, Kundu M, Viollet B, Guan KL. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol*. 2011;13:132–141.
- Chaveroux C, Eichner LJ, Dufour CR, Shatnawi A, Khoutorsky A, Bourque G, Sonenberg N, Giguère V. Molecular and genetic crosstalks between mTOR and ERR $\alpha$  are key determinants of rapamycin-induced nonalcoholic fatty liver. *Cell Metab*. 2013;17:586–598.
- Nazio F, Strappazzon F, Antonoli M, Bielli P, Cianfanelli V, Bordini M, Gretzmeier C, Dengjel J, Piacentini M, Fimia GM, Cecconi F. mTOR inhibits autophagy by controlling ULK1 ubiquitylation, self-association and function through AMBRA1 and TRAF6. *Nat Cell Biol*. 2013;15:406–416.
- Nazio F, Carinci M, Valacca C, Bielli P, Strappazzon F, Antonoli M, Ciccocanti F, Rodolfo C, Campello S, Fimia GM, Sette C, Bonaldo P, Cecconi F. Fine-tuning of ULK1 mRNA and protein levels is required for autophagy oscillation. *J Cell Biol*. 2016;215:841–856.
- Mizushima N, Yoshimori T, Levine B. Methods in mammalian autophagy research. *Cell*. 2010;140:313–326.
- Sarbassov DD, Ali SM, Sengupta S, Sheen JH, Hsu PP, Bagley AF, Markhard AL, Sabatini DM. Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB. *Mol Cell*. 2006;22:159–168.
- Lamming DW, Ye L, Katajisto P, Goncalves MD, Saitoh M, Stevens DM, Davis JG, Salmon AB, Richardson A, Ahima RS, Guertin DA, Sabatini DM, Baur JA. Rapamycin-induced insulin resistance is mediated by mTORC2 loss and uncoupled from longevity. *Science*. 2012;335:1638–1643.
- Alejandro EU, Gregg B, Wallen T, Kumusoglu D, Meister D, Chen A, Merrins MJ, Satin LS, Liu M, Arvan P, Bernal-Mizrachi E. Maternal diet-induced microRNAs and mTOR underlie  $\beta$  cell dysfunction in offspring. *J Clin Invest*. 2014;124:4395–4410.
- Abu Shehab M, Damerill I, Shen T, Rosario FJ, Nijland M, Nathanielsz PW, Kamat A, Jansson T, Gupta MB. Liver mTOR controls IGF-I bioavailability by regulation of protein kinase CK2 and IGFBP-1 phosphorylation in fetal growth restriction. *Endocrinology*. 2014;155:1327–1339.
- Zhu MJ, Ford SP, Nathanielsz PW, Du M. Effect of maternal nutrient restriction in sheep on the development of fetal skeletal muscle. *Biol Reprod*. 2004;71:1968–1973.
- Rosario FJ, Jansson N, Kanai Y, Prasad PD, Powell TL, Jansson T. Maternal protein restriction in the rat inhibits placental insulin, mTOR, and STAT3 signaling and down-regulates placental amino acid transporters. *Endocrinology*. 2011;152:1119–1129.
- Kavitha JV, Rosario FJ, Nijland MJ, McDonald TJ, Wu G, Kanai Y, Powell TL, Nathanielsz PW, Jansson T. Down-regulation of placental mTOR, insulin/IGF-I signaling, and nutrient transporters in response to maternal nutrient restriction in the baboon. *FASEB J*. 2014;28:1294–1305.
- O'Dowd R, Kent JC, Moseley JM, Wlodek ME. Effects of uteroplacental insufficiency and reducing litter size on maternal mammary function and postnatal offspring growth. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2008;294:R539–R548.
- Zohdi V, Lim K, Pearson JT, Black MJ. Developmental programming of cardiovascular disease following intrauterine growth restriction: findings utilising a rat model of maternal protein restriction. *Nutrients*. 2014;7:119–152.
- Coan PM, Ferguson-Smith AC, Burton GJ. Developmental dynamics of the definitive mouse placenta assessed by stereology. *Biol Reprod*. 2004;70:1806–1813.
- Jansson T, Aye IL, Goberdhan DC. The emerging role of mTORC1 signaling in placental nutrient-sensing. *Placenta*. 2012;33(suppl 2):e23–e29.
- Roos S, Jansson N, Palmberg I, Säljö K, Powell TL, Jansson T. Mammalian target of rapamycin in the human placenta regulates leucine transport and is down-regulated in restricted fetal growth. *J Physiol*. 2007;582(Pt 1):449–459.
- Yung HW, Calabrese S, Hynx D, Hemmings BA, Cetin I, Charnock-Jones DS, Burton GJ. Evidence of placental translation inhibition and endoplasmic reticulum stress in the etiology of human intrauterine growth restriction. *Am J Pathol*. 2008;173:451–462.
- Jankiewicz M, Groner B, Desrivieres S. Mammalian target of rapamycin regulates the growth of mammary epithelial cells through the inhibitor of deoxyribonucleic acid binding Id1 and their functional differentiation through Id2. *Mol Endocrinol*. 2006;20:2369–2381.
- Fu NY, Rios AC, Pal B, Soetanto R, Lun AT, Liu K, Beck T, Best SA, Vaillant F, Bouillet P, Strasser A, Preiss T, Smyth GK, Lindeman GJ, Visvader JE. EGF-mediated induction of Mcl-1 at the switch to lactation is essential for alveolar cell survival. *Nat Cell Biol*. 2015;17:365–375.
- Moshel Y, Rhoads RE, Barash I. Role of amino acids in translational mechanisms governing milk protein synthesis in murine and ruminant mammary epithelial cells. *J Cell Biochem*. 2006;98:685–700.
- Bautista CJ, Rodríguez-González GL, Torres N, Hernández-Pando R, Ramírez V, Rodríguez-Cruz M, Nathanielsz PW, Zambrano E. Protein restriction in the rat negatively impacts long-chain polyunsaturated fatty acid composition and mammary gland development at the end of gestation. *Arch Med Res*. 2013;44:429–436.
- Ohanna M, Sobering AK, Lapointe T, Lorenzo L, Praud C, Petroulakis E, Sonenberg N, Kelly PA, Sotiropoulos A, Pende M. Atrophy of S6K1(–/–) skeletal muscle cells reveals distinct mTOR effectors for cell cycle and size control. *Nat Cell Biol*. 2005;7:286–294.
- Dowling RJ, Topisirovic I, Alain T, Bidinosti M, Fonseca BD, Petroulakis E, Wang X, Larsson O, Selvaraj A, Liu Y, Kozma SC, Thomas G, Sonenberg N. mTORC1-mediated cell proliferation, but not cell growth, controlled by the 4E-BPs. *Science*. 2010;328:1172–1176.
- Foglia MJ, Poss KD. Building and re-building the heart by cardiomyocyte proliferation. *Development*. 2016;143:729–740.
- Wlodek ME, Westcott K, Siebel AL, Owens JA, Moritz KM. Growth restriction before or after birth reduces nephron number and increases blood pressure in male rats. *Kidney Int*. 2008;74:187–195.

44. Schmidt IM, Chellakooty M, Boisen KA, Damgaard IN, Mau Kai C, Olgaard K, Main KM. Impaired kidney growth in low-birth-weight children: distinct effects of maturity and weight for gestational age. *Kidney Int.* 2005;68:731–740.
45. Zhang D, Contu R, Latronico MV, Zhang J, Rizzi R, Catalucci D, Miyamoto S, Huang K, Ceci M, Gu Y, Dalton ND, Peterson KL, Guan KL, Brown JH, Chen J, Sonenberg N, Condorelli G. mTORC1 regulates cardiac function and myocyte survival through 4E-BP1 inhibition in mice. *J Clin Invest.* 2010;120:2805–2816.
46. Shende P, Plaisance I, Morandi C, Pellieux C, Berthonneche C, Zorzato F, Krishnan J, Lerch R, Hall MN, Rüegg MA, Pedrazzini T, Brink M. Cardiac raptor ablation impairs adaptive hypertrophy, alters metabolic gene expression, and causes heart failure in mice. *Circulation.* 2011;123:1073–1082.
47. Jonker SS, Louey S. Endocrine and other physiologic modulators of perinatal cardiomyocyte endowment. *J Endocrinol.* 2016;228:R1–R18.
48. Rueda-Clausen CF, Morton JS, Davidge ST. Effects of hypoxia-induced intrauterine growth restriction on cardiopulmonary structure and function during adulthood. *Cardiovasc Res.* 2009;81:713–722.
49. Menendez-Castro C, Toka O, Fahlbusch F, Cordasic N, Wachtveitl R, Hilgers KF, Rascher W, Hartner A. Impaired myocardial performance in a normotensive rat model of intrauterine growth restriction. *Pediatr Res.* 2014;75:697–706.
50. Alsaied T, Omar K, James JF, Hinton RB, Crombleholme TM, Habli M. Fetal origins of adult cardiac disease: a novel approach to prevent fetal growth restriction induced cardiac dysfunction using insulin like growth factor. *Pediatr Res.* 2017;81:919–925.
51. Zohdi V, Wood BR, Pearson JT, Bamberg KR, Black MJ. Evidence of altered biochemical composition in the hearts of adult intrauterine growth-restricted rats. *Eur J Nutr.* 2013;52:749–758.

#### **4.5. Die Folgen einer Proteinrestriktion in der Nahrung für das Wachstum des prä- und postnatalen Herzens der Maus**

Eine Proteinrestriktion von normalerweise ~22% auf ~8% in der mütterlichen Nahrung während der Trächtigkeit ist ein weit verbreitetes Modell zu Induktion einer IUGR in Nagern (siehe Kapitel 1.4.4.). Viele Studien zeigen unter diesen Bedingungen in den Nachkommen eine Reduktion des Körpergewichts bei der Geburt sowie kleinere Herzen, möglicherweise bedingt durch eine Reduktion der Kardiomyozytenzahl (87). Werden diese Nachkommen postnatal auf eine normale Nahrung umgestellt, so führt die IUGR zu verschiedenen Veränderungen im adulten Herzen, die letztendlich dessen Stress-Anfälligkeit erhöhen und beispielsweise die Erholung der Herzfunktion nach Ischämie/Reperfusion verschlechtern. Es wurde postuliert, dass solche negativen Konsequenzen einer durch Nährstoffmangel induzierten IUGR auf das adulte Herz vor allem durch eine fehlende Übereinstimmung zwischen prä- und postnatalem Nährstoffangebot bedingt sind (siehe Kapitel 1.4.1.). Demnach sollte es keine negativen Folgen für das adulte Herz haben, wenn ein Nährstoffmangel während der intrauterinen Entwicklung auch nach der Geburt weiterhin bestehen bleibt. Aus diesen Überlegungen leiteten wir die Hypothese ab, dass eine kontinuierliche Proteinrestriktion während der intrauterinen und postnatalen Entwicklung keine pathologischen Veränderungen im adulten Herzen der Maus induzieren dürfte.

Um dies zu überprüfen, wurden weibliche Mäuse vor und während der Trächtigkeit sowie während der Säuge-Phase auf einer proteinreduzierten Diät (low protein diet = LPD) gehalten. Nach der Trennung von der Mutter wurden auch die Nachkommen bis ins Alter von 12 Wochen mit derselben LPD ernährt. Kontrolltiere wurden zu jeder Zeit während der Trächtigkeit, der Säuge-Phase und danach bis ins Alter von 12 Wochen auf einem normalen Futter gehalten. Die LPD führt im Vergleich zur Kontrolldiät bei der Geburt zu einer leichten Reduktion des Körpergewichts in weiblichen aber nicht in männlichen Nachkommen, wobei die Herzgröße bei beiden Geschlechtern nicht beeinträchtigt ist. Die zelluläre Zusammensetzung des myokardialen Gewebes, die Zellzyklus-Aktivität und die Entwicklung des Gefäßsystems wird im neonatalen Herzen durch eine pränatale LPD nicht beeinflusst. Lediglich in weiblichen (nicht aber in männlichen) LPD-Hezen zeigt sich bei der Geburt eine leichte Größenzunahme der Kardiomyozyten, was bei unveränderter Herzgröße auf eine reduzierte Zellzahl hindeuten könnte. Im Alter von 12 Wochen sind Mäuse auf LPD insgesamt kleiner als Kontrollen, haben aber ein normal großes und morphologisch unauffälliges Herz. Echokardiographisch zeigt sich in den LPD-Tieren eine leicht erhöhte Wanddicke des linken Ventrikels bei normaler Kontraktilität. Histologische sind adulte Tiere auf LPD dagegen durch ein kleineres Kardiomyozyten-Volumen und eine höhere Kardiomyozyten-Dichte charakterisiert. Die Kardiomyozytenzahl pro Herz ist in LPD-Tieren im Vergleich zu Kontrollen folglich tendenziell erhöht, dieser Unterschied erreicht aber keine statistische Signifikanz. Die Fibrosierung des linksventrikulären Myokards und die Dichte an Fibrozyten sind in LPD-Tiere im Vergleich zu Kontrollen reduziert, während die Kapillardichte erhöht ist. Zusammenfassend deuten ein reduziertes Kardiomyozyten-Volumen, eine verringerte Ablagerung von extrazellulärer Matrix und eine bessere Kapillarisation des Myokards auf einen möglicherweise vorteilhaften Gewebeumbau im LPD-Hezen hin. Dies würde nicht nur zeigen, dass die Aufrechterhaltung von konstanten Nahrungsbedingungen vor und nach der Geburt pathologische Veränderungen im adulten Herzen verhindern könnte, sondern dass eine dauerhafte Proteinreduktion in der Ernährung möglicherweise generell positive Auswirkungen auf die Gewebe-Homöostase des Herzens hat.

**Veröffentlichung zu den dargestellten Arbeiten:**

Hennig M, Ewering L, Pyschny S, Shimoyama S, Olecka M, Ewald D, Magarin M, Uebing A, Thierfelder L, Jux C, Drenckhahn JD. Dietary protein restriction throughout intrauterine and postnatal life results in potentially beneficial myocardial tissue remodeling in the adult mouse heart. Sci Rep. 2019;9:15126.



OPEN

# Dietary protein restriction throughout intrauterine and postnatal life results in potentially beneficial myocardial tissue remodeling in the adult mouse heart

Maria Hennig<sup>2</sup>, Lea Ewering<sup>1</sup>, Simon Pyschny<sup>1</sup>, Shinya Shimoyama<sup>1,4,5</sup>, Maja Olecka<sup>2</sup>, Dominik Ewald<sup>2</sup>, Manuela Magarin<sup>2</sup>, Anselm Uebing<sup>1</sup>, Ludwig Thierfelder<sup>2</sup>, Christian Jux<sup>1,3</sup> & Jörg-Detlef Drenckhahn<sup>1,2,3\*</sup> 

Diet composition impacts metabolic and cardiovascular health with high caloric diets contributing to obesity related disorders. Dietary interventions such as caloric restriction exert beneficial effects in the cardiovascular system, but alteration of which specific nutrient is responsible is less clear. This study investigates the effects of a low protein diet (LPD) on morphology, tissue composition and function of the neonatal and adult mouse heart. Mice were subjected to LPD (8.8% protein) or standard protein diet (SPD, 22% protein) throughout intrauterine and postnatal life. At birth LPD female but not male offspring exhibit reduced body weight whereas heart weight was unchanged in both sexes. Cardiomyocyte cross sectional area was increased in newborn LPD females compared to SPD, whereas proliferation, cellular tissue composition and vascularization were unaffected. Adult female mice on LPD exhibit reduced body weight but normal heart weight compared to SPD controls. Echocardiography revealed normal left ventricular contractility in LPD animals. Histology showed reduced interstitial fibrosis, lower cardiomyocyte volume and elevated numbers of cardiomyocyte and non-myocyte nuclei per tissue area in adult LPD versus SPD myocardium. Furthermore, capillary density was increased in LPD hearts. In conclusion, pre- and postnatal dietary protein restriction in mice causes a potentially beneficial myocardial remodeling.

Diet composition has a major impact on metabolic and cardiovascular health in humans and influences the pathogenesis of various chronic diseases including diabetes mellitus, hypertension and coronary heart disease<sup>1</sup>. One of the most obvious examples is obesity induced by high caloric diets (containing high levels of saturated fats and refined carbohydrates, i.e. sugar), which causes metabolic syndrome and is associated with most of the diseases listed above<sup>2</sup>. Furthermore, a high fat diet (HFD) has been shown to execute negative effects in animal models by increasing body weight and fat deposition, increasing blood glucose and lipid levels, causing insulin resistance and elevating blood pressure<sup>3,4</sup>. In the rodent heart, HFD causes variable outcomes likely caused by differences in diet composition, onset and duration as well as species, gender or genetic background<sup>3</sup>. Nevertheless, HFD appears to promote cardiac hypertrophy resulting in impaired contractility under baseline conditions<sup>5,6</sup> and increase myocardial susceptibility to ischemia<sup>7,8</sup>.

<sup>1</sup>Department of Pediatric Cardiology, University Hospital Münster, Münster, Germany. <sup>2</sup>Max-Delbrück-Center for Molecular Medicine, Berlin, Germany. <sup>3</sup>Department of Pediatric Cardiology, Justus Liebig University, Gießen, Germany. <sup>4</sup>Department of Pediatric Cardiology, Gunma Children's Medical Center, Gunma, Japan. <sup>5</sup>Department of Pediatrics, Gunma University Graduate School of Medicine, Gunma, Japan. \*email: [Joerg.Drenckhahn@paediat.med.uni-giessen.de](mailto:Joerg.Drenckhahn@paediat.med.uni-giessen.de)

Caloric restriction (CR) has been shown to improve metabolic and cardiovascular health in humans<sup>9,10</sup> and extend lifespan in various model organisms<sup>11</sup>. In rodents, for example, CR prevents hypertension and cardiac hypertrophy in spontaneously hypertensive rats<sup>12</sup>, improves heart function after ischemia/reperfusion injury or myocardial infarction<sup>13,14</sup> and ameliorates ageing associated cardiac dysfunction<sup>15,16</sup>. Furthermore, intermittent fasting has been shown to exert cardioprotective effects in the rat heart<sup>17,18</sup>. Interestingly, a Mediterranean diet is associated with beneficial influences on human cardiovascular health and lifespan<sup>19</sup>. Although a Mediterranean diet might contain less calories compared to most western diets, it has become increasingly clear that its composition (high amounts of whole grains, vegetables, fruits, nuts and olive oil; moderate amounts of seafood, fish, poultry and dairy products; little red meat and sweets) likely mediates the positive impact<sup>19</sup>.

In order to identify specific diet components that mediate the beneficial effects of CR, carbohydrate and protein content has been modified. Interestingly, low carbohydrate/high protein diets appear to increase the risk of cardiovascular disease in humans<sup>20,21</sup>. In contrast, dietary protein restriction has been associated with longevity in various model organisms as well as humans by reducing overall mortality and cancer incidence<sup>22–24</sup>. It even appears that specific amino acids, such as branched-chain amino acids or methionine, might be primarily responsible for the positive outcome of dietary protein restriction<sup>23</sup>.

Although beneficial influences of a low protein diet (LPD) on overall metabolic health and longevity have been proposed in animal models and humans, the specific effects on the heart have not been investigated. The aim of this study was to expose mice to dietary protein restriction both throughout intrauterine development as well as postnatal life and investigate the consequences for the heart at birth and in early adulthood. Our data revealed normal left ventricular function and various potentially beneficial alterations in cell composition and vascularization of the LV myocardium in adult mice constantly on LPD.

## Results

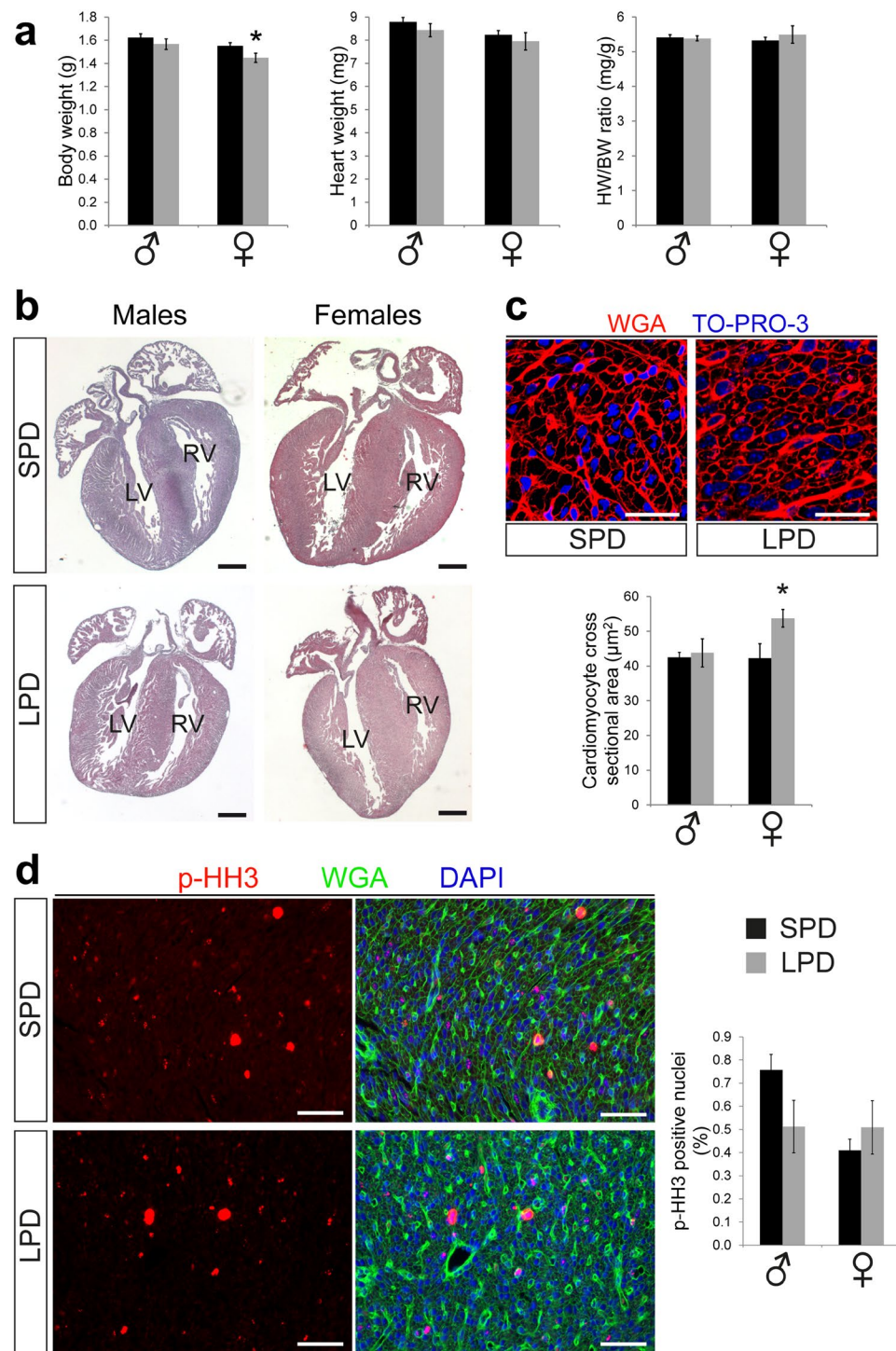
**Reduced protein content in the diet is not compensated for by increased food intake in female mice.** We subjected female mice to LPD (8.8% protein compared to 22% in the standard protein diet (SPD)) for  $\geq 2$  weeks prior to mating and throughout pregnancy. Mice could potentially compensate the effect of the altered diet composition by increasing food consumption, such that protein uptake would not be different compared to the SPD group. We measured food intake in pregnant and non-pregnant adult female mice but did not find a difference between groups (Supplementary Fig. S1a and S1b). Consequently, the calculated daily protein uptake per mouse normalized to body weight was  $44.7 \pm 3.2$  mg/g BW in SPD versus  $14.7 \pm 0.7$  mg/g BW in LPD non-pregnant females and  $29.2 \pm 0.6$  mg/g BW versus  $10.4 \pm 1.2$  mg/g BW in pregnant females, respectively.

**LPD reduces body weight in female but not male offspring at birth and does not affect heart size or cardiac morphology.** To explore the consequences of intrauterine protein restriction on the neonatal heart, we analyzed mice from SPD and LPD litters on postnatal day 1 (P1). Importantly, litter size was comparable between both groups (Supplementary Fig. S1c). Although maternal LPD during pregnancy has been shown to reduce birth weight in both sexes<sup>25</sup>, we only observed a reduction in body weight in female but not male offspring (Fig. 1a). Heart weight as well as heart weight to body weight ratios were not different between SPD and LPD hearts in both sexes at P1 (Fig. 1a). Histological examinations confirmed normal cardiac morphology, left ventricular (LV) dimensions and wall thickness in LPD compared to SPD neonates (Fig. 1b).

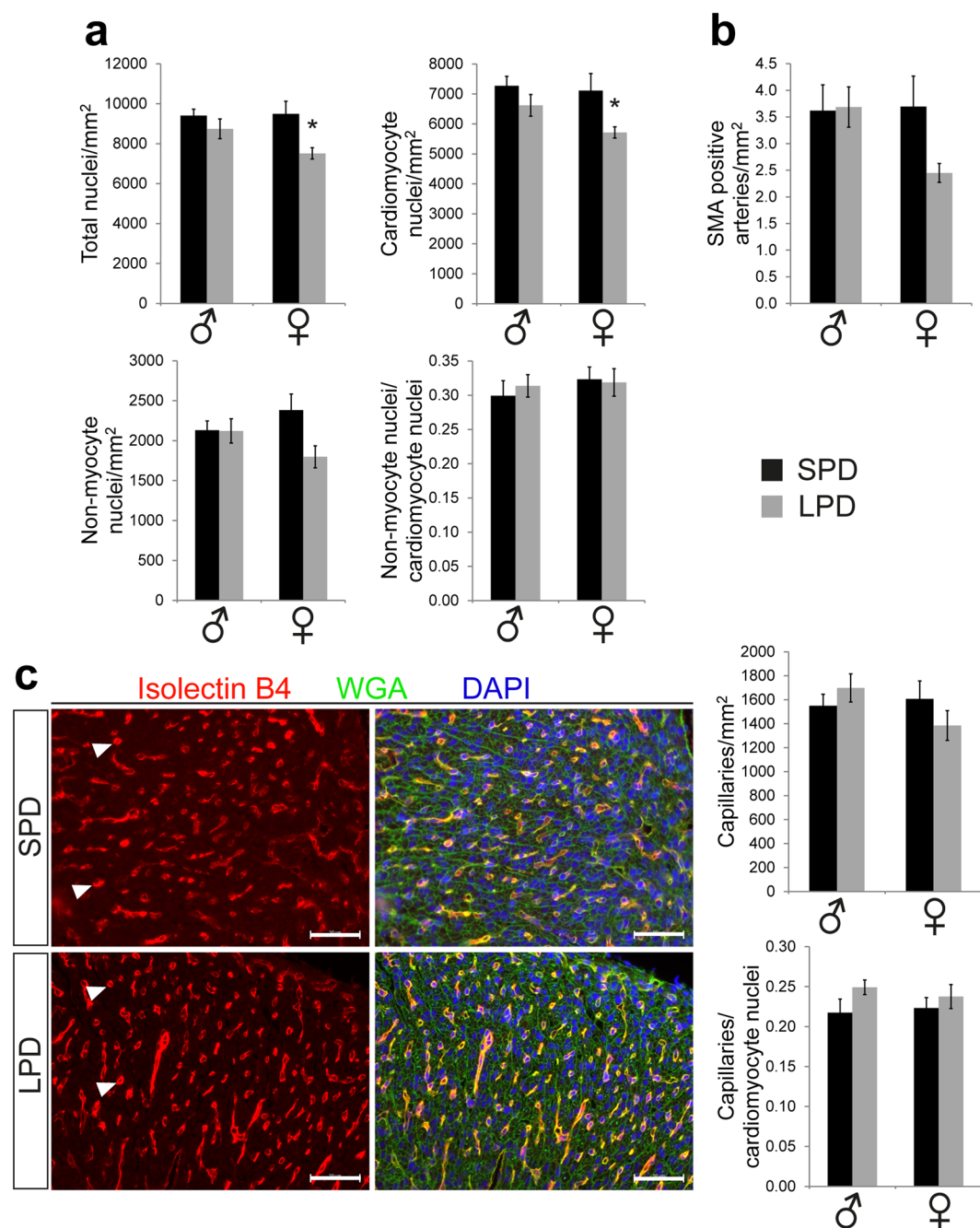
**Sex dependent alterations in cardiomyocyte size but not proliferation in newborn LPD compared to SPD mice.** Neonatal heart sections were stained with fluorochrome-conjugated wheat germ agglutinin (WGA) to visualize cell membranes and measure cardiomyocyte cross sectional area (CSA) in the LV myocardium. Whereas no difference in cardiomyocyte CSA was observed between SPD and LPD males, CSA was significantly increased in LPD compared to SPD females at P1 (Fig. 1c). The latter indicates a sex specific effect of prenatal LPD on cardiomyocyte size at birth. Proliferation rates in the neonatal heart were investigated using immunostaining for phosphorylated histone H3 (p-HH3) to detect mitotic cells. When normalizing the number of p-HH3 positive nuclei to the total number of nuclei in the left ventricular myocardium (irrespective of cell type), no differences in overall proliferation rates were observed in LPD compared to SPD male and female P1 hearts (Fig. 1d). In summary, these data indicate that under the experimental conditions used in this study maternal LPD during pregnancy has sex specific effects on cardiomyocyte size but not cell cycle activity in the neonatal heart.

**Normal cell composition in LPD versus SPD myocardium at birth.** Cellular tissue composition was determined in the left ventricular myocardium of newborn SPD and LPD hearts. Non-myocytes and cardiomyocytes were differentiated based on WGA staining of cell membranes in combination with DAPI staining of nuclei (see methods and Supplementary Fig. S2). Consistent with increased cardiomyocyte CSA, the number of total nuclei as well as cardiomyocyte nuclei normalized to myocardial tissue area was reduced in LPD compared to SPD female hearts (Fig. 2a). The number of non-myocyte nuclei per tissue area and the ratio of non-myocyte per cardiomyocyte nuclei were not affected by LPD, however (Fig. 2a). Nuclei numbers per area as well as non-myocyte to cardiomyocyte nuclei ratio was not different in LPD versus SPD male myocardium (Fig. 2a), consistent with normal cardiomyocyte size in LPD male hearts. These data indicate appropriate cellular tissue composition in LPD compared to SPD neonatal myocardium, despite alterations caused by increased cardiomyocyte size in LPD females.

**Normal vascularization in newborn LPD compared to SPD myocardium.** To evaluate whether prenatal LPD has consequences for myocardial vascularization in the neonatal heart, we investigated the number of coronary arteries in SPD and LPD LV myocardium at P1 based on immunofluorescence staining of smooth muscle cells in vessel walls (Supplementary Fig. S3a). These data revealed a normal number of intramyocardial



**Figure 1.** Normal cardiac size and morphology but increased cardiomyocyte cross sectional area in LPD compared to SPD neonatal female mice. **(a)** Body and heart weight were determined in neonatal mice from SPD and LPD pregnancies on postnatal day 1. Body weight was reduced in LPD compared to SPD females but not males. Heart weight (absolute as well as normalized to body weight) is not affected by LPD (SPD ♂  $n = 22$ , LPD ♂  $n = 17$ , SPD ♀  $n = 20$ , LPD ♀  $n = 11$  litters,  $*P < 0.05$  versus SPD females). **(b)** Representative overview images of male and female P1 hearts on SPD and LPD (H&E staining, RV = right ventricle, LV = left ventricle, scale bar = 500  $\mu\text{m}$ ). **(c)** Fluorescence images of cross-sectioned cardiomyocyte in the LV myocardium of neonatal SPD and LPD female hearts. Cell membranes are stained in red using WGA and nuclei in blue using TO-PRO-3. Cardiomyocyte cross sectional area is increased in female but not male hearts on LPD compared to SPD (SPD ♂  $n = 5$ , LPD ♂  $n = 6$ , SPD ♀  $n = 6$ , LPD ♀  $n = 6$  litters, scale bar = 25  $\mu\text{m}$ ,  $*P < 0.05$  versus SPD females). **(d)** Immunofluorescence staining for phosphorylated histone H3 (p-HH3, red) was used to detect cell proliferation in the LV myocardium of neonatal SPD and LPD mice. Cell membranes were stained in green and nuclei in blue using WGA and DAPI, respectively. No difference in proliferation rates was observed between groups (SPD ♂  $n = 5$ , LPD ♂  $n = 6$ , SPD ♀  $n = 6$ , LPD ♀  $n = 5$  litters, scale bar = 50  $\mu\text{m}$ ).



**Figure 2.** Cellular tissue composition and vascularization in the neonatal LPD heart. **(a)** The total number of nuclei as well as the number of cardiomyocyte nuclei per LV tissue area is reduced in LPD compared to SPD females whereas no difference between diets was observed in males. The number of non-myocyte nuclei per area as well as the ratio of non-myocyte to cardiomyocyte nuclei are not different between groups (SPD ♂  $n = 5$ , LPD ♂  $n = 6$ , SPD ♀  $n = 6$ , LPD ♀  $n = 5$  litters,  $*P < 0.05$  versus SPD females). **(b)** The number of smooth muscle actin (SMA) positive arteries within the LV myocardium was not different between SPD and LPD neonates of both sexes (SPD ♂  $n = 5$ , LPD ♂  $n = 6$ , SPD ♀  $n = 6$ , LPD ♀  $n = 6$  litters). **(c)** Capillarization of the LV myocardium in neonatal SPD and LPD hearts was determined by Isolectin B4 fluorescence staining (red, arrowheads indicate capillary profiles) whereas cell membranes were stained in green using WGA and nuclei in blue using DAPI. No differences in capillary density or the ratio of capillaries per cardiomyocyte nuclei were observed between groups (SPD ♂  $n = 5$ , LPD ♂  $n = 6$ , SPD ♀  $n = 6$ , LPD ♀  $n = 5$  litters, scale bar = 50  $\mu\text{m}$ ).

arteries per tissue area in LPD compared to SPD males and females, although LPD females tended to have fewer arteries compared SPD females (Fig. 2b). Morphology and size of arteries was not different in LPD versus SPD female hearts, however (Supplementary Fig. S3b and S3c). Capillary density was determined based on Isolectin B4 fluorescence staining to detect endothelial cells (Fig. 2c). The number of capillaries normalized to myocardial



tissue area as well as the ratio of capillaries per cardiomyocyte nuclei (determined by WGA/DAPI staining as described above) was not different between dietary groups in both sexes (Fig. 2c), indicating normal development of the myocardial microvasculature in LPD hearts. In summary, these data show that prenatal dietary protein restriction does not affect vascularization in the neonatal mouse myocardium.

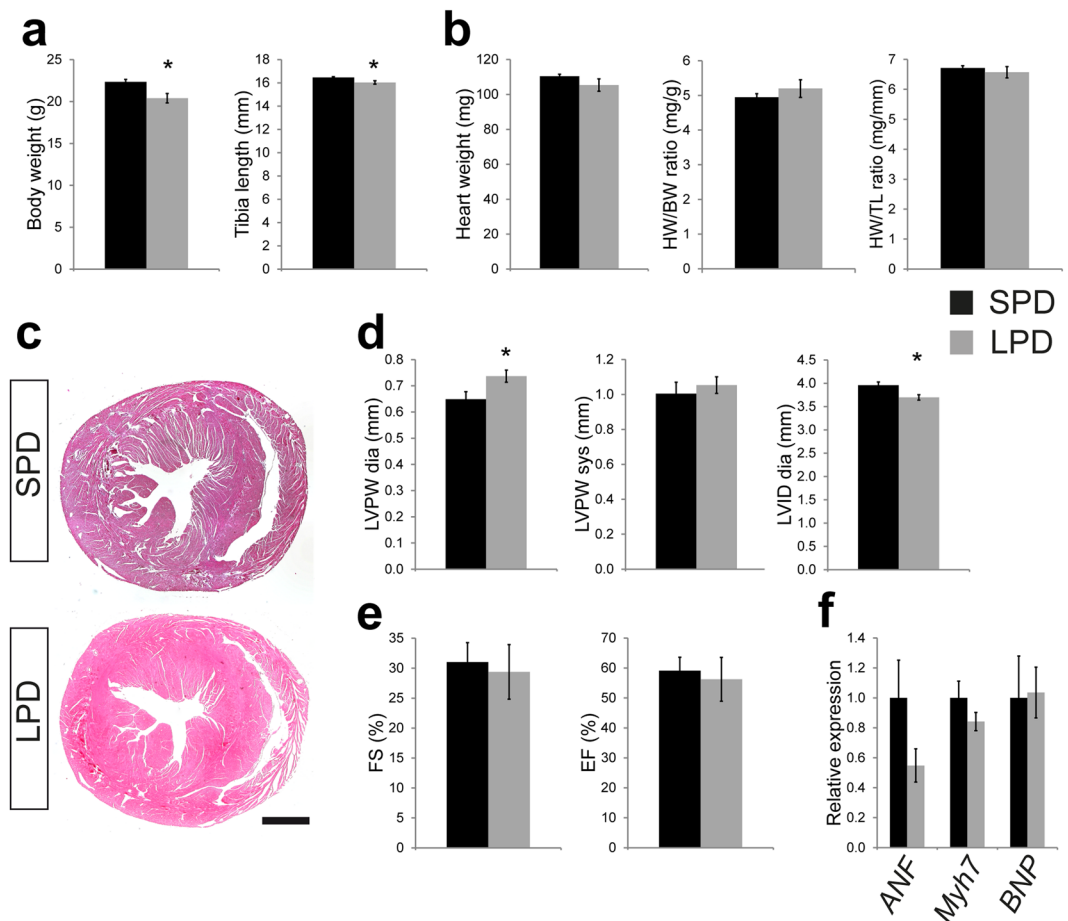
**Reduced body weight but normal cardiac morphology and function in adult females subjected to pre- and postnatal LPD.** Given the sex specific alterations in body weight and cardiomyocyte size observed in LPD females but not males at birth, we subjected female mice born from LPD pregnancies to postnatal LPD until early adulthood (i.e. 11 weeks of age). Another rationale to focus on females was the aim to investigate the effect of dietary protein restriction on postnatal compensatory growth of the heart after neonatal cardiac hypoplasia. Therefore, we used mice carrying a heart conditional knockout of the X-linked Holocytochrome c synthase (*Hccs*) gene<sup>26</sup>. Whereas the hemizygous inactivation of *Hccs* in the heart of male mice results in embryonic lethality, heterozygous *Hccs* knockout females (*cHccs*<sup>+/-</sup>) are born with reduced heart size due to a reduced number of cardiomyocytes<sup>27</sup>. Heart size normalizes during postnatal development until early adulthood mainly by compensatory hypertrophy of existing cardiomyocytes<sup>27</sup>. To test whether this process is dependent on dietary protein uptake, we included *cHccs*<sup>+/-</sup> female mice in this study and subjected them to pre- and postnatal dietary protein restriction.

Pre- and postnatal LPD results in reduced body weight and tibia length (Fig. 3a) but normal absolute heart weight as well as normal heart weight to body weight and heart weight to tibia length ratios in adult wildtype LPD compared to SPD female mice (Fig. 3b). Interestingly, none of these parameters was different in LPD compared to SPD *cHccs*<sup>+/-</sup> females or in LPD *cHccs*<sup>+/-</sup> compared to LPD wildtype females (Supplementary Fig. S4). Gross cardiac morphology was not affected by LPD in wildtype mice, as revealed by histological analyses (Fig. 3c). To gain further insights into LV morphology and function, we performed echocardiography in adult LPD and SPD female mice. These data revealed a slight but significant increase in LV wall thickness in diastole but not in systole as well as a slightly reduced LV internal diameter in LPD compared to SPD females (Fig. 3d). Left ventricular contractility, however, was not different between dietary groups (Fig. 3e). Consistently, RNA expression of fetal genes reactivated in the adult heart upon pathological conditions is not different between LPD and SPD females (Fig. 3f). Interestingly, echocardiography furthermore revealed that LV wall thickness, diameter and contractility in *cHccs*<sup>+/-</sup> female mice were not negatively affected by pre- and postnatal LPD (Supplementary Table S1). The latter suggests that the demands for postnatal compensatory growth and maintenance of normal cardiac function after neonatal cardiac hypoplasia are not negatively influenced by LPD. In summary, pre- and postnatal dietary protein restriction is well tolerated in the murine heart until early adulthood and does not negatively impact on left ventricular function.

**Reduced cardiomyocyte size but normal cardiomyocyte number in adult hearts after pre- and postnatal LPD.** The consequences of pre- and postnatal LPD on myocardial tissue composition were determined in heart sections of 11 week old female mice. Cardiomyocyte CSA was measured based on WGA staining (Fig. 4a), which revealed a reduced CSA in LPD compared to SPD hearts (Fig. 4b). Cardiomyocyte length was not different between dietary groups (Fig. 4b), as determined by N-cadherin immunofluorescence staining of intercalated discs in longitudinally oriented cardiomyocytes (Supplementary Fig. S5). Consequently, the calculated cardiomyocyte volume was significantly reduced in LPD compared to SPD hearts (Fig. 4b). Furthermore, the cardiomyocyte area fraction was reduced in LPD versus SPD hearts (Fig. 4c), as determined by WGA staining in tissue sections. Based on heart weight, myocardial tissue density, cardiomyocyte volume and cardiomyocyte area fraction, the number of cardiomyocytes per heart was calculated (see methods). This revealed a normal cardiomyocyte number in LPD compared to SPD female hearts (Fig. 4d). Considering reduced cardiomyocyte volume but normal cardiomyocyte number in adult LPD compared to SPD females, this raises the question how normal heart weight and morphology (Fig. 3) is achieved upon LPD conditions. One possible explanation would be the compensatory deposition of extracellular matrix (ECM), which could also explain the reduced cardiomyocyte area fraction. However, quantification of Sirius Red stained tissue sections actually revealed a reduction in myocardial fibrosis in adult LPD versus SPD hearts (Fig. 4e). The latter was confirmed by unaltered RNA and protein expression of various ECM components (i.e. collagen isoforms, fibronectin, osteopontin) and key regulators of fibrosis (TGF- $\beta$ ) in LPD hearts (Supplementary Fig. S6). In summary, pre- and postnatal LPD results in normal cardiomyocyte number but reduced size, which is not compensated by excessive ECM deposition to maintain normal organ size.

**Increased cell density per tissue area in the adult heart after pre- and postnatal LPD.** Given normal cardiomyocyte number but reduced cardiomyocyte volume we hypothesized that a non-myocyte cell population might account for normal heart size in adult LPD females. This would be consistent with a reduced cardiomyocyte area fraction in the absence of myocardial fibrosis, as shown above (Fig. 4). Cardiomyocyte and non-myocyte nuclei were differentiated based on WGA and DAPI staining, as described for neonatal hearts (see methods and Supplementary Fig. S7). The number of both non-myocyte nuclei as well as cardiomyocyte nuclei per tissue area was significantly increased in LPD compared to SPD hearts, resulting in a normal non-myocyte/cardiomyocyte nuclei ratio (Supplementary Fig. S7). Given that differentiating myocardial cell types based on WGA and DAPI staining might be inaccurate we verified these data by specifically detecting cardiomyocyte nuclei using immunofluorescence staining for PCM1 (pericentriolar material 1) (Fig. 5a). The latter has been shown to reliably label cardiomyocyte nuclei in the adult heart<sup>28</sup>. This approach confirmed the results based on WGA/DAPI staining (Supplementary Fig. S7), showing increased numbers of total nuclei as well as PCM1 positive cardiomyocyte nuclei per LV tissue area in LPD compared to SPD hearts but normal ratios of non-myocyte (PCM1 negative) nuclei per cardiomyocyte (PCM1 positive) nuclei (Fig. 5a).



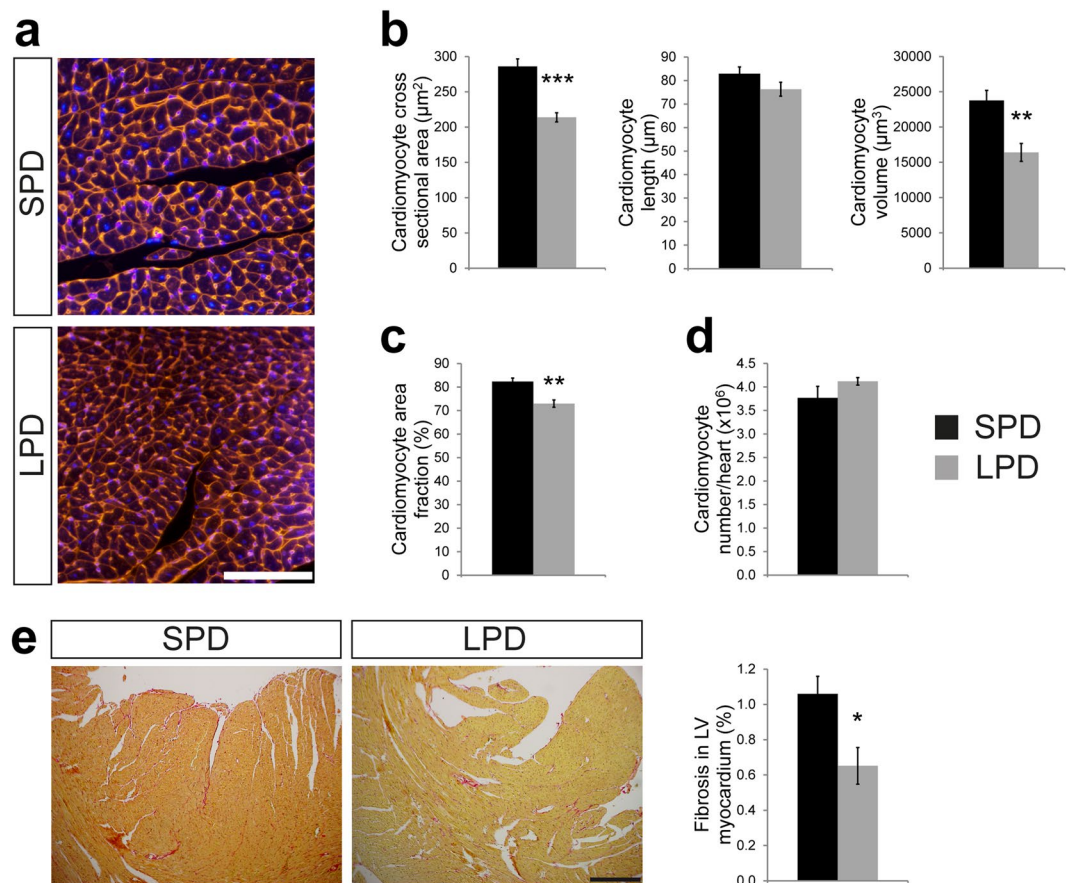


**Figure 3.** Reduced body weight but normal heart weight and contractility in adult female mice on LPD. **(a)** Body weight and tibia length are reduced in 11 week old LPD compared to SPD female mice (\* $P < 0.05$ ). **(b)** Absolute heart weight as well as heart weight normalized to body weight (HW/BW) or tibia length (HW/TL) is not different between SPD and LPD females ( $n = 5$  litters per group in (a) and (b)). **(c)** Histological analyses revealed no major alterations of gross myocardial morphology in adult LPD compared to SPD mice (H&E staining, scale bar = 1 mm). **(d)** Echocardiographic measurements show a significantly increased left ventricular posterior wall (LVPW) thickness in diastole but not systole as well as a reduced left ventricular internal diameter (LVID) in 11 week old LPD compared to SPD females (\* $P < 0.05$ ). **(e)** Left ventricular contractility determined by echocardiography is not different between SPD and LPD hearts (FS = fractional shortening, EF = ejection fraction, SPD  $n = 7$ , LPD  $n = 6$  mice in (d) and (e)). **(f)** RNA expression of fetal genes reactivated in the adult heart upon pathological conditions was not different between adult LPD and SPD hearts (ANF = atrial natriuretic factor, encoded by the *Nppa* gene; BNP = brain natriuretic protein, encoded by the *Nppb* gene; *Myh7* encoding  $\beta$ -myosin heavy chain, SPD  $n = 4$ , LPD  $n = 5$  litters).

Given the increased density of non-myocyte nuclei per tissue area in LPD compared to SPD myocardium, we aimed to identify the underlying cell type. Fibroblasts represent an obvious candidate, however, quantification of vimentin positive fibroblasts based on immunostaining in tissue sections (Supplementary Fig. S8a) revealed a reduced contribution to the myocardial cell populations in LPD compared to SPD females (Fig. 5b). Smooth muscle actin (SMA) positive myofibroblasts (Supplementary Fig. S8b) were unchanged between dietary groups (Fig. 5b). Consistently, RNA and/or protein expression of vimentin and SMA was not different between LPD and SPD adult hearts (Supplementary Fig. S6). In conclusion, pre- and postnatal LPD conditions alter myocardial tissue composition by increasing cardiomyocyte and non-myocyte density, which appears not to involve fibroblasts.

#### Increased capillary density per area but normal capillary per cardiomyocyte ratio in adult hearts after pre- and postnatal LPD.

Considering that endothelial cells have recently been proposed to be the most abundant non-myocyte cell population in the adult mouse heart<sup>29</sup>, we hypothesized that LPD might impact on myocardial capillarization. Endothelial cells were detected in tissue sections of adult hearts based on Isolectin B4 staining and quantified in relation to tissue area and cardiomyocyte number (evaluated by WGA/DAPI staining as described in Supplementary Fig. S7 and verified in Fig. 5a). Capillary density per area was increased in LPD compared to SPD adult hearts, but the ratio of capillaries per total nuclear number as well as capillaries per cardiomyocytes was not different between groups (Fig. 6a). Myocardial arteries were detected by



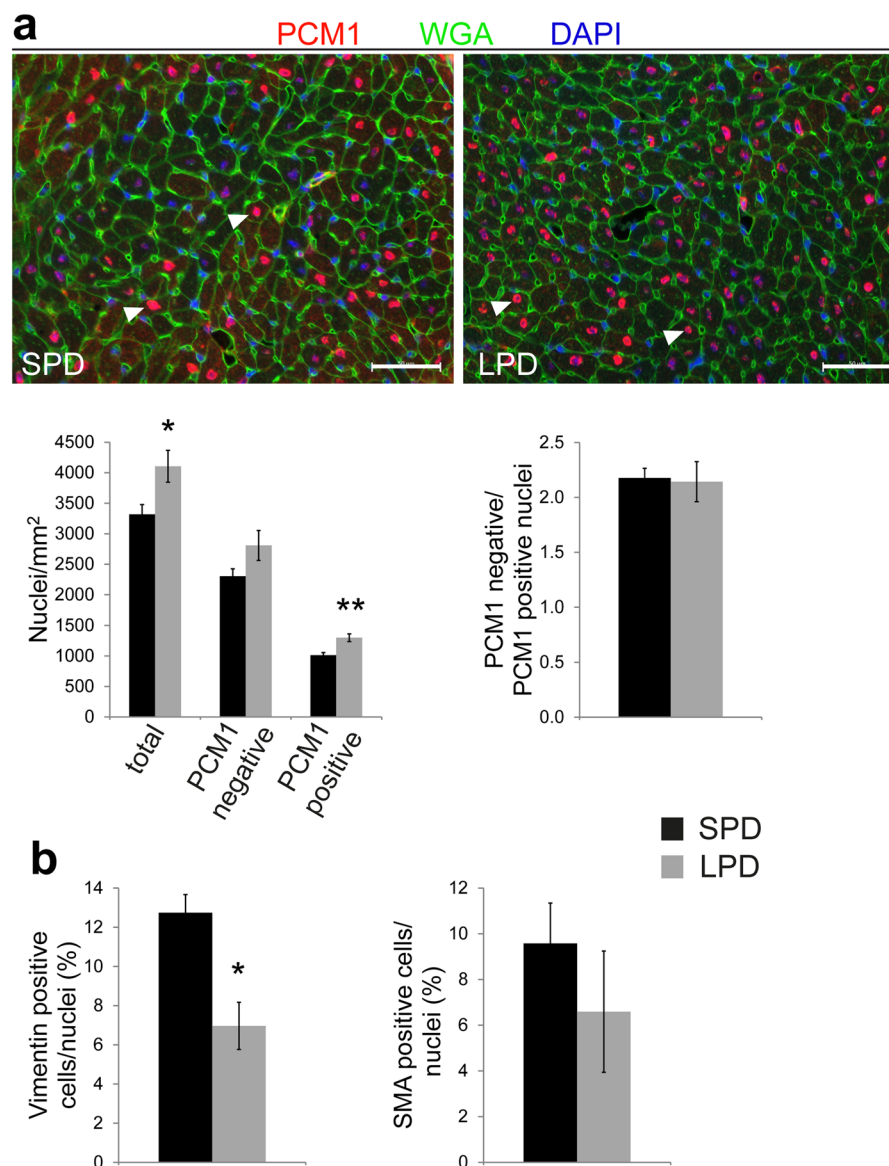
**Figure 4.** Reduced cardiomyocyte volume but normal number and absence of fibrosis in adult hearts on LPD. (a) Representative images of cross-sectioned cardiomyocytes in the LV myocardium of adult SPD and LPD hearts. Cell membranes are stained in red using WGA and nuclei in blue using DAPI (scale bar = 100  $\mu\text{m}$ ). (b) Cardiomyocyte cross sectional area (SPD n = 6, LPD n = 4 mice) is reduced in adult LPD compared to SPD LV myocardium, whereas cardiomyocyte length (n = 6 mice per group) is unaltered. This results in a significant reduction in calculated cardiomyocyte volume (SPD n = 6, LPD n = 4 mice) in LPD hearts (\*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ ). (c) Cardiomyocyte area fraction is reduced in tissue sections of LV myocardium in LPD compared to SPD hearts (SPD n = 6, LPD n = 4 mice, \*\* $P < 0.01$ ). (d) Cardiomyocyte number per heart was calculated based on cardiomyocyte volume, area fraction and heart weight (see methods). No difference was observed between adult LPD and SPD hearts (SPD n = 6, LPD n = 4 mice). (e) Representative images of LV myocardium stained with Sirius Red to visualize extracellular matrix deposition (scale bar = 300  $\mu\text{m}$ ). Interstitial fibrosis was reduced in LPD compared to SPD hearts (SPD n = 4, LPD n = 6 mice, \* $P < 0.05$ ).

SMA staining in vessel walls (Supplementary Fig. S9). The number of SMA positive profiles per tissue area was not different in LPD compared to SPD hearts (Fig. 6b). In conclusion, pre- and postnatal LPD results in increased capillary tissue density but a normal capillary to cardiomyocyte ratio.

### Signaling pathways involved in cell growth and nutrient sensing are not altered in adult hearts after pre- and postnatal LPD.

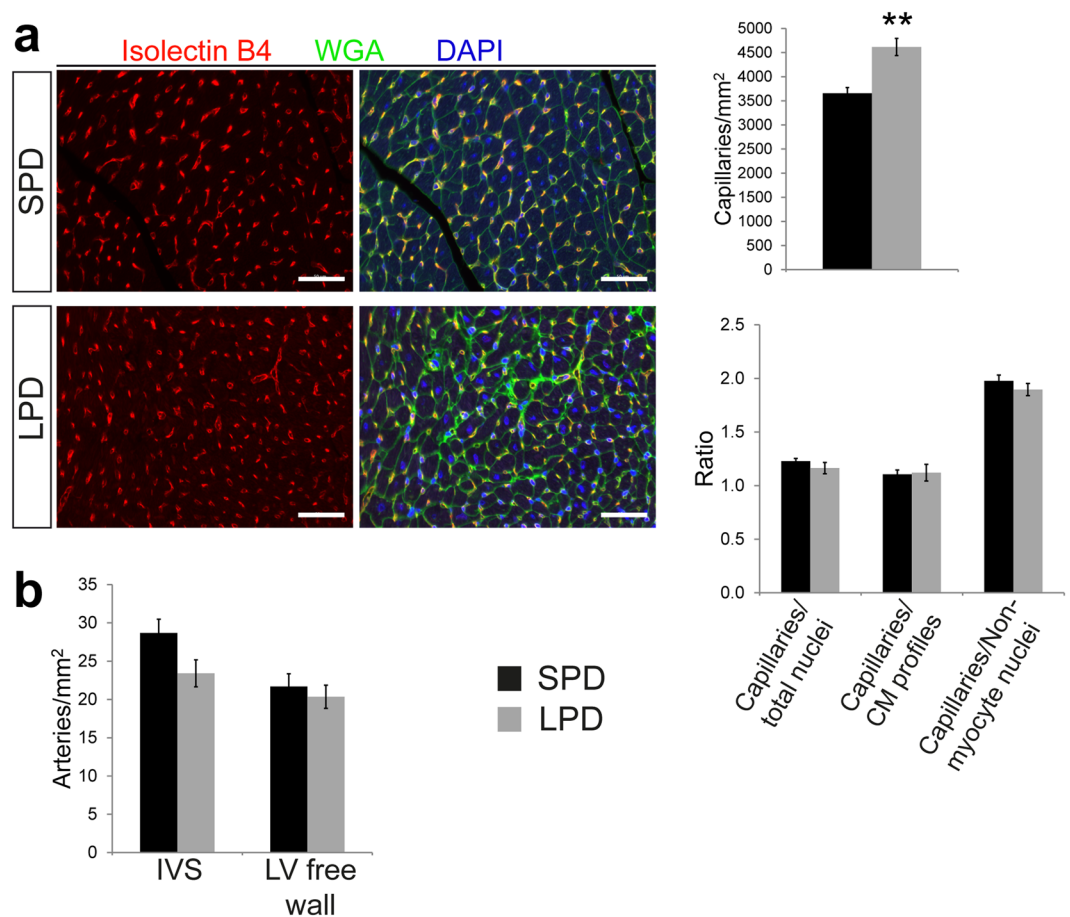
To gain insights into the molecular alterations induced by long-term dietary protein restriction that might underlie the changes in cellular tissue composition in adult female LPD hearts, we performed western blot analyses of key signaling pathways regulating cellular metabolism, nutrient and energy sensing and cell growth. The mTOR (mechanistic target of rapamycin) pathway is regulated by amino acid availability to induce translation and protein biosynthesis required for cell proliferation and cardiomyocyte hypertrophy<sup>30</sup>. mTOR complex 1 activity was normal in adult LPD female hearts, however, evident as unaltered phosphorylation of the well characterized downstream targets S6 ribosomal protein and 4E-BP1 (Supplementary Fig. S10a). Moreover, Ser473 phosphorylation of Akt, a target site for mTOR complex 2<sup>30</sup>, as well as Akt Thr308 phosphorylation was not different between groups (Supplementary Fig. S10a). Similarly, we did not detect altered phosphorylation of p42/44 (ERK1/2) and p38 MAP-kinases in adult LPD hearts (Supplementary Fig. S10b), both of which are involved in cardiac growth<sup>31</sup> and have been shown to be responsive to amino acid availability<sup>32</sup>.

It has recently been reported that dietary amino acid restriction increases capillary density in murine skeletal muscle<sup>33</sup>, a phenotype similar to the one seen in heart muscle in this study. The underlying proangiogenic mechanism was proposed to depend on an amino acid starvation response (AASR) involving phosphorylation of eIF2 $\alpha$  by GCN2, increased translation of ATF4 and transcriptional induction of VEGF. In addition, activation of



**Figure 5.** Altered cellular tissue composition in the LV myocardium of adult mice on LPD. **(a)** The number of cardiomyocyte and non-myocyte nuclei per tissue area was determined in LV myocardium of adult SPD and LPD mice based on immunofluorescence staining for PCM1 (red). WGA and DAPI staining was used to label cell membranes (green) and nuclei (blue), respectively. The total number of nuclei as well as the number of PCM1 positive cardiomyocyte nuclei per area was increased in LPD compared to SPD hearts. The number of non-myocyte nuclei per area as well as the ratio of non-myocyte/cardiomyocyte nuclei were not different between groups (SPD  $n = 3$ , LPD  $n = 5$  litters,  $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$ ). **(b)** Fibroblasts and myofibroblasts were quantified in the LV myocardium of adult LPD and SPD hearts based on immunofluorescence staining for vimentin and smooth muscle actin (SMA), respectively. The number of vimentin positive cells normalized to the total number of nuclei was reduced in LPD compared to SPD hearts, whereas SMA positive cell numbers were unchanged ( $n = 4$  mice per group,  $*P < 0.05$ ).

AMPK (AMP-regulated protein kinase) results in metabolic adaptations to support endothelial cell proliferation and migration<sup>33</sup>. We did not find evidence that a similar mechanism is active in adult hearts after long-term LPD treatment, as we did not detect differences in eIF2 $\alpha$  phosphorylation (Fig. 7a) or RNA expression of ATF4 and AASR target genes (Fig. 7b) between SPD and LPD hearts. Moreover, phosphorylation of the catalytic AMPK subunit  $\alpha$  (Fig. 7c) as well as protein and RNA expression of VEGFA was not different between groups (Fig. 7d,e). Our data furthermore excludes an AASR mediated by activation of p42/44 MAP-kinase (ERK1/2) previously reported in cultured cells<sup>34</sup>. In conclusion, long-term dietary protein restriction does not seem to affect some of the key pathways involved in cell growth, energy and nutrient sensing or AASR in the adult heart.

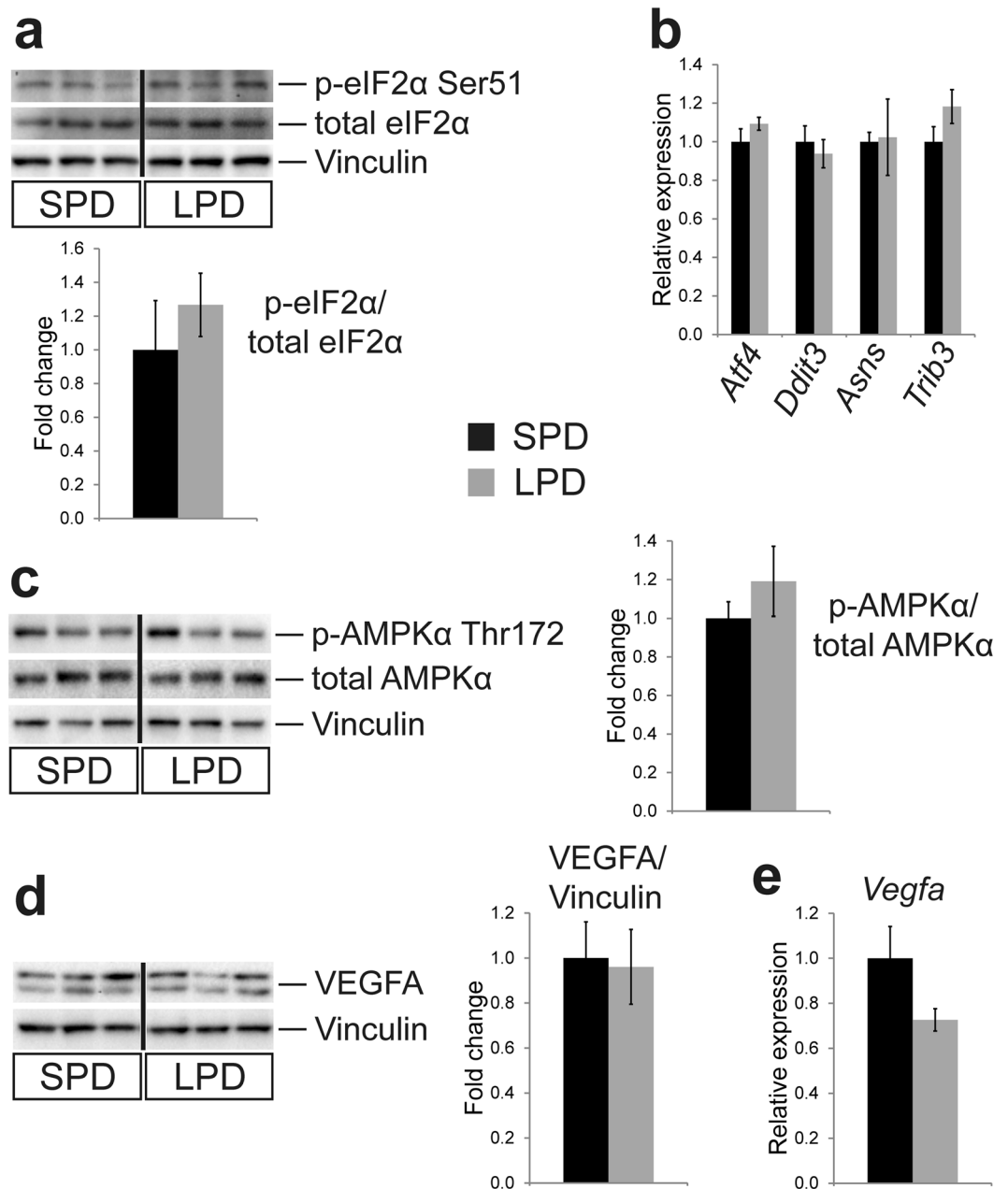


**Figure 6.** Vascularization of the LV myocardium in adult mice on LPD. **(a)** Detection of capillary profiles in the LV myocardium of adult SPD and LPD hearts by Isolectin B4 staining (co-stained with WGA and DAPI to visualize cell membranes and nuclei, respectively). The number of capillaries per tissue area was increased in LPD versus SPD hearts, whereas the ratio of capillaries per total nuclei, cardiomyocyte (CM) profiles and non-myocyte nuclei was unchanged (SPD  $n = 6$ , LPD  $n = 7$  mice,  $**P < 0.01$ , scale bar = 50  $\mu\text{m}$ ). **(b)** Intramyocardial arteries were detected by immunofluorescence staining for smooth muscle actin and quantified in the LV free wall and interventricular septum (IVS) of adult SPD and LPD hearts. No difference in the number of arteries per tissue area was detected ( $n = 6$  mice per group).

## Discussion

It is well-established that diet impacts on human health and disease. The most striking examples are high caloric diets contributing to the pathogenesis of diseases associated with metabolic syndrome, such as type 2 diabetes, hypertension and coronary heart disease<sup>1–3</sup>. In contrast, caloric restriction positively influences health and lifespan in humans and animal models<sup>9,11</sup>, whereas the specific diet components mediating these effects are under debate. It has been proposed that not caloric intake itself but rather the ratio of dietary macronutrients determines cardiometabolic health, aging and longevity in mice with optimal outcome when dietary protein is replaced by carbohydrates<sup>35</sup>. At the same time low carbohydrate/high protein diets seem to negatively influence cardiovascular health in humans<sup>20,21</sup>. Therefore, dietary protein content has gained increasing attention, as it has been reported that protein restriction reduces overall mortality in young and middle aged humans and mice, whereas high protein intake is essential in the elderly<sup>24</sup>. Further dissecting the role of specific diet components has revealed that sulfur amino acids (methionine and cysteine) mediate some of the beneficial effects of dietary restriction on stress resistance and longevity<sup>36</sup>. The impact of diets on metabolic health is mostly determined at the systemic level (by monitoring body weight, body composition, blood pressure and parameters such as blood glucose, insulin, triglycerides, cholesterol, etc.) whereas changes at the organ or tissue level are less frequently investigated. Our present study suggests that dietary protein restriction positively affects myocardial tissue composition, as mice constantly on LPD had smaller cardiomyocytes, reduced interstitial fibrosis and increased capillary density in the left ventricle compared to SPD controls. Whether the observed changes are influenced by beneficial effects of LPD on body weight, blood pressure or circulating metabolites is unclear at this stage. Also, future studies are warranted to longitudinally follow up hearts constantly on LPD upon ageing and investigate their response to challenges like ischemia or pressure overload. Such analyses will address the possibility that certain myocardial changes upon long-term protein restriction observed in our study might increase stress tolerance of the adult heart thereby promoting cardiovascular health.





**Figure 7.** No activation of an amino acid starvation response or induction of VEGF expression in adult LPD hearts. **(a)** Western blot analyses revealed no difference in eIF2α (eukaryotic translation initiation factor 2α) phosphorylation in adult LPD compared to SPD hearts (SPD *n* = 3, LPD *n* = 6 litters). **(b)** RNA expression of *Atf4* (activating transcription factor 4) and its target genes involved in amino acid starvation response is not different between SPD and LPD hearts (qRT-PCR data; *Ddit3* = DNA damage inducible transcript 3 (also known as Chop), *Asns* = asparagine synthetase, *Trib3* = Tribbles homolog 3; SPD *n* = 4, LPD *n* = 5 litters). **(c)** Phosphorylation of AMPK (AMP activated protein kinase) subunit α is not different between groups (*n* = 5 litters per group). **(d)** Protein expression of the proangiogenic factor VEGFA (vascular endothelial growth factor A) is not different between SPD and LPD hearts (*n* = 5 litters per group). **(e)** RNA expression of *Vegfa* is unaltered in adult LPD compared to SPD hearts (qRT-PCR data, SPD *n* = 4, LPD *n* = 5 litters). In **(a)**, **(c)** and **(d)** samples were run on the same gel but were non-contiguous, as indicated by a vertical black line. Full length, uncropped blots are presented in Supplementary Fig. S11.

Dietary interventions have previously been reported to alter tissue composition in animal models. For example, a high fat diet decreases capillary density in heart and skeletal muscle and increases cardiomyocyte diameter<sup>37,38</sup>. In contrast, caloric restriction accelerates revascularization after hindlimb ischemia in part by increasing capillary density<sup>39</sup> and exerts proangiogenic functions in cerebral endothelial cells<sup>40</sup>. Importantly, caloric restriction ameliorates myocardial fibrosis in postischemic heart failure and upon ageing as well as age associated cardiomyocyte hypertrophy<sup>14–16</sup>. Similarly, intermittent fasting has positive effects on tissue remodeling after



myocardial infarction in rats by attenuating cardiomyocyte hypertrophy, reducing fibrosis and increasing capillary density<sup>17,18</sup>. The impact of dietary protein restriction on myocardial tissue composition is less clear. Maternal LPD during pregnancy is often used in animal studies to induce intrauterine growth restriction and investigate the consequences for disease susceptibility in adulthood<sup>25</sup>. Typically, mothers and pups are switched to standard chow shortly after birth (between postnatal day 1 and 3), such that LPD conditions are effective during pre- and perinatal life. Such diet regime results in maladaptive changes in the adult offspring heart, a pathological gene expression program and increased collagen deposition<sup>41,42</sup>. Dietary protein restriction initiated after birth and maintained throughout the lactation period or LPD started after weaning also negatively affect cardiomyocyte contractility and morphometry as well as myocardial fibrosis<sup>43,44</sup>. Our data show that constant pre- and postnatal LPD reduces cardiomyocyte size and myocardial fibrosis but increases capillary density in the adult heart compared to mice on SPD. Interestingly, LPD restricted to the prenatal period also increases capillary density in the adult heart<sup>41</sup>. A recent study has identified a proangiogenic function of dietary amino acid restriction when initiated in young adult mice resulting in increased capillary density in skeletal muscle<sup>33</sup>. In contrast, prenatal LPD has been proposed to reduce capillary density in adult skeletal muscle<sup>45</sup>. Therefore, although dietary protein restriction could exert certain positive effects on myocardial tissue composition the timing of initiation might be crucial to determine beneficial versus maladaptive changes in the adult heart.

Adult female mice after pre- and postnatal LPD exhibit reduced cardiomyocyte size but normal heart weight compared to mice constantly on SPD. Such counterintuitive findings could be explained by an increase in cardiomyocyte and/or non-myocyte numbers or increased extracellular matrix (ECM) deposition. The latter can be excluded given that LPD hearts exhibit less myocardial fibrosis compared to SPD controls. In contrast, the number of cardiomyocyte nuclei per tissue area was significantly increased in adult LPD myocardium, although this could represent differences in nuclearity rather than cell number<sup>46</sup>. Calculations based on heart weight and cardiomyocyte volume show a trend towards increased cardiomyocyte numbers in LPD compared to SPD hearts, although this difference misses statistical significance. Nevertheless, given that this approach is based on various simplistic assumptions, future studies are warranted to precisely determine cardiomyocyte numbers in the adult LPD heart using more sensitive methodologies, such as stereology or FACS sorting<sup>28,46</sup>. The latter would furthermore allow to more precisely quantify non-myocyte cell populations. Interestingly, cardiomyocyte cross sectional area is increased in LPD female hearts at birth but heart weight is not different compared to SPD controls. This might indicate compensatory hypertrophy to account for a reduced cardiomyocyte number. Prenatal LPD in rats has been reported to cause a cardiomyocyte deficit at birth<sup>47</sup> which is normalized until weaning<sup>48</sup>. In agreement, others have reported reduced proliferation in the neonatal rat heart upon LPD followed by a boost around day 7<sup>49</sup>. Our data raise the interesting hypothesis that combined pre- and postnatal dietary protein restriction in female mice reduces cardiomyocyte number at birth but through compensatory proliferation in the postnatal period eventually increases cardiomyocyte number in the adult heart, although this will have to be thoroughly tested in future studies.

Our data might have implications for fetal or developmental programming, a phenomenon by which the intrauterine environment impacts postnatal health and disease. Intrauterine growth restriction (IUGR) resulting in low birth weight and small for gestational age babies increases susceptibility towards various chronic diseases in adulthood, including diabetes mellitus, hypertension and coronary artery disease<sup>50</sup>. This is proposed to be caused by alterations of cellular metabolism, gene and protein expression and epigenetics induced in the fetal organism upon unfavorable growth conditions and persisting after birth<sup>50</sup>. According to the thrifty phenotype hypothesis, fetal programming primes the unborn organisms to live in a postnatal environment in which nutrients and resources are likely to be short. In today's western world, however, a mismatch exists between poor intrauterine growth conditions and a postnatal environment of plenty<sup>51</sup>. It is proposed that after IUGR accelerated postnatal growth during infancy, overfeeding and an unhealthy lifestyle are the main drivers boosting maladaptive consequences of fetal programming<sup>52</sup>. That way, intrauterine adaptations initially intended to be beneficial for the growth restricted baby turn into a risk factor for various diseases in adulthood. Based on this logic, maintaining starvation conditions after birth should prevent fetal programming associated disease after IUGR. In support of such idea, studies in sheep have shown that a mismatch in pre- versus postnatal nutrient conditions induces alterations in blood pressure regulation, renal function and LV morphology that were not observed if nutrient conditions were the same before and after birth<sup>53</sup>. As described above, IUGR can be induced by maternal LPD during pregnancy in mice or rats<sup>25</sup>. Switching pups to standard chow after birth results in maladaptive changes in the adult heart, which also includes contractile dysfunction<sup>25,41,42</sup>. Interestingly, if LPD conditions are maintained for 2 weeks after birth no impairment of heart function was observed in adulthood<sup>54</sup>. Consistently, our data show that constant pre- and postnatal LPD conditions do not adversely affect the offspring's heart in adulthood under baseline conditions, even though detrimental changes upon cardiac stress or ageing cannot be excluded. This supports the hypothesis that if pre- and postnatal nutrient availability and growth trajectories match, negative effects of IUGR on the adult heart can potentially be prevented or at least delayed. A limitation of our study in regard of such interpretation is that we did not include mice subjected to prenatal LPD but switched to SPD after birth to confirm maladaptive changes in the heart. Interestingly, we applied pre- and postnatal LPD conditions to *cHccs*<sup>+/-</sup> mice, which are born with smaller hearts due to a reduced cardiomyocyte number and require postnatal compensatory hypertrophy to normalize heart size until adulthood<sup>27</sup>. Heart size and function were normal in adult *cHccs*<sup>+/-</sup> mice on LPD compared to SPD, indicating that the increased demand for postnatal cardiac growth is not affected by dietary protein restriction and that LPD does not induce cardiac pathology in this mouse model.

After prenatal LPD we observed a reduction in neonatal body weight in female but not male offspring compared to SPD but no changes in heart weight in either sex. This is in contrast to various other IUGR studies that showed reduced body and heart weight in both sexes at birth<sup>25</sup>. This reflects the variety of outcomes reported when using the LPD model, which might depend on species (rats versus mice), diet regime (prior to conception, during pregnancy, postnatally), diet composition, time of analyses (postnatal day 1 versus later stages) and

others<sup>25</sup>. Nevertheless, sex specific changes in response to IUGR have been reported previously and fetal programming is known to affect sexes differently<sup>50</sup>. We furthermore observed increased cardiomyocyte cross sectional area in LPD versus SPD females but not males at birth, which could potentially indicate a sex specific effect of LPD on cardiomyocyte growth and proliferation. Interestingly, maternal hypoxia (but not nutrient restriction) during the second half of gestation in guinea pigs reduces the number of cardiomyocytes in the heart of adult female but not male offspring<sup>55</sup>.

A limitation of our study is that the SPD used was a normal rodent chow but not an ideal experimental control diet with the best possible match compared to the LPD. Although this is a general concern in diet induced animal models including protein restriction<sup>56</sup>, it has become clear that factors other than protein content could have confounding effects on the resulting data<sup>57</sup>. The reduction in protein has to be adjusted for by increasing other ingredients (usually fat and starch) to ensure isocaloric conditions. The diets used in this study for example show differences in sugar content (see Supplementary Table S2), such that we cannot exclude that other nutrient components contribute to the observed outcome.

In summary, our data reveal that a combined pre- and postnatal dietary protein restriction does not lead to detectable pathological changes in the murine heart under baseline conditions. In contrast, it is tempting to speculate that myocardial tissue remodeling observed in adult mice permanently on LPD might represent beneficial effects of dietary protein restriction, which could positively influence cardiovascular health and longevity.

## Methods

**Diet composition, treatment regime and heart preparation.** Mice were either fed a low protein diet (LPD) containing 8.8% crude protein (ssniff® EF R/M Protein deficient experimental diet, E15202-24) or a standard protein diet (SPD) containing 22% crude protein (ssniff® M-Z complete feed for mice, V1124-3). A detailed diet composition is provided in Supplementary Table S2. Female and male mice were accustomed to LPD conditions for at least two weeks prior to mating and pregnant dams were kept on SPD or LPD during pregnancy. Newborn mice were studied on postnatal day 1 (P1), defined as the morning when litters were first observed. Pups were weighed, euthanized by decapitation and hearts were prepared. To study adult hearts, after birth mothers and offspring were kept on the same diet as during pregnancy, offspring were weaned after 3 weeks and remained on their respective diet until early adulthood. At the age of 11 weeks, mice were euthanized by cervical dislocation, weighed and hearts were prepared.

**Mice and sample sizes.** Basic considerations for mice used in this study and sample sizes have been described before<sup>26,27,58</sup>. In order to investigate the effect of dietary protein restriction on both normal as well as compensatory postnatal cardiac growth and function, a specific mouse strain which generates a heart conditional *Hccs* (Holocytochrome c synthase) knock-out (KO) was used for all experiments. Mice were kept on a mixed 129 Sv/C57BL6 genetic background. The characterization of pre- and postnatal development in heart conditional *Hccs* KO mice has been described previously<sup>26,27</sup>. Briefly, mice carrying a “floxed” (fl) *Hccs* allele were bred to mice expressing *Cre* recombinase under the control of the *Nkx2.5* promoter. Experiments in adulthood that included heart conditional *Hccs* KO mice were performed on heterozygous *Hccs* KO females (*Hccs*<sup>fl/wt</sup>/*Nkx2.5*<sup>Cre/wt</sup>, referred to as *cHccs*<sup>+/-</sup>) and their respective female littermate controls (*Hccs*<sup>fl/wt</sup>/*Nkx2.5*<sup>wt/wt</sup>, referred to as *Hccs*<sup>+/+</sup>). The latter were furthermore used for all other experiments not including *cHccs*<sup>+/-</sup> females, implying that all mice were carrying the “floxed” *Hccs* allele. Similarly, the genotype of neonates used in the study was *Hccs*<sup>fl/wt</sup>/*Nkx2.5*<sup>wt/wt</sup> for all females and *Hccs*<sup>fl/y</sup>/*Nkx2.5*<sup>wt/wt</sup> for all males.

The total number of mice included in the different experiments is as follows: neonates on postnatal day 1: SPD males *n* = 9 from 5 different litters, SPD females *n* = 10 from 6 different litters, LPD males *n* = 7 from 6 different litters, LPD females *n* = 8 from 6 different litters; adults: SPD *Hccs*<sup>+/+</sup> females *n* = 9 from 5 different litters, SPD *cHccs*<sup>+/-</sup> females *n* = 9 from 6 different litters, LPD *Hccs*<sup>+/+</sup> females *n* = 9 from 5 different litters, LPD *cHccs*<sup>+/-</sup> females *n* = 13 from 7 different litters.

For animal studies of developmental programming it is recommended to use only one representative male and/or female per litter in order to compensate for differences in intrauterine or postnatal conditions specific for a particular pregnancy or dam. If more than one mouse per litter is used, this should be accounted for in the statistical analyses<sup>59</sup>. Thus, data was averaged for mice from the same litter if applicable, such that *n* represents the number of litters included. In case this results in small sample sizes (*n* ≤ 3), data represent individual mice. Whether *n* indicates litters or mice is stated in each figure legend.

All animal procedures were performed following institutional guidelines and had previously been approved by the responsible authorities (“Landesamt für Gesundheit und Soziales” (LaGeSo) Berlin, approval number G 0027/10).

**Evaluation of food intake.** To measure food intake of adult mice, 5 months old non-pregnant or pregnant females were kept in individual cages. A defined amount of food was weighed and provided to the mice. For non-pregnant mice the remaining food was weighed at the same time each day over the following 10 days and body weight was determined half way through the observation period (i.e. on day 5). For pregnant mice the defined amount of food was provided at 13.5 dpc (days post coitum) and the remaining food was weighed daily until 19.5 dpc. Body weight was determined at the end of pregnancy at 19.5 dpc. Absolute food intake was calculated from the daily decline in food weight and averaged over the observation period (given in gram food per day per mouse) and food intake was furthermore normalized to body weight.

**Echocardiography.** Echocardiography was performed as described<sup>58</sup>. Adult mice (11 weeks old) were anesthetized by inhalation of a 2.5% isoflurane/oxygen mixture using the Vevo compact dual anesthesia system (VisualSonics, Toronto, Canada). Body temperature was kept constant at 37 °C using a heat lamp and a rectal

temperature probe. Echocardiography was recorded using the Vevo 2100 high frequency ultrasound system (VisualSonics) with a MicroScan™ transducer MS400 set to 30 MHz. Operators were blinded for mouse genotypes and treatment groups during echocardiographic recordings as well as data analyses.

**Histological analyses and immunofluorescence staining.** Histology and immunofluorescence staining were performed as described<sup>58</sup>. Hearts were excised, rinsed in cold PBS and fixed in 4% paraformaldehyde/PBS (Sigma Aldrich) for 24–48 hours. The tissue was subsequently dehydrated through an increasing ethanol series, cleared in toluol and embedded in paraffin. 5 µm paraffin sections were stained with hematoxylin & eosin (Carl Roth) to assess overall cardiac morphology or with Sirius Red (Direct Red 80, Sigma Aldrich) to visualize myocardial fibrosis.

For immunofluorescence staining paraffin sections were deparaffinized, rehydrated and heat mediated antigen retrieval was performed in sodium citrate buffer (10 mM, pH 6.0) for 20 minutes. After blocking in antibody solution containing 5% normal goat serum (Jackson ImmunoResearch) for 1 hour, sections were incubated over night with primary antibodies at 4 °C. Secondary antibody detection was performed at room temperature for 1 hour using Alexa Fluor 488 or 555 conjugated secondary antibodies (Life Technologies, 1:500). Nuclei were stained with DAPI or TO-PRO-3 (Life Technologies) and sections were mounted in ProLong Gold antifade reagent (Life Technologies).

**Quantification of myocardial fibrosis.** Experiments for quantifying fibrosis have been described previously<sup>58</sup>. Light microscopy images of Sirius Red stained heart sections from 11 week old adult mice were taken using the Biozero BZ-8100 microscope (Keyence, Osaka, Japan). By applying 5x optical magnification, 6 random fields of the left ventricular (LV) myocardium, including free wall and interventricular septum (IVS), were imaged, thereby covering the entire LV tissue. Two non-adjacent cross-sections per heart were used. The percentage of interstitial fibrotic tissue was quantified using the color-threshold plugin of the ImageJ software (<https://imagej.nih.gov/ij/>), which measures the red stained area in relation to the total LV myocardial area. Values of all 12 images were averaged to give the mean fibrotic tissue content for each heart. Perivascular fibrosis was excluded and deleted from the images prior to analysis.

**Quantification and morphological assessment of coronary arteries.** Paraffin sections of postnatal day 1 and adult hearts were stained with an antibody against alpha smooth muscle actin (SMA, Abcam ab5694, 1:200) following standard procedures. For neonates 3 non-adjacent sections per heart and for adults 1 section per heart were included. Neonatal hearts were imaged at 40x and adult hearts at 20x magnification using a Zeiss Axio Scope A1 microscope. SMA positive coronary arteries within the entire myocardium of the LV free wall and interventricular septum were counted irrespective of their size and morphological appearance. The number of coronary arteries was related to the overall tissue area. For size measurements in the neonatal heart, only cross sectioned arteries with a circular profile were outlined along the outer margin of the SMA positive cell layer and the area occupied as well as the outer circumference were measured (using Zeiss ZEN blue software). Approximately 15 arteries per heart were included.

**Evaluation of cellular tissue composition.** Paraffin sections of neonatal and adult hearts were stained with Alexa Fluor 488 or 555 conjugated wheat germ agglutinin (WGA, Life Technologies, 1:500) and DAPI to visualize cell membranes and nuclei, respectively. Images of tissue areas with cross sectioned cardiomyocytes within the LV free wall and IVS were captured at 40x magnification using a Zeiss Axio Scope A1 microscope. In neonates 7–10 images and in adults 6–8 images per heart were analyzed. The total number of DAPI stained nuclei per image was automatically counted using the “find maxima” tool of the ImageJ software and manually corrected if necessary. The total tissue area was measured using ZEN blue software (Zeiss). Nuclei were assigned to the cardiomyocyte or non-myocyte cell population based on WGA staining: WGA staining directly adjacent to the nucleus with no visible cytoplasm was considered to indicate non-myocytes, whereas nuclei localized within large cells with a discernable cytoplasmic fringe were scored as cardiomyocytes (see Supplementary Figs S2 and S7). The number of cardiomyocyte and non-myocyte nuclei per tissue area as well as the non-myocyte/cardiomyocyte nuclei ratio was calculated for each image and averaged for each heart. Cardiomyocyte area fraction per image was estimated by measuring the total WGA stained area (which includes cell membranes, non-myocytes, capillaries and extracellular matrix (ECM)) using the “color threshold” tool of the ImageJ software. The WGA positive area (i.e. the non-myocyte/ECM fraction) was expressed as percentage of the overall tissue area and the remaining tissue was considered to represent the cardiomyocyte area fraction.

Cellular tissue composition in the adult heart was validated by staining cardiomyocyte nuclei with an antibody against PCM1 (HPA023374, Sigma Aldrich, 1:200). Secondary detection was performed by Tyramide signal amplification (TSA Plus Cyanine 3 System, Perkin Elmer) according to the manufacturer's instructions using a horseradish peroxidase (HRP)-linked secondary antibody (Cell Signaling Technology, #7074, 1:500). Nuclei and cell membranes were co-stained as described above.

Fibroblast and myofibroblasts in the adult LV myocardium were detected using immunostaining for vimentin (Abcam, ab7783, 1:100) and smooth muscle actin (Sigma Aldrich, A2547, 1:400), respectively. The number of vimentin and SMA positive cells was manually counted on four confocal laser scanning microscopy (Leica SP5) images per heart and related to the total number of DAPI stained nuclei.

**Evaluation of myocardial capillarization.** To visualize endothelial cells in the myocardium, paraffin sections of postnatal day 1 and adult hearts were stained with Alexa Fluor 568 conjugated Isolectin B4 (Life Technologies, I21412, 1:200). Sections were co-stained with Alexa Fluor 488 conjugated wheat germ agglutinin (Life Technologies, W11261, 1:500) and DAPI to visualize cell membranes and nuclei, respectively. Images of tissue areas with cross-sectioned cardiomyocytes within the LV free wall and IVS were captured at 40x

magnification using a Zeiss Axio Scope A1 microscope. In neonates 7–10 images and in adults 6–8 images per heart were analyzed using ZEN blue software (Zeiss) and ImageJ. The total number of nuclei as well as the number of cardiomyocyte and non-myocyte nuclei was determined for each image as described above. In adult hearts, the total number of cardiomyocyte profiles (with and without visible nuclei) was furthermore counted. Capillary profiles were manually counted and normalized to the underlying tissue area to indicate capillary density. In neonatal hearts the ratio of capillaries per cardiomyocyte nuclei and in adult hearts the ratio of capillaries per cardiomyocyte profiles and non-myocyte nuclei were calculated. Values were determined for each image and averaged per heart.

**Evaluation of cardiomyocyte size, volume and number.** Cardiomyocyte cross sectional area (CSA), length, volume and number per heart were determined as previously described<sup>58</sup>. Briefly, CSA was measured in the LV myocardium based on WGA staining whereas cardiomyocyte length was measured by visualizing intercalated discs based on N-cadherin immunostaining using rabbit polyclonal antibody sc-7939 (1:200) from Santa Cruz (see Supplementary Fig. S5). Mean cardiomyocyte volume per heart was calculated by multiplying mean CSA x mean length. Cardiomyocyte number per heart was calculated based on heart volume, cardiomyocyte area fraction and cardiomyocyte volume<sup>58</sup>.

**Evaluation of cell cycle activity.** To assess proliferation rates in neonatal hearts, immunofluorescence staining for phosphorylated histone H3 (p-HH3) was performed (using rabbit polyclonal antibody #9701 from Cell Signaling Technology, 1:200). Sections were co-stained with WGA and DAPI following standard procedures as described above. One longitudinal section per heart was imaged at 40x optical magnification using a Zeiss Axio Scope A1 fluorescence microscope resulting in approximately 10 random fields taken within the LV myocardium (including the free wall and IVS). Cells that exhibited co-localization of p-HH3 and DAPI were considered as cycling. The total number of DAPI stained nuclei as well as p-HH3 positive nuclei were manually quantified using the cell counter plugin of the ImageJ software. For each image the percentage of p-HH3 positive nuclei was calculated. Data from all images were averaged to give the mean proliferation rate for each heart.

**Western blot analyses.** Western blot analyses were performed as described previously<sup>58</sup>. For isolation of cardiac protein extracts snap frozen tissue samples derived from apical LV myocardium were homogenized in RIPA buffer supplemented with protease (Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Roche Diagnostics) and phosphatase inhibitors (PhosSTOP Phosphatase Inhibitor Cocktail Tablets, Roche) and incubated at 4 °C for 2 hours with gentle agitation. For samples on the same gel equal protein amounts were loaded (40 µg), separated using denaturing polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and blotted onto nitrocellulose (GE Healthcare) or PVDF (Millipore) membranes. Membranes were blocked for 1 h in 5% non-fat dry milk (Carl Roth) in TBS-T and incubated with the following primary antibodies at 4 °C overnight: phospho-S6 Ser235/236 (#4858, 1:2000), phospho-S6 Ser240/244 (#4838, 1:1000), total S6 (#2217, 1:1000), phospho-4E-BP1 Thr37/46 (#2855, 1:1000), phospho-4E-BP1 Ser65 (#9451, 1:1000), total 4E-BP1 (#9644, 1:1000), phospho-AMPKα Thr172 (#4188, 1:2000), total AMPKα (#2532, 1:1000), phospho-Akt Thr308 (#13038, 1:1000), phospho-Akt Ser473 (#4060, 1:2000), total Akt (#4691, 1:1000), phospho-p42/44 Thr202/Tyr204 (#4370, 1:2000), total p42/44 (#4695, 1:1000), phospho-p38 Thr180/Tyr182 (#4511, 1:1000), total p38 (#8690, 1:1000), phospho-eIF2α Ser51 (#3597, 1:1000), total eIF2α (#2103, 1:1000) (all from Cell Signaling Technology); collagen I (ab34710, 1:5000), vimentin (ab8978, 1:500), osteopontin (ab8448, 1:2000), fibronectin (ab23750, 1:1000), VEGFA (ab46154, 1:1000) (all from Abcam); smooth muscle actin (A2547, 1:2000), α-actinin (A7811, 1:1000) (both from Sigma Aldrich); troponin T (CT3, Developmental Studies Hybridoma Bank, 1:500). Antibodies against GAPDH (MA1-22670, Thermo Scientific, 1:10000), α-Tubulin (T9026, 1:5000) and Vinculin (V9131, 1:5000) (both from Sigma Aldrich) were used for loading control. Secondary detection was performed using horseradish peroxidase (HRP)-linked secondary antibodies (Cell Signaling Technology, #7074 and #7076, 1:2000). Enhanced chemiluminescence (ECL) reaction was performed and detected with the imaging system Odyssey Fc (LI-COR Biosciences) or ChemiDoc XRS + (BIO-RAD). Intensity of detected protein bands was quantified by densitometry using ImageJ software.

**Analyses of RNA expression by qRT-PCR.** RNA isolation and qRT-PCR experiments have been described previously<sup>58</sup>. Snap frozen tissue samples derived from apical LV myocardium were homogenized in TRIzol reagent (Invitrogen) and total RNA was isolated according to the manufacturer's instructions. RNA was subsequently purified using RNeasy spin columns (Qiagen), including digestion of genomic DNA on the column (RNase-free DNase set, Qiagen). Isolated cardiac RNA was reversely transcribed using M-MuLV reverse transcriptase (New England BioLabs) and random hexamer primers. Quantitative real time PCR was performed using the Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) on the ViiA™ 7 real-time PCR system (Applied Biosystems). Primers were obtained from BioTeZ (Berlin, Germany) and sequences are provided in Supplementary Table S3. All primers and PCR conditions were optimized to PCR efficiencies between 90–110% and a correlation coefficient  $\geq 0.990$  using cDNA dilution series. All samples were analyzed in triplicates and normalized to GAPDH expression. Relative expression differences between groups were determined using the  $\Delta\Delta CT$  method.

**Statistical analyses.** Basic considerations for statistical analyses have been described previously<sup>58</sup>. All data were analyzed with SPSS (IBM) or Excel 2010 (Microsoft) software and are presented as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). Data sets were tested for normal distribution by Kolmogorov-Smirnov test and homogeneity of variances between groups was assessed by Levene's test. If these criteria were met, differences between two groups were evaluated with unpaired, two-sided student's *t*-test and those among multiple groups with one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni post-hoc test. Differences between multiple groups with unequal variances were evaluated with non-parametric Kruskal-Wallis one-way analysis of variance followed by



Mann-Whitney post-hoc test. Neonatal data involving males and females were analyzed by two-way ANOVA with the factors diet, sex and their interaction followed by Bonferroni post-hoc test for pairwise comparison. A probability ( $P$ ) value less than 0.05 was considered to indicate statistical significance (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  and \*\*\* $P < 0.001$ ).

## Data availability

All data generated or analyzed during this study are included in this article and its Supplementary Information. No datasets were generated or analyzed during the current study.

Received: 14 February 2019; Accepted: 2 October 2019;

Published online: 22 October 2019

## References

1. Mirzaei, H., Di Biase, S. & Longo, V. D. Dietary interventions, cardiovascular aging, and disease: animal models and human studies. *Circ. Res.* **118**, 1612–1625 (2016).
2. Ortega, F. B., Lavie, C. J. & Blair, S. N. Obesity and cardiovascular disease. *Circ. Res.* **118**, 1752–1770 (2016).
3. Buettner, R., Schölmerich, J. & Bollheimer, L. C. High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. *Obesity (Silver Spring)* **15**, 798–808 (2007).
4. Melo, B. F. *et al.* Evaluating the impact of different hypercaloric diets on weight gain, insulin resistance, glucose intolerance, and its comorbidities in rats. *Nutrients* **11**, e1197 (2019).
5. Fang, C. X. *et al.* Hypertrophic cardiomyopathy in high-fat diet-induced obesity: role of suppression of forkhead transcription factor and atrophy gene transcription. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **295**, H1206–H1215 (2008).
6. Calligaris, S. D. *et al.* Mice long-term high-fat diet feeding recapitulates human cardiovascular alterations: an animal model to study the early phases of diabetic cardiomyopathy. *PLoS One* **8**, e60931 (2013).
7. Thakker, G. D. *et al.* Increased myocardial susceptibility to repetitive ischemia with high-fat diet-induced obesity. *Obesity (Silver Spring)* **16**, 2593–2600 (2008).
8. Liu, J. *et al.* High-fat, low-carbohydrate diet promotes arrhythmic death and increases myocardial ischemia-reperfusion injury in rats. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **307**, H598–608 (2014).
9. Most, J., Tosti, V., Redman, L. M. & Fontana, L. Calorie restriction in humans: an update. *Ageing Res. Rev.* **39**, 36–45 (2017).
10. Fontana, L., Meyer, T. E., Klein, S. & Holloszy, J. O. Long-term calorie restriction is highly effective in reducing the risk for atherosclerosis in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 6659–6663 (2004).
11. Fontana, L. & Partridge, L. Promoting health and longevity through diet: from model organisms to humans. *Cell* **161**, 106–118 (2015).
12. Dolinsky, V. W. *et al.* Calorie restriction prevents hypertension and cardiac hypertrophy in the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension* **56**, 412–421 (2010).
13. Melo, D. S. *et al.* Severe calorie restriction reduces cardiometabolic risk factors and protects rat hearts from ischemia/reperfusion injury. *Front. Physiol.* **7**, 106 (2016).
14. de Lucia, C. *et al.* Long-term caloric restriction improves cardiac function, remodeling, adrenergic responsiveness, and sympathetic innervation in a model of postischemic heart failure. *Circ. Heart Fail.* **11**, e004153 (2018).
15. Shimura, K. *et al.* Impact of long-term caloric restriction on cardiac senescence: caloric restriction ameliorates cardiac diastolic dysfunction associated with aging. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **50**, 117–127 (2011).
16. Ahmet, I., Tae, H. J., de Cabo, R., Lakatta, E. G. & Talan, M. I. Effects of calorie restriction on cardioprotection and cardiovascular health. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **51**, 263–271 (2011).
17. Ahmet, I., Wan, R., Mattson, M. P., Lakatta, E. G. & Talan, M. Cardioprotection by intermittent fasting in rats. *Circulation* **112**, 3115–3121 (2005).
18. Katare, R. G., Kakinuma, Y., Arikawa, M., Yamasaki, F. & Sato, T. Chronic intermittent fasting improves the survival following large myocardial ischemia by activation of BDNF/VEGF/PI3K signaling pathway. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **46**, 405–412 (2009).
19. Shen, J. *et al.* Mediterranean dietary patterns and cardiovascular health. *Annu. Rev. Nutr.* **35**, 425–449 (2015).
20. Halbesma, N. *et al.* High protein intake associates with cardiovascular events but not with loss of renal function. *J. Am. Soc. Nephrol.* **20**, 1797–1804 (2009).
21. Lagiou, P. *et al.* Low carbohydrate-high protein diet and incidence of cardiovascular diseases in Swedish women: prospective cohort study. *BMJ* **344**, e4026 (2012).
22. Mirzaei, H., Raynes, R. & Longo, V. D. The conserved role of protein restriction in aging and disease. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* **19**, 74–79 (2016).
23. Kitada, M., Ogura, Y., Monno, I. & Koya, D. The impact of dietary protein intake on longevity and metabolic health. *EBioMedicine* **43**, 632–640 (2019).
24. Levine, M. E. *et al.* Low protein intake is associated with a major reduction in IGF-1, cancer, and overall mortality in the 65 and younger but not older population. *Cell Metab.* **19**, 407–417 (2014).
25. Zohdi, V., Lim, K., Pearson, J. T. & Black, M. J. Developmental programming of cardiovascular disease following intrauterine growth restriction: findings utilising a rat model of maternal protein restriction. *Nutrients* **7**, 119–152 (2014).
26. Drenckhahn, J. D. *et al.* Compensatory growth of healthy cardiac cells in the presence of diseased cells restores tissue homeostasis during heart development. *Dev. Cell* **15**, 521–533 (2008).
27. Drenckhahn, J. D. *et al.* Impaired myocardial development resulting in neonatal cardiac hypoplasia alters postnatal growth and stress response in the heart. *Cardiovasc. Res.* **106**, 43–54 (2015).
28. Bergmann, O. *et al.* Identification of cardiomyocyte nuclei and assessment of ploidy for the analysis of cell turnover. *Exp. Cell Res.* **317**, 188–194 (2011).
29. Pinto, A. R. *et al.* Revisiting cardiac cellular composition. *Circ. Res.* **118**, 400–409 (2016).
30. Sciarretta, S., Forte, M., Frati, G. & Sadoshima, J. New insights into the role of mTOR signaling in the cardiovascular system. *Circ. Res.* **122**, 489–505 (2018).
31. Wang, Y. Mitogen-activated protein kinases in heart development and diseases. *Circulation* **116**, 1413–1423 (2007).
32. Casas-Terradellas, E., Tato, I., Bartrons, R., Ventura, F. & Rosa, J. L. ERK and p38 pathways regulate amino acid signalling. *Biochim. Biophys. Acta* **1783**, 2241–2254 (2008).
33. Longchamp, A. *et al.* Amino acid restriction triggers angiogenesis via GCN2/ATF4 regulation of VEGF and H<sub>2</sub>S production. *Cell* **173**, 117–129.e14 (2018).
34. Shan, J. *et al.* A mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase (MEK)-dependent transcriptional program controls activation of the early growth response 1 (EGR1) gene during amino acid limitation. *J. Biol. Chem.* **289**, 24665–24679 (2014).



35. Solon-Biet, S. M. *et al.* The ratio of macronutrients, not caloric intake, dictates cardiometabolic health, aging, and longevity in ad libitum-fed mice. *Cell Metab.* **19**, 418–430 (2014).
36. Hine, C. *et al.* Endogenous hydrogen sulfide production is essential for dietary restriction benefits. *Cell* **160**, 132–144 (2015).
37. Nascimento, A. R. *et al.* Structural and functional microvascular alterations in a rat model of metabolic syndrome induced by a high-fat diet. *Obesity (Silver Spring)* **21**, 2046–2054 (2013).
38. Machado, M. V. *et al.* Exercise training dose differentially alters muscle and heart capillary density and metabolic functions in an obese rat with metabolic syndrome. *Exp. Physiol.* **102**, 1716–1728 (2017).
39. Kondo, M. *et al.* Caloric restriction stimulates revascularization in response to ischemia via adiponectin-mediated activation of endothelial nitric-oxide synthase. *J. Biol. Chem.* **284**, 1718–1724 (2009).
40. Csiszar, A. *et al.* Caloric restriction confers persistent anti-oxidative, pro-angiogenic, and anti-inflammatory effects and promotes anti-aging miRNA expression profile in cerebrovascular endothelial cells of aged rats. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **307**, H292–H306 (2014).
41. Menendez-Castro, C. *et al.* Impaired myocardial performance in a normotensive rat model of intrauterine growth restriction. *Pediatr. Res.* **75**, 697–706 (2014).
42. Menendez-Castro, C. *et al.* Early and late postnatal myocardial and vascular changes in a protein restriction rat model of intrauterine growth restriction. *PLoS One* **6**, e20369 (2011).
43. Ferguson, D. P. *et al.* Postnatal undernutrition alters adult female mouse cardiac structure and function leading to limited exercise capacity. *J. Physiol.* **597**, 1855–1872 (2019).
44. Penitente, A. R. *et al.* Protein restriction after weaning modifies the calcium kinetics and induces cardiomyocyte contractile dysfunction in rats. *Cells Tissues Organs* **198**, 311–317 (2013).
45. Pladys, P. *et al.* Microvascular rarefaction and decreased angiogenesis in rats with fetal programming of hypertension associated with exposure to a low-protein diet in utero. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **289**, R1580–R1588 (2005).
46. Leone, M., Magadum, A. & Engel, F. B. Cardiomyocyte proliferation in cardiac development and regeneration: a guide to methodologies and interpretations. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **309**, H1237–H1250 (2015).
47. Corstius, H. B. *et al.* Effect of intrauterine growth restriction on the number of cardiomyocytes in rat hearts. *Pediatr. Res.* **57**, 796–800 (2005).
48. Lim, K., Zimanyi, M. A. & Black, M. J. Effect of maternal protein restriction during pregnancy and lactation on the number of cardiomyocytes in the postproliferative weanling rat heart. *Anat. Rec.* **293**, 431–437 (2010).
49. Aroutiounova, N., Fandrich, R., Kardami, E. & Tappia, P. S. Prenatal exposure to maternal low protein diet suppresses replicative potential of myocardial cells. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* **19**, 707–712 (2009).
50. Alexander, B. T., Dasinger, J. H. & Intapad, S. Fetal programming and cardiovascular pathology. *Compr. Physiol.* **5**, 997–1025 (2015).
51. Godfrey, K. M., Gluckman, P. D. & Hanson, M. A. Developmental origins of metabolic disease: life course and intergenerational perspectives. *Trends Endocrinol. Metab.* **21**, 199–205 (2010).
52. Yang, Z. & Huffman, S. L. Nutrition in pregnancy and early childhood and associations with obesity in developing countries. *Matern. Child. Nutr.* **9**(Suppl 1), 105–119 (2013).
53. Cleal, J. K. *et al.* Mismatched pre- and postnatal nutrition leads to cardiovascular dysfunction and altered renal function in adulthood. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 9529–9533 (2007).
54. Zohdi, V. *et al.* When early life growth restriction in rats is followed by attenuated postnatal growth: effects on cardiac function in adulthood. *Eur. J. Nutr.* **54**, 743–750 (2015).
55. Botting, K. J. *et al.* IUGR decreases cardiomyocyte endowment and alters cardiac metabolism in a sex- and cause-of-IUGR-specific manner. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **315**, R48–R67 (2018).
56. Chalvon-Demersay, T., Blachier, F., Tomé, D. & Blais, A. Animal models for the study of the relationships between diet and obesity: a focus on dietary protein and estrogen deficiency. *Front. Nutr.* **4**, 5 (2017).
57. Pellizzon, M. A. & Ricci, M. R. The common use of improper control diets in diet-induced metabolic disease research confounds data interpretation: the fiber factor. *Nutr. Metab.* **15**, 23 (2018).
58. Hennig, M., Fiedler, S., Jux, C., Thierfelder, L. & Drenckhahn, J. D. Prenatal mechanistic target of rapamycin complex 1 (mTORC1) inhibition by rapamycin treatment of pregnant mice causes intrauterine growth restriction and alters postnatal cardiac growth, morphology, and function. *J. Am. Heart Assoc.* **6**, e005506 (2017).
59. Dickinson, H. *et al.* A review of fundamental principles for animal models of DOHaD research: an Australian perspective. *J. Dev. Orig. Health Dis.* **7**, 449–472 (2016).

## Acknowledgements

We thank Arnd Heuser, Martin Taube and Stefanie Schelenz for performing echocardiography and Beatrice Heuser and Michaela Tirre for technical assistance. This work was supported by institutional funds of the Max-Delbrück-Center Berlin and the University Hospital Münster.

## Author contributions

J.D.D. designed and supervised the study with contributions from M.H., M.M., L.T. and C.J. Experiments and data analyses were performed by M.H., L.E., S.P., S.S., M.O. and D.E. Statistical analyses were performed by M.H. and J.D.D. The initial version of the manuscript was written by J.D.D. and edited by M.H. All authors reviewed and contributed to the final version of the manuscript. A.U., L.T. and C.J. secured funding and provided infrastructural support.

## Competing interests

The authors declare no competing interests.

## Additional information

**Supplementary information** is available for this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51654-3>.

**Correspondence** and requests for materials should be addressed to J.-D.D.

**Reprints and permissions information** is available at [www.nature.com/reprints](http://www.nature.com/reprints).

**Publisher's note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2019

## 5. Literatur

1. Dolk H, Loane M, Garne E. The prevalence of congenital anomalies in Europe. *Adv Exp Med Biol.* 2010;686:349-364.
2. Hoffman JI, Kaplan S. The incidence of congenital heart disease. *J Am Coll Cardiol.* 2002;39:1890-1900.
3. van der Linde D, Konings EE, Slager MA, Witsenburg M, Helbing WA, Takkenberg JJ, Roos-Hesselink JW. Birth prevalence of congenital heart disease worldwide: a systematic review and meta-analysis. *J Am Coll Cardiol.* 2011;58:2241-2247.
4. Liu Y, Chen S, Zühlke L, Black GC, Choy MK, Li N, Keavney BD. Global birth prevalence of congenital heart defects 1970-2017: updated systematic review and meta-analysis of 260 studies. *Int J Epidemiol.* 2019;48:455-463.
5. Schwedler G, Lindinger A, Lange PE, Sax U, Olchvary J, Peters B, Bauer U, Hense HW. Frequency and spectrum of congenital heart defects among live births in Germany: a study of the Competence Network for Congenital Heart Defects. *Clin Res Cardiol.* 2011;100:1111-1117.
6. Jorgensen M, McPherson E, Zaleski C, Shivaram P, Cold C. Stillbirth: the heart of the matter. *Am J Med Genet A.* 2014;164A:691-699.
7. Bruneau BG. The developmental genetics of congenital heart disease. *Nature.* 2008;451:943-948.
8. Fung A, Manlhiot C, Naik S, Rosenberg H, Smythe J, Lougheed J, Mondal T, Chitayat D, McCrindle BW, Mital S. Impact of prenatal risk factors on congenital heart disease in the current era. *J Am Heart Assoc.* 2013;2:e000064.
9. Kalisch-Smith JI, Ved N, Sparrow DB. Environmental risk factors for congenital heart disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2019;a037234.
10. Lee TM, Hsu DT, Kantor P, Towbin JA, Ware SM, Colan SD, Chung WK, Jefferies JL, Rossano JW, Castleberry CD, Addonizio LJ, Lal AK, Lamour JM, Miller EM, Thrush PT, Czachor JD, Razoky H, Hill A, Lipshultz SE. Pediatric cardiomyopathies. *Circ Res.* 2017;121:855-873.
11. Wilsbacher L, McNally EM. Genetics of cardiac developmental disorders: cardiomyocyte proliferation and growth and relevance to heart failure. *Annu Rev Pathol.* 2016;11:395-419.
12. Rupp S, Felimban M, Schänzer A, Schranz D, Marschall C, Zenker M, Logeswaran T, Neuhäuser C, Thul J, Jux C, Hahn A. Genetic basis of hypertrophic cardiomyopathy in children. *Clin Res Cardiol.* 2019;108:282-289.
13. Loar RW, Bos JM, Will ML, Ommen SR, Ackerman MJ. Genotype-phenotype correlations of hypertrophic cardiomyopathy when diagnosed in children, adolescents, and young adults. *Congenit Heart Dis.* 2015;10:529-536.
14. Mone SM, Gillman MW, Miller TL, Herman EH, Lipshultz SE. Effects of environmental exposures on the cardiovascular system: prenatal period through adolescence. *Pediatrics.* 2004;113:1058-1069.
15. Harvey RP. Patterning the vertebrate heart. *Nat Rev Genet.* 2002;3:544-556.
16. Bruneau BG. Signaling and transcriptional networks in heart development and regeneration. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013;5:a008292.
17. Meilhac SM, Buckingham ME. The deployment of cell lineages that form the mammalian heart. *Nat Rev Cardiol.* 2018;15:705-724.
18. Ji RP, Phoon CK, Aristizábal O, McGrath KE, Palis J, Turnbull DH. Onset of cardiac function during early mouse embryogenesis coincides with entry of primitive erythroblasts into the embryo proper. *Circ Res.* 2003;92:133-135.

19. Desgrange A, Le Garrec JF, Meilhac SM. Left-right asymmetry in heart development and disease: forming the right loop. *Development*. 2018;145:dev162776.
20. Lamers WH, Moorman AF. Cardiac septation: a late contribution of the embryonic primary myocardium to heart morphogenesis. *Circ Res*. 2002;91:93-103.
21. Armstrong EJ, Bischoff J. Heart valve development: endothelial cell signaling and differentiation. *Circ Res*. 2004;95:459-470.
22. Moorman A, Webb S, Brown NA, Lamers W, Anderson RH. Development of the heart: formation of the cardiac chambers and arterial trunks. *Heart*. 2003;89:806-814.
23. Sedmera D, Pexieder T, Vuillemin M, Thompson RP, Anderson RH. Developmental patterning of the myocardium. *Anat Rec*. 2000;258:319-337.
24. Samsa LA, Yang B, Liu J. Embryonic cardiac chamber maturation: trabeculation, conduction, and cardiomyocyte proliferation. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 2013;163C:157-168.
25. Pinto AR, Ilinykh A, Ivey MJ, Kuwabara JT, D'Antoni ML, Debuque R, Chandran A, Wang L, Arora K, Rosenthal NA, Tallquist MD. Revisiting cardiac cellular composition. *Circ Res*. 2016;118:400-409.
26. Banerjee I, Fuseler JW, Price RL, Borg TK, Baudino TA. Determination of cell types and numbers during cardiac development in the neonatal and adult rat and mouse. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007;293:H1883-1891.
27. Mattfeldt T, Krämer KL, Zeitz R, Mall G. Stereology of myocardial hypertrophy induced by physical exercise. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*. 1986;409:473-484.
28. Tang Y, Nyengaard JR, Andersen JB, Baandrup U, Gundersen HJ. The application of stereological methods for estimating structural parameters in the human heart. *Anat Rec (Hoboken)*. 2009;292:1630-1647.
29. Bensley JG, De Matteo R, Harding R, Black MJ. Three-dimensional direct measurement of cardiomyocyte volume, nuclearity, and ploidy in thick histological sections. *Sci Rep*. 2016;6:23756.
30. Karra R, Poss KD. Redirecting cardiac growth mechanisms for therapeutic regeneration. *J Clin Invest*. 2017;127:427-436.
31. Soonpaa MH, Kim KK, Pajak L, Franklin M, Field LJ. Cardiomyocyte DNA synthesis and binucleation during murine development. *Am J Physiol*. 1996;271:H2183-2189.
32. Li F, Wang X, Capasso JM, Gerdes AM. Rapid transition of cardiac myocytes from hyperplasia to hypertrophy during postnatal development. *J Mol Cell Cardiol*. 1996;28:1737-1746.
33. Walsh S, Pontén A, Fleischmann BK, Jovinge S. Cardiomyocyte cell cycle control and growth estimation in vivo--an analysis based on cardiomyocyte nuclei. *Cardiovasc Res*. 2010;86:365-373.
34. Jonker SS, Louey S, Giraud GD, Thornburg KL, Faber JJ. Timing of cardiomyocyte growth, maturation, and attrition in perinatal sheep. *FASEB J*. 2015;29:4346-4357.
35. Ye L, Qiu L, Zhang H, Chen H, Jiang C, Hong H, Liu J. Cardiomyocytes in young infants with congenital heart disease: a three-month window of proliferation. *Sci Rep*. 2016;6:23188.
36. Mollova M, Bersell K, Walsh S, Savla J, Das LT, Park SY, Silberstein LE, Dos Remedios CG, Graham D, Colan S, Kühn B. Cardiomyocyte proliferation contributes to heart growth in young humans. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013;110:1446-1451.
37. Bergmann O, Zdunek S, Felker A, Salehpour M, Alkass K, Bernard S, Sjöström SL, Szewczykowska M, Jackowska T, Dos Remedios C, Malm T, Andrä M, Jashari R, Nyengaard JR, Possnert G, Jovinge S, Druid H, Frisén J. Dynamics of cell generation and turnover in the human heart. *Cell*. 2015;161:1566-1575.

38. Bergmann O, Bhardwaj RD, Bernard S, Zdunek S, Barnabé-Heider F, Walsh S, Zupicich J, Alkass K, Buchholz BA, Druid H, Jovinge S, Frisén J. Evidence for cardiomyocyte renewal in humans. *Science*. 2009;324:98-102.
39. Rawlins J, Bhan A, Sharma S. Left ventricular hypertrophy in athletes. *Eur J Echocardiogr*. 2009;10:350-356.
40. Chung E, Leinwand LA. Pregnancy as a cardiac stress model. *Cardiovasc Res*. 2014;101:561-570.
41. Mailliet M, van Berlo JH, Molkentin JD. Molecular basis of physiological heart growth: fundamental concepts and new players. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2013;14:38-48.
42. Vujic A, Lerchenmüller C, Wu TD, Guillermier C, Rabolli CP, Gonzalez E, Senyo SE, Liu X, Guerquin-Kern JL, Steinhauser ML, Lee RT, Rosenzweig A. Exercise induces new cardiomyocyte generation in the adult mammalian heart. *Nat Commun*. 2018;9:1659.
43. Nakamura M, Sadoshima J. Mechanisms of physiological and pathological cardiac hypertrophy. *Nat Rev Cardiol*. 2018;15:387-407.
44. Travers JG, Kamal FA, Robbins J, Yutzey KE, Blaxall BC. Cardiac fibrosis: the fibroblast awakens. *Circ Res*. 2016;118:1021-1040.
45. Mohammed SF, Hussain S, Mirzoyev SA, Edwards WD, Maleszewski JJ, Redfield MM. Coronary microvascular rarefaction and myocardial fibrosis in heart failure with preserved ejection fraction. *Circulation*. 2015;131:550-559.
46. Hamasaki S, Al Suwaidi J, Higano ST, Miyauchi K, Holmes DR Jr, Lerman A. Attenuated coronary flow reserve and vascular remodeling in patients with hypertension and left ventricular hypertrophy. *J Am Coll Cardiol*. 2000;35:1654-1660.
47. Whelan RS, Kaplinskiy V, Kitsis RN. Cell death in the pathogenesis of heart disease: mechanisms and significance. *Annu Rev Physiol*. 2010;72:19-44.
48. Frieler RA, Mortensen RM. Immune cell and other noncardiomyocyte regulation of cardiac hypertrophy and remodeling. *Circulation*. 2015;131:1019-1030.
49. Shioi T, Kang PM, Douglas PS, Hampe J, Yballe CM, Lawitts J, Cantley LC, Izumo S. The conserved phosphoinositide 3-kinase pathway determines heart size in mice. *EMBO J*. 2000;19:2537-2548.
50. Matsui Y, Nakano N, Shao D, Gao S, Luo W, Hong C, Zhai P, Holle E, Yu X, Yabuta N, Tao W, Wagner T, Nojima H, Sadoshima J. Lats2 is a negative regulator of myocyte size in the heart. *Circ Res*. 2008;103:1309-1318.
51. Porrello ER, Widdop RE, Delbridge LM. Early origins of cardiac hypertrophy: does cardiomyocyte attrition programme for pathological 'catch-up' growth of the heart? *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2008;35:1358-1364.
52. Barker DJ, Winter PD, Osmond C, Margetts B, Simmonds SJ. Weight in infancy and death from ischaemic heart disease. *Lancet* 1989;2:577-580.
53. Barker DJ, Hales CN, Fall CH, Osmond C, Phipps K, Clark PM. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus, hypertension and hyperlipidaemia (syndrome X): relation to reduced fetal growth. *Diabetologia* 1993;36:62-67.
54. Alexander BT, Dasinger JH, Intapad S. Fetal programming and cardiovascular pathology. *Compr Physiol*. 2015;5:997-1025.
55. Thornburg KL. The programming of cardiovascular disease. *J Dev Orig Health Dis*. 2015;6:366-376.
56. Symonds ME, Sebert SP, Hyatt MA, Budge H. Nutritional programming of the metabolic syndrome. *Nat Rev Endocrinol*. 2009;5:604-610.
57. Rinaudo P & Wang E. Fetal programming and metabolic syndrome. *Annu Rev Physiol*. 2012;74:107-130.



58. Walker CL & Ho SM. Developmental reprogramming of cancer susceptibility. *Nat Rev Cancer*. 2012;12:479-486.
59. Godfrey KM, Gluckman PD, Hanson MA. Developmental origins of metabolic disease: life course and intergenerational perspectives. *Trends Endocrinol Metab*. 2010;21:199-205.
60. Yang Z, Huffman SL. Nutrition in pregnancy and early childhood and associations with obesity in developing countries. *Matern Child Nutr*. 2013;9 Suppl 1:105-119.
61. Hales CN, Ozanne SE. The dangerous road of catch-up growth. *J Physiol*. 2003;547:5-10.
62. Singhal A, Cole TJ, Fewtrell M, Deanfield J, Lucas A. Is slower early growth beneficial for long-term cardiovascular health? *Circulation*. 2004;109:1108-1113.
63. Sharma D, Shastri S, Sharma P. Intrauterine growth restriction: antenatal and postnatal aspects. *Clin Med Insights Pediatr*. 2016;10:67-83.
64. Roseboom T, de Rooij S, Painter R. The Dutch famine and its long-term consequences for adult health. *Early Hum Dev*. 2006;82:485-491.
65. Lumey LH, Stein AD, Susser E. Prenatal famine and adult health. *Annu Rev Public Health*. 2011;32:237-262.
66. Soria R, Julian CG, Vargas E, Moore LG, Giussani DA. Graduated effects of high-altitude hypoxia and highland ancestry on birth size. *Pediatr Res*. 2013;74:633-638.
67. Rando OJ & Simmons RA. I'm eating for two: parental dietary effects on offspring metabolism. *Cell*. 2015;161:93-105.
68. Holland ML, Lowe R, Caton PW, Gemma C, Carbajosa G, Danson AF, Carpenter AA, Loche E, Ozanne SE, Rakyan VK. Early-life nutrition modulates the epigenetic state of specific rDNA genetic variants in mice. *Science*. 2016;353:495-498.
69. Lee HS. Impact of maternal diet on the epigenome during in utero life and the developmental programming of diseases in childhood and adulthood. *Nutrients*. 2015;7:9492-9507.
70. Keating ST & El-Osta A. Epigenetics and metabolism. *Circ Res*. 2015;116:715-736.
71. Horikoshi M, et al. Genome-wide associations for birth weight and correlations with adult disease. *Nature*. 2016;538:248-252.
72. Warrington NM, et al. Maternal and fetal genetic effects on birth weight and their relevance to cardio-metabolic risk factors. *Nat Genet*. 2019;51:804-814.
73. Sookoian S, Gianotti TF, Burgueño AL, Pirola CJ. Fetal metabolic programming and epigenetic modifications: a systems biology approach. *Pediatr Res*. 2013;73:531-542.
74. Bahtiyar MO & Copel JA. Cardiac changes in the intrauterine growth-restricted fetus. *Semin Perinatol*. 2008;32:190-193.
75. Naujorks AA, Zielinsky P, Beltrame PA, Castagna RC, Petracco R, Busato A, Nicoloso AL, Piccoli A, Manica JL. Myocardial tissue Doppler assessment of diastolic function in the growth-restricted fetus. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2009;34:68-73.
76. Patey O, Carvalho JS, Thilaganathan B. Perinatal changes in cardiac geometry and function in growth-restricted fetuses at term. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2019;53:655-662.
77. Crispi F, Bijlens B, Figueras F, Bartrons J, Eixarch E, Le Noble F, Ahmed A, Gratacós E. Fetal growth restriction results in remodeled and less efficient hearts in children. *Circulation*. 2010;121:2427-2436.
78. Cohen E, Wong FY, Horne RS, Yiallourou SR. Intrauterine growth restriction: impact on cardiovascular development and function throughout infancy. *Pediatr Res*. 2016;79:821-830.

79. Sarvari SI, Rodriguez-Lopez M, Nuñez-Garcia M, Sitges M, Sepulveda-Martinez A, Camara O, Butakoff C, Gratacos E, Bijmens B, Crispi F. Persistence of cardiac remodeling in preadolescents with fetal growth restriction. *Circ Cardiovasc Imaging*. 2017;10:e005270.
80. Crispi F, Miranda J, Gratacós E. Long-term cardiovascular consequences of fetal growth restriction: biology, clinical implications, and opportunities for prevention of adult disease. *Am J Obstet Gynecol*. 2018;218:S869-S879.
81. Matthiesen NB, Henriksen TB, Agergaard P, Gaynor JW, Bach CC, Hjortdal VE, Østergaard JR. Congenital heart defects and indices of placental and fetal growth in a nationwide study of 924 422 liveborn infants. *Circulation*. 2016;134:1546-1556.
82. Malik S, Cleves MA, Zhao W, Correa A, Hobbs CA; National Birth Defects Prevention Study. Association between congenital heart defects and small for gestational age. *Pediatrics*. 2007;119:e976-982.
83. Miao CY, Zuberbuhler JS, Zuberbuhler JR. Prevalence of congenital cardiac anomalies at high altitude. *J Am Coll Cardiol*. 1988;12:224-228.
84. Chun H, Yue Y, Wang Y, Dawa Z, Zhen P, La Q, Zong Y, Qu Y, Mu D. High prevalence of congenital heart disease at high altitudes in Tibet. *Eur J Prev Cardiol*. 2019;26:756-759.
85. Swanson AM, David AL. Animal models of fetal growth restriction: considerations for translational medicine. *Placenta*. 2015;36:623-630.
86. Blackmore HL, Ozanne SE. Programming of cardiovascular disease across the life-course. *J Mol Cell Cardiol*. 2015;83:122-130.
87. Corstius HB, Zimanyi MA, Maka N, Herath T, Thomas W, van der Laarse A, Wreford NG, Black MJ. Effect of intrauterine growth restriction on the number of cardiomyocytes in rat hearts. *Pediatr Res*. 2005;57:796-800.
88. Black MJ, Siebel AL, Gezmish O, Moritz KM, Wlodek ME. Normal lactational environment restores cardiomyocyte number after uteroplacental insufficiency: implications for the preterm neonate. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2012;302:R1101-1110.
89. Botting KJ, McMillen IC, Forbes H, Nyengaard JR, Morrison JL. Chronic hypoxemia in late gestation decreases cardiomyocyte number but does not change expression of hypoxia-responsive genes. *J Am Heart Assoc*. 2014;3:e000531.
90. Paradis AN, Gay MS, Wilson CG, Zhang L. Newborn hypoxia/anoxia inhibits cardiomyocyte proliferation and decreases cardiomyocyte endowment in the developing heart: role of endothelin-1. *PLoS One*. 2015;10:e0116600.
91. Jonker SS, Louey S. Endocrine and other physiologic modulators of perinatal cardiomyocyte endowment. *J Endocrinol*. 2016;228:R1-18.
92. Poss KD, Wilson LG, Keating MT. Heart regeneration in zebrafish. *Science*. 2002;298:2188-2190.
93. Jopling C, Sleep E, Raya M, Martí M, Raya A, Izpisua Belmonte JC. Zebrafish heart regeneration occurs by cardiomyocyte dedifferentiation and proliferation. *Nature*. 2010;464:606-609.
94. Kikuchi K, Holdway JE, Werdich AA, Anderson RM, Fang Y, Egnaczyk GF, Evans T, Macrae CA, Stainier DY, Poss KD. Primary contribution to zebrafish heart regeneration by gata4(+) cardiomyocytes. *Nature*. 2010;464:601-605.
95. Laube F, Heister M, Scholz C, Borchardt T, Braun T. Re-programming of newt cardiomyocytes is induced by tissue regeneration. *J Cell Sci*. 2006;119:4719-4729.

96. Witman N, Murtuza B, Davis B, Arner A, Morrison JL. Recapitulation of developmental cardiogenesis governs the morphological and functional regeneration of adult newt hearts following injury. *Dev Biol.* 2011;354:67-76.
97. Marshall LN, Vivien CJ, Girardot F, Péricard L, Scerbo P, Palmier K, Demeneix BA, Coen L. Stage-dependent cardiac regeneration in *Xenopus* is regulated by thyroid hormone availability. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2019;116:3614-3623.
98. Yuan X, Braun T. Multimodal regulation of cardiac myocyte proliferation. *Circ Res.* 2017;121:293-309.
99. Sturzu AC, Rajarajan K, Passer D, Plonowska K, Riley A, Tan TC, Sharma A, Xu AF, Engels MC, Feistritzer R, Li G, Selig MK, Geissler R, Robertson KD, Scherrer-Crosbie M, Domian IJ, Wu SM. Fetal mammalian heart generates a robust compensatory response to cell loss. *Circulation.* 2015;132:109-121.
100. Herdrich BJ, Danzer E, Davey MG, Allukian M, Englefield V, Gorman JH 3rd, Gorman RC, Liechty KW. Regenerative healing following foetal myocardial infarction. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2010;38:691-698.
101. Lock MC, Darby JRT, Soo JY, Brooks DA, Perumal SR, Selvanayagam JB, Seed M, Macgowan CK, Porrello ER, Tellam RL, Morrison JL. Differential response to injury in fetal and adolescent sheep hearts in the immediate post-myocardial infarction period. *Front Physiol.* 2019;10:208.
102. Porrello ER, Mahmoud AI, Simpson E, Hill JA, Richardson JA, Olson EN, Sadek HA. Transient regenerative potential of the neonatal mouse heart. *Science.* 2011;331:1078-1080.
103. Haubner BJ, Adamowicz-Brice M, Khadayate S, Tiefenthaler V, Metzler B, Aitman T, Penninger JM. Complete cardiac regeneration in a mouse model of myocardial infarction. *Aging (Albany NY).* 2012;4:966-977.
104. Andersen DC, Jensen CH, Baun C, Hvidsten S, Zebrowski DC, Engel FB, Sheikh SP. Persistent scarring and dilated cardiomyopathy suggest incomplete regeneration of the apex resected neonatal mouse myocardium--A 180 days follow up study. *J Mol Cell Cardiol.* 2016;90:47-52.
105. Konfino T, Landa N, Ben-Mordechai T, Leor J. The type of injury dictates the mode of repair in neonatal and adult heart. *J Am Heart Assoc.* 2015;4:e001320.
106. Zebrowski DC, Jensen CH, Becker R, Ferrazzi F, Baun C, Hvidsten S, Sheikh SP, Polizzotti BD, Andersen DC, Engel FB. Cardiac injury of the newborn mammalian heart accelerates cardiomyocyte terminal differentiation. *Sci Rep.* 2017;7:8362.
107. Ye L, D'Agostino G, Loo SJ, Wang CX, Su LP, Tan SH, Tee GZ, Pua CJ, Pena EM, Cheng RB, Chen WC, Abdurrachim D, Lalic J, Tan RS, Lee TH, Zhang J, Cook SA. Early regenerative capacity in the porcine heart. *Circulation.* 2018;138:2798-2808.
108. Zhu W, Zhang E, Zhao M, Chong Z, Fan C, Tang Y, Hunter JD, Borovjagin AV, Walcott GP, Chen JY, Qin G, Zhang J. Regenerative potential of neonatal porcine hearts. *Circulation.* 2018;138:2809-2816.
109. Haubner BJ, Schneider J, Schweigmann U, Schuetz T, Dichtl W, Velik-Salchner C, Stein JI, Penninger JM. Functional recovery of a human neonatal heart after severe myocardial infarction. *Circ Res.* 2016;118:216-221.
110. Kennedy-Lydon T, Rosenthal N. Cardiac regeneration: All work and no repair? *Sci Transl Med.* 2017;9:eaad9019.
111. Canseco DC, Kimura W, Garg S, Mukherjee S, Bhattacharya S, Abdisalaam S, Das S, Asaithamby A, Mammen PP, Sadek HA. Human ventricular unloading induces cardiomyocyte proliferation. *J Am Coll Cardiol.* 2015;65:892-900.

112. Karbassi E, Fenix A, Marchiano S, Muraoka N, Nakamura K, Yang X, Murry CE. Cardiomyocyte maturation: advances in knowledge and implications for regenerative medicine. *Nat Rev Cardiol.* 2020;17:341–359.
113. Ali H, Braga L, Giacca M. Cardiac regeneration and remodelling of the cardiomyocyte cytoarchitecture. *FEBS J.* 2020;287:417-438.
114. Engel FB, Schebesta M, Duong MT, Lu G, Ren S, Madwed JB, Jiang H, Wang Y, Keating MT. p38 MAP kinase inhibition enables proliferation of adult mammalian cardiomyocytes. *Genes Dev.* 2005;19:1175-1187.
115. Lopaschuk GD, Jaswal JS. Energy metabolic phenotype of the cardiomyocyte during development, differentiation, and postnatal maturation. *J Cardiovasc Pharmacol* 2010;56:130-140.
116. Lopaschuk GD, Spafford MA, Marsh DR. Glycolysis is predominant source of myocardial ATP production immediately after birth. *Am J Physiol.* 1991;261:H1698-1705.
117. Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science.* 2009;324:1029-1033.
118. Makinde AO, Gamble J, Lopaschuk GD. Upregulation of 5'-AMP-activated protein kinase is responsible for the increase in myocardial fatty acid oxidation rates following birth in the newborn rabbit. *Circ Res* 1997;80:482-489.
119. Chen YR, Zweier JL. Cardiac mitochondria and reactive oxygen species generation. *Circ Res.* 2014;114:524-537.
120. Puente BN, Kimura W, Muralidhar SA, Moon J, Amatruda JF, Phelps KL, Grinsfelder D, Rothermel BA, Chen R, Garcia JA, Santos CX, Thet S, Mori E, Kinter MT, Rindler PM, Zacchigna S, Mukherjee S, Chen DJ, Mahmoud AI, Giacca M, Rabinovitch PS, Aroumougame A, Shah AM, Szweda LI, Sadek HA. The oxygen-rich postnatal environment induces cardiomyocyte cell-cycle arrest through DNA damage response. *Cell.* 2014;157:565-579.
121. Leone M, Magadum A, Engel FB. Cardiomyocyte proliferation in cardiac development and regeneration: a guide to methodologies and interpretations. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2015;309:H1237-1250.
122. Hesse M, Doengi M, Becker A, Kimura K, Voeltz N, Stein V, Fleischmann BK. Midbody positioning and distance between daughter nuclei enable unequivocal identification of cardiomyocyte cell division in mice. *Circ Res.* 2018;123:1039-1052.
123. Leone M, Musa G, Engel FB. Cardiomyocyte binucleation is associated with aberrant mitotic microtubule distribution, mislocalization of RhoA and IQGAP3, as well as defective actomyosin ring anchorage and cleavage furrow ingression. *Cardiovasc Res.* 2018 Jul 1;114(8):1115-1131.
124. González-Rosa JM, Sharpe M, Field D, Soonpaa MH, Field LJ, Burns CE, Burns CG. Myocardial polyploidization creates a barrier to heart regeneration in zebrafish. *Dev Cell.* 2018;44:433-446.
125. Hirose K, Payumo AY, Cutie S, Hoang A, Zhang H, Guyot R, Lunn D, Bigley RB, Yu H, Wang J, Smith M, Gillett E, Muroy SE, Schmid T, Wilson E, Field KA, Reeder DM, Maden M, Yartsev MM, Wolfgang MJ, Grützner F, Scanlan TS, Szweda LI, Buffenstein R, Hu G, Flamant F, Olgin JE, Huang GN. Evidence for hormonal control of heart regenerative capacity during endothermy acquisition. *Science.* 2019;364:184-188.
126. Vivien CJ, Hudson JE, Porrello ER. Evolution, comparative biology and ontogeny of vertebrate heart regeneration. *NPJ Regen Med.* 2016;1:16012.
127. Nakada Y, Canseco DC, Thet S, Abdisalaam S, Asaithamby A, Santos CX, Shah AM, Zhang H, Faber JE, Kinter MT, Szweda LI, Xing C, Hu Z, Deberardinis RJ, Schiattarella

- G, Hill JA, Oz O, Lu Z, Zhang CC, Kimura W, Sadek HA. Hypoxia induces heart regeneration in adult mice. *Nature*. 2017;541:222-227.
128. Jopling C, Suñé G, Faucherre A, Fabregat C, Izpisua Belmonte JC. Hypoxia induces myocardial regeneration in zebrafish. *Circulation*. 2012;126:3017-3027.
  129. Kimura W, Xiao F, Canseco DC, Muralidhar S, Thet S, Zhang HM, Abderrahman Y, Chen R, Garcia JA, Shelton JM, Richardson JA, Ashour AM, Asaithamby A, Liang H, Xing C, Lu Z, Zhang CC, Sadek HA. Hypoxia fate mapping identifies cycling cardiomyocytes in the adult heart. *Nature*. 2015;523:226-230.
  130. Elhelaly WM, Lam NT, Hamza M, Xia S, Sadek HA. Redox regulation of heart regeneration: an evolutionary tradeoff. *Front Cell Dev Biol*. 2016;4:137.
  131. Menasché P. Cell therapy trials for heart regeneration - lessons learned and future directions. *Nat Rev Cardiol*. 2018;15:659-671.
  132. Chien KR, Frisén J, Fritsche-Danielson R, Melton DA, Murry CE, Weissman IL. Regenerating the field of cardiovascular cell therapy. *Nat Biotechnol*. 2019;37:232-237.
  133. van Berlo JH, Kanisicak O, Maillet M, Vagnozzi RJ, Karch J, Lin SC, Middleton RC, Marbán E, Molkentin JD. c-kit<sup>+</sup> cells minimally contribute cardiomyocytes to the heart. *Nature*. 2014;509:337-341.
  134. Sultana N, Zhang L, Yan J, Chen J, Cai W, Razzaque S, Jeong D, Sheng W, Bu L, Xu M, Huang GY, Hajjar RJ, Zhou B, Moon A, Cai CL. Resident c-kit(+) cells in the heart are not cardiac stem cells. *Nat Commun*. 2015;6:8701.
  135. Neidig LE, Weinberger F, Palpant NJ, Mignone J, Martinson AM, Sorensen DW, Bender I, Nemoto N, Reinecke H, Pabon L, Molkentin JD, Murry CE, van Berlo JH. Evidence for minimal cardiogenic potential of stem cell antigen 1-positive cells in the adult mouse heart. *Circulation*. 2018;138:2960-2962.
  136. Vagnozzi RJ, Sargent MA, Lin SJ, Palpant NJ, Murry CE, Molkentin JD. Genetic lineage tracing of sca-1<sup>+</sup> cells reveals endothelial but not myogenic contribution to the murine heart. *Circulation*. 2018;138:2931-2939.
  137. Uygur A & Lee RT. Mechanisms of cardiac regeneration. *Dev Cell*. 2016;36:362-374.
  138. Vagnozzi RJ, Maillet M, Sargent MA, Khalil H, Johansen AKZ, Schwanekamp JA, York AJ, Huang V, Nahrendorf M, Sadayappan S, Molkentin JD. An acute immune response underlies the benefit of cardiac stem cell therapy. *Nature*. 2020;577:405-409.
  139. Eschenhagen T, Bolli R, Braun T, Field LJ, Fleischmann BK, Frisén J, Giacca M, Hare JM, Houser S, Lee RT, Marbán E, Martin JF, Molkentin JD, Murry CE, Riley PR, Ruiz-Lozano P, Sadek HA, Sussman MA, Hill JA. Cardiomyocyte regeneration: a consensus statement. *Circulation*. 2017;136:680-686.
  140. Madonna R, Van Laake LW, Botker HE, Davidson SM, De Caterina R, Engel FB, Eschenhagen T, Fernandez-Aviles F, Hausenloy DJ, Hulot JS, Lecour S, Leor J, Menasché P, Pesce M, Perrino C, Prunier F, Van Linthout S, Ytrehus K, Zimmermann WH, Ferdinandy P, Sluijter JPG. ESC Working Group on Cellular Biology of the Heart: position paper for Cardiovascular Research: tissue engineering strategies combined with cell therapies for cardiac repair in ischaemic heart disease and heart failure. *Cardiovasc Res*. 2019;115:488-500.
  141. Tzahor E, Poss KD. Cardiac regeneration strategies: Staying young at heart. *Science*. 2017;356:1035-1039.
  142. Shiba Y, Gomibuchi T, Seto T, Wada Y, Ichimura H, Tanaka Y, Ogasawara T, Okada K, Shiba N, Sakamoto K, Ido D, Shiina T, Ohkura M, Nakai J, Uno N, Kazuki Y, Oshimura M, Minami I, Ikeda U. Allogeneic transplantation of iPS cell-derived cardiomyocytes regenerates primate hearts. *Nature*. 2016;538:388-391.



143. Liu YW, Chen B, Yang X, Fugate JA, Kalucki FA, Futakuchi-Tsuchida A, Couture L, Vogel KW, Astley CA, Baldessari A, Ogle J, Don CW, Steinberg ZL, Seslar SP, Tuck SA, Tsuchida H, Naumova AV, Dupras SK, Lyu MS, Lee J, Hailey DW, Reinecke H, Pabon L, Fryer BH, MacLellan WR, Thies RS, Murry CE. Human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes restore function in infarcted hearts of non-human primates. *Nat Biotechnol.* 2018;36:597-605.
144. Srivastava D, DeWitt N. In vivo cellular reprogramming: the next generation. *Cell.* 2016;166:1386-1396.
145. Qian L, Huang Y, Spencer CI, Foley A, Vedantham V, Liu L, Conway SJ, Fu JD, Srivastava D. In vivo reprogramming of murine cardiac fibroblasts into induced cardiomyocytes. *Nature.* 2012;485:593-598.
146. Song K, Nam YJ, Luo X, Qi X, Tan W, Huang GN, Acharya A, Smith CL, Tallquist MD, Neilson EG, Hill JA, Bassel-Duby R, Olson EN. Heart repair by reprogramming non-myocytes with cardiac transcription factors. *Nature.* 2012;485:599-604.
147. Zhang J, Zhu W, Radisic M, Vunjak-Novakovic G. Can we engineer a human cardiac patch for therapy? *Circ Res.* 2018;123:244-265.
148. Tiburcy M, Hudson JE, Balfanz P, Schlick S, Meyer T, Chang Liao ML, Levent E, Raad F, Zeidler S, Wingender E, Riegler J, Wang M, Gold JD, Kehat I, Wettwer E, Ravens U, Dierickx P, van Laake LW, Goumans MJ, Khadjeh S, Toischer K, Hasenfuss G, Couture LA, Unger A, Linke WA, Araki T, Neel B, Keller G, Gepstein L, Wu JC, Zimmermann WH. Defined engineered human myocardium with advanced maturation for applications in heart failure modeling and repair. *Circulation.* 2017;135:1832-1847.
149. Galdos FX, Guo Y, Paige SL, VanDusen NJ, Wu SM, Pu WT. Cardiac regeneration: lessons from development. *Circ Res.* 2017;120:941-959.
150. González A, Fortuño MA, Querejeta R, Ravassa S, López B, López N, Díez J. Cardiomyocyte apoptosis in hypertensive cardiomyopathy. *Cardiovasc Res.* 2003;59:549-562.
151. Ouyang C, You J, Xie Z. The interplay between autophagy and apoptosis in the diabetic heart. *J Mol Cell Cardiol.* 2014;71:71-80.
152. Wencker D, Chandra M, Nguyen K, Miao W, Garantziotis S, Factor SM, Shirani J, Armstrong RC, Kitsis RN. A mechanistic role for cardiac myocyte apoptosis in heart failure. *J Clin Invest.* 2003;111:1497-1504.
153. Ewer MS, Ewer SM. Cardiotoxicity of anticancer treatments. *Nat Rev Cardiol.* 2015;12:547-558.
154. Tait SW, Green DR. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010;11:621-632.
155. Zhang S, Liu X, Bawa-Khalfe T, Lu LS, Lyu YL, Liu LF, Yeh ET. Identification of the molecular basis of doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Nat Med.* 2012;18:1639-1642.
156. Dai DF, Rabinovitch PS, Ungvari Z. Mitochondria and cardiovascular aging. *Circ Res.* 2012;110:1109-1124.
157. Larsson NG. Somatic mitochondrial DNA mutations in mammalian aging. *Annu Rev Biochem.* 2010;79:683-706.
158. Ibáñez B, Heusch G, Ovize M, Van de Werf F. Evolving therapies for myocardial ischemia/reperfusion injury. *J Am Coll Cardiol.* 2015;65:1454-1471.
159. Heusch G. Critical issues for the translation of cardioprotection. *Circ Res.* 2017;120:1477-1486.
160. Heusch G. Molecular basis of cardioprotection: signal transduction in ischemic pre-, post-, and remote conditioning. *Circ Res.* 2015;116:674-699.

161. Heusch G, Rassaf T. Time to give up on cardioprotection? A critical appraisal of clinical studies on ischemic pre-, post-, and remote conditioning. *Circ Res*. 2016;119:676-695.
162. Nam YJ, Mani K, Ashton AW, Peng CF, Krishnamurthy B, Hayakawa Y, Lee P, Korsmeyer SJ, Kitsis RN. Inhibition of both the extrinsic and intrinsic death pathways through nonhomotypic death-fold interactions. *Mol Cell*. 2004;15:901-912.
163. Donath S, Li P, Willenbockel C, Al-Saadi N, Gross V, Willnow T, Bader M, Martin U, Bauersachs J, Wollert KC, Dietz R, von Harsdorf R; German Heart Failure Network. Apoptosis repressor with caspase recruitment domain is required for cardioprotection in response to biomechanical and ischemic stress. *Circulation*. 2006;113:1203-1212.
164. Coles JG, Boscarino C, Takahashi M, Grant D, Chang A, Ritter J, Dai X, Du C, Musso G, Yamabi H, Goncalves J, Kumar AS, Woodgett J, Lu H, Hannigan G. Cardioprotective stress response in the human fetal heart. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2005;129:1128-1136.
165. Fujimoto KL, Clause KC, Liu LJ, Tinney JP, Verma S, Wagner WR, Keller BB, Tobita K. Engineered fetal cardiac graft preserves its cardiomyocyte proliferation within postinfarcted myocardium and sustains cardiac function. *Tissue Eng Part A*. 2011;17:585-596.
166. Reinecke H, Zhang M, Bartosek T, Murry CE. Survival, integration, and differentiation of cardiomyocyte grafts: a study in normal and injured rat hearts. *Circulation*. 1999;100:193-202.
167. Konorev EA, Vanamala S, Kalyanaraman B. Differences in doxorubicin-induced apoptotic signaling in adult and immature cardiomyocytes. *Free Radic Biol Med*. 2008;45:1723-1728.
168. Shi J, Zhang L, Zhang YW, Surma M, Mark Payne R, Wei L. Downregulation of doxorubicin-induced myocardial apoptosis accompanies postnatal heart maturation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2012;302:H1603-H1613.
169. Cui N, Wu F, Lu WJ, Bai R, Ke B, Liu T, Li L, Lan F, Cui M. Doxorubicin-induced cardiotoxicity is maturation dependent due to the shift from topoisomerase II $\alpha$  to II $\beta$  in human stem cell derived cardiomyocytes. *J Cell Mol Med*. 2019;23:4627-4639.
170. Yoshioka J, Chutkow WA, Lee S, Kim JB, Yan J, Tian R, Lindsey ML, Feener EP, Seidman CE, Seidman JG, Lee RT. Deletion of thioredoxin-interacting protein in mice impairs mitochondrial function but protects the myocardium from ischemia-reperfusion injury. *J Clin Invest*. 2012;122:267-279.
171. Ausma J, Thoné F, Dispersyn GD, Flameng W, Vanoverschelde JL, Ramaekers FC, Borgers M. Dedifferentiated cardiomyocytes from chronic hibernating myocardium are ischemia-tolerant. *Mol Cell Biochem*. 1998;186:159-168.
172. Dispersyn GD, Mesotten L, Meuris B, Maes A, Mortelmans L, Flameng W, Ramaekers F, Borgers M. Dissociation of cardiomyocyte apoptosis and dedifferentiation in infarct border zones. *Eur Heart J*. 2002;23:849-857.
173. Kubin T, Pöling J, Kostin S, Gajawada P, Hein S, Rees W, Wietelmann A, Tanaka M, Lörchner H, Schimanski S, Szibor M, Warnecke H, Braun T. Oncostatin M is a major mediator of cardiomyocyte dedifferentiation and remodeling. *Cell Stem Cell*. 2011;9:420-432.
174. Rajabi M, Kassiotis C, Razeghi P, Taegtmeyer H. Return to the fetal gene program protects the stressed heart: a strong hypothesis. *Heart Fail Rev*. 2007;12:331-343.
175. Patterson AJ, Zhang L. Hypoxia and fetal heart development. *Curr Mol Med*. 2010;10:653-666.

176. Li F, Huang Q, Chen J, Peng Y, Roop DR, Bedford JS, Li CY. Apoptotic cells activate the "phoenix rising" pathway to promote wound healing and tissue regeneration. *Sci Signal*. 2010;3:ra13.
177. Sena LA, Chandel NS. Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species. *Mol Cell*. 2012;48:158-167.
178. Gauron C, Rampon C, Bouzaffour M, Ipendey E, Teillon J, Volovitch M, Vriza S. Sustained production of ROS triggers compensatory proliferation and is required for regeneration to proceed. *Sci Rep*. 2013;3:2084.
179. Love NR, Chen Y, Ishibashi S, Kritsiligkou P, Lea R, Koh Y, Gallop JL, Dorey K, Amaya E. Amputation-induced reactive oxygen species are required for successful *Xenopus* tadpole tail regeneration. *Nat Cell Biol*. 2013;15:222-228.
180. Nishina T, Komazawa-Sakon S, Yanaka S, Piao X, Zheng DM, Piao JH, Kojima Y, Yamashina S, Sano E, Putoczki T, Doi T, Ueno T, Ezaki J, Ushio H, Ernst M, Tsumoto K, Okumura K, Nakano H. Interleukin-11 links oxidative stress and compensatory proliferation. *Sci Signal*. 2012;5:ra5.
181. Ohsawa S, Sato Y, Enomoto M, Nakamura M, Betsumiya A, Igaki T. Mitochondrial defect drives non-autonomous tumour progression through Hippo signalling in *Drosophila*. *Nature*. 2012;490:547-551.
182. Baris OR, Ederer S, Neuhaus JF, von Kleist-Retzow JC, Wunderlich CM, Pal M, Wunderlich FT, Peeva V, Zsurka G, Kunz WS, Hickethier T, Bunck AC, Stöckigt F, Schrickel JW, Wiesner RJ. Mosaic deficiency in mitochondrial oxidative metabolism promotes cardiac arrhythmia during aging. *Cell Metab*. 2015;21:667-677.
183. Villa Del Campo C, Clavería C, Sierra R, Torres M. Cell competition promotes phenotypically silent cardiomyocyte replacement in the mammalian heart. *Cell Rep*. 2014;8:1741-1751.
184. Clavería C, Torres M. Cell competition: mechanisms and physiological roles. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2016;32:411-439.
185. Sedmera D, Hu N, Weiss KM, Keller BB, Denslow S, Thompson RP. Cellular changes in experimental left heart hypoplasia. *Anat Rec*. 2002;267:137-145.
186. deAlmeida A, McQuinn T, Sedmera D. Increased ventricular preload is compensated by myocyte proliferation in normal and hypoplastic fetal chick left ventricle. *Circ Res*. 2007;100:1363-1370.
187. Jonker SS, Faber JJ, Anderson DF, Thornburg KL, Louey S, Giraud GD. Sequential growth of fetal sheep cardiac myocytes in response to simultaneous arterial and venous hypertension. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2007;292:R913-919.
188. Saiki Y, König A, Waddell J, Rebeyka IM. Hemodynamic alteration by fetal surgery accelerates myocyte proliferation in fetal guinea pig hearts. *Surgery*. 1997;122:412-419.
189. Sedmera D, Thompson RP, Kolar F. Effect of increased pressure loading on heart growth in neonatal rats. *J Mol Cell Cardiol*. 2003;35:301-309.
190. Wong FY, Veldman A, Sasi A, Teoh M, Edwards A, Chan Y, Graupner O, Enzensberger C, Axt-Fliedner R, Black MJ, Schranz D. Induction of left ventricular hypoplasia by occluding the foramen ovale in the fetal lamb. *Sci Rep*. 2020;10:880.
191. Grossfeld P, Nie S, Lin L, Wang L, Anderson RH. Hypoplastic Left Heart Syndrome: a new paradigm for an old disease? *J Cardiovasc Dev Dis*. 2019;6:E10.
192. Liu X, Yagi H, Saeed S, Bais AS, Gabriel GC, Chen Z, Peterson KA, Li Y, Schwartz MC, Reynolds WT, Saydmohammed M, Gibbs B, Wu Y, Devine W, Chatterjee B, Klena NT, Kostka D, de Mesy Bentley KL, Ganapathiraju MK, Dexheimer P, Leatherbury L, Khalifa O, Bhagat A, Zahid M, Pu W, Watkins S, Grossfeld P, Murray SA, Porter GA Jr,

- Tsang M, Martin LJ, Benson DW, Aronow BJ, Lo CW. The complex genetics of hypoplastic left heart syndrome. *Nat Genet.* 2017;49:1152-1159.
193. Zohdi V, Lim K, Pearson JT, Black MJ. Developmental programming of cardiovascular disease following intrauterine growth restriction: findings utilising a rat model of maternal protein restriction. *Nutrients.* 2014;7:119-152.
  194. Lim K, Zimanyi MA, Black MJ. Effect of maternal protein restriction during pregnancy and lactation on the number of cardiomyocytes in the postproliferative weanling rat heart. *Anat Rec (Hoboken).* 2010;293:431-437.
  195. Aroutiounova N, Fandrich R, Kardami E, Tappia PS. Prenatal exposure to maternal low protein diet suppresses replicative potential of myocardial cells. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2009;19:707-712.
  196. Assalin HB, Gontijo JAR, Boer PA. miRNAs, target genes expression and morphological analysis on the heart in gestational protein-restricted offspring. *PLoS One.* 2019;14:e0210454.
  197. Lim K, Zimanyi MA, Black MJ. Effect of maternal protein restriction in rats on cardiac fibrosis and capillarization in adulthood. *Pediatr Res.* 2006;60:83-87.
  198. Menendez-Castro C, Fahlbusch F, Cordasic N, Amann K, Münzel K, Plank C, Wachtveitl R, Rascher W, Hilgers KF, Hartner A. Early and late postnatal myocardial and vascular changes in a protein restriction rat model of intrauterine growth restriction. *PLoS One.* 2011;6:e20369.
  199. Menendez-Castro C, Toka O, Fahlbusch F, Cordasic N, Wachtveitl R, Hilgers KF, Rascher W, Hartner A. Impaired myocardial performance in a normotensive rat model of intrauterine growth restriction. *Pediatr Res.* 2014;75:697-706.
  200. Cheema KK, Dent MR, Saini HK, Aroutiounova N, Tappia PS. Prenatal exposure to maternal undernutrition induces adult cardiac dysfunction. *Br J Nutr.* 2005;93:471-477.
  201. Elmes MJ, Gardner DS, Langley-Evans SC. Fetal exposure to a maternal low-protein diet is associated with altered left ventricular pressure response to ischaemia-reperfusion injury. *Br J Nutr.* 2007;98:93-100.
  202. Elmes MJ, McMullen S, Gardner DS, Langley-Evans SC. Prenatal diet determines susceptibility to cardiac ischaemia-reperfusion injury following treatment with diethylmaleic acid and N-acetylcysteine. *Life Sci.* 2008;82:149-155.
  203. Kuo AH, Li C, Li J, Huber HF, Nathanielsz PW, Clarke GD. Cardiac remodelling in a baboon model of intrauterine growth restriction mimics accelerated ageing. *J Physiol.* 2017;595:1093-1110.
  204. Kuo AH, Li C, Huber HF, Schwab M, Nathanielsz PW, Clarke GD. Maternal nutrient restriction during pregnancy and lactation leads to impaired right ventricular function in young adult baboons. *J Physiol.* 2017;595:4245-4260.
  205. Ge W, Hu N, George LA, Ford SP, Nathanielsz PW, Wang XM, Ren J. Maternal nutrient restriction predisposes ventricular remodeling in adult sheep offspring. *J Nutr Biochem.* 2013;24:1258-1265.
  206. Desai M, Gayle D, Babu J, Ross MG. Permanent reduction in heart and kidney organ growth in offspring of undernourished rat dams. *Am J Obstet Gynecol.* 2005;193:1224-1232.
  207. Harvey TJ, Murphy RM, Morrison JL, Posterino GS. Maternal nutrient restriction alters Ca<sup>2+</sup> handling properties and contractile function of isolated left ventricle bundles in male but not female juvenile rats. *PLoS One.* 2015;10:e0138388.
  208. Xu Y, Williams SJ, O'Brien D, Davidge ST. Hypoxia or nutrient restriction during pregnancy in rats leads to progressive cardiac remodeling and impairs postischemic recovery in adult male offspring. *FASEB J.* 2006;20:1251-1253.

209. Botting KJ, Loke XY, Zhang S, Andersen JB, Nyengaard JR, Morrison JL. IUGR decreases cardiomyocyte endowment and alters cardiac metabolism in a sex- and cause-of-IUGR-specific manner. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2018;315:R48-R67.
210. Vaughan OR, Rossi CA, Ginsberg Y, White A, Hristova M, Sebire NJ, Martin J, Zachary IC, Peebles DM, David AL. Perinatal and long-term effects of maternal uterine artery adenoviral VEGF-A165 gene therapy in the growth-restricted guinea pig fetus. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2018;315:R344-R353.
211. Bertram C, Khan O, Ohri S, Phillips DI, Matthews SG, Hanson MA. Transgenerational effects of prenatal nutrient restriction on cardiovascular and hypothalamic-pituitary-adrenal function. *J Physiol*. 2008;586:2217-2229.
212. Kawamura M, Itoh H, Yura S, Mogami H, Suga S, Makino H, Miyamoto Y, Yoshimasa Y, Sagawa N, Fujii S. Undernutrition in utero augments systolic blood pressure and cardiac remodeling in adult mouse offspring: possible involvement of local cardiac angiotensin system in developmental origins of cardiovascular disease. *Endocrinology*. 2007;148:1218-1225.
213. Knight BS, Sunn N, Pennell CE, Adamson SL, Lye SJ. Developmental regulation of cardiovascular function is dependent on both genotype and environment. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2009;297:H2234-2241.
214. Darby JRT, McMillen IC, Morrison JL. Maternal undernutrition in late gestation increases IGF2 signalling molecules and collagen deposition in the right ventricle of the fetal sheep heart. *J Physiol*. 2018;596:2345-2358.
215. Masoumy EP, Sawyer AA, Sharma S, Patel JA, Gordon PMK, Regnault TRH, Matuszewski B, Weintraub NL, Richardson B, Thompson JA, Stansfield BK. The lifelong impact of fetal growth restriction on cardiac development. *Pediatr Res*. 2018;84:537-544.
216. Camm EJ, Botting KJ, Sferruzzi-Perri AN. Near to one's heart: the intimate relationship between the placenta and fetal heart. *Front Physiol*. 2018;9:629.
217. Louey S, Jonker SS, Giraud GD, Thornburg KL. Placental insufficiency decreases cell cycle activity and terminal maturation in fetal sheep cardiomyocytes. *J Physiol*. 2007;580:639-648.
218. Bubb KJ, Cock ML, Black MJ, Dodic M, Boon WM, Parkington HC, Harding R, Tare M. Intrauterine growth restriction delays cardiomyocyte maturation and alters coronary artery function in the fetal sheep. *J Physiol*. 2007;578:871-881.
219. Morrison JL, Botting KJ, Dyer JL, Williams SJ, Thornburg KL, McMillen IC. Restriction of placental function alters heart development in the sheep fetus. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2007;293:R306-R313.
220. Vranas S, Heinemann GK, Liu H, De Blasio MJ, Owens JA, Gatford KL, Black MJ. Small size at birth predicts decreased cardiomyocyte number in the adult ovine heart. *J Dev Orig Health Dis*. 2017;8:618-625.
221. Garcia-Canadilla P, de Vries T, Gonzalez-Tendero A, Bonnin A, Gratacos E, Crispi F, Bijnens B, Zhang C. Structural coronary artery remodelling in the rabbit fetus as a result of intrauterine growth restriction. *PLoS One*. 2019;14:e0218192.
222. Wadley GD, McConell GK, Goodman CA, Siebel AL, Westcott KT, Wlodek ME. Growth restriction in the rat alters expression of metabolic genes during postnatal cardiac development in a sex-specific manner. *Physiol Genomics*. 2013;45:99-105.
223. Alsaied T, Omar K, James JF, Hinton RB, Crombleholme TM, Habli M. Fetal origins of adult cardiac disease: a novel approach to prevent fetal growth restriction induced cardiac dysfunction using insulin like growth factor. *Pediatr Res*. 2017;81:919-925.



224. Tare M, Parkington HC, Wallace EM, Sutherland AE, Lim R, Yawno T, Coleman HA, Jenkin G, Miller SL. Maternal melatonin administration mitigates coronary stiffness and endothelial dysfunction, and improves heart resilience to insult in growth restricted lambs. *J Physiol*. 2014;592:2695-2709.
225. Ream M, Ray AM, Chandra R, Chikaraishi DM. Early fetal hypoxia leads to growth restriction and myocardial thinning. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2008;295:R583-R595.
226. Tong W, Xue Q, Li Y, Zhang L. Maternal hypoxia alters matrix metalloproteinase expression patterns and causes cardiac remodeling in fetal and neonatal rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2011;301:H2113-2121.
227. Bae S, Xiao Y, Li G, Casiano CA, Zhang L. Effect of maternal chronic hypoxic exposure during gestation on apoptosis in fetal rat heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003;285:H983-990.
228. Tintu A, Rouwet E, Verlohren S, Brinkmann J, Ahmad S, Crispi F, van Bilsen M, Carmeliet P, Staff AC, Tjwa M, Cetin I, Gratacos E, Hernandez-Andrade E, Hofstra L, Jacobs M, Lamers WH, Morano I, Safak E, Ahmed A, le Noble F. Hypoxia induces dilated cardiomyopathy in the chick embryo: mechanism, intervention, and long-term consequences. *PLoS One*. 2009;4:e5155.
229. Shi H, O'Reilly VC, Moreau JL, Bewes TR, Yam MX, Chapman BE, Grieve SM, Stocker R, Graham RM, Chapman G, Sparrow DB, Dunwoodie SL. Gestational stress induces the unfolded protein response, resulting in heart defects. *Development*. 2016;143:2561-2572.
230. Yuan X, Qi H, Li X, Wu F, Fang J, Bober E, Dobрева G, Zhou Y, Braun T. Disruption of spatiotemporal hypoxic signaling causes congenital heart disease in mice. *J Clin Invest*. 2017;127:2235-2248.
231. Moreau JLM, Kesteven S, Martin EMMA, Lau KS, Yam MX, O'Reilly VC, Del Monte-Nieto G, Baldini A, Feneley MP, Moon AM, Harvey RP, Sparrow DB, Chapman G, Dunwoodie SL. Gene-environment interaction impacts on heart development and embryo survival. *Development*. 2019;146:dev172957.
232. Rueda-Clausen CF, Morton JS, Davidge ST. Effects of hypoxia-induced intrauterine growth restriction on cardiopulmonary structure and function during adulthood. *Cardiovasc Res*. 2009;81:713-722.
233. Rueda-Clausen CF, Morton JS, Lopaschuk GD, Davidge ST. Long-term effects of intrauterine growth restriction on cardiac metabolism and susceptibility to ischaemia/reperfusion. *Cardiovasc Res*. 2011;90:285-294.
234. Li G, Xiao Y, Estrella JL, Ducsay CA, Gilbert RD, Zhang L. Effect of fetal hypoxia on heart susceptibility to ischemia and reperfusion injury in the adult rat. *J Soc Gynecol Investig*. 2003;10:265-274.
235. Xue Q, Dasgupta C, Chen M, Zhang L. Foetal hypoxia increases cardiac AT(2)R expression and subsequent vulnerability to adult ischaemic injury. *Cardiovasc Res*. 2011;89:300-308.
236. Harrison MS, Goldenberg RL. Global burden of prematurity. *Semin Fetal Neonatal Med*. 2016;21:74-79.
237. Bensley JG, Moore L, De Matteo R, Harding R, Black MJ. Impact of preterm birth on the developing myocardium of the neonate. *Pediatr Res*. 2018;83:880-888.
238. Bensley JG, De Matteo R, Harding R, Black MJ. The effects of preterm birth and its antecedents on the cardiovascular system. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2016;95:652-663.

239. Aye CYL, Lewandowski AJ, Lamata P, Upton R, Davis E, Ohuma EO, Kenworthy Y, Boardman H, Wopperer S, Packham A, Adwani S, McCormick K, Papageorgiou AT, Leeson P. Disproportionate cardiac hypertrophy during early postnatal development in infants born preterm. *Pediatr Res*. 2017;82:36-46.
240. Eriksen BH, Nestaas E, Hole T, Liestøl K, Støylen A, Fugelseth D. Myocardial function in term and preterm infants. Influence of heart size, gestational age and postnatal maturation. *Early Hum Dev*. 2014;90:359-364.
241. Kozák-Bárány A, Jokinen E, Saraste M, Tuominen J, Välimäki I. Development of left ventricular systolic and diastolic function in preterm infants during the first month of life: a prospective follow-up study. *J Pediatr*. 2001;139:539-545.
242. Hirose A, Khoo NS, Aziz K, Al-Rajaa N, van den Boom J, Savard W, Brooks P, Hornberger LK. Evolution of left ventricular function in the preterm infant. *J Am Soc Echocardiogr*. 2015;28:302-338.
243. Mohlkert LA, Hallberg J, Broberg O, Rydberg A, Halvorsen CP, Liuba P, Fellman V, Domellöf M, Sjöberg G, Norman M. The preterm heart in childhood: left ventricular structure, geometry, and function assessed by echocardiography in 6-year-old survivors of periviable births. *J Am Heart Assoc*. 2018;7: e007742.
244. Lewandowski AJ, Augustine D, Lamata P, Davis EF, Lazdam M, Francis J, McCormick K, Wilkinson AR, Singhal A, Lucas A, Smith NP, Neubauer S, Leeson P. Preterm heart in adult life: cardiovascular magnetic resonance reveals distinct differences in left ventricular mass, geometry, and function. *Circulation*. 2013;127:197-206.
245. Lewandowski AJ, Bradlow WM, Augustine D, Davis EF, Francis J, Singhal A, Lucas A, Neubauer S, McCormick K, Leeson P. Right ventricular systolic dysfunction in young adults born preterm. *Circulation*. 2013;128:713-720.
246. Huckstep OJ, Williamson W, Telles F, Burchert H, Bertagnolli M, Herdman C, Arnold L, Smillie R, Mohamed A, Boardman H, McCormick K, Neubauer S, Leeson P, Lewandowski AJ. Physiological stress elicits impaired left ventricular function in preterm-born adults. *J Am Coll Cardiol*. 2018;71:1347-1356.
247. Carr H, Chattingius S, Granath F, Ludvigsson JF, Edstedt Bonamy AK. Preterm birth and risk of heart failure up to early adulthood. *J Am Coll Cardiol*. 2017;69:2634-2642.
248. McCarthy R, Martin-Fairey C, Sojka DK, Herzog ED, Jungheim ES, Stout MJ, Fay JC, Mahendroo M, Reese J, Herington JL, Plosa EJ, Shelton EL, England SK. Mouse models of preterm birth: suggested assessment and reporting guidelines. *Biol Reprod*. 2018;99:922-937.
249. Ratajczak CK, Fay JC, Muglia LJ. Preventing preterm birth: the past limitations and new potential of animal models. *Dis Model Mech*. 2010;3:407-414.
250. Bensley JG, Stacy VK, De Matteo R, Harding R, Black MJ. Cardiac remodelling as a result of pre-term birth: implications for future cardiovascular disease. *Eur Heart J*. 2010;31:2058-2066.
251. Mrocki MM, Nguyen VB, Lombardo P, Sutherland MR, Bensley JG, Nitsos I, Allison BJ, Harding R, De Matteo R, Schneider M, Polglase GR, Black MJ. Moderate preterm birth affects right ventricular structure and function and pulmonary artery blood flow in adult sheep. *J Physiol*. 2018;596:5965-5975.
252. Levkau B, Schäfers M, Wohlschlaeger J, von Wnuck Lipinski K, Keul P, Hermann S, Kawaguchi N, Kirchhof P, Fabritz L, Stypmann J, Stegger L, Flögel U, Schrader J, Fischer JW, Hsieh P, Ou YL, Mehrhof F, Tiemann K, Ghanem A, Matus M, Neumann J, Heusch G, Schmid KW, Conway EM, Baba HA. Survivin determines cardiac function by controlling total cardiomyocyte number. *Circulation*. 2008;117:1583-1593.

253. Bisping E, Ikeda S, Kong SW, Tarnavski O, Bodyak N, McMullen JR, Rajagopal S, Son JK, Ma Q, Springer Z, Kang PM, Izumo S, Pu WT. Gata4 is required for maintenance of postnatal cardiac function and protection from pressure overload-induced heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103:14471-14476.
254. Li J, Gao E, Vite A, Yi R, Gomez L, Goossens S, van Roy F, Radice GL. Alpha-catenins control cardiomyocyte proliferation by regulating Yap activity. *Circ Res*. 2015;116:70-79.
255. Mahmoud AI, Kocabas F, Muralidhar SA, Kimura W, Koura AS, Thet S, Porrello ER, Sadek HA. Meis1 regulates postnatal cardiomyocyte cell cycle arrest. *Nature*. 2013;497:249-253.
256. Bersell K, Arab S, Haring B, Kühn B. Neuregulin1/ErbB4 signaling induces cardiomyocyte proliferation and repair of heart injury. *Cell*. 2009;138:257-270.
257. Botting KJ, Wang KC, Padhee M, McMillen IC, Summers-Pearce B, Rattanatrav L, Cutri N, Posterino GS, Brooks DA, Morrison JL. Early origins of heart disease: low birth weight and determinants of cardiomyocyte endowment. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2012;39:814-823.
258. Stacy V, De Matteo R, Brew N, Sozo F, Probyn ME, Harding R, Black MJ. The influence of naturally occurring differences in birthweight on ventricular cardiomyocyte number in sheep. *Anat Rec (Hoboken)*. 2009;292:29-37.
259. Whitcomb J, Gharibeh L, Nemer M. From embryogenesis to adulthood: critical role for GATA factors in heart development and function. *IUBMB Life*. 2020;72:53-67.
260. Wei X, Wu B, Zhao J, Zeng Z, Xuan W, Cao S, Huang X, Asakura M, Xu D, Bin J, Kitakaze M, Liao Y. Myocardial hypertrophic preconditioning attenuates cardiomyocyte hypertrophy and slows progression to heart failure through upregulation of S100A8/A9. *Circulation*. 2015;131:1506-1517.
261. Gokhale RH, Shingleton AW. Size control: the developmental physiology of body and organ size regulation. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*. 2015;4:335-356.
262. Dibble CC, Manning BD. Signal integration by mTORC1 coordinates nutrient input with biosynthetic output. *Nat Cell Biol*. 2013;15:555-564.
263. Alejandro EU, Gregg B, Wallen T, Kumusoglu D, Meister D, Chen A, Merrins MJ, Satin LS, Liu M, Arvan P, Bernal-Mizrachi E. Maternal diet-induced microRNAs and mTOR underlie  $\beta$  cell dysfunction in offspring. *J Clin Invest*. 2014;124:4395-4410.
264. Abu Shehab M, Damerill I, Shen T, Rosario FJ, Nijland M, Nathanielsz PW, Kamat A, Jansson T, Gupta MB. Liver mTOR controls IGF-I bioavailability by regulation of protein kinase CK2 and IGFBP-1 phosphorylation in fetal growth restriction. *Endocrinology*. 2014;155:1327-1339.
265. Zhu MJ, Ford SP, Nathanielsz PW, Du M. Effect of maternal nutrient restriction in sheep on the development of fetal skeletal muscle. *Biol Reprod*. 2004;71:1968-1973.
266. Tumaneng K, Russell RC, Guan KL. Organ size control by Hippo and TOR pathways. *Curr Biol*. 2012;22:R368-379.
267. Klammt J, Pfäffle R, Werner H, Kiess W. IGF signaling defects as causes of growth failure and IUGR. *Trends Endocrinol Metab*. 2008;19:197-205.
268. Woods KA, Camacho-Hübner C, Savage MO, Clark AJ. Intrauterine growth retardation and postnatal growth failure associated with deletion of the insulin-like growth factor I gene. *N Engl J Med*. 1996;335:1363-1367.
269. Abuzzahab MJ, Schneider A, Goddard A, Grigorescu F, Lautier C, Keller E, Kiess W, Klammt J, Kratzsch J, Osgood D, Pfäffle R, Raile K, Seidel B, Smith RJ, Chernausk SD; Intrauterine Growth Retardation (IUGR) Study Group. IGF-I receptor mutations

- resulting in intrauterine and postnatal growth retardation. *N Engl J Med.* 2003;349:2211-2222.
270. Araki E, Lipes MA, Patti ME, Brüning JC, Haag B 3rd, Johnson RS, Kahn CR. Alternative pathway of insulin signalling in mice with targeted disruption of the IRS-1 gene. *Nature.* 1994;372:186-190.
  271. Tamemoto H, Kadowaki T, Tobe K, Yagi T, Sakura H, Hayakawa T, Terauchi Y, Ueki K, Kaburagi Y, Satoh S, et al. Insulin resistance and growth retardation in mice lacking insulin receptor substrate-1. *Nature.* 1994;372:182-186.
  272. Lawlor MA, Mora A, Ashby PR, Williams MR, Murray-Tait V, Malone L, Prescott AR, Lucocq JM, Alessi DR. Essential role of PDK1 in regulating cell size and development in mice. *EMBO J.* 2002;21:3728-3738.
  273. Cho H, Thorvaldsen JL, Chu Q, Feng F, Birnbaum MJ. Akt1/PKBalpha is required for normal growth but dispensable for maintenance of glucose homeostasis in mice. *J Biol Chem.* 2001;276:38349-38352.
  274. Shima H, Pende M, Chen Y, Fumagalli S, Thomas G, Kozma SC. Disruption of the p70(s6k)/p85(s6k) gene reveals a small mouse phenotype and a new functional S6 kinase. *EMBO J.* 1998;17:6649-6659.
  275. Chen Y, McCauley SR, Johnson SE, Rhoads RP, El-Kadi SW. Downregulated translation initiation signaling predisposes low-birth-weight neonatal pigs to slower rates of muscle protein synthesis. *Front Physiol.* 2017;8:482.
  276. Klinger S, Turgeon B, Lévesque K, Wood GA, Aagaard-Tillery KM, Meloche S. Loss of Erk3 function in mice leads to intrauterine growth restriction, pulmonary immaturity, and neonatal lethality. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106:16710-16715.
  277. Soulez M, Saba-El-Leil MK, Turgeon B, Mathien S, Coulombe P, Klinger S, Rousseau J, Lévesque K, Meloche S. Reevaluation of the role of extracellular signal-regulated kinase 3 in perinatal survival and postnatal growth using new genetically engineered mouse models. *Mol Cell Biol.* 2019;39:e00527-18.
  278. Um SH, Sticker-Jantscheff M, Chau GC, Vintersten K, Mueller M, Gangloff YG, Adams RH, Spetz JF, Elghazi L, Pfluger PT, Pende M, Bernal-Mizrachi E, Tauler A, Tschöp MH, Thomas G, Kozma SC. S6K1 controls pancreatic  $\beta$  cell size independently of intrauterine growth restriction. *J Clin Invest.* 2015;125:2736-2747.
  279. Rosario FJ, Jansson N, Kanai Y, Prasad PD, Powell TL, Jansson T. Maternal protein restriction in the rat inhibits placental insulin, mTOR, and STAT3 signaling and down-regulates placental amino acid transporters. *Endocrinology.* 2011;152:1119-1129.
  280. Kavitha JV, Rosario FJ, Nijland MJ, McDonald TJ, Wu G, Kanai Y, Powell TL, Nathanielsz PW, Jansson T. Down-regulation of placental mTOR, insulin/IGF-I signaling, and nutrient transporters in response to maternal nutrient restriction in the baboon. *FASEB J.* 2014;28:1294-1305.
  281. Jansson T, Aye IL, Goberdhan DC. The emerging role of mTORC1 signaling in placental nutrient-sensing. *Placenta.* 2012;33 Suppl 2:e23-29.
  282. Roos S, Jansson N, Palmberg I, Säljö K, Powell TL, Jansson T. Mammalian target of rapamycin in the human placenta regulates leucine transport and is down-regulated in restricted fetal growth. *J Physiol.* 2007;582:449-459.
  283. Yung HW, Calabrese S, Hynx D, Hemmings BA, Cetin I, Charnock-Jones DS, Burton GJ. Evidence of placental translation inhibition and endoplasmic reticulum stress in the etiology of human intrauterine growth restriction. *Am J Pathol.* 2008;173:451-462.
  284. Sciarretta S, Volpe M, Sadoshima J. Mammalian target of rapamycin signaling in cardiac physiology and disease. *Circ Res.* 2014;114:549-564.

285. Zhang D, Contu R, Latronico MV, Zhang J, Rizzi R, Catalucci D, Miyamoto S, Huang K, Ceci M, Gu Y, Dalton ND, Peterson KL, Guan KL, Brown JH, Chen J, Sonenberg N, Condorelli G. mTORC1 regulates cardiac function and myocyte survival through 4E-BP1 inhibition in mice. *J Clin Invest*. 2010;120:2805-2816.
286. Shende P, Plaisance I, Morandi C, Pellieux C, Berthonneche C, Zorzato F, Krishnan J, Lerch R, Hall MN, Rüegg MA, Pedrazzini T, Brink M. Cardiac raptor ablation impairs adaptive hypertrophy, alters metabolic gene expression, and causes heart failure in mice. *Circulation*. 2011;123:1073-1082.
287. Kemi OJ, Ceci M, Wisloff U, Grimaldi S, Gallo P, Smith GL, Condorelli G, Ellingsen O. Activation or inactivation of cardiac Akt/mTOR signaling diverges physiological from pathological hypertrophy. *J Cell Physiol*. 2008;214:316-321.
288. Völkers M, Toko H, Doroudgar S, Din S, Quijada P, Joyo AY, Ornelas L, Joyo E, Thuermer DJ, Konstantin MH, Gude N, Glembotski CC, Sussman MA. Pathological hypertrophy amelioration by PRAS40-mediated inhibition of mTORC1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110:12661-12666.
289. Gao XM, Wong G, Wang B, Kiriazis H, Moore XL, Su YD, Dart A, Du XJ. Inhibition of mTOR reduces chronic pressure-overload cardiac hypertrophy and fibrosis. *J Hypertens*. 2006;24:1663-1670.
290. Shioi T, McMullen JR, Tarnavski O, Converso K, Sherwood MC, Manning WJ, Izumo S. Rapamycin attenuates load-induced cardiac hypertrophy in mice. *Circulation*. 2003;107:1664-1670.
291. McMullen JR, Sherwood MC, Tarnavski O, Zhang L, Dorfman AL, Shioi T, Izumo S. Inhibition of mTOR signaling with rapamycin regresses established cardiac hypertrophy induced by pressure overload. *Circulation*. 2004;109:3050-3055.
292. Cargnello M, Tcherkezian J, Roux PP. The expanding role of mTOR in cancer cell growth and proliferation. *Mutagenesis*. 2015;30:169-176.
293. Mazelin L, Panthou B, Nicot AS, Belotti E, Tintignac L, Teixeira G, Zhang Q, Risson V, Baas D, Delaune E, Derumeaux G, Taillandier D, Ohlmann T, Ovize M, Gangloff YG, Schaeffer L. mTOR inactivation in myocardium from infant mice rapidly leads to dilated cardiomyopathy due to translation defects and p53/JNK-mediated apoptosis. *J Mol Cell Cardiol*. 2016;97:213-225.
294. Zhu Y, Pires KM, Whitehead KJ, Olsen CD, Wayment B, Zhang YC, Bugger H, Ilkun O, Litwin SE, Thomas G, Kozma SC, Abel ED. Mechanistic target of rapamycin (Mtor) is essential for murine embryonic heart development and growth. *PLoS One*. 2013;8:e54221.
295. Zhang P, Shan T, Liang X, Deng C, Kuang S. Mammalian target of rapamycin is essential for cardiomyocyte survival and heart development in mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014;452:53-59.
296. Tamai T, Yamaguchi O, Hikoso S, Takeda T, Taneike M, Oka T, Oyabu J, Murakawa T, Nakayama H, Uno Y, Horie K, Nishida K, Sonenberg N, Shah AM, Takeda J, Komuro I, Otsu K. Rheb (Ras homologue enriched in brain)-dependent mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) activation becomes indispensable for cardiac hypertrophic growth after early postnatal period. *J Biol Chem*. 2013;288:10176-10187.
297. Ortega FB, Lavie CJ, Blair SN. Obesity and cardiovascular disease. *Circ Res*. 2016;118:1752-1770.
298. Buettner R, Schölmerich J, Bollheimer LC. High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. *Obesity (Silver Spring)*. 2007;15:798-808.



299. Melo BF, Sacramento JF, Ribeiro MJ, Prego CS, Correia MC, Coelho JC, Cunha-Guimaraes JP, Rodrigues T, Martins IB, Guarino MP, Seica RM, Matafome P, Conde SV. Evaluating the impact of different hypercaloric diets on weight gain, insulin resistance, glucose intolerance, and its comorbidities in rats. *Nutrients*. 2019;11:E1197.
300. Fang CX, Dong F, Thomas DP, Ma H, He L, Ren J. Hypertrophic cardiomyopathy in high-fat diet-induced obesity: role of suppression of forkhead transcription factor and atrophy gene transcription. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2008;295:H1206-H1215.
301. Calligaris SD, Lecanda M, Solis F, Ezquer M, Gutiérrez J, Brandan E, Leiva A, Sobrevia L, Conget P. Mice long-term high-fat diet feeding recapitulates human cardiovascular alterations: an animal model to study the early phases of diabetic cardiomyopathy. *PLoS One*. 2013;8:e60931.
302. Thakker GD, Frangogiannis NG, Zymek PT, Sharma S, Raya JL, Barger PM, Taegtmeier H, Entman ML, Ballantyne CM. Increased myocardial susceptibility to repetitive ischemia with high-fat diet-induced obesity. *Obesity (Silver Spring)*. 2008;16:2593-2600.
303. Liu J, Wang P, Zou L, Qu J, Litovsky S, Umeda P, Zhou L, Chatham J, Marsh SA, Dell'Italia LJ, Lloyd SG. High-fat, low-carbohydrate diet promotes arrhythmic death and increases myocardial ischemia-reperfusion injury in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2014;307:H598-608.
304. Mirzaei H, Di Biase S, Longo VD. Dietary interventions, cardiovascular aging, and disease: animal models and human studies. *Circ Res*. 2016;118:1612-1625.
305. Most J, Tosti V, Redman LM, Fontana L. Calorie restriction in humans: An update. *Ageing Res Rev*. 2017;39:36-45.
306. Fontana L, Meyer TE, Klein S, Holloszy JO. Long-term calorie restriction is highly effective in reducing the risk for atherosclerosis in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101:6659-6663.
307. Fontana L, Partridge L. Promoting health and longevity through diet: from model organisms to humans. *Cell*. 2015;161:106-118.
308. Dolinsky VW, Morton JS, Oka T, Robillard-Frayne I, Bagdan M, Lopaschuk GD, Des Rosiers C, Walsh K, Davidge ST, Dyck JR. Calorie restriction prevents hypertension and cardiac hypertrophy in the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension*. 2010;56:412-421.
309. Melo DS, Costa-Pereira LV, Santos CS, Mendes BF, Costa KB, Santos CF, Rocha-Vieira E, Magalhães FC, Esteves EA, Ferreira AJ, Guatimosim S, Dias-Peixoto MF. Severe calorie restriction reduces cardiometabolic risk factors and protects rat hearts from ischemia/reperfusion injury. *Front Physiol*. 2016;7:106.
310. de Lucia C, Gambino G, Petraglia L, Elia A, Komici K, Femminella GD, D'Amico ML, Formisano R, Borghetti G, Liccardo D, Nolano M, Houser SR, Leosco D, Ferrara N, Koch WJ, Rengo G. Long-term caloric restriction improves cardiac function, remodeling, adrenergic responsiveness, and sympathetic innervation in a model of postischemic heart failure. *Circ Heart Fail*. 2018;11:e004153.
311. Shinmura K, Tamaki K, Sano M, Murata M, Yamakawa H, Ishida H, Fukuda K. Impact of long-term caloric restriction on cardiac senescence: caloric restriction ameliorates cardiac diastolic dysfunction associated with aging. *J Mol Cell Cardiol*. 2011;50:117-127.
312. Ahmet I, Tae HJ, de Cabo R, Lakatta EG, Talan MI. Effects of calorie restriction on cardioprotection and cardiovascular health. *J Mol Cell Cardiol*. 2011;51:263-271.
313. Ahmet I, Wan R, Mattson MP, Lakatta EG, Talan M. Cardioprotection by intermittent fasting in rats. *Circulation*. 2005;112:3115-3121.

314. Katare RG, Kakinuma Y, Arikawa M, Yamasaki F, Sato T. Chronic intermittent fasting improves the survival following large myocardial ischemia by activation of BDNF/VEGF/PI3K signaling pathway. *J Mol Cell Cardiol.* 2009;46:405-412.
315. Solon-Biet SM, McMahon AC, Ballard JW, Ruohonen K, Wu LE, Cogger VC, Warren A, Huang X, Pichaud N, Melvin RG, Gokarn R, Khalil M, Turner N, Cooney GJ, Sinclair DA, Raubenheimer D, Le Couteur DG, Simpson SJ. The ratio of macronutrients, not caloric intake, dictates cardiometabolic health, aging, and longevity in ad libitum-fed mice. *Cell Metab.* 2014;19:418-430.
316. Shen J, Wilmot KA, Ghasemzadeh N, Molloy DL, Burkman G, Mekonnen G, Gongora MC, Quyyumi AA, Sperling LS. Mediterranean dietary patterns and cardiovascular health. *Annu Rev Nutr.* 2015;35:425-449.
317. Halbesma N, Bakker SJ, Jansen DF, Stolk RP, De Zeeuw D, De Jong PE, Gansevoort RT; PREVEND Study Group. High protein intake associates with cardiovascular events but not with loss of renal function. *J Am Soc Nephrol.* 2009;20:1797-1804.
318. Lagiou P, Sandin S, Lof M, Trichopoulos D, Adami HO, Weiderpass E. Low carbohydrate-high protein diet and incidence of cardiovascular diseases in Swedish women: prospective cohort study. *BMJ.* 2012;344:e4026.
319. Kitada M, Ogura Y, Monno I, Koya D. The impact of dietary protein intake on longevity and metabolic health. *EBioMedicine.* 2019;43:632-640.
320. Mirzaei H, Raynes R, Longo VD. The conserved role of protein restriction in aging and disease. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2016;19:74-79.
321. Levine ME, Suarez JA, Brandhorst S, Balasubramanian P, Cheng CW, Madia F, Fontana L, Mirisola MG, Guevara-Aguirre J, Wan J, Passarino G, Kennedy BK, Wei M, Cohen P, Crimmins EM, Longo VD. Low protein intake is associated with a major reduction in IGF-1, cancer, and overall mortality in the 65 and younger but not older population. *Cell Metab.* 2014;19:407-417.
322. Pladys P, Sennlaub F, Brault S, Checchin D, Lahaie I, Lê NL, Bibeau K, Cambonie G, Abran D, Brochu M, Thibault G, Hardy P, Chemtob S, Nuyt AM. Microvascular rarefaction and decreased angiogenesis in rats with fetal programming of hypertension associated with exposure to a low-protein diet in utero. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2005;289:R1580-1588.
323. Longchamp A, Mirabella T, Arduini A, MacArthur MR, Das A, Treviño-Villarreal JH, Hine C, Ben-Sahra I, Knudsen NH, Brace LE, Reynolds J, Mejia P, Tao M, Sharma G, Wang R, Corpataux JM, Haefliger JA, Ahn KH, Lee CH, Manning BD, Sinclair DA, Chen CS, Ozaki CK, Mitchell JR. Amino acid restriction triggers angiogenesis via GCN2/ATF4 regulation of VEGF and H<sub>2</sub>S production. *Cell.* 2018;173:117-129.e14.
324. Hine C, Harputlugil E, Zhang Y, Ruckenstein C, Lee BC, Brace L, Longchamp A, Treviño-Villarreal JH, Mejia P, Ozaki CK, Wang R, Gladyshev VN, Madeo F, Mair WB, Mitchell JR. Endogenous hydrogen sulfide production is essential for dietary restriction benefits. *Cell.* 2015;160:132-144.
325. Kondo M, Shibata R, Miura R, Shimano M, Kondo K, Li P, Ohashi T, Kihara S, Maeda N, Walsh K, Ouchi N, Murohara T. Caloric restriction stimulates revascularization in response to ischemia via adiponectin-mediated activation of endothelial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem.* 2009;284:1718-1724.
326. Csiszar A, Gautam T, Sosnowska D, Tarantini S, Banki E, Tucsek Z, Toth P, Losonczy G, Koller A, Reglodi D, Giles CB, Wren JD, Sonntag WE, Ungvari Z. Caloric restriction confers persistent anti-oxidative, pro-angiogenic, and anti-inflammatory effects and promotes anti-aging miRNA expression profile in cerebrovascular endothelial cells of aged rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2014;307:H292-306.

327. Nascimento AR, Machado M, de Jesus N, Gomes F, Lessa MA, Bonomo IT, Tibiriçá E. Structural and functional microvascular alterations in a rat model of metabolic syndrome induced by a high-fat diet. *Obesity (Silver Spring)*. 2013;21:2046-2054.
328. Machado MV, Vieira AB, da Conceição FG, Nascimento AR, da Nóbrega ACL, Tibirica E. Exercise training dose differentially alters muscle and heart capillary density and metabolic functions in an obese rat with metabolic syndrome. *Exp Physiol*. 2017;102:1716-1728.
329. Pellizzon MA, Ricci MR. The common use of improper control diets in diet-induced metabolic disease research confounds data interpretation: the fiber factor. *Nutr Metab (Lond)*. 2018;15:23.
330. Chalvon-Demersay T, Blachier F, Tomé D, Blais A. Animal models for the study of the relationships between diet and obesity: a focus on dietary protein and estrogen deficiency. *Front Nutr*. 2017;4:5.
331. Gallo LA, Tran M, Moritz KM, Wlodek ME. Developmental programming: variations in early growth and adult disease. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2013;40:795-802.
332. Neitzke U, Harder T, Schellong K, Melchior K, Ziska T, Rodekamp E, Dudenhausen JW, Plagemann A. Intrauterine growth restriction in a rodent model and developmental programming of the metabolic syndrome: a critical appraisal of the experimental evidence. *Placenta*. 2008;29:246-254.
333. Cleal JK, Poore KR, Boullin JP, Khan O, Chau R, Hambidge O, Torrens C, Newman JP, Poston L, Noakes DE, Hanson MA, Green LR. Mismatched pre- and postnatal nutrition leads to cardiovascular dysfunction and altered renal function in adulthood. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104:9529-9533.
334. Zohdi V, Pearson JT, Kett MM, Lombardo P, Schneider M, Black MJ. When early life growth restriction in rats is followed by attenuated postnatal growth: effects on cardiac function in adulthood. *Eur J Nutr*. 2015;54:743-750.
335. Ferguson DP, Monroe TO, Heredia CP, Fleischmann R, Rodney GG, Taffet GE, Fiorotto ML. Postnatal undernutrition alters adult female mouse cardiac structure and function leading to limited exercise capacity. *J Physiol*. 2019;597:1855-1872.
336. Penitente AR, Novaes RD, Chianca DA Jr, da Silva MF, Silva ME, Souza AM, Guatimosim S, Almeida PW, Alves MN, Felix LB, Neves CA, Natali AJ. Protein restriction after weaning modifies the calcium kinetics and induces cardiomyocyte contractile dysfunction in rats. *Cells Tissues Organs*. 2013;198:311-317.
337. Intapad S, Ojeda NB, Dasinger JH, Alexander BT. Sex differences in the developmental origins of cardiovascular disease. *Physiology (Bethesda)*. 2014;29:122-132.
338. Alexander BT. Placental insufficiency leads to development of hypertension in growth-restricted offspring. *Hypertension*. 2003;41:457-462.
339. Woods LL, Ingelfinger JR, Nyengaard JR, Rasch R. Maternal protein restriction suppresses the newborn renin-angiotensin system and programs adult hypertension in rats. *Pediatr Res*. 2001;49:460-467.
340. Woods LL, Ingelfinger JR, Rasch R. Modest maternal protein restriction fails to program adult hypertension in female rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2005;289:R1131-1136.
341. Babbitt SE, San Francisco B, Mendez DL, Lukat-Rodgers GS, Rodgers KR, Bretsnyder EC, Kranz RG. Mechanisms of mitochondrial holocytochrome c synthase and the key roles played by cysteines and histidine of the heme attachment site, Cys-XX-Cys-His. *J Biol Chem*. 2014;289:28795-28807.

342. Pellegrino MW, Nargund AM, Haynes CM. Signaling the mitochondrial unfolded protein response. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1833:410-416.
343. Harding HP, Zhang Y, Zeng H, Novoa I, Lu PD, Calton M, Sadri N, Yun C, Popko B, Paules R, Stojdl DF, Bell JC, Hettmann T, Leiden JM, Ron D. An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. *Mol Cell*. 2003;11:619-633.

## **6. Abbildungsverzeichnis**

**Abbildung 1: Die pränatale Entwicklung des Herzens in der Maus. Seite 3**  
entnommen aus: Epstein JA, Aghajanian H, Singh MK. Semaphorin signaling in cardiovascular development. Cell Metab. 2015;21:163-173.  
mit Genehmigung des Rechteinhabers: Elsevier  
Lizenz-Nr.: 4812951156379

**Abbildung 2: Wachstum des prä- im Vergleich zum postnatalen Herzen. Seite 6**  
entnommen aus: Karra R, Poss KD. Redirecting cardiac growth mechanisms for therapeutic regeneration. J Clin Invest. 2017;127:427-436.  
mit Genehmigung des Rechteinhabers: American Society for Clinical Investigation  
Lizenz-Nr.: 1029596-1

**Abbildung 3: Developmental Programming. Seite 9**  
entnommen aus: Symonds ME, Sebert SP, Hyatt MA, Budge H. Nutritional programming of the metabolic syndrome. Nat Rev Endocrinol. 2009;5:604-610.  
mit Genehmigung des Rechteinhabers: Springer Nature  
Lizenz-Nr.: 4830240532986

**Abbildung 4: Schematische Darstellung der embryonalen Herzregeneration im Hccs-KO-Mausmodell. Seite 17**  
eigenhändig erstellt; entnommen aus: Magarin M, Schulz H, Thierfelder L, Drenckhahn JD. Transcriptional profiling of regenerating embryonic mouse hearts. Genom Data. 2016;9:145-147.

**Abbildung 5: Regenerationsfähigkeit des Herzens in der Maus. Seite 19**  
entnommen aus: Uygur A, Lee RT. Mechanisms of cardiac regeneration. Dev Cell. 2016;36:362-374.  
mit Genehmigung des Rechteinhabers: Elsevier  
Lizenz-Nr.: 4812980035824

**Abbildung 6: Zellzyklus-Aktivität im postnatalen Herzen. Seite 21**  
entnommen aus: Karra R, Poss KD. Redirecting cardiac growth mechanisms for therapeutic regeneration. J Clin Invest. 2017;127:427-436.  
mit Genehmigung des Rechteinhabers: American Society for Clinical Investigation  
Lizenz-Nr.: 1029596-1



## **7. Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit bzw. die mir zuzuordnenden Teile im Rahmen einer kumulativen Habilitationsschrift, selbstständig und ohne zulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Ich versichere, dass ich für die nach §2 (3) der Habilitationsordnung angeführten bereits veröffentlichten Originalarbeiten als Erst- oder Seniorautor fungiere, da ich den größten Teil der Daten selbst erhoben habe, für das Design der Arbeiten verantwortlich bin und die Manuskripte maßgeblich gestaltet habe. Für alle von mir erwähnten Untersuchungen habe ich die in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegten Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass alle an der Finanzierung der Arbeiten beteiligten Geldgeber in den jeweiligen Publikationen genannt worden sind. Ich versichere außerdem, dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Weise einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt wurde oder Gegenstand eines anderen Prüfungsverfahrens war. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.

---

Ort, Datum, Unterschrift