

Wnt signaling and cardiac hypertrophy

Citation for published version (APA):

van de Schans, V. A. M. (2009). *Wnt signaling and cardiac hypertrophy*. Maastricht University.

Document status and date:

Published: 01/01/2009

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Samenvatting en conclusies

Samenvatting en Conclusies

Wnt signalering en cardiale hypertrofie

Cardiale hypertrofie (vergroting van de hartspiercellen) is het resultaat van de activiteit van pro- en anti-hypertrofe signalen. De bestaande farmacotherapeutische behandelingen van hoge bloeddruk richt zich primair op de pro-hypertrofe signalen maar het is ook raadzaam om te kijken naar de anti-hypertrofe mechanismen als nieuwe therapeutische targets in de behandeling van cardiale hypertrofie. In deze dissertatie is de rol van de Wnt signaalcascade onderzocht tijdens de ontwikkeling van cardiale hypertrofie. Verder hebben we ook het niveau van het secundaire boodschapper molecule β -catenine, een pro-hypertrofe proteïne, en de activiteit van het kinase GSK-3 β , een anti-hypertrofe proteïne, in de ontwikkeling van cardiale hypertrofie bestudeerd.

Tijdens de hypertrofe reactie is er een re-expressie van het foetale genexpressie patroon in de cardiomyocyten. Een voorbeeld van zo'n signaalcascade, betrokken bij de foetale ontwikkeling, is de Wnt signaalcascade. Tot nu toe waren er enkel suggestieve data beschreven voor de re-expressie van de canonical Wnt signaalcascade in cardiale remodelering tijdens hoge bloeddruk. In **hoofdstuk 2** wordt de expressie van de componenten van de Wnt signaalcascade beschreven in de tijd gedurende de hypertrofe respons geïnduceerd door “aortic banding” (druk-overbelasting) in Wistar ratten. Wnt-3a, een component van de canonical Wnt signaalcascade, zorgt voor een efficiënte stabilisatie van het β -catenine proteïne, wat niet werd aangetoond voor Wnt-5a. Dit β -catenine is het secundaire boodschapper molecule van deze signaalcascade. Van de meeste Fz receptoren is beschreven dat zij hun signaal kunnen doorgeven in de canonical Wnt cascade, maar sommige Fz receptoren geven hun signaal door onafhankelijk van de canonical Wnt cascade. Van alle wegen wordt gedacht dat zij Dvl gebruiken als doorsein proteïne. Een re-expressie van de componenten van de canonical Wnt cascade was vastgesteld met een graduele stijging in mRNA

hoeveelheden van Fz-2 en Dvl-1 op dag 10 na druk-overbelasting. In tegenstelling, Wnt-5a expressie was opmerkelijk en persistent gedaald op alle tijdstippen die getest zijn na druk-overbelasting. De relatieve hoeveelheid van de actieve vorm van GSK-3 β was geleidelijk gedaald in tijd, maar de inactieve vorm toont een minder consistent patroon. De hoeveelheid β -catenine eiwit was opgereguleerd vanaf dag 1 na druk-overbelasting. Deze gegevens zijn indicatief voor een geactiveerde canonical, β -catenine gemedieerde Wnt signalering gedurende de cardiale hypertrofie-ontwikkeling, geïnduceerd door druk-overbelasting in de rat.

Omdat er nog geen farmacologische tools aanwezig zijn die specifiek Wnt signalering blokkeren op het niveau van de Wnt/Fz interactie, hebben wij gebruik gemaakt van een genetisch gemodificeerde muis, nl. een conventionele knock-out muis. Deze muis bezit een germline verlies van het Dishevelled-1 gen. Daardoor hebben wij de functionele rol van de Wnt signalering tijdens de hypertrofe reactie kunnen onderzoeken (**hoofdstuk 3**). De Dvl-1 knock-out (*Dvl-1^{-/-}*) muizen zijn onderworpen aan druk-overbelasting en de ontwikkeling van hypertrofie werd vergeleken met de wildtype littermates. Het niet aanwezig zijn van het Dvl-1 gen resulteert in een verminderde hypertrofe reactie, tot zelfs 14 dagen na druk-overbelasting, zoals vastgesteld door parameters zoals hartgewicht en de expressie van ANF en BNP. Verrassend was de gestegen activiteit van GSK-3 β in de hypertrofe *Dvl-1^{-/-}* muizen in vergelijking met de sham muizen. De wildtype muizen daarentegen vertoonden een trend tot een verlaagde activiteit van GSK-3 β . Het verschil in GSK-3 β activiteit wordt gereflecteerd in de aangetoonde lagere hoeveelheid van het β -catenine proteïne in de *Dvl-1^{-/-}* muizen. Deze studie heeft aangetoond dat het onderbreken van de Wnt signalering resulteert in een verminderde hypertrofe reactie op druk overbelasting. De verminderde hypertrofe reactie kan verklaard worden door de gestegen activiteit van het anti-hypertrofe kinase GSK-3 β en/of door de reductie in hoeveelheid van het β -catenine proteïne. Dus stabilisatie van het β -catenine proteïne gebeurt niet enkel via Wnt-onafhankelijke mechanismen maar ook de canonical Wnt signalering is hiervoor verantwoordelijk. In zowel **hoofdstuk 2**

als in **hoofdstuk 3** hebben we de hoeveelheid van het mRNA bepaald als de hoeveelheid eiwit van β -catenine. Er werd geen correlatie gevonden tussen de resultaten van mRNA en eiwit. Dit kan verklaard worden door het feit dat de cellen de hoeveelheid β -catenine reguleren via degradatie eerder dan via productie. De hoeveelheid β -catenine eiwit bepalen, is de methode om de rol van β -catenine te onderzoeken in de hypertrofe reactie.

Het inhiberen van GSK-3 β activiteit tijdens de ontwikkeling van cardiale hypertrofie, geïnduceerd door druk-overbelasting, was het onderwerp van de studie beschreven in **hoofdstuk 4**. In deze studie hebben we LiCl, een gekende GSK-3 β inhibitor, in twee verschillende dosissen toegediend. Vier weken voor de cardiale hypertrofie werd geïnduceerd door druk-overbelasting, werden de dieren voorbehandeld en dit zonder enig zichtbaar effect. De behandeling met een lage dosis LiCl (600 mg/l) verhoogt de ANF hoeveelheid vergeleken met de niet behandelde groep, maar er was geen significant verschil in hartgewicht of in hartspiercelgrootte. Dit suggereert dat de hypertrofie reactie door druk-overbelasting zijn maximaal effect heeft bereikt en niet verslechtert door LiCl behandeling. Maar toediening van LiCl in hoge dosis (800 mg/l in het drinkwater) in combinatie van druk-overbelasting bleek dodelijk te zijn in de behandelde dieren. De meeste dieren stierven binnen de 12 uur na druk-overbelasting en vertoonden longoedeem, een teken van acuut hartfalen. Het mechanisme van deze observatie dient nog verder uitgezocht te worden.

De doelstelling van de studie beschreven in **hoofdstuk 5** was om het effect te onderzoeken van behandeling van cardiale hypertrofie door Angiotensine Receptor Type I (AT1R) blokkers op de expressie van Wnt signaalcascade componenten. Toediening van losartan en olmesartan in equipotente dosissen resulteren in een verschillende graad van regressie van cardiale hypertrofie in spontane hypertensieve hart-falende gevoelige (SHHF) ratten. Maar ondanks dit verschillend effect is de re-expressie van de Wnt signaalcascade componenten hetzelfde voor de twee AT1R

blokkers. Dit suggereert dat de AT1R blokkers de expressie van de Wnt componenten niet direct beïnvloed via vermindering van cardiale hypertrofie, maar dat er eerder een directe link is tussen de AT1R blokker en de expressie van Wnt componenten. Het mechanisme hierachter dient nog verder uitgezocht te worden.

In **hoofdstuk 6** van deze dissertatie bestudeerden we het effect van inductie en regressie van cardiale hypertrofie in TGR(*cyp11a1-mRen2*) ratten. In deze ratten wordt ernstige hoge bloeddruk geïnduceerd door toediening van indole-3-carbinole in het voedsel. Het verwijderen van deze component resulteert in een normalisatie van de bloeddruk. Tijdens deze hoge bloeddruk ontstaat concentrische hypertrofie zonder fibrose en 5 weken na stopzetting van de behandeling zijn de gemeten waarden vergelijkbaar met de niet-behandelde dieren. De GSK-3 β activiteit daalt en de β -catenine hoeveelheid stijgt tijdens de hypertrofie reactie, maar na stopzetting van de indole-3-carbinole behandeling normaliseren de waarden tot controle waarden. Deze data tonen dat regressie van cardiale hypertrofie de activiteit van de Wnt signalering naar baseline waarden herstelt.

Concluderend is de Wnt signalering geactiveerd gedurende de ontwikkeling van cardiale hypertrofie in onze studies. Dit was vastgesteld door een verhoogde expressie van Fz-2 en Dvl-1, een verlaging van het actieve (P-Tyr²¹⁶) vorm en een verhoogde hoeveelheid inactieve (P-Ser⁹) vorm van GSK-3 β en een verhoogde hoeveelheid van het β -catenine proteïne. Onderbreking van de Wnt signalering verlaagt de hypertrofie reactie gedurende druk-overbelasting, dit geeft een functionele rol aan voor de Wnt signaleringscascade in cardiale remodelering. Daartegenover staat dat een verhoogde inhibitie van GSK-3 β de hypertrofie reactie niet verergert maar dat het wel dodelijk hartfalen induceert.

De resultaten van al deze experimenten geven een centrale regulerende rol voor GSK-3 β in de hypertrofie reactie. Vanuit therapeutische oogpunt zou men de GSK-3 β activiteit verhogen in het hypertrofe hart zodat de anti-hypertrofie cascade wordt geactiveerd. Maar recente data geven aan dat een continue activiteit van GSK-3 β leidt tot hartfalen. Vanuit dit perspectief zou de beste manier van interfereren in de Wnt signalering zijn op het niveau hoger dan GSK-3 β vb. door het toepassen van antagonisten die de binding van Wnt aan Frizzled receptoren beletten. Dit zou een nieuwe therapeutische behandeling van cardiale hypertrofie kunnen zijn. Ook de inhibitie van de interactie tussen Dvl en Frizzled receptor kan als een veelbelovende toepassing gezien worden in de behandeling van cardiale hypertrofie. De volgende uitdaging in dit veld is het ontwikkelen van specifieke Wnt antagonisten en hun effect te testen op cardiale remodelering.

REFERENCES

1. McMullen JR, Jennings GL. Differences between pathological and physiological cardiac hypertrophy: novel therapeutic strategies to treat heart failure. *Clin Exp Pharmacol Physiol.*2007;34(4):255-262.
2. Eisenberg LM, Eisenberg CA. Wnt signal transduction and the formation of the myocardium. *Dev Biol.*2006;293(2):305-315.
3. Brade T, Manner J, Kuhl M. The role of Wnt signalling in cardiac development and tissue remodelling in the mature heart. *Cardiovasc Res.*2006;72(2):198-209.
4. Blankesteijn WM, Essers-Janssen YP, Ulrich MM, et al. Increased expression of a homologue of drosophila tissue polarity gene "frizzled" in left ventricular hypertrophy in the rat, as identified by subtractive hybridization. *J Mol Cell Cardiol.*1996;28(5):1187-1191.
5. Cerutti C, Kurdi M, Bricca G, et al. Transcriptional alterations in the left ventricle of three hypertensive rat models. *Physiol Genomics.*2006;27(3):295-308.
6. Takada R, Hijikata H, Kondoh H, et al. Analysis of combinatorial effects of Wnts and Frizzleds on beta-catenin/armadillo stabilization and Dishevelled phosphorylation. *Genes Cells.*2005;10(9):919-928.
7. Topol L, Jiang X, Choi H, et al. Wnt-5a inhibits the canonical Wnt pathway by promoting GSK-3-independent beta-catenin degradation. *J Cell Biol.*2003;162(5):899-908.
8. Boutros M, Mihaly J, Bouwmeester T, et al. Signaling specificity by Frizzled receptors in Drosophila. *Science.*2000;288(5472):1825-1828.
9. Wharton KA, Jr. Runnin' with the Dvl: proteins that associate with Dsh/Dvl and their significance to Wnt signal transduction. *Dev Biol.*2003;253(1):1-17.
10. Haq S, Michael A, Andreucci M, et al. Stabilization of beta-catenin by a Wnt-independent mechanism regulates cardiomyocyte growth. *Proc Natl Acad Sci U S A.*2003;100(8):4610-4615.
11. Kimelman D, Xu W. beta-catenin destruction complex: insights and questions from a structural perspective. *Oncogene.*2006;25(57):7482-7491.
12. Hardt SE, Sadoshima J. Negative regulators of cardiac hypertrophy. *Cardiovasc Res.*2004;63(3):500-509.
13. Kerkela R, Woulfe K, Force T. Glycogen synthase kinase-3beta-actively inhibiting hypertrophy. *Trends Cardiovasc Med.*2007;17(3):91-96.
14. Michael A, Haq S, Chen X, et al. Glycogen synthase kinase-3beta regulates growth, calcium homeostasis, and diastolic function in the heart. *J Biol Chem.*2004;279(20):21383-21393.
15. Hirotsani S, Zhai P, Tomita H, et al. Inhibition of glycogen synthase kinase 3beta during heart failure is protective. *Circ Res.*2007;101(11):1164-1174.
16. Badorff C, Ruetten H, Mueller S, et al. Fas receptor signaling inhibits glycogen synthase kinase 3 beta and induces cardiac hypertrophy following pressure overload. *J Clin Invest.*2002;109(3):373-381.

Chapter 7

Summary and Conclusions:

Wnt signaling and cardiac hypertrophy

Cardiac hypertrophy has recently been recognized as the net result of the activity of pro- and anti-hypertrophic signaling. Because current pharmacotherapy of hypertrophy primarily focuses on the pro-hypertrophic signaling, it is worthwhile to explore anti-hypertrophic mechanisms for novel therapeutic targets of cardiac hypertrophy. The aim of the studies described in this thesis was to explore the role of the Wnt signaling pathway in the development of cardiac hypertrophy. To this end, we focused on the levels of the second messenger β -catenin, a pro-hypertrophic protein, and the activity of the kinase GSK-3 β , an anti-hypertrophic protein, in the development of cardiac hypertrophy.

During the hypertrophic response, there is a re-expression of a fetal gene expression pattern in the cardiomyocytes¹. An example of such pathway involved in fetal development is the Wnt signaling pathway^{2, 3}. Until now, suggestive data for a re-expression of the canonical Wnt signaling in cardiac hypertrophic remodeling was described^{4, 5}. In **Chapter 2** of this thesis, the time course of the expression of components of the Wnt pathway in Wistar rats subjected to aortic banding is described. In the canonical Wnt pathway, only Wnt-3a, but not Wnt-5a, has been shown to be capable of an efficient stabilization of β -catenin protein level^{6, 7}, which acts as a signal transduction molecule in this pathway. Most Fz receptors have been reported to signal through the canonical Wnt pathway, whereas some Fz receptors signal independent of the canonical Wnt pathway however, all pathways are thought to use Dvl as a transduction component^{8, 9}. A re-expression of components of the canonical Wnt pathway was observed, with a gradual increase in mRNA levels of Fz-2 and Dvl-1 at 10 days after aortic banding. On the other hand, the expression of Wnt-5a was markedly and persistently downregulated at all time points tested. The relative amount of the active form of GSK-3 β gradually decreased over time, whereas the amount of the inactive form showed a less consistent pattern. Protein levels of β -catenin were up-regulated as early as 1 day after aortic banding. These findings are indicative for an upregulation of the

canonical, β -catenin-mediated Wnt signaling during the development of pressure overload-induced cardiac hypertrophy in the rat.

Because no pharmacological tools are available to specifically inhibit Wnt signaling at the level of the Wnt/frizzled interaction, we used a genetically modified mouse, a ‘conventional knockout mouse’, with germline loss of the Dishevelled-1 gene to explore the functional role of Wnt signaling in the hypertrophic response (**Chapter 3**). To this end, mice lacking the Dishevelled-1 gene were subjected to aortic banding, and the development of cardiac hypertrophy was compared to wildtype littermates. The lack of the Dishevelled-1 gene attenuated the hypertrophic response up to 14 days after aortic banding, as determined by increases in heart weight and expression of ANF and BNP. Interestingly, the activity of GSK-3 β was found to be elevated in the hypertrophic *Dvl-1*^{-/-} mice compared to sham, whereas in wildtypes GSK-3 β showed a tendency towards a decrease. This difference in GSK-3 β activity was also reflected in considerably lower β -catenin levels in the *Dvl-1*^{-/-} mice. This study showed that interruption of Wnt signaling leads to an attenuated hypertrophic response upon pressure overload. This attenuated hypertrophic response may be explained by an elevated activity of the anti-hypertrophic kinase GSK-3 β and/or a reduction in the pro-hypertrophic protein β -catenin. This indicates that the stabilization of β -catenin occurs not only by a Wnt-independent mechanism¹⁰ but also by canonical Wnt signaling. In both **chapters (2 and 3)**, we also determined the mRNA levels of β -catenin together with the protein levels of β -catenin. The results, however, did not show any correlation between mRNA levels and protein content of β -catenin, which can be explained by the fact that the cell controls its β -catenin content by regulating its degradation rather than its production¹¹. So, determination of the β -catenin protein content is the method to examine the role of β -catenin in the hypertrophic response.

The effect of inactivation of GSK-3 β on the development of cardiac hypertrophy, induced by pressure overload, was the subject of the study described in **Chapter 4**. In this study, we used LiCl, a well-known GSK-3 β inhibitor, at two different doses.

Animals were pre-treated for 4 weeks which did not induce any noticeable effects; then cardiac hypertrophy was induced by aortic banding. The low LiCl dose (600 mg/l) induced elevated ANF levels compared to the untreated group, but no significant difference in heart weight or cardiomyocyte cross sectional area were observed. This suggests that the hypertrophic response upon aortic banding is already maximal and can not further be aggravated by LiCl treatment. But aortic banding turned out to be fatal in animals that received the high LiCl dose (800 mg/l in drinking water). Death occurred within 12 hours after aortic banding in most animals and these animals showed pulmonary edema, a sign of acute heart failure. The mechanism behind this observation requires further investigation.

The aim of the study described in **Chapter 5** was to investigate the effect of treatment of cardiac hypertrophy with Angiotensin receptor type I blockers on the expression of components of the Wnt signaling pathway. Losartan and olmesartan, although administered in equipotent doses, induced different degrees of regression of cardiac hypertrophy regression in spontaneously hypertensive heart failure-prone (SHHF) rats. However, the effect on the re-expression of the components of the Wnt pathway was similar for the two AT1 receptor blockers. This suggests that AT1 receptor blockers do not affect the expression of Wnt components indirectly by reducing cardiac hypertrophy, but that there is a more direct link between AT1 receptor blockers and Wnt component expression. The mechanism behind this direct modulation remains to be elucidated.

In **Chapter 6** of this thesis we studied the effect of induction and regression of cardiac hypertrophy in TGR(*cyp11a1-mRen2*) rats. In these rats, severe hypertension can be induced by adding indole-3-carbinole to the food, whereas blood pressure normalizes upon withdrawal of this compound. This hypertension caused concentric cardiac hypertrophy without fibrosis, which returned to values observed in non-treated animals at 5 weeks after discontinuation of the treatment. GSK-3 β activity was lower and β -catenin levels were elevated in the hypertrophic phase, but were normalized after

withdrawal of indole-3-carbinole. The data show that regression of cardiac hypertrophy is accompanied by a return of the activated Wnt signaling towards baseline values.

In conclusion, Wnt signaling is consistently activated during the development of cardiac hypertrophy in our studies. This was characterized by an increase in the expression of Fz-2 and Dvl-1, a decrease in active (P-Tyr²¹⁶) and an increase in the inactive (P-Ser⁹) form of GSK-3 β and increased levels of β -catenin protein. Interruption of Wnt signaling attenuates the hypertrophic response upon pressure overload, indicating a functional role for this pathway in cardiac remodeling. On the other hand, additional inhibition of GSK-3 β did not further aggravate the hypertrophic response but could induce lethal heart failure.

All these experimental results point to GSK-3 β as a central regulator of the hypertrophic response. From a therapeutic point of view it seems beneficial to increase the GSK-3 β activity^{12, 13} in the hypertrophic heart, thereby activating an anti-hypertrophic pathway, but recent data indicate that systemic activation of GSK-3 β leads to heart failure¹⁴⁻¹⁶. From this perspective, the best way to intervene in Wnt signaling is at the level upstream of GSK-3 β , e.g. by applying antagonists for the binding of Wnt to Frizzled receptors, which therefore could serve as a novel therapeutic approach for cardiac hypertrophy. Also inhibiting the interaction of Dvl with Fz receptors could be a promising intervention to treat cardiac hypertrophy. The next challenge in this field will be to develop these specific Wnt antagonists and test their effect on cardiac remodeling.

REFERENCES

1. McMullen JR, Jennings GL. Differences between pathological and physiological cardiac hypertrophy: novel therapeutic strategies to treat heart failure. *Clin Exp Pharmacol Physiol.*2007;34(4):255-262.
2. Eisenberg LM, Eisenberg CA. Wnt signal transduction and the formation of the myocardium. *Dev Biol.*2006;293(2):305-315.
3. Brade T, Manner J, Kuhl M. The role of Wnt signalling in cardiac development and tissue remodelling in the mature heart. *Cardiovasc Res.*2006;72(2):198-209.
4. Blankesteijn WM, Essers-Janssen YP, Ulrich MM, et al. Increased expression of a homologue of drosophila tissue polarity gene "frizzled" in left ventricular hypertrophy in the rat, as identified by subtractive hybridization. *J Mol Cell Cardiol.*1996;28(5):1187-1191.
5. Cerutti C, Kurdi M, Bricca G, et al. Transcriptional alterations in the left ventricle of three hypertensive rat models. *Physiol Genomics.*2006;27(3):295-308.
6. Takada R, Hijikata H, Kondoh H, et al. Analysis of combinatorial effects of Wnts and Frizzleds on beta-catenin/armadillo stabilization and Dishevelled phosphorylation. *Genes Cells.*2005;10(9):919-928.
7. Topol L, Jiang X, Choi H, et al. Wnt-5a inhibits the canonical Wnt pathway by promoting GSK-3-independent beta-catenin degradation. *J Cell Biol.*2003;162(5):899-908.
8. Boutros M, Mihaly J, Bouwmeester T, et al. Signaling specificity by Frizzled receptors in Drosophila. *Science.*2000;288(5472):1825-1828.
9. Wharton KA, Jr. Runnin' with the Dvl: proteins that associate with Dsh/Dvl and their significance to Wnt signal transduction. *Dev Biol.*2003;253(1):1-17.
10. Haq S, Michael A, Andreucci M, et al. Stabilization of beta-catenin by a Wnt-independent mechanism regulates cardiomyocyte growth. *Proc Natl Acad Sci U S A.*2003;100(8):4610-4615.
11. Kimelman D, Xu W. beta-catenin destruction complex: insights and questions from a structural perspective. *Oncogene.*2006;25(57):7482-7491.
12. Hardt SE, Sadoshima J. Negative regulators of cardiac hypertrophy. *Cardiovasc Res.*2004;63(3):500-509.
13. Kerkela R, Woulfe K, Force T. Glycogen synthase kinase-3beta-actively inhibiting hypertrophy. *Trends Cardiovasc Med.*2007;17(3):91-96.
14. Michael A, Haq S, Chen X, et al. Glycogen synthase kinase-3beta regulates growth, calcium homeostasis, and diastolic function in the heart. *J Biol Chem.*2004;279(20):21383-21393.
15. Hirotsani S, Zhai P, Tomita H, et al. Inhibition of glycogen synthase kinase 3beta during heart failure is protective. *Circ Res.*2007;101(11):1164-1174.
16. Badorff C, Ruetten H, Mueller S, et al. Fas receptor signaling inhibits glycogen synthase kinase 3 beta and induces cardiac hypertrophy following pressure overload. *J Clin Invest.*2002;109(3):373-381.