

# **UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF**

Zentrum für Experimentelle Medizin

aus dem Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie-II:

Institut für Molekulare Zellbiologie

Direktorin: Prof. Dr. rer. Physiol. Dr. h.c. Ulrike Beisiegel

## **GENEXPRESSION VON MATRIX METALLOPROTEINASEN IM ATROPHIERENDEN UND HYPERTROPHIERENDEN SKELETTMUSKEL**

### **Dissertation**

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von:

Jasmin Wöhler, geb. Alizadeh – Naderi

aus Bad Neuenahr

Hamburg, 2010

**Angenommen von der Medizinischen Fakultät am: 04.08.2010**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der medizinischen Fakultät der Universität Hamburg**

**Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende:** Prof. Dr. Dr. U. Beisiegel

**Prüfungsausschuss, 2. Gutachter/in:** PD Dr. K. Sultan

**Prüfungsausschuss, 3. Gutachter/in:** Prof. Dr. M. Davidoff

***Meinen Eltern und Geschwistern in Liebe und Dankbarkeit  
gewidmet.***

# Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	5
1.1	Das adaptive Potential des adulten Skelettmuskels	5
1.1.1	Funktion und Aufbau der Skelettmuskulatur	5
1.1.2	Aktivitätsabhängige Adaptation der Skelettmuskulatur	7
1.1.3	Muskelverletzungen und Regeneration der Skelettmuskulatur	8
1.1.4	Muskelatrophie	10
1.1.4.1	Glukokortikoid-induzierte Skelettmuskelatrophie	11
1.1.4.2	Inaktivitätsbedingte Skelettmuskelatrophie	12
1.1.5	Muskelhypertrophie	12
1.2	Die Rolle des Ubiquitin-Proteasom-Systems in der Skelettmuskulatur	14
1.3	Matrix Metalloproteinasen	15
1.3.1	Das MMP-EZM-System in der Skelettmuskulatur	15
1.3.2	Regulation der Aktivität von MMP	21
1.4.	Ziel der Dissertationsarbeit	24
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden</b>	26
2.1	L6 Myotuben Zellkultur	26
2.2	Schwerelosigkeitinduzierte Muskelatrophie	27
2.3	Muskelbiopsien von Patienten	28
2.4	RNA-Extraktion und Quantifizierung	28
2.5	RNA Umschreibung in cDNA	29
2.6	Primer design	30
2.7	Real-time QRT-PCR	32
2.7.1	Schmelzkurve	34
2.8	Housekeeping-Gen	34
2.9	Auswertung der Light Cyclers-Daten	35
2.9.1	PCR – Effizienz	36
2.10	Gelelektrophorese	37
2.10.1	Gel-Bild	38
2.11	Lösungen, Chemikalien und Geräteliste	39
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	43
3.1	Genexpression des MMP-TIMP-Systems in verschiedenen Muskelgeweben	43



3.2	Atrophie und Hypertrophie im L6-Myotuben-Modell	45
3.3	Veränderung der MMP-EZM Genexpression von L6-Myotuben durch die Glukokortikoid-induzierte Muskelatrophie	48
3.4	Veränderung der MMP-EZM Genexpression von L6-Myotuben durch IGF-1 induzierter Muskelhypertrophie	52
3.5	Einfluss des Schilddrüsenhormons T3 auf die MMP-EZM Genexpression in L6-Myotuben	55
3.6	Veränderung der MMP-EZM Genexpression des M. gastrocnemius durch Schwereelosigkeit-induzierte Atrophie	57
3.7	PAI-1 in atrophischem Skelettmuskel von Patienten	65
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>67</b>
4.1	MMP-TIMP-Expressionsmuster im Muskel	67
4.2	Die Wirkung der Glukokortikoide auf die EZM-Homöostase	69
4.3	Die Wirkung des IGF-1 auf die EZM-Homöostase	72
4.4	Die Wirkung des Schilddrüsenhormons T3 auf die EZM-Homöostase	73
4.5	Schwereelosigkeit induzierte Skelettmuskel-Atrophie	74
4.6	Neurogene Muskelatrophie im Menschen	76
4.7	Systemische Auswirkungen von PAI-1	77
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>79</b>
<b>6.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>81</b>
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>83</b>
<b>8.</b>	<b>Danksagung</b>	<b>90</b>
<b>9.</b>	<b>Eidesstattliche Versicherung</b>	<b>91</b>

# 1. Einleitung

## 1.1 Das adaptive Potential des adulten Skelettmuskels

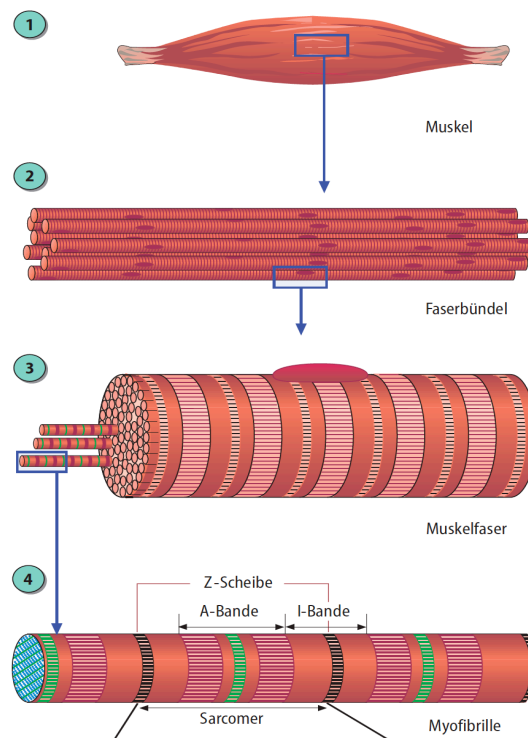
Die SKM verfügt über ein hohes adaptives Potential und besitzt die Fähigkeit, ihren Phänotyp durch qualitative und quantitative Änderungen der Genexpression anzupassen, um längerfristig den Erfordernissen zu entsprechen. Gute divergente Beispiele hierfür sind hohe Trainingsanforderungen oder körperliche Inaktivität. Je nach funktioneller Anforderung werden verschiedene MHC-Isoformen (MHC= *Myosin heavy chain*) ein- oder abgebaut, bis letztendlich eine Veränderung des Fasertyps nachweisbar ist.

### 1.1.1 Funktion und Aufbau der Skelettmuskulatur

Die Skelettmuskulatur macht etwa 40-50% des Körpergewichts aus und besitzt mit ca. 3 Litern das grösste Wasserreservoir des Körpers. Neben der Stütz- und Haltefunktion dient sie zusammen mit Sehnen, Knochen und Gelenken vor allem der Bewegung. Die Skelettmuskulatur setzt sich aus mehreren Faserbündeln zusammen, welche eine Einheit von mehreren anatomisch-histologischen Muskelfasern darstellen. Die einzelnen Muskelfasern entsprechen den Muskelzellen, welche bis zu 15 cm lang sein können und aus Tausenden von fadenförmigen Strukturen, den so genannten Myofibrillen (Muskelfasern), bestehen. Diese durchziehen nebeneinander der Länge nach und sind aus den kleineren Einheiten, den Myofilamenten, aufgebaut. Die grundlegende Baueinheit einer Myofibrille ist das Sarkomer, welches die funktionelle Einheit darstellt (siehe Abb.1).

Den Strukturrahmen der dünnen Filamente bilden Aktin, Troponin und Tropomyosin. Die Myosine befinden sich in den dicken Filamenten der Sarkomere und bilden die

molekularen Motoreinheiten. Es gibt verschiedene Isoformen der Myosin-Schwerketten, welche die kontraktile Eigenschaften einer Faser bestimmen und den Muskel charakterisieren (siehe Tab.1). Man nimmt an, dass körperliche Aktivität die aerobe Kapazität und die Größe der Muskelfasern erhöht und umgekehrt eine Inaktivität zu einer Verminderung führt (Saltin and Helge, 2000). Einer der wichtigsten Mechanismen für die muskuläre Anpassung ist die Transformation der MHC.



**Abbildung 1:** Feinstruktur der Skelettmuskulatur.

Aufbau eines Skelettmuskels (1), bestehend aus Faserbündeln (2), diese wiederum aus Muskelfasern (3) welche aus der kleinsten kontraktile Einheit, der Myofibrille (4) aufgebaut ist.

(Löffler/Petrides: Biochemie und Pathobiochemie 8. Auflage 2008, Kap. 30.1, Springer, Seite 1003).

<b>Fasertyp</b>	<b>I</b>	<b>IIA</b>	<b>IID</b>
Vorherrschende MHC-Isoform	I	Ila	Ild
Kontraktionstyp	langsam	schnell	schnell
Ermüdbarkeit	niedrig	mittel	hoch
Blutfluss	hoch	hoch	niedrig
<b>Stoffwechsel</b>			
ATPase Aktivität	niedrig	mittel	hoch
Spiegel energiereicher Phosphate	niedrig	mittel	hoch
Glykolytische Kapazität	niedrig	mittel	hoch
Oxidative Kapazität	hoch	hoch	mittel
Fettstoffwechsel	hoch	mittel	niedrig

**Tabelle 1:** Übersicht der Fasertypen des menschlichen Skelettmuskels und ihre wichtigen Eigenschaften nach Steinacker et al.

### 1.1.2 Aktivitätsabhängige Adaptation der Skelettmuskulatur

Jeder einzelne Muskel setzt sich aus verschiedenen Anteilen des schnellen und langsamen Fasertyps zusammen. Es gibt Muskeln, die vorwiegend eine Haltefunktion ausüben (z.B. Rückenmuskulatur) und überwiegend den langsam kontrahierenden Fasertyp I besitzen. Daneben existieren Muskeln, welche zügige und kräftige Bewegungen ausführen (z.B. Extremitätenmuskulatur), diese verfügen über die schnell kontrahierenden Fasertypen II A und II D (siehe Tab.1).

Bekannt ist, dass eine erhöhte neuromuskuläre Aktivität die Umwandlung von schnellen in langsame Fasertypen auslöst, während verminderte neuromuskuläre

Aktivität die Umwandlung von langsamen in schnelle Fasertypen induziert. (Pette and Vrbova, 1992). Tierexperimentelle Modelle veranschaulichen die Bedeutung neuronaler Impulsmuster für die Ausprägung verschiedener Muskelfasertypen und demonstrieren das adaptive Potential der SKM. Durch chronisch niederfrequente Stimulation (CNS) der Muskulatur kleiner Säugetiere wird eine Transformation von schnell ermüdbaren (Typ II) in ermüdungsresistente Muskelfasern (Typ I) ausgelöst. Diese Transformation beinhaltet auch eine Änderung des Stoffwechsels. Muskelfasern mit einem anaerob-glykolytischen Stoffwechsel (Typ II D) wandeln sich bei gesteigerter Aktivität in mitochondrienreiche Fasern mit einem vorwiegend aerob-oxidativen Stoffwechsel (Typ II A und Typ I) (Pette and Vrbova, 1992), (Steinacker J.M., 2002).

Krafttraining ist eine Trainingsform, welche auch zu einer schnell-zu-langsam Transformation führt. Diese Veränderungen führen ebenfalls zu einer Verschiebung der MHC IId zu MHC IIa sowie zu einer Hypertrophie des Muskelfasertyps IIA und einer Abnahme des Fasertyps IID (Pette and Vrbova, 1992), (Steinacker J.M., 2002).

### **1.1.3 Muskelverletzungen und Regeneration der Skelettmuskulatur**

Muskelgewebe unterliegt sehr häufig Verletzungen. Zur Bestimmung des Ausmaßes wird im klinischen Alltag häufig die Kreatinin-Kinase im Serum bestimmt. Aufgrund des hohen Verletzungsrisikos sind die Regenerationsmechanismen der Skelettmuskulatur von erheblicher medizinischer Bedeutung. Die Skelettmuskulatur besitzt die besondere Eigenschaft, sich anhand guter Regenerationsmechanismen schnell wiederherzustellen. Für die Neubildung von Muskelfasern sind Satellitenzellen (adulte Stammzellen des Skelettmuskels) sowie spezifische

myogene Differenzierungsfaktoren erforderlich. Satellitenzellen sind einkernige Zellen, welche unter der Basalmembran der Skelettmuskelfasern vorkommen. Sie spielen eine wichtige Rolle in der Wiederherstellung von verletzten und entzündeten Muskelfasern. Neben der posttraumatischen Neubildung von Muskelzellen sind sie auch an der Fusion von Muskelfasern beteiligt (Steinacker J.M., 2002). Man geht davon aus, dass diese ruhenden Zellen auf Zytokine reagieren, welche von inflammatorischen Zellen ausgeschüttet werden und im Bereich des verletzten Muskels in der extrazellulären Matrix (EZM) akkumulieren (Droguett et al., 2006).

Das Myogenesepotential der Satellitenzellen hat man sich zunutze gemacht und in vitro zwei weit verbreitete myogene Zellkultur-Linien (L6 der Ratte und C2C12 der Maus) entwickelt (Yaffe, 1968), (Richler and Yaffe, 1970). Diese Zellkulturen finden breite Verwendung in der biologischen und medizinischen Forschung und sind etablierte Modelle zur Untersuchung spezifischer Parameter der SKM. In der vorliegenden Studie wurden die in vitro Experimente anhand der L6-Zelllinie der Ratte durchgeführt.

Die myogenen Zellen der L6-Linie wurden 1968 aus der Oberschenkelmuskulatur neonataler Ratten isoliert. Als immortalisierte Zelllinie bietet sie gegenüber der Primärkultur entscheidende Vorteile, u. a. eine unbegrenzte Zahl an Zellmaterial für Experimente sowie die Unabhängigkeit von Organentnahmen. Für die Fusion der Myoblasten zu multinukleären Myotuben in vitro sind spezielle Kulturbedingungen (Konfluenz, Zugabe von Pferdeserum) zu beachten.

#### 1.1.4 Muskelatrophie

Die Skelettmuskelatrophie kann unter verschiedenen Bedingungen zustande kommen, wie z.B. bei Immobilisation, Hungerzustand, Alterungsprozess, Denervation, oder neurogener Muskelatrophie (z.B. Polyneuropathie). Ein abwehrgeschwächter Zustand des Organismus, wie sie im Rahmen von Malignome, Sepsis, AIDS-Stadium etc. bekannt ist, kann ebenfalls zu einer Abnahme der Muskelmasse führen. Aus endokrinologischer Sicht stehen zwei Hormonsysteme im Vordergrund, die Glukokortikoide und die Schilddrüsenhormone. Hyperthyreoidismus führt zu einer gesteigerten Proteolyse, was mit einem Gewichtsverlust einhergeht (Angeras and Hasselgren, 1987), (Morrison et al., 1988). Die Glukokortikoid-induzierte Muskelatrophie zählt zu den bekanntesten Ursachen und ist die zurzeit bestuntersuchte Form der Muskelatrophie (siehe 1.1.4.1.).

Ähnlich wie im Rahmen einer Immobilisation verhält sich die SKM in der Schwerelosigkeit. Die im Weltall hervorgerufene Abnahme der Muskelmasse ist eine bekannte Problematik, mit der Astronauten zu kämpfen haben. Um dem Muskelschwund entgegen zu wirken, müssen sie täglich trainieren. Der Körper reagiert mit einer Abnahme der Muskelmasse, weil er für die Fortbewegung weniger Kraft benötigt als auf der Erde unter normaler Schwerkraft. Diese Tatsache konnte an Ratten reproduziert werden, welche der Schwerelosigkeit ausgesetzt waren (Riley et al., 1996).

Es existieren drei bekannte molekulare Mechanismen, welche mit einer Muskelatrophie einhergehen. Dazu zählen die gesteigerte Proteolyse im Ubiquitin-Proteasom-System (siehe 1.2.) sowie eine reduzierte Proteinbiosynthese. Des Weiteren ist die Rolle des Myostatins in der Regulation der Muskelfasergröße nachgewiesen worden (Williams, 2004). Myostatin ist als Wachstums-/

Differenzierungsfaktor-8 bekannt und gehört zur Familie der TGF- $\beta$  (*Transforming Growth Factor- $\beta$* ). Myostatin spielt eine wichtige Rolle in der Entwicklung und Regulation des Muskelwachstums in der adulten SKM (Guttridge, 2004). Man vermutet, dass es in der Muskelentwicklung einen inhibitorischen Effekt auf proliferierende und differenzierende Myoblasten hat. Im adulten SKM führt eine gesteigerte Myostatinexpression zur Hemmung der Proteinbiosynthese und kann somit zu einer Skelettmuskelatrophie führen (Jackman and Kandarian, 2004). Diese Zusammenhänge konnten in der altersbedingten Atrophie (Zachwieja et al., 1999), in der steroidinduzierten Atrophie (Ma et al., 2003) sowie im Krankheitsstadium AIDS (Gonzalez-Cadavid et al., 1998) nachgewiesen werden. Eine reduzierte Myostatinexpression konnte dagegen in der Muskelfaserhyperplasie und Muskelfaserhypertrophie beobachtet werden (Kambadur et al., 1997), (Lee and McPherron, 1999), (Nishi et al., 2002).

#### **1.1.4.1 Glukokortikoid-induzierte Skelettmuskelatrophie**

Die Muskelatrophie als Nebenwirkung von Glukokortikoiden (GC) ist ein weit verbreitetes Problem im klinischen Alltag. Steroide werden häufig zur Behandlung von verschiedenen Erkrankungen eingesetzt und sind bekannt dafür, dass sie ab einer gewissen Einnahmedauer und Dosierung, zu einer Abnahme der Muskelmasse führen können. Der katabole Einfluss der GC kann neben einer Muskelatrophie auch zu Myopathien oder Wachstumsstörungen führen. Neben der therapeutischen Gabe von GC wurde auch der endogene GC-Gehalt genauer untersucht. Man nimmt an, dass der Nichtgebrauch der Muskulatur z.B. im Rahmen der Immobilisation (Jaspers and Tischler, 1986) oder einer Kachexie (Lecker et al., 1999) mit einer Erhöhung des Glukokortikoidgehalts assoziiert ist. Zusätzlich wird eine erhöhte Bindungskapazität der Kortikosteroide während der Immobilisation beschrieben. Diese Beobachtungen



könnten den nicht aufhaltsamen Prozess der Muskelatrophie erklären (Jackman and Kandarian, 2004).

#### **1.1.4.2 Inaktivitätsbedingte Skelettmuskelatrophie**

Die Folgen einer Immobilisation sind in den Kliniken gefürchtete Komplikationen. Bei den betroffenen Patienten, die aufgrund verschiedener Krankheitsbilder oder Ursachen (postoperativ, Frakturen etc.) bettlägerig sind, kommt es durch die fehlende physikalische Aktivität zu einem fortschreitenden Muskelschwund. Die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen sind noch weitestgehend unbekannt. Desweiteren können chirurgischen Eingriffen, die mit einer Ischämie der Muskulatur einhergehen, über die Entstehung des oxidativen Stresses auch zu einem verstärkten Muskelabbau führen (Appell, 1997). In der Arbeit von Appell et al. wird auch postuliert, dass trainierte Personen sich in der postoperativen Rehabilitation schneller erholen können und weniger dem Atrophieprozess unterliegen.

#### **1.1.5. Muskelhypertrophie**

Im Gegensatz zur Muskelentwicklung sind ausdifferenzierte Skelettmuskelfasern nicht mehr teilungsfähig. Insofern reagieren sie auf veränderte Signalwege nicht mit einer Proliferation sondern mit einer Größenveränderung, wie z.B. der Hypertrophie. Dieser Prozess findet statt, wenn die Muskulatur über ihr normales Leistungsniveau hinaus beansprucht wird. Dieses Phänomen ist durch den Einsatz von Anabolika bekannt. Zu den bekanntesten Vertretern zählen die Steroide (z.B. Testosteron), die ihre Wirkung über eine gesteigerte Proteinbiosynthese hervorrufen.

Im Gegensatz dazu wird der Calcium-abhängigen Proteinphosphatase Calcineurin eine spezifische hypertrophe Rolle zugeschrieben, da sie zu einer Expression von Hypertrophie-relevanten Genen führen soll (Musaro et al., 1999).

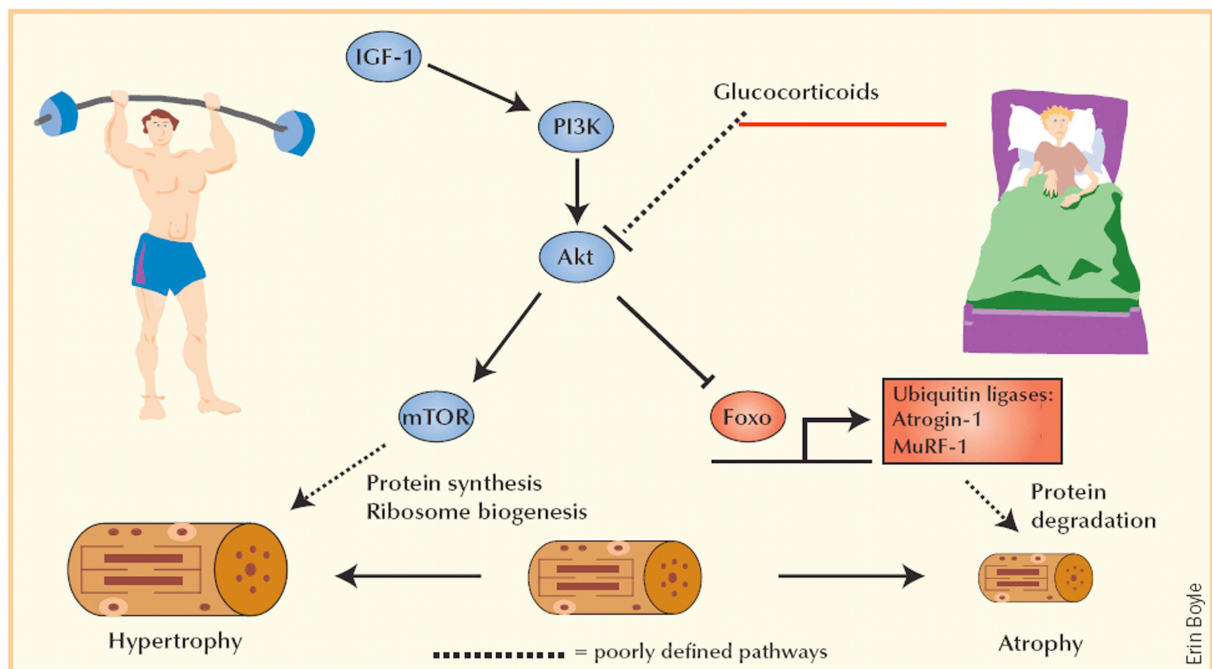
Daneben werden in der Medizin auch häufig Wachstumsfaktoren im Rahmen einer Muskelatrophie eingesetzt um eine schnellere Rehabilitation zu ermöglichen. Der stärkste anabole Wachstumsfaktor ist das IGF-1 (Insuline like Growth Factor-1). Über Effekte von IGF-1 auf die Muskulatur wurde in zahlreichen Studien berichtet. Diese postulieren, dass IGF-1 einen stimulierenden Effekt auf die Proteinbiosynthese hat und gleichzeitig der Proteinabbau reduziert wird. Darüber hinaus wird das regenerative Potential der SKM stimuliert (Fukushima et al., 2001), (kSato et al., 2003). In diesem Zusammenhang konnte auch gezeigt werden, dass IGF-1 als Zytokin die im Skelettmuskel befindlichen Stammzellen aktiviert und die Proliferation und Differenzierung von Myoblasten stimuliert. In einem transgenen Mausmodell kann die IGF-1 Überexpression die altersbedingte Atrophie der Muskulatur verhindern. Damit behält die Muskulatur die Fähigkeit einer proliferativen Antwort auf Muskelschädigung, wie man sie bei junger Muskulatur kennt.

Das MGF (*Mechano Growth Factor*) ist ein weiterer aber Skelettmuskel-spezifischer Wachstumsfaktor welcher auch zu der Familie der IGF gehört. MGF wird vom Muskel in physiologischer Weise freigesetzt, wenn der Muskel Dehnungsreizen und Belastung ausgesetzt wird (Goldspink et al., 1991). MGF wirkt autokrin auf die Muskelfaser und soll so zu einem verstärkten Muskelwachstum führen (Goldspink et al., 2008)

## **1.2 Die Rolle des Ubiquitin-Proteasom-Systems in der Skelettmuskulatur**

Das Proteasom stellt in der Zelle den wichtigsten Ort des Proteinabbaus dar. Proteine, die abgebaut werden sollen, werden in einem mehrstufigen enzymatischen Prozess mit einer Polyubiquitin-Kette markiert. Atrogin-1, auch MAFbx genannt, ist eine solche E3-Ubiquitin-Ligase, welche die Muskelproteine mit einer Kette von Ubiquitinproteinen kovalent verknüpft, welche anschliessend vom Ubiquitin Proteasom System (UPS) abgebaut werden. Daneben wird dem Atrogin-1 eine zentrale Rolle in der Muskelatrophie und Hypertrophie zugeschrieben (Hoffman and Nader, 2004). Das UPS zeigt eine Korrelation mit dem Beginn einer Muskelatrophie und Veränderungen der Atrogin-1 Genexpression reflektieren den Aktivierungsgrad des UPS (Lecker et al., 2004), (Sultan et al., 2006). Im Rahmen einer Hypertrophie wird weniger Atrogin-1 exprimiert (Guttridge, 2004). Demnach kann die E3-Ubiquitin-Ligase als ein Marker der Muskelatrophie eingesetzt werden.

Der Aktivierungsweg der Glukokortikoid-induzierten Muskelatrophie wird in der Studie von Hoffman et al. über die Akt-Foxo-Kaskade beschrieben. Die hemmende Wirkung von Glukokortikoiden auf Akt wurde an der Maus Zelllinie C2C12 dargestellt. Dies führt zu einer Dephosphorylierung und somit auch Aktivierung des Transkriptionsfaktors FOXO, welches an das Atrogin-1 bindet und zu einer Zunahme der Atrogin-1 Genexpression führt, was letztendlich zu einer gesteigerten Proteindegradation führt (siehe Abb.2).



**Abbildung 2:** Darstellung der zentralen Stellung des Akt in der Aktivierungskaskade der Glukokortikoid-bedingten Muskelatrophie und IGF-1 induzierten Muskelhypertrophie. (Modifiziert nach (Hoffman and Nader, 2004).

## 1.3 Matrix Metalloproteinasen

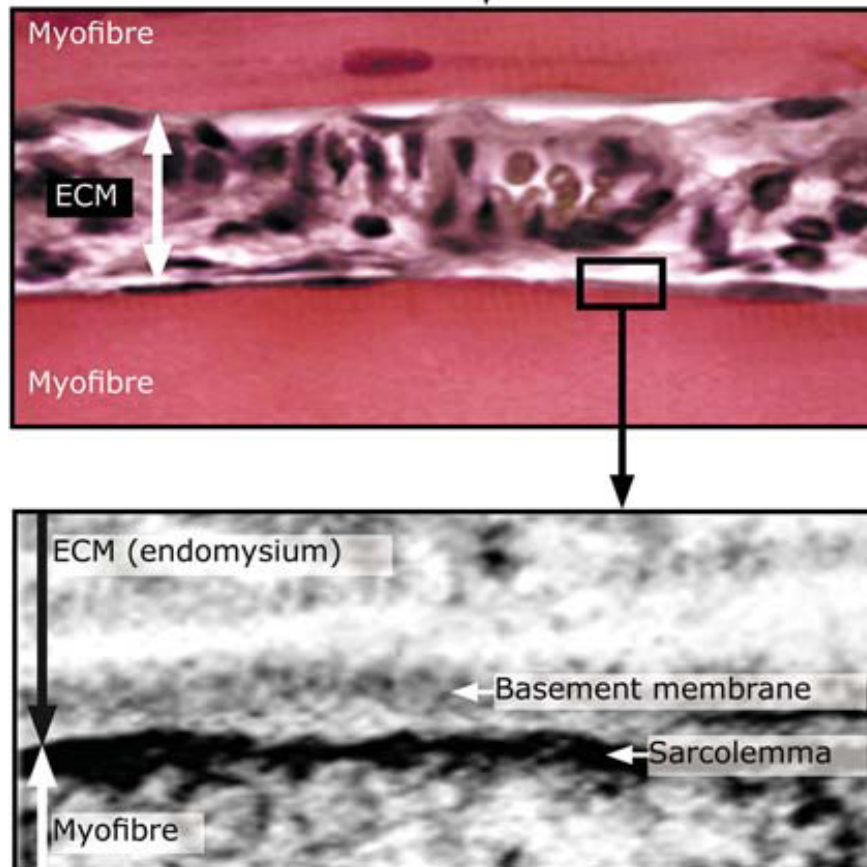
### 1.3.1 Das MMP-EZM-System in der Skelettmuskulatur

Die Matrix-Metalloroteinasen (MMP) stellen eine Familie von inzwischen über 20 Zink-abhängigen Proteasen dar und werden gewöhnlich von Fibroblasten, inflammatorischen Zellen oder Endothelzellen sezerniert und von Zytokinen induziert. MMP sind extrazelluläre Enzyme, welche Komponenten der extrazellulären Matrix (EZM) aber auch die Zell-Zell- und Zell-EZM-Verbindungen abbauen können (Hamacher et al., 2004). Dadurch sind MMP in physiologischen Prozessen wie während der embryonalen Entwicklung, Zellmigration, Morphogenese und Gewebsumgestaltung involviert. Darüber hinaus, sind sie auch in Prozesse wie Uterine- und Brustdrüsenumbildung, Ovulation sowie Angiogenese involviert. Neben den physiologischen Veränderungen nehmen die MMP auch Teil an pathologischen

Prozessen der EZM, wie z.B. Entzündungen, zelluläre Invasion, Tumorprogression, Metastasen und Zelltod (Hamacher et al., 2004)

Die MMP zeigen eine bestimmte Substratspezifität: Die Kollagenasen (MMP-1,-8,-13) spalten die fibrillären Kollagene 1, 2, 3, nicht aber den Kollagen 4. Die Spaltung erfolgt an einer einzigen Gly-Ile/Leu-Bindung. Die Tripelhelix der Fragmente ist thermisch nicht mehr stabil und kann anschließend von den Gelatinasen (MMP-2,-9) weiter abgebaut werden. Letztere spalten auch das Kollagen 4 (siehe Tab. 2). Darüber hinaus gibt es die *Tissue Inhibitors of Metalloproteinases* (TIMP), welche spezifische Inhibitoren der MMP darstellen. Bisher wurden TIMP-1, -2, -3, -4 identifiziert, die bis zu 40% in ihrer Aminosäuresequenz identisch sind und strukturelle Homologien besitzen. Normalerweise herrscht ein fein reguliertes Gleichgewicht zwischen den MMP und den TIMP. Bei pathologischen Zuständen ist dieses Gleichgewicht gestört. Hierdurch können hohe TIMP-Spiegel über eine Matrix-Akkumulation profibrotische Folgen haben (Hamacher et al., 2004).

In der Skelettmuskulatur ist das Sarkolemm eine Membran, welche die Myofibrillen umgibt und nahezu undurchlässig ist für extrazelluläre Flüssigkeit. Die Bestandteile der Basallamina sowie des Sarkolemms werden von den Muskelfasern selbst produziert (Kovanen et al., 1987).



**Abbildung 3:** Organisation der Extrazellulären Matrix (EZM) der Skelettmuskulatur.

Oberes Bild: Aufbau des Endomysiums zwischen zwei Muskelfasern. Dieser Raum beinhaltet verschiedene Zellen: u.a. Fibroblasten, Makrophagen, Adipozyten und Endothelzellen.

Unteres Bild: Die hohe Auflösung (mittels Elektronenmikroskopie) der Grenzfläche zeigt den Aufbau zwischen der EZM und der Muskelfaser bestehend aus der Basalmembran und dem Sarkolemm. (S. Schiaffino and T. Partridge: *Skeletal Muscle Repair and Regeneration*, 1. Auflage 2008, Kap. 13, Springer, Seite 269–301: Grounds MD, 'Complexity of extracellular Matrix and Skeletal Muscle Regeneration')

Die Komponenten der EZM kann man in zwei Hauptklassen (Proteoglykane und Faserproteine) unterteilen, die wiederum eine Reihe von diversen Makromolekülen zusammenfassen. Proteoglykane (z.B. Aggrecan, Perlecan und Decorin) bestehen aus Glykosaminoglykanen, die an Proteine gekoppelt sind. Faserproteine werden entsprechend ihrer Funktion in Strukturproteine (z.B. Kollagen und Elastin) und

Adhäsionsproteine (z.B. Fibronectin und Laminin) unterteilt. Die Hauptquelle der EZM-Komponenten sind Fibroblasten, welche auch Kollagene als Hauptprotein der EZM synthetisieren. Insgesamt sind 28 verschiedene Kollagentypen bekannt, von denen Kollagen 1 die Hauptfraktion in der EZM darstellt (Kjaer, 2004).

Namen	MMP	Typische Substrate	Proteolytische Aktivierung
Kollagenasen	MMP- 1	Kollagen 1, 2, 3, 4, 10, Gelatine, Aggrecan	proTNF, pro-MMP-2 und -9
	MMP- 8	Kollagen 1, 2, 3, Aggrecan	
	MMP-13		
Gelatinase A B	MMP- 2	Kollagen 1, 4, 5, 10, Gelatine, Aggrecan	
	MMP- 9		
Stromelysin 1 2	MMP- 3	Kollagene und nicht Kollagene EZM-Proteine	Pro-MMP-1, -8, -9, -13
	MMP-10	Wie MMP-3 aber schwächer	
Membran- MT1-MMP	MMP-14	Kollage 1, 2, 3, Fibronectin, Aggrecan	Pro-MMP-2, -13, proTNF

**Tabelle 2:** Die wichtigsten Vertreter aus der Familie der Matrix Metalloproteinasen. Modifiziert nach (Hamacher et al., 2004).

Die Stabilität der Kollagen Moleküle basiert vor allem auf den intra- und intermolekularen Vernetzungen (*cross-links*). Das Enzym Prolyl-4-Hydroxylase (P-4-H) spielt eine zentrale Rolle in der Synthese aller Kollagenformen (Nissi et al., 2001).

Die Expression von P-4-H erlaubt somit Rückschlüsse auf Veränderungen der Kollagensynthese (Kjaer, 2004), (Koskinen et al., 2001). Der Aktivitätszustand der SKM scheint ebenfalls einen Einfluss auf die Kollagen-Zusammensetzung zu haben. Es wird angenommen, dass ein trainierter Muskel einen höheren Kollagengehalt aufweist als ein untrainierter Muskel (Kovanen et al., 1987), (Koskinen et al., 2001).

In der Skelettmuskulatur wurde bisher wenig über die MMP geforscht. Bekannt ist, dass MMP-2, -9 und -14 in der SKM vorkommen, die Expression von MMP-1 ist jedoch noch nicht sicher bewiesen. Die Gelatinase MMP-2 ist wie in vielen Geweben der Hauptvertreter der Matrix Metalloproteinasen (Carmeli et al., 2004). Berichte über erhöhte Gelatinaseaktivität im verletzten Muskel haben das methodische Problem, dass es noch unklar ist, ob diese gesteigerte proteolytische Aktivität aus den Muskelfasern selbst stammt oder aus aktivierten Fibroblasten und/oder infiltrierenden Zellen des Immunsystems. Die MMP-2 Aktivierung geht gleichzeitig mit der Regeneration der neuen Muskelfasern einher (Kherif et al., 1999). Eine tierexperimentelle Studie zeigte an Ratten nach körperlicher Belastung einen Anstieg der Gelatinasen MMP-2 und MMP-9. Diese Zunahme wurde als Reaktion auf eine erhöhte Kollagen-4-Menge erklärt, da die Gelatinasen für den Abbau von Kollagen 4 bekannt sind. Während der Erholungsphase stiegen die natürlichen Inhibitoren (TIMP) an, vermutlich um eine weitere EZM Degradation zu vermeiden (Koskinen et al., 2001). Neben erhöhter körperlicher Bewegung wurde auch die MMP-TIMP Expression nach Immobilisation bei Ratten untersucht. Hier zeigte sich nach 4-wöchiger Immobilisation einer Extremität eine erhöhte Aktivität von MMP-2, MMP-9 und TIMP-1 (Reznick et al., 2003). Weitere Publikationen zeigten, dass im Rahmen einer Ischämie die Skelettmuskulatur von Ratten zu einer Zunahme der MMP-2 und MMP-9 Expression führte (Frisdal et al., 2000), (Roach et al., 2002). Ein allgemeiner



Nachteil solcher Studien ist die nicht auszuschließende Infiltration von Immunzellen, wodurch die Herkunft einer erhöhten MMP-Aktivität unklar bleibt.

Interessanterweise konnte man feststellen, dass Glukokortikoide durch die Hemmung proinflammatorischer Gene auch zur Hemmung der MMP-Synthese führen. Direkte Effekte von Glukokortikoiden auf MMP der SKM sind weitestgehend unbekannt. Zwei tierexperimentelle Studien demonstrieren eine Abnahme von MMP-2 in der SKM nach Gabe von Glukokortikoiden (Pross et al., 2002), (Ahtikoski et al., 2004). Obwohl der Gewichtsverlust und die Abnahme der Kollagen 4 mRNA in schnellen und langsamen Muskeltypen stattfand, war die Reduktion von MMP-2 nur in den schnellen Muskeln nachweisbar.

MMP und TIMP spielen auch während der Myogenese eine wichtige Rolle, dabei ist bekannt, dass die Myoblastenmigration ein MMP-abhängiger Vorgang ist (Chin and Werb, 1997), (El Fahime et al., 2000). Eine Studie untersuchte die Aktivität der Gelatinasen MMP-2 und MMP-9 in Satelliten-Zellen aus humanem Massetermuskel und in der murinen Myoblasten Zelllinie C2C12. In beiden Zellsystemen war die MMP-9 Expression nur in unfusionierten Myoblasten detektierbar, während MMP-2 in Myoblasten und in Myotuben differenzierungsunabhängig exprimiert wurde. Kherif et al. postulieren, dass die MMP-9 Expression mit der Aktivierung von Satelliten-Zellen in Beziehung steht (Kherif et al., 1999). Die Migration von humanen Satellitenzellen wurde durch einen spezifischen anti-MMP-9 Antikörper (*blocking monoclonal antibody* 6-6B) inhibiert (Lewis et al., 2000). Die Resultate zeigen eine spezifische Rolle von MMP-9 in der Migration und Fusion von Myogenen Zellen. Durch diese und weitere Publikationen (Lewis et al., 2000) ist anzunehmen, dass Satelliten Zellen bestimmte Typen der MMP-Familie synthetisieren und sezernieren können und das

sie auch direkt an der Umgestaltung der EZM während der Myogenese und Regeneration der SKM beteiligt sind (Guerin and Holland, 1995).

### **1.3.2 Regulation der Aktivität von MMP**

Die Synthese und Aktivierung der inaktiven pro-MMP wird auf unterschiedlichen Ebenen reguliert. Die transkriptionale Regulation der MMP kann zum einen durch lösliche Faktoren, z.B. Interleukine (IL-1, IL-6, IL-8) und Wachstumsfaktoren wie EGF und VEGF, zum anderen aber auch durch Veränderungen in der Zell-Zell- bzw. Zell-Matrix-Interaktion moduliert werden (Karin et al., 1997), (Reitamo et al., 1994).

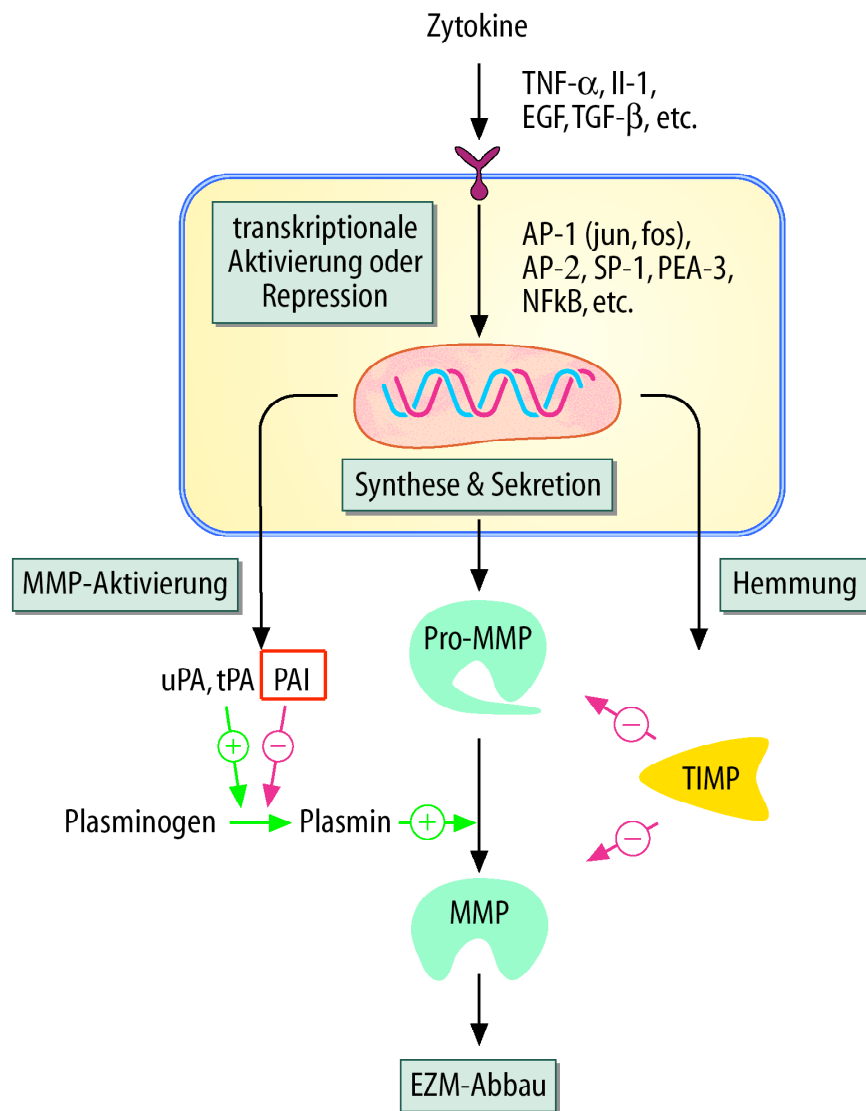
Die detaillierten Analysen von MMP-Promoterregionen zeigten, dass induzierbare MMP an konservierten Positionen im Promotorbereich PEA-3-cis und AP-1 Elemente aufweisen, welche spezifisch von Mitgliedern der Jun- und Fos-Proteinfamilie gebunden werden. Die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren ist das Resultat der Phosphorylierung von mitogenaktivierten Proteinkinasen (MAPK).

Die post-transkriptionale Regulation kann durch Erhöhung der mRNA Stabilität erfolgen (Overall et al., 1991), (Vincenti et al., 1996). In ihrer Aktivität werden die aktiven MMP hauptsächlich durch ihre natürlichen Inhibitoren, den TIMP, gehemmt bzw. reguliert. Diese können sowohl die aktivierten als auch die pro-MMP Formen hemmen. TIMP-1 bindet an die aktivierte Form der MMP und bildet mit ihnen nicht-kovalente Komplexe während TIMP-2 die inaktive Form der MMP stabilisiert und folglich dessen Formation zum aktiven proteolytischen Enzym inhibieren kann.

Von besonderer Bedeutung ist die Tatsache, dass die Neusynthese von MMP zu inaktiven Proenzymen führt. Die Aktivierung der latenten Vorläuferproteine durch Serinproteasen und andere MMP stellen weitere wichtige Regulationsmechanismen dar (Overall, 1994). MMP werden zunächst als inaktive Zymogene (Pro-Form) in den

Extrazellulärraum sezerniert. In der perizellulären Umgebung werden sie mithilfe der Proteinase Plasmin durch limitierte Proteolyse aktiviert, was zu einer proteolytischen Abspaltung des Pro-peptids führt. Lediglich Stomelysin-3 und die membrangebundene MMP-14 werden bereits im Golgi Apparat aktiviert. Die am besten beschriebene Aktivierung an der Zelloberfläche ist die Aktivierung von pro-MMP-2 (Sato et al., 1994). Hierbei bildet sich ein trimolekularer Komplex, bestehend aus MT1-MMP und TIMP-2, die eine Art ‚Rezeptor‘ für pro-MMP-2 bilden. Die verschiedenen Aktivierungs-Mechanismen verhindern eine überschießende Reaktion, welche zu einer Gewebszerstörung führen würde.

Die Plasmin-abhängige Aktivierung unterliegt ebenfalls einer Regulation. Diese Protease wird durch die Plasminogen Aktivatoren t-PA und u-PA (*tissue- und urokinase-plasminogen activator*) aus Plasminogen generiert. Die entscheidende Regulation der Plasmingenerierung erfolgt durch PAI-1, indem es die Aktivatoren hemmt. Hierdurch übt es einen Einfluß auf die EZM-Höomöostase aus, indem es durch die verminderte Plasmingenerierung zur verminderten pro-MMP Aktivierung und zu einer EZM-Akkumulation führen kann. PAI-1 gehört zur Familie der Serpine und wird vorwiegend in Endothelzellen gebildet und dort durch Thrombin, Endotoxin oder Zytokine freigesetzt. Es ist ein wichtiges Akute Phase Protein, das bei Venenthrombose, koronarer Herzkrankheit, nach Operationen, bei Entzündungen oder Infektionen vermehrt im Blut zirkuliert (Dellas and Loskutoff, 2005).



**Abbildung 4:** Regulation der Aktivität von Matrix-Metalloproteinasen durch TIMP und Zytokine. *PA* Plasminogen-Aktivator, *PAI* Plasminogen-Aktivator-Inhibitor. (modifiziert nach Ries u. Petrides 1995)

## 1.4 Ziel der Dissertationsarbeit

Die Skelettmuskulatur besitzt eine große Kapazität sich an pathophysiologische Veränderungen anzupassen. Zu diesen Veränderungen zählen auch die Skelettmuskelatrophie und –hypertrophie. Charakteristische Induktoren der Atrophie sind Glukokortikoide (GC), während ein wichtiger Regulator der Hypertrophie der *Insulin like Growth Factor* (IGF-1) ist. Neben der Ab- und Zunahme der Muskelfasergröße spielt die extrazelluläre Matrix (EZM) eine bedeutende Rolle für den Erhalt der Integrität und der kontraktile Funktion des Skelettmuskels. Veränderungen der EZM beruhen auf dem Vorhandensein verschiedener MMP und ihrer natürlichen Inhibitoren (TIMP).

Die Erforschung der MMP-EZM-Homöostase im Skelettmuskel ist immer noch weitestgehend ungeklärt. In der vorliegenden Arbeit wird diese Homöostase in der Atrophie und Hypertrophie der Skelettmuskulatur untersucht. Darüberhinaus wird auch die übergeordnete MMP-Plasminogen-Aktivierungskaskade analysiert. Die Genexpression der EZM-Komponenten und des MMP/TIMP-Systems wird mit der quantitativen (*real time*) QRT-PCR ermittelt und in den unterschiedlich behandelten Muskelproben verglichen. Hierfür werden insgesamt zwei experimentelle Modelle herangezogen und anschließend die Hauptergebnisse auf ihre klinische Relevanz überprüft:

1. Das *in vitro* Modell besteht aus der myogenen Zelllinie L6, welche nach einer Glukokortikoid-Behandlung atrophisch reagiert. Das Wachstumshormon IGF-1 führt dagegen zu einer Hypertrophie der L6 Myotuben.
2. Beim zweiten experimentellen Atrophie-Modell werden Skelettmuskelproben der Ratte untersucht, welche der Schwerelosigkeit ausgesetzt waren. Hierbei handelt es sich um einen 14-tägigen Aufenthalt im *Space Shuttle* Flug SLS-2.

3. Die Untersuchung der klinischen Muskelbiopsien von Patienten mit einer neurogenen Atrophie wurde zusammen mit Prof. Markus Glatzel, Institut für Neuropathologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf, durchgeführt.

Die Veränderungen der ausgewählten *Targetgene* im Rahmen der Atrophie und Hypertrophie und deren mögliche systemische Bedeutung werden in der vorliegenden Arbeit diskutiert.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 L6 Myotuben Zellkultur

Die L6-Zelllinie wurde von der *European Collection of Cell Culture* (Salisbury, UK) bezogen. Diese Zelllinie wurde von David Yaffe im Jahre 1977 aus dem Skelettmuskel der Ratte isoliert, als Zelllinie etabliert und charakterisiert. Es sind myogene Zellen, welche als Myoblasten proliferieren und unter reduzierter Serumkonzentration zu multinukleären Myotuben fusionieren können. Neben der C2C12-Zelllinie der Maus, zählen sie zu den weitverbreitetsten und am besten untersuchten myogenen Zelllinien.

Die proliferierenden Myoblasten wurden in 10% FCS haltigem DMEM Medium (FCS= *Foetal Calf Serum*, DMEM= *Dulbecco's Modified Eagle Medium*) supplementiert mit 4mM L-Glutamin, 1mM Pyruvat, 100 U/ml Penicillin und 100µg/ml Streptomycin bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Die Myoblasten wurden bei einer Konfluenz von unter 75% passagiert. Für Fusionsexperimente wurden die Zellen in einer Dichte von  $2 \times 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup> auf 1% Gelatine beschichteten Kulturflaschen ausgesät. Um die Fusionierung der Myoblasten zu induzieren, wurden Kulturen mit 90-100% Konfluenz auf DMEM Medium supplementiert und mit 2% Pferdeserum umgestellt. Das Wachstum der Myoblasten und die Formation der Myotuben wurden mittels Phasenkontrast-Mikroskopie kontrolliert und dokumentiert. Die Differenzierung der Zellen im Fusionierungsmedium betrug 10 Tage, wobei alle 2 Tage das Medium gewechselt wurde. Um die charakteristischen Eigenschaften der Zelllinie zu bewahren wurden die Zellen bis zu 10 Passagen in Kultur gehalten. Die Behandlung der Myotuben betrug zwischen 24 und 72 Stunden. In diesem Zeitraum wurden die zu testenden Substanzen in das serumfreie Medium hinzugegeben und alle 24

Stunden erneuert. Dexamethason und das Schilddrüsenhormon T3 wurden in DMSO gelöst und auf die Endkonzentration von 100 nM verdünnt, wobei die DMSO-Endkonzentration unter 0,01% betrug. IGF-1 wurde in einer Konzentration von 10 bzw. 20 ng/ml supplementiert.

Die immunhistochemische Darstellung von dem Intermediärfilament Desmin in den ausdifferenzierten Myotuben wurde folgendermaßen durchgeführt:

Formalin-fixierte Myotubenkulturen wurden für 2 Stunden mit 2% BSA-Lösung (Bovine Serum Albumin) blockiert, um die unspezifische Bindung des Antikörpers zu verhindern. Anschließend wurde der 1. Antikörper gegen Desmin (Sigma) 1:50 in der Blockierlösung verdünnt und für 2 Stunden inkubiert. Hiernach erfolgten 3 Waschschriffe in PBS-tween 0,1% und anschließend mit dem 2. Antikörper, spezifisch gegen Maus IgG und durch biotinylierung markiert, für 45 min. inkubiert. Nun folgt die Inkubation für 1 Stunde mit Peroxidase gekoppeltes Avidin, in Form des ABC-Elite Kits von Vector (Linaris, Göttingen). Hiernach schließt sich die Farbentwicklung mit DAB (Diaminobenzidine) an.

## **2.2 Schwerelosigkeitinduzierte Muskelatrophie**

Die hier untersuchten Skelettmuskelproben wurden von Prof. Gordon Bell (*Exercise Biochemistry Laboratory, Faculty of Physical Education and Recreation, University of Alberta, Edmonton, Canada*) zur Verfügung gestellt (Hansen et al., 2004). Adulte männliche Ratten der Gattung *Sprague-Dawley* wurden über 14 Tage im Weltraumlaboratorium *Life Sciences-2* (SLS-2), einer Weltraumfähre, der Schwerelosigkeit im Weltall ausgesetzt (NASA-Mission SLS-2, *Spacelab Life Sciences 2, STS-58*, 1993). Als Kontrolle dienten Ratten derselben Gattung, welche nicht der Schwerelosigkeit ausgesetzt waren (n=5). Alle Tiere wurden in identischen und getrennt voneinander aufgebauten Käfigen des *Research Animal Housing*



*Facility* (RAHF) untergebracht. Während der gesamten Zeit wurden die Bewegungen der Ratten durch den Käfig eingeschränkt. Die Tiere wurden 5 Stunden nach der Landung getötet und die Muskulatur wurde präpariert. Für weitere Details der SLS-2 Flugbedingungen (Riley et al., 1996), (Caiozzo et al., 1996) (Sulzman, 1996) war ein Teil des NASA *tissue sharing project* für die SLS-2 Mission zuständig.

### **2.3 Muskelbiopsien von Patienten**

Die Muskelbiopsien wurden im Institut für Neuropathologie des Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf entnommen. 12 Proben stammen aus dem M. vastus lateralis von Patienten im Alter zwischen 37 und 70 Jahre (7 Frauen, 6 Männer). 7 Biopsien zeigten deutliche Anzeichen einer neurogenen Muskelatrophie, während die 5 Kontrollbiopsien frei von jeglichen sichtbaren Myopathien waren (Naderi et al., 2009). Die Entnahme und Befundung der Biopsien erfolgte von Prof. Dr. med. Markus Glatzel.

### **2.4 RNA-Extraktion und Quantifizierung**

#### Durchführung:

Die Skelettmuskelproben wurden mit flüssigem Stickstoff schockgefroren. Anschliessend wurde das Gewebe mit Hilfe eines Stahlmörsers pulverisiert. Die RNA wurde mit der TriZol® (Invitrogen) Lösung nach Anleitung des Herstellers aus dem Gewebepulver gewonnen. Es wurden 100 mg Gewebepulver in 1 ml Trizol Lösung homogenisiert. Die anschliessende Bearbeitung ist identisch mit der RNA Isolierung aus Zellkulturproben. Die L6-Myotuben wurden 2-mal mit PBS (Phosphate buffered Saline) gewaschen. Pro Kulturflasche wird 2 ml TriZol® supplementiert. Die Zellen wurden mit Hilfe eines Zellschabers von dem Boden der Flaschen abgekratzt und in

2 ml Eppendorfer Röhrchen überführt. Danach wurden 210 µl Chloroform hinzugeben, wonach zwei voneinander farblich getrennte Phasen entstanden. Das Gemisch wurde anschließend 15 Sekunden mit einem Vortex-Gerät gemischt. Es folgte eine 2-3 min. Inkubation bei Raumtemperatur. Um die Proteinreste zu entfernen, wurde das Gemisch zentrifugiert (14.000 rpm (12.000g), 15min, 4°C). Für die RNA Präzipitation wurde die wässrige Phase (enthält RNA) mit dem gleichen Volumen an Isopropanol in ein neues Gefäß gegeben. Die Proben mussten mindestens 30 Minuten im Gefrierschrank stehen. Nach erneuter Zentrifugation (14.000 rpm, 15min, 4°C) setzte sich die RNA als Pellet am Grund ab. Das Pellet wurde mit 75% Ethanol gewaschen und anschließend abzentrifugiert (7500g, 5 min., 4°C). Zum Schluss wurde es für ca. 5 Minuten luftgetrocknet und in DEPC-Wasser resuspendiert. Die Quantifizierung der gesamt RNA wurde mit dem Eppendorfer UV-Photometer durchgeführt. Die Proben wurden in einem Verhältnis von 1:99 verdünnt und bei 260nm photometrisch gemessen. Die Qualität der RNA wurde mittels der Gelelektrophorese bestimmt.

## **2.5 RNA Umschreibung in cDNA**

Die ReverseTranskriptase-Reaktion wurde angewandt um die mRNA in cDNA umzuschreiben.

### Durchführung:

Es wurde 1µg RNA mit H<sub>2</sub>O auf insgesamt 17µl aufgefüllt. Danach wurden 1µl dN6- und 1µl dT-Primer dazugegeben. Eine Inkubation bei 70°C für ca. 10 Minuten löste die RNA wie auch die Primerdimer voneinander. Die Proben kühlten ab, sodass sich die Primer an jeden der freien RNA- Stränge anlagern konnten. Um einen vorzeitigen Beginn der Reaktion zu verhindern, wurden die Proben auf Eis gestellt und gekühlt. Anschließend wurden 5-mal *first strand buffer*, 0,1 M DTT, Super Script reverse

Transkriptase (von Invitrogen-Kit) und dNTP- Mix aller vier Nukleinsäuren supplementiert. Die Umschreibung der RNA in cDNA erfolgte unter 60minütiger Inkubationszeit bei 42°C.

## **2.6      *Primer design***

Um den gewünschten DNA Abschnitt zu amplifizieren, wurden Primer eingesetzt, welche auf beiden Seiten der gewünschten Sequenz binden und somit diesen DNA Abschnitt flankierten. Die *Primer* besitzen zwei Bindungsstellen, welche sich an zwei verschiedenen Exons befinden. Hierdurch wurde gewährleistet, dass nur mRNA nachgewiesen wurde und nicht kontaminierte DNA-Reste. Die verwendeten *Primer*-sequenzen sind in der Tabelle 3 dargestellt.

Die Konstruktion der *Target*-genspezifischen *Primer* wurde mittels der *freeware Software Primer3 (Rozen and Skaletsky, 2000)* entwickelt. Hierfür wurde die Gensequenz der *Targetgene* in der *NCBI* Datenbank gesucht, dabei werden oft mehrere Sequenzen gefunden. Im Falle von unterschiedlichen Sequenzen zu ein und demselben Gen wurden mittels *BLASTN* die Unterschiede ermittelt und aus der *Primer*-Konstruktion ausgeschlossen. Die *Primer*-sequenzen wurden wiederum mittels *BLASTN* auf ihre Spezifität untersucht und mit der gesamten Gendatenbank verglichen. Es sollte nur das *Targetgen* erkannt werden, um die Spezifität der exonübergreifenden *Primer* zu gewährleisten.

<b>Target mRNA</b>	<b>Primer Sequenz (sense / antisense)</b>	<b>PCR, Fragment- Größe</b>	<b>Genbank Akzession-N°</b>
<b>GSalpha</b>	TACCATCTCTGTGATCCTCTTC GTGAGGGTAGCAGTAGTGAC	238	M17525.1
<b>Atrogin 1</b>	TCACAGCTCACATCCCTGAG GACTTGCCGACTCTCTGGAC	167	NM_133 521
<b>u-PA</b>	TGAAGGTGGCAGTGAACCTTG CGGCCTTTGGTGTGTCAGTATT	216	NM_013085
<b>t-PA</b>	GAGATGCTTCAATGGGGGTA TGCTCCATGTGCCTCTGTAG	155	NM-013151
<b>PAI-1</b>	TGGTGAACGCCCTCTATTTTC GAGGGGCACATCTTTTTCAA	248	M24067
<b>MMP-1</b>	CGTGGACCAACAACAGTGAC GGCCCATATAAAGCCTGGAT	184	XM_235849
<b>MMP-2</b>	GATGGATACCCGTTTGATGG CCATCAGCGTTCCATACTT	221	NM_031054
<b>MMP-3</b>	GCTCATCCTACCCATTGCAT GCTTGTGCATCAGCTCCATA	219	NM_133 523
<b>MMP-9</b>	CCACCGAGCTATCCACTCAT GTCCGGTTTCAGCATGTTTT	159	NM-031 055
<b>MMP-13</b>	AGGCCTTCAGAAAAGCCTTC GAGCTGCTTGTCCAGGTTTC	226	M60616
<b>MMP-14</b>	TTGGTGTGTGTCCAACCCTA GCTGCCAACTGGGTACACTT	203	NM_031056
<b>TIMP-1</b>	TCCCCAGAAATCATCGAGAC TCAGATTATGCCAGGGAACC	250	NM_053819
<b>TIMP-2</b>	CAAGTTCTTTGCCTGCATCA TCCAGGAAGGGATGTCAAAG	180	U14526
<b>TIMP-3</b>	CACGGAAGCCTCTGAAAGTC AATTGCAACCCAGGTGGTAG	185	U27201
<b>TIMP-4</b>	TGGCCAGATTCTCAGTGATG ATGGTACACGGCACTGCATA	159	NM_001109393
<b>PAI-1 (human)</b>	CTCTCTCTGCCCTCACCAAC GTGGAGAGGCTCTTGGTCTG	212	NM 000602
<b>GAPDH (human)</b>	GAGTCAACGGATTTGGTCGT TTGATTTTGGAGGGATCTCG	238	M32599

**Tabelle 3:** Verwendete PCR Primer (Naderi et al., 2009).

## 2.7 *Real-time* QRT-PCR

Die PCR (*polymerase chain reaction*) stellt ein *in vitro* Verfahren zur gezielten Vermehrung von DNA mit Hilfe von synthetischen Oligonukleotiden und dem Enzym DNA-Polymerase dar. Durch wiederholte thermische Zyklen wird aus einer DNA Lösung ein spezifischer DNA Abschnitt vermehrt. Hierbei definieren synthetische Oligonukleotide den DNA Abschnitt, der amplifiziert werden soll.

### Material für die *Real-time* RT-PCR:

- cDNA- Template 1, 5 ul
- 25 mM MgCl 1, 5 ul
- 40 uM 5' u. 3' Primer working solution 0, 15 ul
- H2O PCR-Grade 10, 05 ul
- 10 x Master SYBR Green 1, 5 ul

(Taq polymerase +SYBR Green)

Roche Applied Sciences (Cat. No. 12 239 264 001)

- Light Cyclers capillaries
- LightCycler (Roche Applied Sciences )
- Zentrifuge
- Zentrifugenadapter (Roche Applied Sciences )

Es wurde zunächst ein *Master Mix* hergestellt, welcher aus 1,5 ul 10 x Master, SYBR Green, 18ul mM MgCl<sub>2</sub>, 0,15ul 40 um 5' + 3' *Primer working solution* und 10,05ul PCR – Wasser bestand (Endvolumen 13,5 ul). Je nach Anzahl der Kapillaren wurden die Mengenverhältnisse multipliziert. Danach wurde 1,5 ul der zu messenden cDNA-Probe oder der Wasserkontrolle in die PCR – Glaskapillare gegeben, um dann mit

13,5ul des *Master Mix* die Kapillare aufzufüllen. Die Glaskapillare wurde anschließend mit einem passenden Adapter der Firma Roche in einer handelsüblichen Tischzentrifuge zentrifugiert. Im Anschluss wurde die Kapillare in das *Light Cycler* Karussell montiert, woraufhin der zu wählende *Light Cycler* Reaktionsablauf folgte. Dieser besteht aus folgenden Phasen: die erste Phase beinhaltet ein initiales Erhitzen auf 95°C, wobei erneut sämtliche Dimere (cDNA oder Primer) in ihre Einzelstränge zerfallen und eine Neuordnung der *Primer* an die cDNA möglich ist. Die zweite Phase des *LightCycler* Reaktionsablaufs beinhaltet eine sich 45-mal wiederholende Reihenfolge von Temperaturänderungen, die sich nach der Beschaffenheit der *Primer* richtet. Sie besteht aus einer *Annealing* – Phase bei 57°C, einer Polymerisationsphase bei 72°C und einer Denaturierungsphase bei 95°C. In der dritten Phase wird das Gemisch in der Glaskapillare schließlich durchgehend auf 95°C erhitzt, wobei sich die entstandenen Doppelstränge vollständig voneinander trennen. In der Fluoreszenzmessung, welche nun konstant läuft, zeigt sich nun die Funktion des SYBR Green. SYBR Green ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der ähnlich wie das Ethidium Bromid oder Pico Green in die Doppelstrang – DNA interkaliert. Es ist den anderen Farbstoffen allerdings in seiner Sensitivität überlegen, so dass es sich für die *realtime* RT-PCR sehr gut eignet. SYBR Green sorgt im DNA-gebundenen Zustand für eine besonders starke Fluoreszenz, die in ungebundenem Zustand nicht besteht. Während des Schmelzvorgangs der PCR-Produkte in der dritten Phase des *Light Cycler* Programms lässt sich über den gemessenen Abfall der Fluoreszenz auf die Menge der enthaltenen DNA schließen. Das grafische Korrelat dieses Vorgangs ist die im Computer aufgezeichnete Schmelzkurve. Nach dem Abkühlvorgang können die eingesetzten Kapillaren aus dem *LightCycler* – Karussell entnommen und für das DNA – Gel aufbewahrt werden. Zur Qualitätssicherung bei der Herstellung jedes

Master Mixes wurde stets eine Negativkontrolle mit Wasser durchgeführt, da während der gesamten PCR Vorbereitungsphase eine Kontamination des Reaktionsansatzes mit fremder DNA stattfinden kann. Es wurden immer Duplikate, bzw. Triplikate, der zu untersuchenden Proben erstellt. Hiermit können eventuelle Schwankungen innerhalb des Pipettiervorgangs verhindert werden. Zudem wurden einzelne *Light Cycler* Läufe komplett wiederholt. Im Falle einer Kontamination der Mastermixlösung oder des verwendeten Wassers mit fremder DNA würde nach Ablauf der PCR in der Kontrollprobe replizierte DNA nachweisbar sein.

### **2.7.1 Schmelzkurve**

In der Schmelzkurve zeigt sich unter ansteigenden Temperaturen bei wie viel Grad Celsius wie viele der DNA – Doppelstränge in Einzelstränge zerfallen und dabei den gespeicherten SYBR Green Farbstoff freisetzen. Je höher die Kurve, desto mehr Produkt ist vorhanden während kleine PCR-Produkte bei niedrigeren Temperaturen erscheinen. Eine Wasserkontrolle, die öfters Primer Dimere aufwies, wurde stets mit durchgeführt. Besonders zu beachten ist hier die H<sub>2</sub>O-Kontrolle. Hat sie einen Schmelzpunkt und liegt er an derselben Stelle wie die der zu untersuchenden Proben, so muss der Lauf verworfen werden, da davon ausgegangen werden muss, dass ein spezifische Probe in die H<sub>2</sub>O – Kontrolle und damit auch möglicherweise in andere Kapillaren gelangt ist. Primer Dimer, solange sie nicht zu deutlich ausgeprägt sind, wurden nicht negativ bewertet.

## **2.8 Housekeeping-Gen**

Die Genexpression aller untersuchten *Targetgene* wurden mit Hilfe der Quantitativen RT-PCR ermittelt und im Bezug auf das *Housekeeping-Gen* GSalpha betrachtet

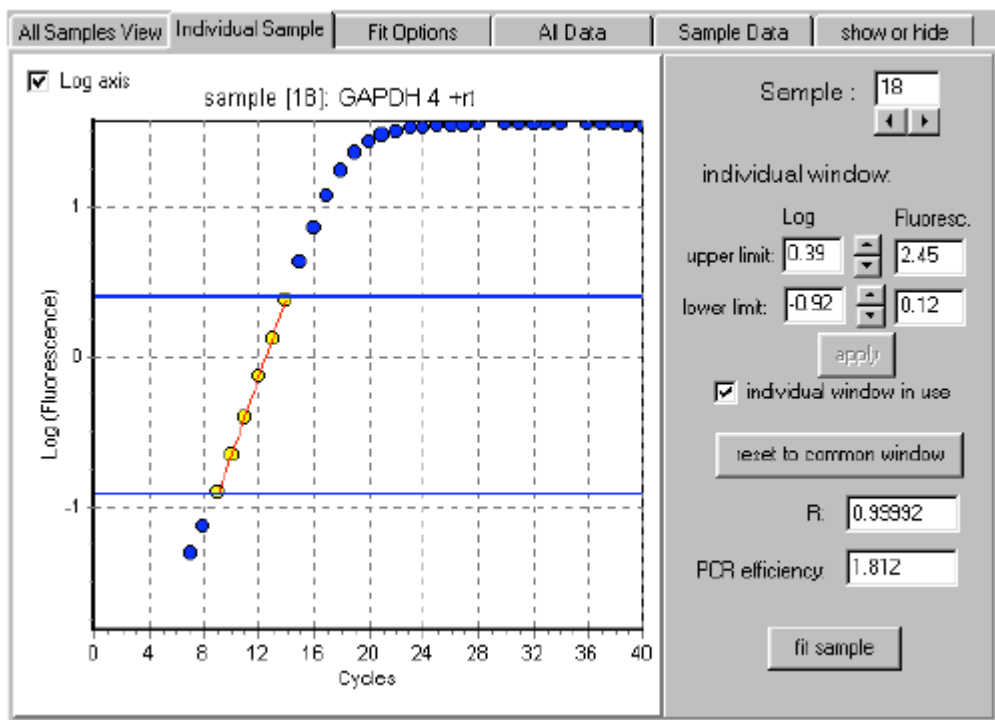
sowie während der statistischen Auswertung normiert. Unter dem Begriff *Housekeeping-Gen* versteht man proteinkodierende Gene, deren Expression wenig beeinflusst wird und die in jedem Zelltyp und in jedem Zellstadium exprimiert werden. Es sind somit nicht-regulierte und konstitutiv exprimierte Gene. Idealerweise sollte kein Unterschied zwischen der Expression des GSalpha in der Kontrollgruppe und den zu untersuchenden Proben bestehen.

## 2.9 Auswertung der Light Cycler-Daten

Die spezifische Anlagerung der Primer an die Targetgen-Sequenz und der damit einhergehende proportionale Einlagerung des Fluoreszenz-Farbstoffs SYBR Green führt zur Ermittlung des sog. Ct-Wertes. Der Ct-Wert beschreibt die PCR-Zykluszahl, an dem die Fluoreszenz einen bestimmten Schwellenwert (*threshold*) übersteigt. Anschließend erfolgt die statistische Auswertung der *Light Cycler* Daten, welche nach zwei unterschiedlichen Verfahren durchgeführt wurde: Die vom Hersteller empfohlene ct-delta-delta und die LinReg – Methode (Ramakers et al., 2003). Das LinReg – Programm ist die zweite Möglichkeit die Rohdaten des *Light Cyclers* zu analysieren. Hierbei berechnet das Programm die theoretische Anfangsmolekülzahl des gemessenen Gens und die PCR-Effizienz der jeweiligen PCR-Reaktion. Hierzu werden die Daten aus dem *Light Cyclers* der Firma Roche als sogenannte „*Noise Band*“ unter der Option „*Quantification*“ abgespeichert. Die Daten müssen in ein *Excel File* transferiert werden, damit sie vom Programm erkannt werden. Der Anstieg der Fluoreszenz wird nun in einer Kurve aus Punkten dargestellt, wobei die Anzahl der Messungen des *Light Cyclers* der logarithmischen Progression der Fluoreszenz entgegengesetzt wird. Das Programm sucht nun die Punkte in der Kurve, die am ehesten einen linearen Anstieg zeigen. Außerdem muss der Abstand zwischen den



Punkten gleich sein, beziehungsweise mit einer maximalen Abweichung von 0,1 Prozent, vorliegen. Das spiegelt sich im Korrelationskoeffizienten wieder, welcher  $R^2$  der  $>0,999$  ist. Andernfalls muss eine Nachkorrektur durch Veränderung der oberen und/oder unteren Grenze durchgeführt werden. Außerdem muss darauf geachtet werden, dass die verwendeten Punkte zwischen 1 und -1 auf der logarithmischen Fluoreszenz Kurve liegen. Die Linie der Punkte schneidet die x-Achse in einem Punkt. Dieser Schnittpunkt stellt als  $N_0$  die Startkonzentration des vervielfältigten Genes in der Konzentration der Probe da.



**Abbildung 5 :** LinReg basierte Ermittlung der Effizienz der einzelnen PCR Reaktionen

## 2.9.1 PCR – Effizienz

Die Effizienz der PCR-Reaktion gibt Schlüsse über die Qualität der PCR-Reaktion. Die ideale PCR Effizienz von 2 ist erreicht, wenn jeder Einzelstrang dupliziert wird. Jedoch wird diese ideale Effizienz kaum erreicht, weil vermutet wird, dass in der RNA

auch PCR kontaminierende Faktoren enthalten sind. Unsere Effizienzen waren daher zwischen 1,6 und 1,8. Es wurden alle Proben, deren Effizienz um 0,05 oder mehr vom Durchschnitt abwich, nicht berücksichtigt. Dadurch wurden nur Proben mit ähnlichen Effizienzen miteinander verglichen.

## **2.10 Gelelektrophorese**

Um die spezifische Größe der PCR Produkte und eine Kontamination auszuschließen, wurde als Qualitätskontrolle die Gelelektrophorese der PCR-Produkte durchgeführt.

### Durchführung:

80 ml Puffer (1 x TBE) wurde mit 1,6g Agarosepulver (2%) in einem Erlenmeyerkolben vermischt. Die Lösung wurde in der Mikrowelle erwärmt, bis keine Schlieren mehr zu sehen waren. Nach kurzer Abkühlung der Flüssigkeit wurde zur Darstellung der Nukleinsäure 0,8g/mg Ethidiumbromid (EtBr) dazugegeben. EtBr ist ein roter Phenanthridin-Farbstoff, welcher Nukleinsäuren anfärbt und bei Anregung mit ultraviolettem Licht sichtbar ist.

In die Gelkammer wurde ein Gelkamm eingesetzt und die fertige Lösung wurde in die Gelkammer gegossen. Die Lösung ruhte für ca. 30min. bei Raumtemperatur, bis sie erstarrte. Zur farblichen Darstellung der Banden in der Gel-Elektrophorese wurde für jede Probe ca. 3µl DNA *loading buffer* in ein Eppendorfer-Röhrchen (1,5 ml) dazugegeben und mit der jeweiligen Probe in der Zentrifuge kurz vermischt. Nach Aushärtung des Gels wurde es aus der Kammer entnommen und der Kamm wurde aus dem Gel entfernt, sodass die entstandenen Kammern nicht beschädigt wurden. In jede der entstandenen Kammern wurden jeweils 5µl der Probe pipettiert. Als

Kotrollen diente Wasser (8  $\mu$ l) und eine Basenpaarkontrolle (8  $\mu$ l). Die Elektrophoresekammer wurde bei 100V Spannung für 40 min angestellt.

### **2.10.1 Gel-Bild**

Das fertige Gel wurde in eine Fotokammer gelegt und unter UV-Licht fotografiert. Durch das Ethidiumbromid fluoreszieren die PCR-Produkte bei Anregung mit UV-Licht. Anhand der Basenpaarleiter konnte die Größe der PCR-Produkte abgeschätzt werden und zusätzlich auf unspezifische PCR-Produkte überprüft werden.

## 2.11 Lösungen, Chemikalien und Geräteliste

### Lösungen:

#### **RNA -> cDNA – Umschreibungslösung, Invitrogen- Kit und dNTP.**

- first strand buffer 6 µl;
- 0,1 M DTT 3 µl;
- Super Script Reverse Transcriptase 1 µl;
- dNTP (siehe unten) 1,5 µl;

#### **RNA- Elektrophorese – Gel (1%):**

- Agarose 0,5g;
- 10x Gel running buffer 5 ml;
- Ethidiumbromid 0,5 µl;
- 37% Formaldehyd 1,5 ml;
- 42,5 ml aqua dest. hinzu fügen

#### **Probengemisch für eine Gelkammer im RNA- Elektrophorese – Gel:**

- 5µg der zu untersuchenden RNA;
- 15 µl Lösung 1
- 65,6 % Formamid;
- 21,3 % 37% Formaldehyd;
- 13,1 % 10x running buffer.
- 1 µl loading buffer (Zusammensetzung siehe unten)

## Herstellung eines Reaktionsgemisches für eine Kapillare im LightCyclers:

( alle Substanzen als Kit von Roche )

- 1,8 µl MgCl<sub>2</sub>;
- 1,5 µl SYBR Green Farbstoff;
- 0,36 µl des Primerpaares des gesuchten Gens;
- 1,5 µl der zu vervielfältigenden RNA.

9,84 µl a.d. hinzu fügen

- **PBS** (Zellkulturpuffer)

- 1,05g      KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> -

- 45g        NaCl -

- 2,42g      Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O

auf 5l mit milli-pore H<sub>2</sub>O auffüllen

**Chemikalien:** (Bezeichnung – Firma – Produktnummer/Bestellnummer)

- Agarose	Invitrogen – 15510-027;
- Bromphenolblau (0,05%)	Merck – 108122;
- BSA	Sigma – A-3059
- CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	Merck – 102382;
- Chloroform	Merck – 102445;
- DEPC	Roth – 2165428;
- DMEM	Gipco - 21885-025;
- dNTP Set	Amersham Biosciences – 27-2035-01;
- EDTA	Merck – 324506;
- Essigsäure	Merck – 109951;
- Ethanol	Merck - 100986;
- Ethidiumbromid	Sigma – E1510;
- FCS	Invitrogen – 10270106;
- Formaldehyd	Merck – 104002;
- Formamid	Merck - 109684;
- Gelatine	Sigma – G1890;
- Isopropylalkohol	Merck – 100995;
- MOPS	Roche – 1.124.684;
- Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	Sigma - 10028-24-7;
- NaAcetat	Merck – 106268;
- NaCl	Fluka – 71381;
- NaOH	Merck –106498;
- pd(N)6 – Primer	Amersham Biosciences – 27-2166-01;
- pd(T) – Primer	Amersham Biosciences – 27-7858-02;
- Tris	Merck – 1.08282.2500;
- Trizol – RNA- Extraktion	Invitrogen – 1029115596-018;

- IGF-1 R & D Systems 4326-RG-050
- Dexamethasone Sigma - D4902
- T3 Sigma - T6397

**Geräte:**

- LightCycler der Firma Roche,
- Photometer der Firma Eppendorf,
- Gelkammer für RNA- Gel der Biorad;
- UltraTurrax der Jahnke+Kunkel (IFN Labortechnik);

### **3. Ergebnisse**

Die untersuchten Genen (=Targetgene) im unbehandelten, atrophierenden und hypertrophierenden Skelettmuskel wurden zur besseren Übersicht in nachfolgende Gruppen eingeteilt.

1. MMP-/TIMP-System (MMP-1,-2,-3, -9 und -14), (TIMP-1,-2.-3.- 4)
2. EZM-Komponenten (Kollagen 1 und 4, P-4-H)
3. Das MMP aktivierende Plasminogen-Plasmin-System (t-PA, u-PA und PAI-
4. Als Kontrolle für die katabole bzw. anabole Reaktion wurde die Genexpression der E3-Ubiquitin-Ligase Atrogin-1 herangezogen.

#### **3.1 Genexpression des MMP-TIMP-Systems in verschiedenen Muskelgeweben**

Der erste Teil der Arbeit untersuchte die Genexpression der Matrix Metalloproteinasen, welche aus Literatur Recherchen eine Rolle in der Atrophie und Hypertrophie der SKM spielen könnten. Außerdem wurden ihre natürlichen Inhibitoren (TIMP) in allen drei Muskeltypen der Ratte mituntersucht. Hierfür wurde die RNA aus dem Herzmuskel, dem schnellen M. gastrocnemius, aus Skelettmuskelzellen der Linie L6 und aus Primärkultur glatter Muskelzellen isoliert. Eine statistisch abgesicherte quantitative Aussage konnte aufgrund einer geringen Probenzahl in dieser Analyse nicht getroffen werden. Dieser Teil diente dazu, das MMP-TIMP-Verteilungsmuster richtungsweisend einzuordnen (siehe Tab. 4).

Alle gemessenen MMP waren in der glatten Muskulatur nachweisbar. Das Stromelysin MMP-3 war nur im glatten Muskel und in der Skelettmuskulatur zu messen. Im Gegensatz dazu waren die Gelatinasen MMP-2 und MMP-9 sowie die



membrangebundene MMP-14 in allen Muskeltypen (Glatte Muskulatur, Herzmuskulatur sowie Skelettmuskulatur) vertreten. MMP-2 war mit einem Durchschnitts-Ct-Wert von 22 am stärksten in den L6-Myotuben präsent. Die in den L6 Myotuben vorkommenden drei MMP (MMP-2,-9,14) wurden nachfolgend genauer untersucht und quantitativ bestimmt.

	Kollagenasen		Gelatinasen		Stromelysin	MT-MMP
	MMP-1	MMP-13	MMP-2	MMP-9	MMP-3	MMP-14
<b>Glatte Muskulatur</b> N=2	++	++	++	+	+	+
<b>Herzmuskel</b> N=3	+/Ø	+/Ø	++	+	+/Ø	+
<b>Skelettmuskel</b> N=4	Ø	Ø	++	+	+	+
<b>L6 Myotuben</b> N=4	Ø	Ø	+++	+	Ø	+
<b>L6 Myoblasten</b> N=3	Ø	Ø	++	+/Ø	Ø	+

**Tabelle 4:** Expression der MMP in den verschiedenen Muskeltypen. Verteilungsgrad der MMP-Expression in den verschiedenen Muskeltypen anhand der Zyklenzahl der QRT-PCR (Ct-Werte): +++ = Ct < 22; ++ = Ct < 28; + = Ct < 34; Ø = Ct > 34.

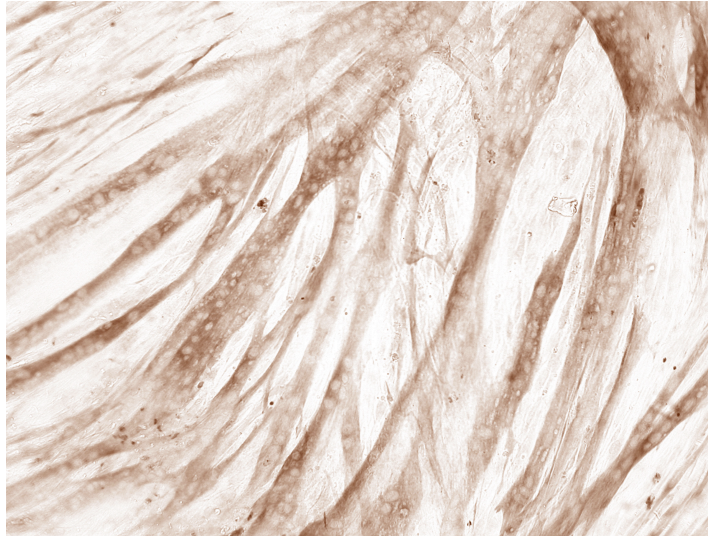
Alle MMP-Inhibitoren (TIMP-1, -2, -3 und -4) kommen sowohl in der glatten Muskulatur als auch im Herzmuskel vor. Im M. gastrocnemius und in der L6-Zelllinie konnten nur TIMP-1 und -2 nachgewiesen werden (siehe Tab. 5). Interessanterweise war TIMP-4 mit einem Durchschnitts-Ct-Wert von 24 am stärksten im Herzmuskel exprimiert.

	TIMP-1	TIMP-2	TIMP-3	TIMP-4
<b>Glatte Muskulatur</b> N=2	+++	+++	++	+
<b>Herzmuskel</b> N=3	+ / +++	++	∅	+++
<b>Skelettmuskel</b> N=4	++	++	∅	∅
<b>L6 Myotuben</b> n=4	++	+++	∅	+ / ∅
<b>L6 Myoblasten</b> n=3	++	+++	∅	∅

**Tabelle 5:** Expression der TIMP in den verschiedenen Muskeltypen. Verteilungsgrad der TIMP-Expression in den verschiedenen Muskeltypen anhand der Zyklenzahl der QRT-PCR (Ct-Werte): +++ = Ct < 22; ++ = Ct < 28; + = Ct < 34; ∅ = Ct > 34.

### 3.2 Atrophie und Hypertrophie im L6-Myotuben-Modell

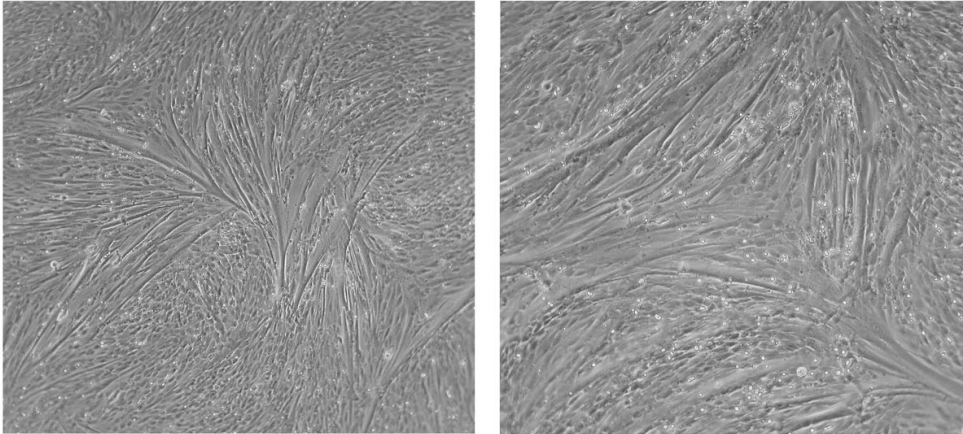
Zur Darstellung der ausdifferenzierten L6-Myotuben, wurde eine Desmin-Immunhistochemie an 10 Tage ausdifferenzierten Myotuben durchgeführt (siehe Abb. 6). Desmin ist ein muskelspezifischer Bestandteil des Zytoskeletts (Intermediärfilament). Zu sehen sind Myotuben, die aus multinukleären Strukturen bestehen und eine geordnete Myotubenausrichtung aufweisen.



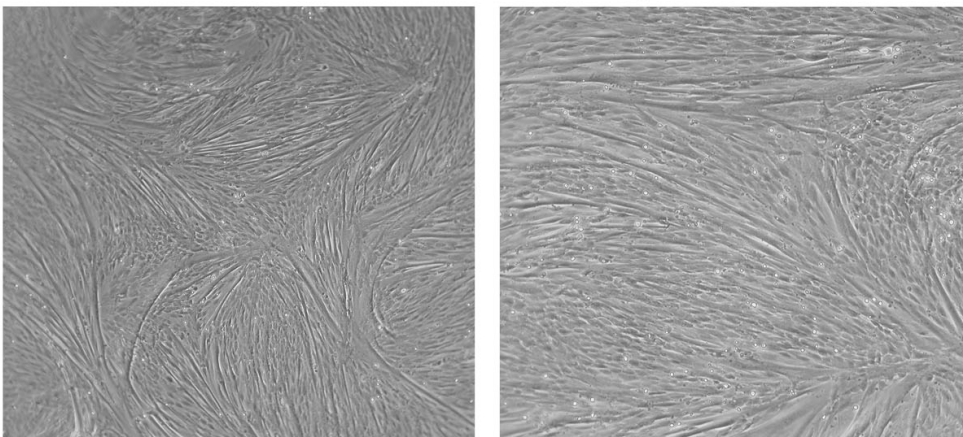
**Abbildung 6:** Immunhistochemische Darstellung von Desmin in ausdifferenzierten L6-Myotuben. 10x Objektiv.

Als experimentelles Modell der Atrophie wurden L6-Myotuben dem katabol-wirkenden Glukokortikoid Dexamethason ausgesetzt. Die Hypertrophie der Myotuben wurde durch den stärksten anabolen Wachstumsfaktor, dem IGF-1, hervorgerufen. Dabei wurden die L6-Myotuben unter serumfreien Bedingungen 48 Stunden lang mit 100 nM Dexamethason bzw. 10 ng/ml IGF-1 behandelt. Das Medium inklusive Testsubstanz wurde täglich erneuert. Das Wachstum und die Morphologie der Myotuben wurden täglich mittels der Phasenkontrast-Mikroskopie kontrolliert. Der atrophische Effekt der Glukokortikoide auf die Skelettmuskulatur war anhand der visuellen Abnahme der Myotuben erkennbar. Die anabole Wirkung der IGF-1 konnte anhand der massiven Zunahme der Muskelfasern gezeigt werden. In der Abb. 7. sind die mikroskopischen Bilder dieser morphologischen Veränderungen dargestellt. Unbehandelte Myotuben dienten als Kontrolle zu den mit Glukokortikoiden und IGF-1 behandelten Myotuben. Eine Quantifizierung der Myotubendurchmesser und dessen Abnahme bzw. Zunahme durch Glukokortikoide bzw. IGF-1 bestätigte die atrophierende bzw. hypertrophierende Reaktion (Naderi et al., 2009).

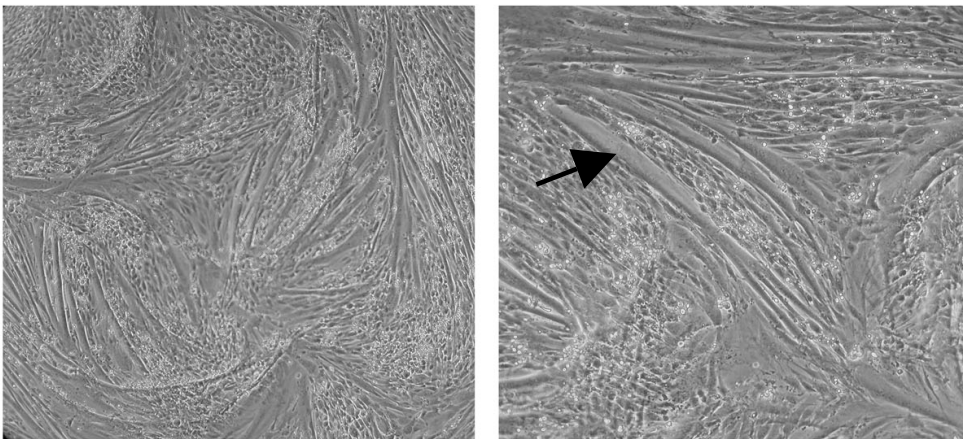
Unbehandelte L6 Myotuben (Kontrolle)



Glucocorticoid behandelte L6 Myotuben



IGF-1 behandelte L6 Myotuben



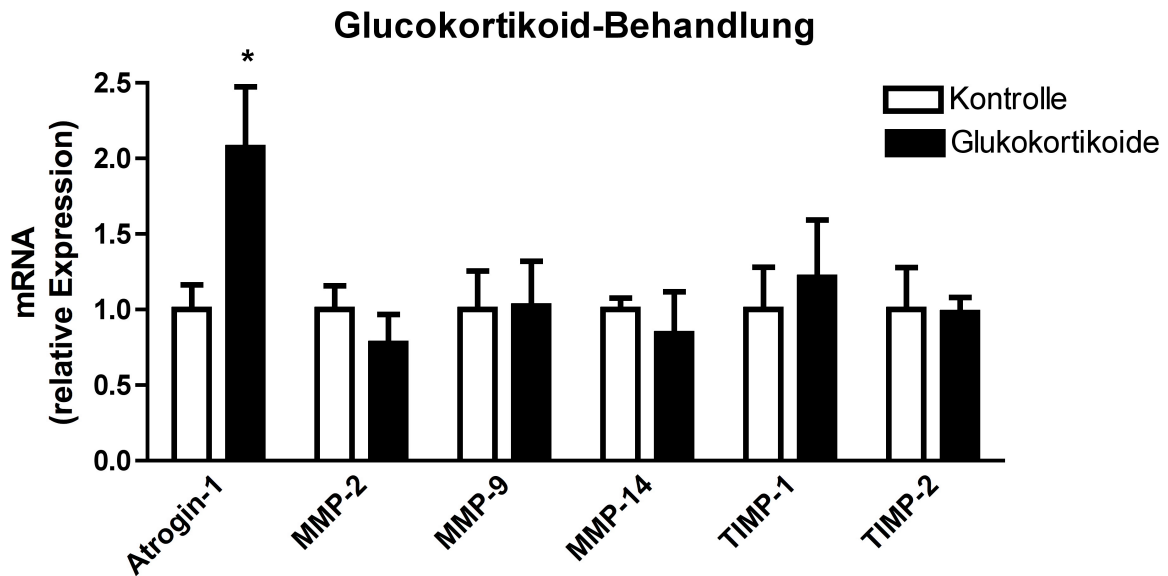
5 x Objektiv

10 x Objektiv

**Abbildung 7:** Phasenkontrast Mikroskopie von lebenden L6-Myotuben: ohne Behandlung (obere Reihe), nach 48 Stunden Behandlung mit 100 nm Dexamethason (mittlere Reihe) und nach 48 Stunden Behandlung mit 10 ng/ml IGF-1 (untere Reihe). Pfeil: Hypertrophe Muskelfaser.

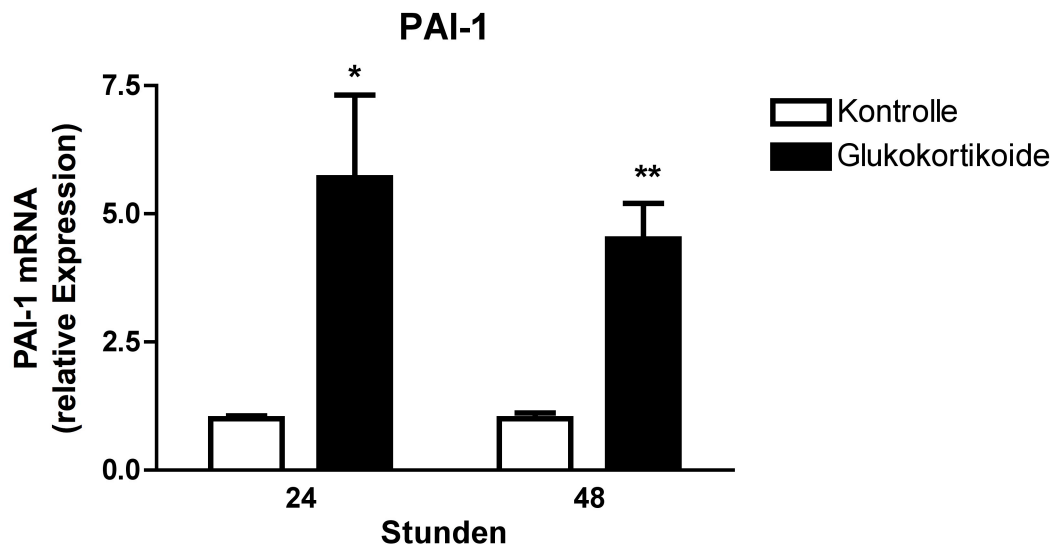
### **3.3 Veränderung der MMP-EZM Genexpression von L6-Myotuben durch die Glukokortikoid-induzierte Muskelatrophie.**

Die Genexpressionsuntersuchungen beschreiben zwei Behandlungszeitpunkte, 24 bzw. 48 Stunden. Die Ergebnisse der Glukokortikoid-vermittelten Veränderungen des MMP/TIMP Systems sind in der Abb. 8 und Tab. 6 zusammengefasst. Als Kennzeichen der Atrophie wurde die Induktion der Ubiquitin-Ligase Atrogin-1 bestimmt. Wie erwartet führte Dexamethason zu einer frühen und dauerhaften Induktion, welche nach 48 Stunden hoch signifikant war. Beide Gelatinasen (MMP-2 und MMP-9) waren jedoch in ihrer Genexpression während des Atrophieprozesses nicht signifikant verändert. Ähnlich unverändert war auch die mRNA-Menge von MMP-14 und den Inhibitoren TIMP-1 und 2. Dagegen konnte eine signifikante Abnahme der Kollagen 1 mRNA um 46% festgestellt werden.



**Abbildung 8:** Quantitative mRNA Bestimmung mittels QRT-PCR verschiedener *Targetgene* in L-6 Myotuben mit und ohne Glukokortikoid-Behandlung. Die Myotuben wurden 48 Stunden jeweils mit Dexamethason in DMSO Endkonzentration von 100 nM behandelt und mit einer Kontrollgruppe ohne Hormonbehandlung verglichen. Dargestellt sind die Durchschnittswerte relativ zur Kontrolle. SD= Standartabweichung \* $p < 0,05$ .

Interessanterweise ließ sich in der MMP-Plasminogen-Aktivierungskaskade die stärkste Veränderung feststellen. Das inhibierende Serpin PAI-1 zeigte eine hochsignifikante Zunahme um das 5-fache bereits nach 24 Stunden der Behandlung (siehe Abb.9). Trotz leichter Abnahme der Expressionsstärke nach 48 Stunden blieb eine konstante Erhöhung auf das 4-fache erhalten.



**Abbildung 9:** Genexpression von PAI-1 nach Behandlung mit Glukokortikoiden.

Quantitative mRNA-Messung von PAI-1 in L-6 Myotuben. Die Myotuben wurden 48 Stunden lang mit Dexamethason behandelt und mit einer Kontrollgruppe ohne Behandlung verglichen. Dargestellt sind die Durchschnittswerte relativ zur Kontrolle. SD= Standardabweichung \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,001$

PAI-1 spielt eine wichtige Rolle im MMP-Plasminogen-Aktivierungskaskades, in dem es die Aktivatoren (tPA und uPA) in der Aktivierungskaskade der MMP hemmt. Die Umwandlung von Plasminogen zu Plasmin findet nicht statt. Folglich entfällt die Konvertierung von Pro-MMP zu MMP durch Plasmin, was letztendlich eine Abnahme der EZM-Degradation zur Folge hat.

Targetgen	n	Kontrolle	SD	Dex	SD	Veränderung	P	
<b>Atrogin-1</b>	24 h	1	1.0	---	2.21	---	+ 121%	---
	48 h	4	1.0	0.16	2.07	0.40	+107%	0.003 *
<b>MMP-2</b>	24 h	1	1.0	---	0.84	---	-16%	---
	48 h	3	1.0	0.16	0.78	0.19	-22%	---
<b>MMP-9</b>	24 h	2	1.0	0.66	1.59	0.95	+59%	---
	48 h	4	1.0	0.25	1.03	0.30	+3%	0.902
<b>MMP-14</b>	24 h	1	1.0	---	0.85	---	-15%	---
	48 h	4	1.0	0.07	0.84	0.28	-16%	0.306
<b>TIMP-1</b>	24 h	1	1.0	---	1.33	---	+33%	---
	48 h	4	1.0	0.28	1.21	0.38	+21%	0.406
<b>TIMP-2</b>	24 h	1	1.0	---	1.14	---	+14%	---
	48 h	4	1.0	0.28	0.98	0.10	-2%	0.894
<b>Kollagen 1</b>	24 h	1	1.0	---	0.58	---	-42%	---
	48 h	4	1.0	0.13	0.54	0.20	-46%	0.008 *
<b>Kollagen 4</b>	3	1.0	0.05	1.12	0.09	+12%	---	
<b>P-4-H</b>	3	1.0	0.19	0.89	0.26	-11%	---	
<b>PAI-1</b>	24 h	4	1.0	0.06	5.63	1.88	+463%	0.004 *
	48 h	4	1.0	0.11	4.51	0.69	+351%	0.000 **

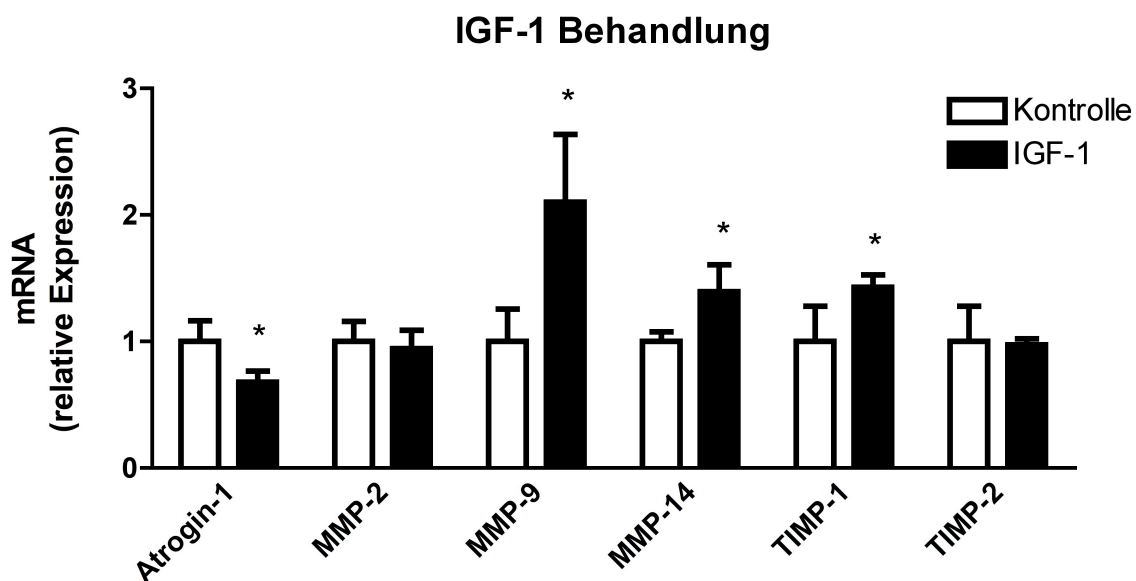
**Tabelle 6:** Glukokortikoid-vermittelte Genexpressionsveränderungen in L6-Myotuben.

Darstellung der mRNA-Expressionsstärke verschiedener *Targetgene* in L6-Myotuben nach 24 und 48 Stunden Behandlung mit dem Glukokortikoid Dexamethason (Dex). Dies wurde in serumfreiem Medium verdünnt und mit einer Endkonzentration von 100 nM eingesetzt. Es wurde jeweils der Vergleich zu einer Kontrollgruppe ohne Behandlung durchgeführt. TG= Targetgen, Dex= Dexamethason, dargestellt sind die Durchschnittswerte relativ zur Kontrolle. SD= Standardabweichung \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.001$ .



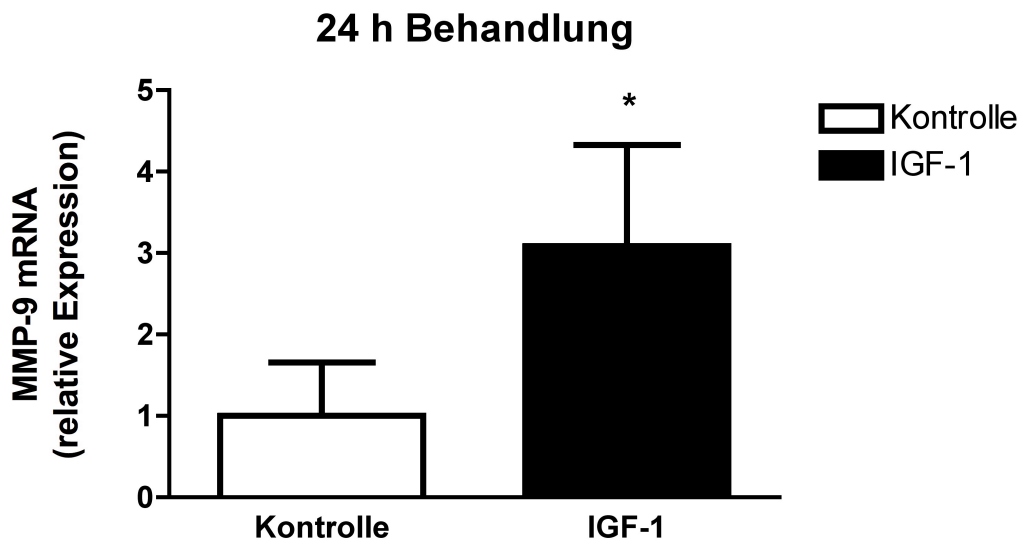
### 3.4 Veränderung der MMP-EZM Genexpression von L6-Myotuben durch IGF-1 induzierter Muskelhypertrophie.

Die Genexpressionsuntersuchungen wurden an zwei Behandlungszeitpunkten, nach 24 Stunden bzw. nach 48 Stunden, vorgenommen. Die Ergebnisse der IGF-1-vermittelten Veränderungen sind in der Abb. 10 und Tab. 7 dargestellt. Zur Kontrolle dieses Hypertrophiemodells wurde die zu erwartende Abnahme der Atrogin-1 Genexpression untersucht. Tatsächlich führte IGF-1 zu einer 30 % Verminderung der Atrogin-1 Expression nach 24 und nach 48 Stunden, wobei die Signifikanzkriterien von  $p=0,013$  erfüllt wurden.



**Abbildung 10:** Quantitative mRNA Bestimmung verschiedener *Targetgene* mittels *real-time* RT-PCR in L6-Myotuben mit und ohne IGF-1 Behandlung. Die Myotuben wurden 48 Stunden lang jeweils mit IGF-1 10 ng/ml behandelt und mit einer Kontrollgruppe ohne Behandlung verglichen. Dargestellt sind die Durchschnittswerte relativ zur Kontrolle. SD= Standardabweichung \* $p<0,05$

Die IGF-1 Behandlung führte im Gegensatz zur Atrophie zu Veränderungen des MMP-TIMP-Systems. Eine Zunahme der Genexpression zeigte der natürliche Inhibitor TIMP-1 mit einer signifikanten Zunahme von 43% nach 48 Stunden. Die membrangebundene MMP-14 zeigte einen geringeren jedoch auch signifikanten Anstieg der mRNA-Menge um 35% nach 48 Stunden der Behandlung. Die stärkste gemessene Veränderung zeigte aber MMP-9 mit einer Induktion um das 2-fache. Interessanterweise war der MMP-9-Anstieg unter diesen Hypertrophie-Bedingungen bereits nach 24 Stunden schon auf das 3-fache erhöht (siehe Abb.11).



**Abbildung 11:** MMP-9 Expressionsnachweis mittels QRT-PCR nach dreitägiger Behandlung der L-6 Myotuben mit IGF-1. Die Myotuben wurden mit IGF-1 10 ng/ml behandelt und mit einer Kontrollgruppe ohne Behandlung verglichen. Dargestellt sind die Durchschnittswerte relativ zur Kontrolle. SD= Standardabweichung \* $p < 0.05$

Die restlichen untersuchten *Targetgene* zeigten keine Veränderungen der Genexpression nach Behandlung mit dem Wachstumsfaktor IGF-1. Somit waren die Gelatinase MMP-2 und der Inhibitor TIMP-2 als auch die EZM-Komponenten Kollagen 1 und P-4-H unverändert. Im Gegensatz zu der zuvor beschriebenen

Atrophie, konnte in der IGF-1 bedingten Hypertrophie keine signifikante PAI-1 Veränderung festgestellt werden.

TG	n	Kontrolle	SD	IGF-1	SD	Veränderung	t-test <i>p</i>
<b>Atrogin-1</b>							
24 h	2	1.0	---	0.72	0.05	-28%	---
48 h	4	1.0	0.16	0.68	0.09	-32%	0.013 *
<b>MMP-2</b>							
24 h	2	1.0	---	1.01	0.01	+1%	---
48 h	3	1.0	0.16	0.94	0.15	-6%	---
<b>MMP-9</b>							
24 h	4	1.0	0.66	3.08	1.24	+208%	0.025*
48 h	4	1.0	0.25	2.10	0.53	+110%	0.010*
<b>MMP-14</b>							
24 h	2	1.0	---	0.85	0.20	-15%	---
48 h	4	1.0	0.07	1.35	0.21	+35%	0.012*
<b>TIMP-1</b>							
24 h	2	1.0	---	1.97	0.03	+97%	---
48 h	4	1.0	0.28	1.43	0.10	+43%	0.027*
<b>TIMP-2</b>							
24 h	2	1.0	---	1.08	0.11	+8%	---
48 h	4	1.0	0.28	0.97	0.05	-3%	Ns
<b>Kollagen</b>							
1	2	1.0	---	1.51	0.12	+51%	---
24 h	4	1.0	0.13	0.87	0.15	-13%	Ns
48 h							
<b>P-4-H</b>	3	1.0	0.19	1.67	0.80	+67%	---
<b>PAI-1</b>							
24 h	4	1.0	0.06	1.16	0.26	+16%	ns
48 h	3	1.0	0.11	1.14	0.16	+14%	---

**Tabelle 7:** Behandlung der L6-Myotuben mit IGF-1 im Vergleich zu der Kontrollgruppe.

Darstellung der mRNA-Expressionsstärke verschiedener *Targetgene* in L6-Myotuben nach 24 und 48 Stunden Behandlung mit dem anabolen Wachstumsfaktor IGF-1, von welchem 10 ng/ml in das serumfreie Medium gegeben wurde. Die Behandlung wurde im Vergleich zu einer Kontrollgruppe ohne Behandlung durchgeführt. Dargestellt sind die Durchschnittswerte relativ zur Kontrolle. SD= Standardabweichung, \* $p < 0.05$ .

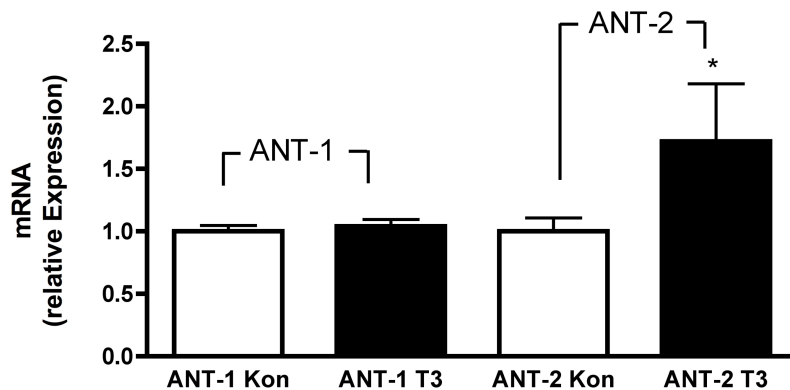
### 3.5 Einfluss des Schilddrüsenhormons T3 auf die MMP-EZM Genexpression in L6-Myotuben

In weiteren Experimenten mit L6-Myotuben wurde der Einfluss des Schilddrüsenhormons T3 auf die Genexpression des MMP-EZM-Systems getestet. Die 48-stündige Behandlung mit 100nM T3 führte zu keiner morphologisch feststellbaren Veränderung. Die gemessenen *Targetgene* zeigten ebenfalls keine signifikanten Veränderungen des MMP/TIMP-Systems, der Kollagene oder des PAI-1 (siehe Tab.8).

TG	n	Kontrolle	SD	T3	SD	Veränderung	t-test <i>p</i>
<b>Atrogin-1</b>	3	1.0	0.16	0.96	0.21	-4%	0.809
<b>MMP-2</b>	3	1.0	0.16	0.96	0.07	-4%	0.795
<b>MMP-9</b>	3	1.0	0.25	0.88	0.27	-12%	0.561
<b>MMP-14</b>	3	1.0	0.07	0.90	0.13	-10%	0.230
<b>TIMP-1</b>	3	1.0	0.28	0.94	0.07	-6%	0.737
<b>TIMP-2</b>	3	1.0	0.28	0.98	0.27	-2%	0.914
<b>Kollagen 1</b>	3	1.0	0.13	1.16	0.19	+16%	0.251
<b>Kollagen 4</b>	3	1.0	0.05	1.06	0.11	+6%	0.345
<b>Pai-1</b>	3	1.0	0.11	1.39	0.30	+39%	0.059

**Tabelle 8:** Behandlung der L6-Myotuben mit dem Schilddrüsenhormon T3 im Vergleich der Kontrollgruppe. Darstellung der mRNA-Expressionsstärke verschiedener *Targetgene* in L6-Myotuben nach Behandlung mit dem Schilddrüsenhormon T3, welches in das serumfreie Medium gegeben und mit der Kontrollgruppe ohne Behandlung verglichen wurde. Dargestellt sind die Durchschnittswerte relativ zur Kontrolle. SD= Standardabweichung.

Zur Überprüfung der T3-Responsivität, wurde die Ziellinie L6 anhand der T3-Targetgene ANT1 und -2 (*Adenin-Nucleotid-Translocator*) überprüft. Diese mitochondrial lokalisierten Proteine sind für den Austausch von ADP zu ATP verantwortlich und haben eine Herz- und Muskelspezifische (Dummler et al., 1996).



**Abbildung 12:** T3 Ansprechbarkeit von L6-Myotuben.

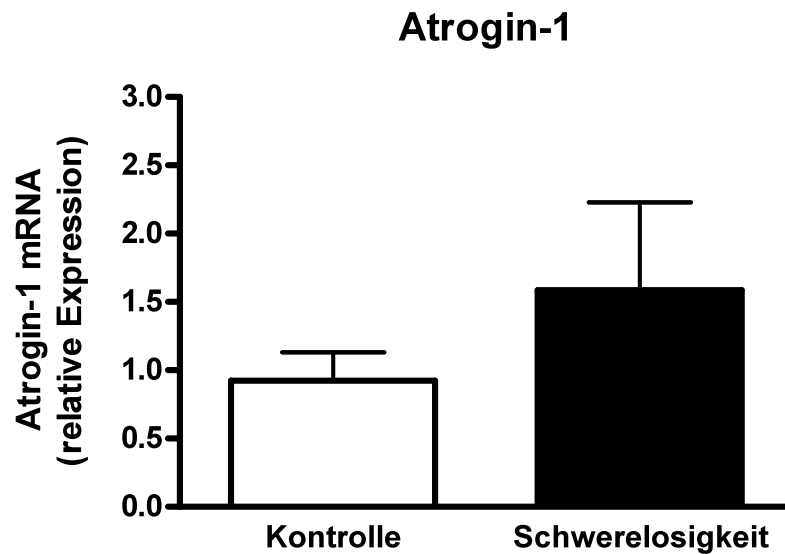
Bestimmung der ANT-1 und ANT-2 mRNA mittels QRT-PCR in L6-Myotuben unter zweitägiger Hormonbehandlung mit dem Schilddrüsenhormon T3 100 nm im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Hormonbehandlung. Dargestellt sind die Durchschnittswerte relativ zur Kontrolle. SD= Standardabweichung, \* $p < 0.05$

Die T3 induzierte Expression von ANT-2 in L6-Myotuben ist in Abb. 12 graphisch dargestellt. ANT-2 zeigt einen signifikanten ( $p=0,23$ ) Anstieg der mRNA-Menge um 72% während das ANT-1 keine Veränderung zeigte. Daraus kann man schließen, dass die L6-Myotuben eine T3-Responsivität besitzen.

### **3.6 Veränderung der MMP-EZM Genexpression des M. gastrocnemius durch Schwerelosigkeit-induzierte Atrophie**

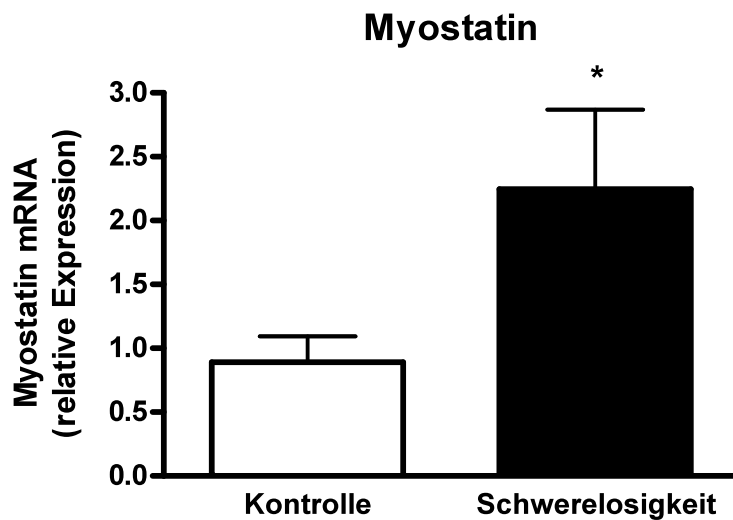
Die durch die Schwerelosigkeit induzierte Muskelatrophie des M. gastrocnemius wurde in vier Ratten untersucht. Die Tiere waren zwei Wochen lang der Schwerelosigkeit im Weltall ausgesetzt (*Spacelab Life Sciences 2/ STS-58* 1993), (siehe Kap. 2.2). Die Veränderungen der Skelettmuskulatur dieser Tiere wurden mittels Immunhistologie und MHC-SDS-PAGE untersucht und publiziert (Hansen et al., 2004). Die Ergebnisse zeigten, dass sich die Skelettmuskulatur der Ratten im Anfangsstadium des Atrophieprozesses befindet. Die hier vorgestellte mRNA-Expression verschiedener *Targetgene* wurde quantitativ bestimmt und mit Muskelproben einer stationären Kontrollgruppe verglichen.

Abbildung13 zeigt eine Zunahme von Atrogin-1 mRNA in denjenigen Muskelproben, welche der Schwerelosigkeit ausgesetzt waren. Trotz einer Zunahme um 71% im Vergleich zur Kontrollgruppe, werden hier die Signifikanzkriterien mit  $p=0,06$  grenzwertig nicht erreicht.



**Abbildung 13:** Genexpression von Atrogin-1 in vivo nach Schwerelosigkeit induzierter Muskelatrophie. Quantitative mRNA-Messung von Atrogin-1 im M. gastrocnemius (MG) der Ratte. Es wurden jeweils vier Ratten, welche zwei Wochen der Schwerelosigkeit im Weltraum ausgesetzt waren (schwarze Säule), (*Spacelab Life Sciences 2/ STS-58 1993*) mit einer Kontrollgruppe (n=4) verglichen (weisse Säule), welche unter physiologischen Bedingungen gehalten wurden.

Ein weiteres Atrophie-responsives Targetgen ist der Differenzierungsfaktor Myostatin. Zur Kontrolle des Atrophiestatus wurde auch dieses Gen in den Skelettmuskeln untersucht. Interessanterweise konnte eine signifikant erhöhte Expression ( $p=0,006$ ) von Myostatin im atrophischen Zustand nachgewiesen werden. Die starke Induktion von über 250% im Vergleich zur Kontrollgruppe verifiziert den Atrophiestatus der Tiere (siehe Abb.14).

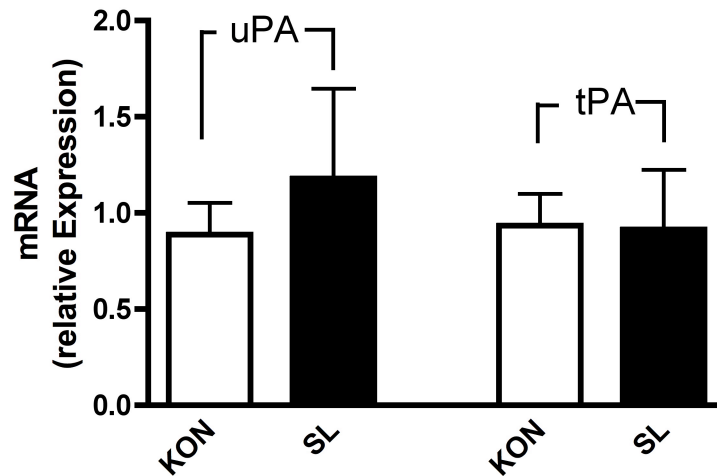


**Abbildung 14:** Genexpression von Myostatin in vivo nach Schwerelosigkeit induzierter Muskelatrophie. Quantitative mRNA-Messung von Myostatin im M. gastrocnemius (MG) der Ratte. Es wurden jeweils 4 Ratten, welche zwei Wochen der Schwerelosigkeit im Weltraum ausgesetzt waren (*Spacelab Life Sciences 2/ STS-58* 1993), mit Kontrollratten (n=4) verglichen. Dargestellt sind die Durchschnittswerte relativ zur Kontrolle. SD= Standardabweichung, \* $p < 0.05$

Die Untersuchungen der MMP im atrophischen M. gastrocnemius zeigten eine signifikante Abnahme der MMP-9 RNA-Menge um 51%. Dagegen waren keine relevanten Veränderungen der Genexpression des MMP-2 und MMP-14 zu sehen. Des Weiteren wurden Komponenten der EZM untersucht und es zeigte sich eine Reduktion der Expression des Enzyms Prolyl-4-Hydroxylase um 37%. Die Kollagene 1 und 4 zeigen keinerlei Veränderungen in der durch Schwerelosigkeit induzierten Muskelatrophie. Ebenso wurden die Genexpressionen der Aktivatoren uPA und tPA untersucht, jedoch erfüllten die Veränderungen nicht die Signifikanzkriterien (siehe Abb.15)

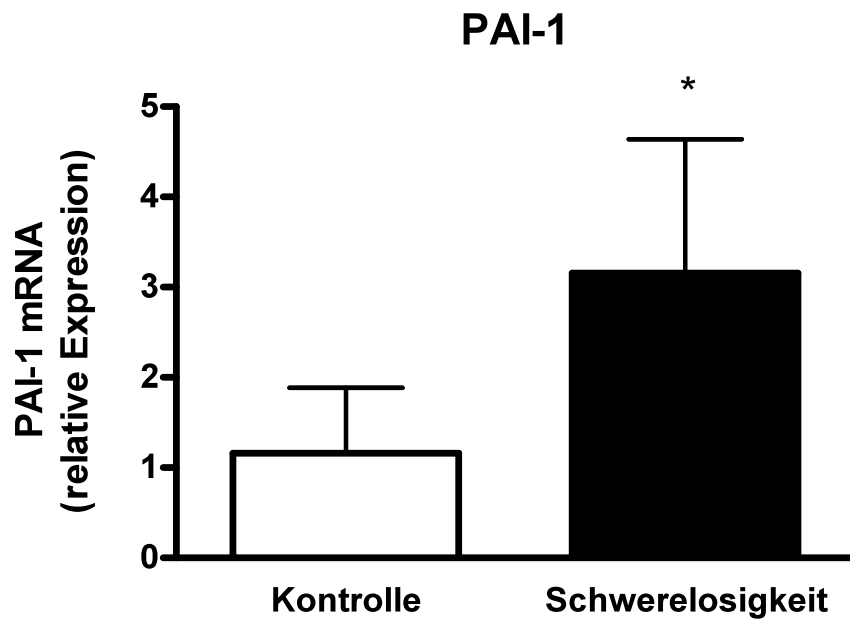


## Plasminogenaktivatoren: uPA / tPA



**Abbildung 15:** Genexpression von uPA / tPA in vivo nach Schwerelosigkeit induzierter Muskelatrophie. Quantitative mRNA-Messung von uPA und tPA im M. gastrocnemius der Ratte. Es wurden jeweils vier Ratten, welche zwei Wochen der Schwerelosigkeit (Riley et al.) im Weltraum ausgesetzt waren (*Spacelab Life Sciences 2/ STS-58 1993*) mit einer Kontrollgruppe (KON) (n=4) verglichen. Dargestellt sind die Durchschnittswerte relativ zur Kontrolle. SD= Standardabweichung.

Analog zum *in vitro* Atrophie-Modell wurde auch in vivo die Genexpression des Serpins PAI-1 bestimmt. Abb.16 und Tab. 9 zeigen eine starke und signifikante ( $p=0,032$ ) Induktion von PAI-1 in vivo. Dies entspricht einer prozentuellen Zunahme um 272% im Vergleich zur Kontrollgruppe. Es besteht somit ein vergleichbarer Anstieg der PAI-1-Genexpression zwischen dem L6-Atrophie-Modell durch GC sowie dem in vivo Atrophie-Modell am M. gastrocnemius.



**Abbildung 16:** Genexpression von PAI-1 in vivo nach Schwerelosigkeit induzierter Muskelatrophie. Quantitative mRNA-Messung von PAI-1 im M. gastrocnemius (MG) der Ratte. Es wurden jeweils 4 Ratten, welche zwei Wochen der Schwerelosigkeit im Weltraum ausgesetzt waren (*Spacelab Life Sciences 2/ STS-58 1993*) mit Kontrollratten (n=4) verglichen. Dargestellt sind die Durchschnittswerte relativ zur Kontrolle. SD= Standardabweichung, \* $p < 0.05$ .

TG	n	Kon	SD	Schwereelosigkeit MG	SD	Veränderung	t-test p
<b>Atrogin-1</b>	4	0.92	0.21	1.58	0.64	+ 71%	Ns
<b>Myostatin</b>	4	0.89	0.20	2.25	0.62	+ 252%	0.006 **
<b>MMP-2</b>	4	0.87	0.34	0.53	0.29	- 39%	Ns
<b>MMP-9</b>	4	0.93	0.27	0.46	0.26	- 51%	0.047 *
<b>MMP-14</b>	3	0.92	0.27	0.93	0.31	---	---
<b>Kollagen 4</b>	3	0.88	0.40	1.48	0.77	+ 68%	---
<b>Kollagen 1</b>	3	0.86	0.57	0.85	0.43	---	---
<b>P-4-H</b>	3	0.97	0.17	0.62	0.12	- 37%	---
<b>PAI-1</b>	4	1.16	0.73	3.16	1.48	+ 272%	0.032 *
<b>u-PA</b>	3	0.89	0.16	1.18	0.47	+ 32%	---
<b>t-PA</b>	3	0.93	0.16	0.92	0.31	---	---

**Tabelle 9:** Übersicht der untersuchten Targetgene in der durch Schwerelosigkeit induzierten Skelettmuskelatrophie in vivo.

Darstellung der mRNA-Expression verschiedener *Targetgene*, in der durch Schwerelosigkeit induzierten Muskelatrophie des M. gastrocnemius (MG) von fünf untersuchten Ratten. Es wurde mit einer Kontrollgruppe (n=4) verglichen, welche unter physiologischen Bedingungen gehalten wurde. Dargestellt sind die Durchschnittswerte relativ zur Kontrolle. SD= Standardabweichung, \* $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ , ns = nicht signifikant.

In der Tab.10 werden ausgewählte Targetgene und Ihre relativen Veränderungen in zwei verschiedenen Atrophie-Modellen miteinander verglichen. Hierbei handelt es sich um die Daten, die nach Glukokortikoid-Behandlung induzierten Muskelatrophie in L6-Myotuben sowie die durch Schwerelosigkeit hervorgerufene Muskelatrophie der Ratten *in vivo*. Der Atrophie-Marker Atrogin-1 zeigt in beiden Atrophie-Modellen eine Zunahme. In der Glukokortikoid-induzierten Atrophie ist die Zunahme nach 48 Stunden signifikant, die durch Schwerelosigkeit hervorgerufene Atrophie zeigt eine deutliche Zunahme jedoch werden die Signifikanzkriterien ( $p=0.06$ ) nicht erfüllt.

Die Metalloproteinase MMP-2 zeigt zwar eine tendenzielle Abnahme jedoch ist diese nicht signifikant. MMP-9 dagegen verhält sich widersprüchlich in beiden Modellen, unter der Glukokortikoid-Behandlung nimmt es tendenziell zu und unter Schwerelosigkeit zeigt es eine tendenzielle Abnahme welche ebenfalls nicht die Signifikanzkriterien erfüllen. Aufgrund des entgegengesetzten Verhaltens des MMP-9 kann man davon ausgehen, dass es keine relevante Rolle im Atrophieprozess einnimmt. Kollagen 4 zeigt in beiden Modellen eine nicht signifikante Zunahme der Genexpression. Kollagen 1 dagegen nimmt in der Zellkultur signifikant ab und *in vivo* sieht man keine Veränderung. P-4-H nimmt sowohl *in vitro* als auch *in vivo* nicht signifikant ab. Das PAI-1 stellt eine eindeutige und auch signifikante Zunahme sowohl in der durch Glukokortikoide als auch durch Schwerelosigkeit induzierte Muskelatrophie dar.

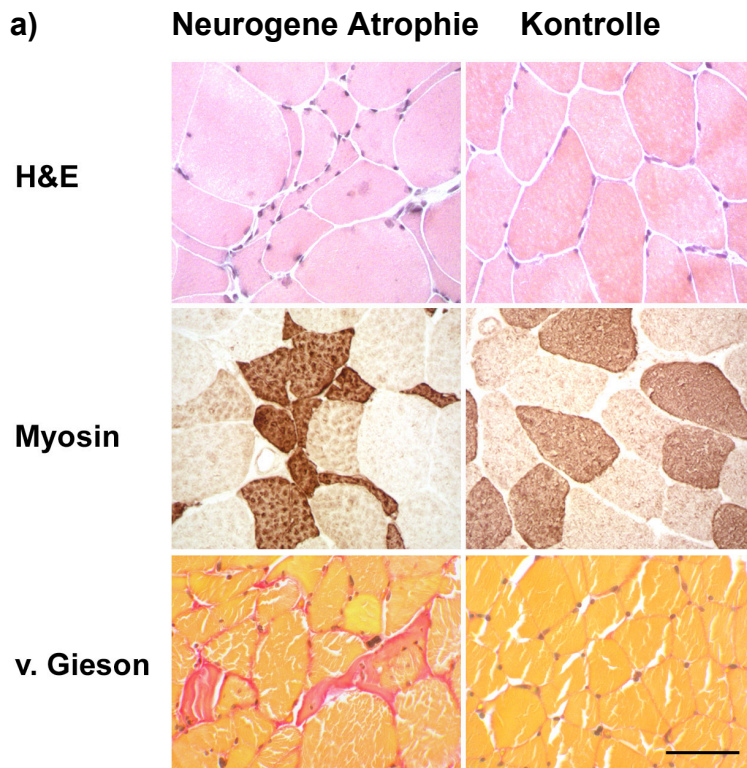
TG	Glukokortikoide % Veränderung	t-test <i>p</i>	Schwereelosigkeit % Veränderung	t-test <i>p</i>
<b>Atrogin-1</b>	(24h) + 121% (48h) +107%	ns 0.003 *	+ 71%	ns
<b>MMP-2</b>	(24h) -16% (48h) -22%	ns ns	- 39%	ns
<b>MMP-9</b>	(24h) +59% (48h) +3%	ns ns	- 51%	0.047 *
<b>Kollagen 4</b>	(24h) +12%	ns	+ 68%	ns
<b>Kollagen 1</b>	(24h) -42% (48h) -46%	ns 0.008 *	0%	ns
<b>P-4-H</b>	(24h) -11%	ns	- 37%	ns
<b>PAI-1</b>	(24h) +463% (48h) +351%	0.004 * 0.000 **	+ 272%	0.032 *

**Tabelle 10:** Vergleich der relativen Veränderungen ausgewählter Targetgene in zwei Modellen der Muskelatrophie induziert durch Glukokortikoide (L6-Myotuben) vs. Schwerelosigkeit ausgesetzten Ratten in vivo.

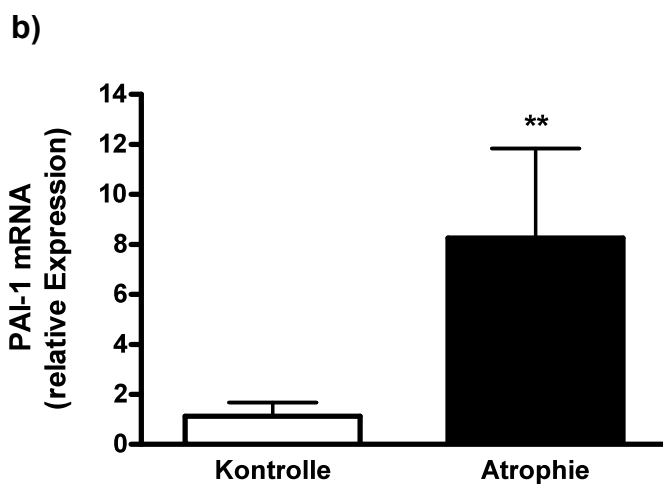
### **3.7 PAI-1 in atrophischem Skelettmuskel von Patienten**

Im letzten Teil der vorliegenden Arbeit wurde überprüft ob sich die Hauptbefunde des Nagetiermodells auf die entsprechende Situation des Menschen übertragen lassen. Hierfür wurde die PAI-1 Expression in Muskelbiopsien von Patienten mit einer neurogenen Atrophie untersucht. Die morphologische Untersuchung der Proben ist in Abb.17a dargestellt. (Die Kryofärbungen wurden im Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf, Institut für Neuropathologie von Prof. Dr. med. M. Glatzel durchgeführt). Die Atrophie ist bereits in der HE-Färbung gut zu erkennen. Die van-Gieson-Färbung zeigte noch zusätzlich die fibrotische Progression dieser Patienten. Die QRT-PCR Analyse ist in Abb.17b dargestellt und zeigte, dass auch in der humanen Muskelatrophie PAI-1 induziert wird. Interessanterweise ist die Induktion in den Patientenproben im Vergleich zu den Kontrollproben am stärksten (8-Fach erhöht,  $p < 0.001$ ).

**Abbildung 17 a) und b):** Analyse von Biopsien des M. vastus lateralis von Patienten im Alter von 37 bis 70 Jahren (Durchschnitt 55 Jahre, n=7) mit diagnostizierter neurogener Muskelatrophie. Die Kontrollbiopsien von gesunden Menschen mit gleicher Altersverteilung zeigten keine pathologischen Veränderungen (n=5).



**a) Morphologie der humanen Skelettmuskelatrophie**  
 HE-Färbung. (obere Reihe) und immunohistochemische Färbung für Myosin Typ II (mittlere Reihe) zeigen atrophische Muskelfasergruppen in den Proben von Patienten mit neurogener Atrophie (linke Reihe). Diese Veränderungen sind in den Kontrollgruppen nicht vorhanden (rechte Spalte). Die van-Gieson-Färbung (untere Reihe) wurde zur Darstellung der fibrotischen Entwicklung des atrophierenden Skelettmuskels durchgeführt. Skalierung=20µm



**b) Genexpression von PAI-1 in der humanen Skelettmuskelatrophie neurogener Genese.** PAI-1 mRNA wurde in Biopsien mithilfe des QRT-PCR bestimmt. PAI-1 Werte wurden auf das Housekeeping Gen GAPDH normalisiert und mit der Kontrollgruppe verglichen (weiße Säule). Dargestellt sind die Durchschnittswerte und ihre Standardabweichung.

\*\*p<0.001

## **4. Diskussion**

In der vorliegenden experimentellen Studie wurde die Homöostase der extrazellulären Matrix (EZM) im Rahmen eines Modells für die Atrophie und die Hypertrophie der Skelettmuskulatur (SKM) untersucht. Hierfür wurde die Genexpression verschiedener Matrix Metalloproteinasen (MMP), ihre natürlichen Inhibitoren (TIMP), einzelner EZM-Hauptkomponenten sowie Komponenten der MMP-Plasminogen-Aktivierungskaskade mittels quantitativer RT-PCR (QRT-PCR) ermittelt. Die festgestellten Veränderungen und ihre mögliche Implikation auf den gesamten Organismus werden im Folgenden diskutiert.

### **4.1 MMP-TIMP-Expressionsmuster im Muskel**

Zu Beginn der Arbeit wurde das MMP-TIMP-Expressionsmuster in den verschiedenen Muskeltypen analysiert. Wie aus der Literatur (Johnson, 2007) bekannt war, konnten alle getesteten MMP (Kollagenasen: MMP-1 und -13, Gelatinasen: -2 und -9, Stromelysin: -3 sowie das membrangebundene MMP-14) in den glatten Muskelzellen der Ratte nachgewiesen werden. Dagegen waren die Kollagenasen (MMP-1, -13) weder im Herzen noch in der Skelettmuskulatur der Ratte detektierbar. In anderen Spezies wurde die Expression von MMP-1 beschrieben, wie beispielsweise im Herzmuskel des Schweins (Danielsen et al., 1998) oder in der SKM der Maus (Gack et al., 1994). Eine kanadische Forschungsgruppe konnte in der SKM des Rindes die Degradation von Kollagen 1 nachweisen, was ebenfalls für das Vorliegen von Kollagenasen spricht (Balcerzak et al., 2001). Die Expression der Kollagenasen scheint demnach ein Spezies-spezifisches Phänomen darzustellen, des Weiteren sind auch andere MMP für ihre kollagenolytische Funktion beschrieben worden. Dagegen konnten die Gelatinasen in



vielen Spezies nachgewiesen werden (Ahtikoski et al., 2004), (Kherif et al., 1999), (Balcerzak et al., 2001). Der Nachweis von MMP 2, -9, -14 in der SKM entspricht den Erwartungen, wie sie von Carmeli et al. beschrieben worden sind (Carmeli et al., 2004). Man geht davon aus, dass die MMP-Expression im Skelettmuskel essentiell für die Myoblasten-Migration ist und dass dafür die Aktivierung von MMP-2 durch MMP-14 eine wichtige Rolle spielt (Carmeli et al., 2004).

Eine unterschiedliche MMP-Expression zwischen dem Skelettmuskel und der in vitro erzeugten reinen L6-Myotubenkulturen betraf lediglich das Stromelysin MMP-3. Es wird angenommen, dass die Expression von Stromelysin (MMP-3) auf andere Zellen, wie Fibroblasten, Endothelzellen oder auch den Satellitenzellen zurückzuführen ist (Balcerzak et al., 2001),(Guerin and Holland, 1995). Diese Zellen fehlen in den L6-reinen Myotuben Kulturen.

Das Verteilungsmuster der natürlichen Inhibitoren war dem der MMP ähnlich (Carmeli et al., 2004). Während die glatten Muskelzellen ebenfalls alle TIMP exprimierten, konnte in der SKM nur TIMP-1 und -2 nachgewiesen werden. Balzerack et. al. detektierten neben den Inhibitoren TIMP-1, -2 auch TIMP-3 in der SKM des Rindes (Balcerzak et al., 2001). Interessanterweise konnte TIMP-4 nur im Herzen nachgewiesen werden. Dieses Resultat entspricht den Studien, in denen TIMP-4 entdeckt wurde (Rahkonen et al., 2002), (Greene et al., 1996). Neuere Studien sprechen für eine kardioprotektive Funktion von TIMP-4 (Schulze et al., 2003). Im Gegensatz zur selektiven Expression von MMP/TIMP im SKM und im Herzen, exprimieren die glatten Muskelzellen eine große Vielfalt an MMP/TIMP Vertretern. Das könnte sich aus ihrer starken migratorischen Eigenschaft und den damit verbundenen Veränderungen der EZM erklären lassen, wie sie beispielsweise im Rahmen der physiologischen Angiogenese notwendig ist (Haas et al., 2000).

## 4.2 Die Wirkung der Glukokortikoide auf die EZM-Homöostase

Im Gegensatz zur gut untersuchten Rolle des MMP-Systems in der Zellmigration ist dessen Datenlage in der Muskeladaptation nur wenig bekannt. Als experimentelles Modell wurden L6-Myotuben mit katabol- bzw. anabol-wirkenden Substanzen behandelt. Das Glukokortikoid Dexamethason wurde zur Induktion der Muskelatrophie herangezogen, während die hypertrophe Reaktion durch den anabol wirkenden Wachstumsfaktor IGF-1 hervorgerufen wurde. Darüber hinaus wurde zur Verifizierung der atrophen bzw. hypertrophen Reaktion konsequent die Genexpression von Atrogin-1 bestimmt. Atrogin-1 ist eine seit 2001 bekannte E3-Ubiquitin-Ligase und markiert diejenigen Muskelproteine, welche im Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) degradiert werden sollen. Somit reflektiert sie den Aktivierungsgrad des UPS.

Die Glukokortikoid-Behandlung der L6-Myotuben führte wie erwartet zu einem Anstieg der Atrogin-1 Expression. Im Rahmen des MMP-TIMP-Systems waren jedoch keine aussagekräftigen Veränderungen auf mRNA-Ebene zu verzeichnen. Dieses Resultat korrespondiert mit den einzig publizierten Untersuchungen der Glukokortikoid induzierten Muskelatrophie (Ahtikoski et al., 2004), (Koskinen et al., 2001). Obwohl in dieser in vivo Studie eine Veränderung der MMP mRNA-Menge beschrieben wurde, konnte diese auf Proteinebene nicht bestätigt werden. Zum jetzigen Wissensstand ist nicht bekannt, ob die MMP Promotoren ein Glukokortikoid-Responsives-Element (Greene et al.) besitzen. Unsere Daten sprechen dafür, dass das MMP-TIMP System im SKM keinem direkten Einfluss durch Glukokortikoiden unterliegt. Die untersuchten EZM-Komponenten zeigten eine Abnahme des Kollagens 1 mRNA-Gehalts im L6-Atrophie-Modell. Eine finnische Studie veröffentlichte ähnliche Resultate, welche nach kurzzeitiger Immobilisation eine

Abnahme der Prokollagene und auch der fibrillären Kollagene 1 und 3 sowie des Enzyms P-4-H auf mRNA-Ebene als auch auf Proteinebene zeigten (Han et al., 1999). Es wurde postuliert, dass die prätranslationale Runterregulation der Kollagensynthese eine bedeutende Rolle im Rahmen der Muskelatrophie spielt.

Im Gegensatz zu den eher geringen Veränderungen der Kollagene und der unveränderten Genexpression der MMP während der Myotuben-Atrophie konnte eine starke und langanhaltende Veränderung in der übergeordneten MMP-Plasminogen-Aktivierungskaskade festgestellt werden. Die Induktion des Serpins PAI-1 ist in der SKM bis dato nicht beschrieben worden. Auch dessen Funktion und Regulation ist im Skelettmuskel unbekannt. Insofern lässt sich die Regulation von PAI-1 nur mit anderen Zellsystemen vergleichen. Aus diesen Studien konnte ein GRE im PAI-1 Promotor der Ratte nachgewiesen werden (Bruzdinski et al., 1993). Die Sequenzierung des humanen PAI-1-Gens zeigte ebenfalls regulatorische Elemente für Glukokortikoide in der Promoter-Region (Ricchio et al., 1988). Mittlerweile wird PAI-1 auch als ein Stressprotein beschrieben (Yamamoto et al., 2002). Insgesamt aber entsteht ein überaus komplexes und zum Teil noch ungeklärtes Bild über dessen Funktion (Dellas and Loskutoff, 2005). PAI-1 hemmt die Aktivatoren (uPA und tPA) und damit die Umwandlung von Plasminogen zu Plasmin. Die Aktivierung der in die EZM sezernierten Pro-MMP in die aktive Form wird durch Plasmin bewerkstelligt. Dies führt zu einer Verlangsamung des EZM-*Turnovers*, woraufhin eine Akkumulation der EZM-Komponenten entstehen und folglich eine fibrotische Entwicklung zustande kommen könnte.

Neben seiner Rolle als Inhibitor der Plasmingenerierung, übt PAI-1 durch seine Interaktion mit dem uPA / uPA-Rezeptor-System einen bedeutenden Einfluss auf die Zellmigration aus (Czekay et al., 2003) Dieser grundlegende zellbiologische Vorgang

bildet die Grundlage der Wundheilung (Romer et al., 1996) und der Regeneration der SKM (Lluis et al., 2001), des Lebergewebes (Shimizu et al., 2001) und des Lungenparenchyms (Sisson et al., 2002), aber auch der metastasierung von Tumorzellen (Seebacher et al., 1992). In einer experimentellen Studie wurde die mRNA und die Protein-Expression verschiedener Gene in der Plasminogen-Aktivierungs-Kaskade während der Skelettmuskeldifferenzierung analysiert. Undifferenzierte, migrierende Myoblasten zeigten einen hohen mRNA-Gehalt der uPA Rezeptoren (uPAR). Während des Differenzierungsprozesses der Myoblasten nahm die uPAR mRNA-Menge ab. Die Hemmung der uPA/Plasmin Aktivität durch Protease Inhibitoren, u.a auch PAI-1, stimulierte die Myoblastendifferenzierung (Wells and Strickland, 1997). Diese Daten weisen auf die komplexe Verwicklung des PAI-1 Systems in der Myotubenentwicklung hin, wie sie auch in der Muskelregeneration vorkommt.

Diese Funktion von PAI-1 in der Myotubenentstehung kann in dem vorgestellten Atrophiemodell weitestgehend ausgeschlossen werden, da die Myotuben ausdifferenziert waren und außerdem die Stimulation unter serumfreien Bedingungen durchgeführt wurde. Unter diesen Bedingungen sind weder fusionierende noch migrierende Zellen zu erwarten. Es scheint, dass PAI-1 noch weitere Funktionen ausübt, welche im Rahmen der Atrophie noch unbekannt sind.

### 4.3 Die Wirkung des IGF-1 auf die EZM-Homöostase

Die anabole Wirkung des IGF-1 ließ sich morphologisch gut dokumentieren und führte auch wie beschrieben (Guttridge, 2004) zu einer Abnahme der Genexpression von Atrogin-1. Hierfür wird der Einfluss von IGF-1 auf die PI3K-AKT-Kaskade verantwortlich gemacht. Hoffmann et al. fasst diese Signalwege auf übersichtliche Weise zusammen (siehe Abb.1 in Einleitung).

Im Gegensatz zum unveränderten MMP/TIMP-Bild während der Glukokortikoid-vermittelten Atrophie führte die IGF-1-Behandlung zu einer verstärkten Genexpression mehrerer MMP-*Targetgene* (MMP-9, -14 und TIMP-1), von denen die MMP-9-Induktion die stärkste war. Die untersuchten EZM-Komponenten, sowie PAI-1 waren dagegen unverändert. Ein Teil dieser Befunde wurde zuvor ähnlich beschrieben (Allen et al., 2003), jedoch in einem anderen Zusammenhang interpretiert. Während Lafreniere et al. die MMP-9 Induktion durch IGF-1 als Zeichen einer verstärkten Migration von Myoblasten betrachtete und hierfür in vitro und in vivo Versuche einsetzte, ist in unserem Zellsystem eine Migration von Myoblasten recht unwahrscheinlich. Die lange Differenzierungsphase der L6-Myotuben unter serumreduzierten Bedingungen gefolgt von der mehrtägigen serumfreien Experimentierphase führte zum Absterben der meisten nicht fusionierten Myoblasten. Es ist aber auch nicht auszuschließen, dass IGF-1 die restlichen Myoblasten zur Migration anregt, dieser Prozess wäre jedoch mit einer Induktion von PAI-1 als Migrationsmarker verbunden. Diese Induktion konnte in den durchgeführten Untersuchungen nicht festgestellt werden. Demzufolge könnte die MMP-9-Induktion zusammen mit der Steigerung von MMP-14 zu einem verstärkten EZM-Abbau führen. Die gleichzeitige Induktion von TIMP-1 ist der Induktion nicht widersprüchlich, sondern ein häufig beobachtetes Phänomen, welches als gegenregulatorische

Maßnahme interpretiert wird, um eine überschießende Proteolyse zu verhindern (Carmeli et al., 2004). Die Bedeutung eines gesteigerten EZM-Abbaus des hypertrophen Muskels lässt sich nicht einfach erklären. Ob die Zunahme der Myotubengröße den EZM-Abbau induziert oder dieser nur eine indirekte Folge ist, lässt sich nur mit weiteren Experimenten erklären.

#### **4.4 Die Wirkung des Schilddrüsenhormons T3 auf die EZM-Homöostase**

Neben den Glukokortikoiden sind die Schilddrüsenhormone sogenannte *Nuclear acting hormones* mit einer darüber hinaus wichtigen Bedeutung für den Stoffwechsel des Skelettmuskels. Der Einfluss von T3 auf die Veränderungen der Muskelgröße ist jedoch weiterhin unklar, sodass den Schilddrüsenhormonen ein permissiver Effekt zugeteilt wird (Sultan et al., 2006). Inwieweit dieser Effekt auch die EZM-Homöostase beeinflusst, wurde zu unseren Kenntnissen noch nicht publiziert. Im Proteinstoffwechsel des Organismus führt eine physiologische Hormonkonzentration des T3 zu einer positiven Stickstoffbilanz und wirkt somit anabol. Erhöhte Hormonkonzentrationen wirken dagegen katabol und fördern den Proteinabbau. In unseren Untersuchungen konnten keine Effekte von T3 auf das MMP/TIMP-System gezeigt werden. Da jedoch ein Verlust der T3-Responsivität in Zellkultursystemen bekannt ist, wurde diese in der L6- Zelllinie überprüft. Die T3 abhängige Induktion der mitochondrialen Proteine der ANT-Familie (*Adenin-Nucleotid-Translocator*) (Dummler et al., 1996) wurde in dieser Arbeit durchgeführt. ANT-1 und ANT-2 sind für den Austausch von ADP zu ATP verantwortlich sind. Sie haben eine Herz- und Muskelspezifische Expression und werden durch T3 stark induziert. Wir konnten die Dominanz der ANT-1 Isoform im Herzmuskel sowie das ubiquitäre Auftreten der

ANT-2 Isoform bestätigen. Unter der Behandlung von T3 zeigte sich eine Induktion von ANT-2, insofern konnte die T3-Responsivität der L6-Myotuben gezeigt werden. Es ist somit zu vermuten, dass das Schilddrüsenhormon T3 keinen gravierenden Einfluss auf die EZM-Homöostase der SKM besitzt.

#### **4.5 Schwerelosigkeit induzierte Skelettmuskel-Atrophie**

Die stärkste Veränderung, welche im Myotubensystem erfasst wurde, ist die Induktion des Serpin PAI-1. Inwieweit diese Induktion im Zusammenhang mit der Atrophie steht oder Glukokortikoid-abhängig ist, kann in dem in vitro Modell nicht einfach geklärt werden. Aus diesem Grund wurde ein in vivo Modell untersucht, in dem die Atrophie durch die Schwerelosigkeit ausgelöst wurde. Hierfür wurden 4 Skelettmuskelproben von Ratten untersucht, welche 2 Wochen im Spaceshuttle stationiert waren und mit stationären Kontrollproben verglichen wurden. Diese Proben wurden bereits von der Arbeitsgruppe um Prof. Charles T. Putman auf andere Eigenschaften hin untersucht. In dieser Arbeit wurde die Atrophie morphologisch bestätigt und quantifiziert. (Hansen et al., 2004)

Diese Muskelproben wurden in der vorliegenden Arbeit nun mit molekularen Methoden untersucht. Der Grad der Atrophie wurde wie im L6-Myotubenmodell durch die Induktion der E3-Ubiquitin-Ligase Atrogin-1 überprüft. Im Gegensatz zu der Myotubenatrophie konnte zwar eine Zunahme der Atrogin-1 mRNA-Menge festgestellt werden, jedoch nicht auf signifikanter Ebene. Im Gegensatz dazu zeigte die Untersuchung eines weiteren Atrophiemarkers, der Differenzierungsfaktor Myostatin (Joulia-Ekaza and Cabello, 2006), eine signifikant erhöhte Expression im M. gastrocnemius der Tiere, die der Schwerelosigkeit ausgesetzt waren. Die unterschiedliche Induktion von Atrogin-1 und Myostatin kann durch mehrere Faktoren

bedingt sein. Zum einen ist der Atrophieverlauf beider Modelle unterschiedlich schnell (48 Stunden versus 2 Wochen), zum anderen bestehen unterschiedliche Induktoren (Glukokortikoide versus Schwerelosigkeit). Es kann davon ausgegangen werden, dass je nach Atrophieursache und Verlauf die Balance der Proteinsynthese und / oder des Abbaus an unterschiedlichen Stellen verändert ist.

Die Untersuchungen der MMP- und EZM-Kandidaten in den atrophischen Muskeln ergaben jedoch keine gravierenden Veränderungen in der Expression. Die Schwerelosigkeit induzierte Muskelatrophie zeigte eine leichte aber dennoch signifikante Abnahme der Expression der Gelatinase MMP-9 und des Enzyms Prolyl-4-Hydroxylase. Die biologische Bedeutung dieser Abnahmen ist unklar und lässt sich auch nicht in den atrophierenden L6-Myotuben feststellen. Im Gegensatz zu den unauffälligen Veränderungen im MMP-EZM-System war ähnlich wie im L6-Myotubenmodell eine deutliche PAI-1 Induktion im atrophischen M. gastrocnemius festzustellen. Die Analyse der PAI-1-Interaktionspartner, uPA und tPA, ergab keine signifikanten Expressionsveränderungen, so dass eine kompensatorische PAI-1-Induktion in den der Schwerelosigkeit ausgesetzten Ratten ausgeschlossen werden konnte. Es stellt sich somit die Frage, welche Auswirkungen eine PAI-1-Induktion im atrophischen Skelettmuskel hat.

In nicht-atrophierenden Skelettmuskelveränderungen konnte festgestellt werden, dass PAI-1 und uPA / tPA eine entscheidende Rolle in der Muskelregeneration besitzen. Man nimmt an, dass uPA die Proliferation, Migration und Fusion der Satellitenzellen stimuliert (Fibbi et al., 2001), (Fibbi et al., 2002), (Munoz-Canoves et al., 1997). Desweiteren konnte eine erhöhte Expression von uPA und PAI-1 im verletzten Skelettmuskel gezeigt werden (Festoff et al., 1994), (Lluis et al., 2001). Insofern scheint dieses System während der Myogenese eine Rolle zu spielen. Wie



bereits zu Beginn der Diskussion erwähnt, können fusionsabhängige Vorgänge im L6-Myotubenmodell ausgeschlossen werden. Darüberhinaus sind diese Vorgänge nicht in den untersuchten *Space-shuttle* Proben aufgefallen (Hansen et al., 2004). Insofern scheint PAI-1 weitere Funktionen auszuüben. Dafür sprechen auch seine oft beschriebenen vielseitigen Eigenschaften.

Die (patho)physiologische Induktion von PAI-1 im atrophischen Skelettmuskel könnte u.a. auch Auswirkungen auf dessen Stoffwechsel haben. So konnte auf molekularer Ebene ein verstärkter Stoffwechsel (Induktion des *uncoupling protein 3*, UCP-3 und des Transkriptionsfaktors *peroxisome proliferator-activated receptor gamma*, PPAR- $\gamma$ ) in PAI-1-Gen-defizienten Mäusen nachgewiesen werden (Ma et al., 2004). In diesen Tieren konnte interessanterweise experimentell keine Fettleibigkeit oder eine Insulin-Resistenz induziert werden. Insofern kann nur spekuliert werden, dass PAI-1 über noch unbekannte Mechanismen einerseits den Stoffwechsel drosseln und damit den Atrophieprozess verlangsamen könnte.

#### **4.6 Neurogene Muskelatrophie im Menschen**

Abschließend wurde der Hauptbefund aus den Tiermodellen in der humane Situation überprüft. Patienten mit einer neurogenen Muskelatrophie zeigten auch eine stark erhöhte PAI-1 Genexpression in den untersuchten Muskelbiopsien. Diese Resultate bestätigen die biologische Relevanz der aus den Myotuben und Ratten erhobenen Daten.

## 4.7 Systemische Auswirkungen von PAI-1

Neben der oben genannten Funktion des PAI-1 als Migrationsmarker ist auch bekannt, dass es die plasminkatalysierte Fibrinolyse beeinträchtigen kann. PAI-1 ist der primäre physiologische Inhibitor der tPA und uPA (tissue-type- und urokinase-like- Plasminogenaktivator) und hemmt neben der Fibrinolyse auch die Proteolyse. Man geht davon aus, dass eine PAI-1 Erhöhung mit der Entstehung von Thrombose, Fibrose und einer Insulinresistenz assoziiert ist.

PAI-1 kann zwar von vielen Zellen synthetisiert werden, man geht aber davon aus, dass das zirkulierende PAI-1 von Endothelzellen produziert und sezerniert wird. Neuere Arbeiten weisen darauf hin, dass auch andere Organsysteme, wie z.B. das Fettgewebe oder die Leber, PAI-1 sezernieren (Thornton et al., 1994), (Van Gaal et al., 2006). Unsere Ergebnisse legen nahe, dass auch der Skelettmuskel zu den PAI-1-sezernierenden Organen gehört. Durch die große Gesamtmasse der Skelettmuskulatur können auch kleinere Änderungen der PAI-1-Genexpression von pathophysiologischer Relevanz sein. Die Skelettmuskelatrophie kann somit über eine vermehrte Synthese und Freisetzung von PAI-1 systemische Auswirkungen haben.

Interessanterweise wird die von uns vertretene Auffassung im Umkehrschluss durch die Ergebnisse der STRRIDE-Studie unterstützt. Im Rahmen dieser klinischen Untersuchung wurde das Genexpressionsmuster des Skelettmuskels vor und nach einem definierten Trainingsprogramm mittels Transkriptomanalyse bestimmt. So konnte in diesem Zusammenhang gezeigt werden, dass die Zunahme physikalischer Aktivität bei Patienten mit Symptomen des metabolischen Syndroms zu einer Abnahme der PAI-1-Konzentration sowohl im Skelettmuskel als auch im Serum führte (Hittel et al., 2003). In einer weiteren Studie konnte eine positive Korrelation zwischen dem Anteil langsamer Typ-I-Fasern und dem Serum-HDL-Cholesterin und

eine negative Korrelation mit Serum-Triglyzeriden und PAI-1 gezeigt werden. Diese Korrelation bestand mit umgekehrten Vorzeichen für den Anteil an schnellen Typ-IIB-Fasern (Hedman et al., 2002).

Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass eine erhöhte Muskelaktivität (d.h. ein hoher Anteil an oxidativen Muskelfasern) mit einer Verringerung von PAI-1-Serumkonzentrationen korreliert, während die muskuläre Inaktivität mit einer PAI-1-Induktion einhergeht. Diese Befunde lassen sich sehr gut mit der hier vorgestellten Arbeit verbinden, da die Inaktivität eine Hauptursache der Atrophie darstellt. Darüberhinaus zeigen diese Befunde, dass der inaktive bzw. atrophische Skelettmuskel mit dem erhöhten PAI-1-Spiegel in Zusammenhang steht.

## 5. Zusammenfassung

Die Skelettmuskulatur (SKM) besitzt ein außerordentlich hohes adaptives Potential, welches nicht nur auf seiner regenerativen Fähigkeit beruht, sondern auch auf Veränderungen der Muskelfasergröße. Die Rolle der Extrazellulären Matrix (EZM) ist in diesen Prozessen noch weitestgehend unklar. Sowohl in der alterungsabhängigen Atrophie als auch in rezidivierenden de- und regenerativen Prozessen werden immer wieder fibrotische Komplikationen beobachtet.

Ziel dieser Arbeit war es, die an der Homöostase der EZM beteiligten Systeme im atrophen und hypertrophen Skelettmuskel zu untersuchen. Hierfür wurde die Glukokortikoid-induzierte Atrophie bzw. die IGF-1-induzierte Hypertrophie in L6-Myotuben in vitro untersucht. Desweiteren wurde die Schwereelosigkeit-induzierte Atrophie in einem Tiermodell geprüft. Der Grad der Atrophie bzw. Hypertrophie wurde in allen Modellen anhand der Genexpression der E3-Ubiquitin-Ligase Atrogin-1 und des Differenzierungsfaktors Myostatin bestimmt. Die Genexpression verschiedener EZM-Komponenten wurde mittels der quantitativen (Q)RT-PCR untersucht, um dauerhafte Verschiebungen der EZM-Hoömostase zu ermitteln. Hierfür wurden die Metalloproteinasen (MMP-2, MMP-9 und MMP-14), ihre natürlichen Inhibitoren (TIMP-1 und -2) und das Kollagen 1 bzw. 4 sowie das kollagenmodifizierende Enzym (P-4-H) untersucht. Darüberhinaus wurde das MMP-regulierende Plasminogen-Aktivierungssystem (uPA und tPA und ihr Inhibitor PAI-1) analysiert.

Die mit IGF-1 behandelten hypertrophen L6-Myotuben waren von einer Verdreifachung der MMP-9 Expression begleitet. Diese Induktion könnte zu einer antifibrotischen Veränderung führen. Die Glukokortikoid-induzierte Atrophie der L6-

Myotuben konnte zwar mit einer signifikanten Verdopplung der Atrogin-1 Expression verifiziert werden, jedoch waren keine erheblichen Veränderungen der EZM-MMP-Komponenten festzustellen. Die durch Schwerelosigkeit-induzierte Atrophie im Tiermodell bestätigte die L6-Ergebnisse in vitro. Interessanterweise scheint diese Form der Atrophie weniger Atrogin-1-abhängig zu sein, da nur die Genexpression von Myostatin in den *space-shuttle*-Skelettmuskelproben eine signifikante Induktion zeigte. Die hier erstmals beobachtete unterschiedliche Beteiligung von Atrogin-1 und Myostatin in den Atrophiemodellen verdeutlicht die Komplexität der Balance der Proteinsynthese und des Abbaus.

Im Gegensatz zu den eher geringen Veränderungen der EZM-MMP-Komponenten während der Atrophie konnte eine starke Veränderung des übergeordneten MMP-Aktivierungs-Systems sowohl in vitro als auch in vivo festgestellt werden. Die PAI-1 Expression war in der Myostatin-abhängigen Atrophie 3-fach und in der Atrogin-1 abhängigen L6-Atrophie um mehr als das 4-fache erhöht. Darüberhinaus konnte die PAI-1 Induktion auch in atrophischen Muskelproben des Menschen bestätigt werden. Die neurogene Atrophie führte zu einer hochsignifikanten 8-fachen PAI-1 Erhöhung. Interessanterweise zählt PAI-1 zu den Risikofaktoren des Diabetes mellitus Typ 2. Neuere Untersuchungen bei Patienten mit metabolischem Syndrom zeigten eine positive Korrelation zwischen physikalischer Aktivität und der Abnahme der PAI-1-Konzentration sowohl im Skelettmuskel als auch im Serum. Diese Ergebnisse verdeutlichen erstmalig die Gefahren einer Atrophie, wie sie auch bei verminderter Muskelaktivität vorkommt. In Anbetracht der Gesamtmasse dieses Gewebes könnte auch eine geringe Induktion zu einer erheblichen Zunahme des zirkulierenden PAI-1 führen.

## 6. Abkürzungsverzeichnis

**Akt** = Proteinkinase B

**BLASTN** = Basic Local Alignment Search Tool Nucleotide

**CNS** = chronisch niederfrequente Stimulation

**Ct-Wert** = Threshold Cycle/ "Schwellenwert-Zyklus", auch **Cp-Wert** = Crossing Point

**DEPC** = *diethylene pyrocarbonate*

**DMEM** = Dulbecco's Modified Eagle Medium (Zellkultur Nährmedium)

**DMSO** = Dimethylsulfoxid

**DTT** = Dithiothreitol

**EGF** = Epithelial Growth Factor

**EtBr** = Ethidiumbromid

**EZM** = extrazelluläre Matrix

**FCS** = frisches Kälberserum

**FOXO** = Forkhead box

**GAPDH** = Glycerinaldehydes-3-phosphatdehydrogenase

**GC** = Glukokortikoide

**GRE** = Glucocorticoid responsive Element (-en)

**Gs- $\alpha$**  =  $\alpha$ -stimulierende Untereinheit des GTP-bindenden Proteins

**IGF-1** = Insuline like Growth Factor – 1

**IL** = Interleukin

**MAFbx** = muscle Atrophy F-box

**MAPK** = Mitogen-activated protein

**MGF** = Mechano Growth Factor

**MHC** = Myosin Heavy Chain

**MMP** = Matrix Metalloproteinasen

**NCBI** = National Center for Biotechnology Information

**PAI-1** = Plasminogen Activator Inhibitor – 1

**P-4-H** = Prolyl-4-Hydroxylase

**rt-PCR** = *real-time polymerase chain reaction*

**SKM** = Skelettmuskulatur

**T3** = Triiodthyronin

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

**TIMP** = Tissue Inhibitors of Matrix Metalloproteinases

**tPA** = tissue Plasminogen Activator

**TSH** = Thyroidhormon stimulierendes Hormon

**uPA** = urokinase Plasminogen Activator

**UPS** = Ubiquitin Proteasom System

**VEGF** = Vascular Endothelial Growth Factor

## 7. Literaturverzeichnis

- Ahtikoski, A. M., E. M. Riso, S. O. Koskinen, J. Risteli, and T. E. Takala, 2004, Regulation of type IV collagen gene expression and degradation in fast and slow muscles during dexamethasone treatment and exercise: *Pflugers Arch*, v. 448, p. 123-30.
- Alessi, M. C., F. Peiretti, P. Morange, M. Henry, G. Nalbome, and I. Juhan-Vague, 1997, Production of plasminogen activator inhibitor 1 by human adipose tissue: possible link between visceral fat accumulation and vascular disease: *Diabetes*, v. 46, p. 860-7.
- Alessi, M. C., M. Poggi, and I. Juhan-Vague, 2007, Plasminogen activator inhibitor-1, adipose tissue and insulin resistance: *Curr Opin Lipidol*, v. 18, p. 240-5.
- Allen, D. L., D. H. Teitelbaum, and K. Kurachi, 2003, Growth factor stimulation of matrix metalloproteinase expression and myoblast migration and invasion in vitro: *Am J Physiol Cell Physiol*, v. 284, p. C805-15.
- Angeras, U., and P. O. Hasselgren, 1987, Protein degradation in skeletal muscle during experimental hyperthyroidism in rats and the effect of beta-blocking agents: *Endocrinology*, v. 120, p. 1417-21.
- Appell, H. J., 1997, [The muscle in the rehabilitation process]: *Orthopade*, v. 26, p. 930-4.
- Balcerzak, D., L. Querengesser, W. T. Dixon, and V. E. Baracos, 2001, Coordinate expression of matrix-degrading proteinases and their activators and inhibitors in bovine skeletal muscle: *J Anim Sci*, v. 79, p. 94-107.
- Bruzdzinski, C. J., M. R. Johnson, C. A. Goble, S. S. Winograd, and T. D. Gelehrter, 1993, Mechanism of glucocorticoid induction of the rat plasminogen activator inhibitor-1 gene in HTC rat hepatoma cells: identification of cis-acting regulatory elements: *Mol Endocrinol*, v. 7, p. 1169-77.
- Caiozzo, V. J., F. Haddad, M. J. Baker, R. E. Herrick, N. Prietto, and K. M. Baldwin, 1996, Microgravity-induced transformations of myosin isoforms and contractile properties of skeletal muscle: *J Appl Physiol*, v. 81, p. 123-32.
- Carmeli, E., M. Moas, A. Z. Reznick, and R. Coleman, 2004, Matrix metalloproteinases and skeletal muscle: a brief review: *Muscle Nerve*, v. 29, p. 191-7.
- Chin, J. R., and Z. Werb, 1997, Matrix metalloproteinases regulate morphogenesis, migration and remodeling of epithelium, tongue skeletal muscle and cartilage in the mandibular arch: *Development*, v. 124, p. 1519-30.
- Czekay, R. P., K. Aertgeerts, S. A. Curriden, and D. J. Loskutoff, 2003, Plasminogen activator inhibitor-1 detaches cells from extracellular matrices by inactivating integrins: *J Cell Biol*, v. 160, p. 781-91.
- Danielsen, C. C., H. Wiggers, and H. R. Andersen, 1998, Increased amounts of collagenase and gelatinase in porcine myocardium following ischemia and reperfusion: *J Mol Cell Cardiol*, v. 30, p. 1431-42.



- Dellas, C., and D. J. Loskutoff, 2005, Historical analysis of PAI-1 from its discovery to its potential role in cell motility and disease: *Thromb Haemost*, v. 93, p. 631-40.
- Droguett, R., C. Cabello-Verrugio, C. Riquelme, and E. Brandan, 2006, Extracellular proteoglycans modify TGF-beta bio-availability attenuating its signaling during skeletal muscle differentiation: *Matrix Biol*, v. 25, p. 332-41.
- Dummler, K., S. Muller, and H. J. Seitz, 1996, Regulation of adenine nucleotide translocase and glycerol 3-phosphate dehydrogenase expression by thyroid hormones in different rat tissues: *Biochem J*, v. 317 ( Pt 3), p. 913-8.
- El Fahime, E., Y. Torrente, N. J. Caron, M. D. Bresolin, and J. P. Tremblay, 2000, In vivo migration of transplanted myoblasts requires matrix metalloproteinase activity: *Exp Cell Res*, v. 258, p. 279-87.
- Festa, A., R. D'Agostino, Jr., R. P. Tracy, and S. M. Haffner, 2002, Elevated levels of acute-phase proteins and plasminogen activator inhibitor-1 predict the development of type 2 diabetes: the insulin resistance atherosclerosis study: *Diabetes*, v. 51, p. 1131-7.
- Festoff, B. W., R. B. Reddy, M. VanBecelaere, I. Smirnova, and J. Chao, 1994, Activation of serpins and their cognate proteases in muscle after crush injury: *J Cell Physiol*, v. 159, p. 11-8.
- Fibbi, G., E. Barletta, G. Dini, A. Del Rosso, M. Pucci, M. Cerletti, and M. Del Rosso, 2001, Cell invasion is affected by differential expression of the urokinase plasminogen activator/urokinase plasminogen activator receptor system in muscle satellite cells from normal and dystrophic patients: *Lab Invest*, v. 81, p. 27-39.
- Fibbi, G., S. D'Alessio, M. Pucci, M. Cerletti, and M. Del Rosso, 2002, Growth factor-dependent proliferation and invasion of muscle satellite cells require the cell-associated fibrinolytic system: *Biol Chem*, v. 383, p. 127-36.
- Frisdal, E., E. Teiger, J. P. Lefaucheur, S. Adnot, E. Planus, C. Lafuma, and P. D'Ortho M, 2000, Increased expression of gelatinases and alteration of basement membrane in rat soleus muscle following femoral artery ligation: *Neuropathol Appl Neurobiol*, v. 26, p. 11-21.
- Fukushima, K., N. Badlani, A. Usas, F. Riano, F. Fu, and J. Huard, 2001, The use of an antifibrosis agent to improve muscle recovery after laceration: *Am J Sports Med*, v. 29, p. 394-402.
- Gack, S., R. Vallon, J. Schaper, U. Ruther, and P. Angel, 1994, Phenotypic alterations in fos-transgenic mice correlate with changes in Fos/Jun-dependent collagenase type I expression. Regulation of mouse metalloproteinases by carcinogens, tumor promoters, cAMP, and Fos oncoprotein: *J Biol Chem*, v. 269, p. 10363-9.
- Goldspink, G., A. Scutt, J. Martindale, T. Jaenicke, L. Turay, and G. F. Gerlach, 1991, Stretch and force generation induce rapid hypertrophy and myosin isoform gene switching in adult skeletal muscle: *Biochem Soc Trans*, v. 19, p. 368-73.
- Goldspink, G., B. Wessner, and N. Bachl, 2008, Growth factors, muscle function and doping: *Curr Opin Pharmacol*, v. 8, p. 352-7.

- Gonzalez-Cadavid, N. F., W. E. Taylor, K. Yarasheski, I. Sinha-Hikim, K. Ma, S. Ezzat, R. Shen, R. Lalani, S. Asa, M. Mamita, G. Nair, S. Arver, and S. Bhasin, 1998, Organization of the human myostatin gene and expression in healthy men and HIV-infected men with muscle wasting: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 95, p. 14938-43.
- Greene, J., M. Wang, Y. E. Liu, L. A. Raymond, C. Rosen, and Y. E. Shi, 1996, Molecular cloning and characterization of human tissue inhibitor of metalloproteinase 4: *J Biol Chem*, v. 271, p. 30375-80.
- Guerin, C. W., and P. C. Holland, 1995, Synthesis and secretion of matrix-degrading metalloproteases by human skeletal muscle satellite cells: *Dev Dyn*, v. 202, p. 91-9.
- Guttridge, D. C., 2004, Signaling pathways weigh in on decisions to make or break skeletal muscle: *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, v. 7, p. 443-50.
- Haas, T. L., M. Milkiewicz, S. J. Davis, A. L. Zhou, S. Egginton, M. D. Brown, J. A. Madri, and O. Hudlicka, 2000, Matrix metalloproteinase activity is required for activity-induced angiogenesis in rat skeletal muscle: *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, v. 279, p. H1540-7.
- Hamacher, S., S. Matern, and E. Roeb, 2004, [Extracellular matrix -- from basic research to clinical significance. An overview with special consideration of matrix metalloproteinases]: *Dtsch Med Wochenschr*, v. 129, p. 1976-80.
- Han, X. Y., W. Wang, R. Myllyla, P. Virtanen, J. Karpakka, and T. E. Takala, 1999, mRNA levels for alpha-subunit of prolyl 4-hydroxylase and fibrillar collagens in immobilized rat skeletal muscle: *J Appl Physiol*, v. 87, p. 90-6.
- Hansen, G., K. J. Martinuk, G. J. Bell, I. M. MacLean, T. P. Martin, and C. T. Putman, 2004, Effects of spaceflight on myosin heavy-chain content, fibre morphology and succinate dehydrogenase activity in rat diaphragm: *Pflugers Arch*, v. 448, p. 239-47.
- Hedman, A., L. Byberg, R. Reneland, and H. O. Lithell, 2002, Muscle morphology, self-reported physical activity and insulin resistance syndrome: *Acta Physiol Scand*, v. 175, p. 325-32.
- Hittel, D. S., W. E. Kraus, and E. P. Hoffman, 2003, Skeletal muscle dictates the fibrinolytic state after exercise training in overweight men with characteristics of metabolic syndrome: *J Physiol*, v. 548, p. 401-10.
- Hoffman, E. P., and G. A. Nader, 2004, Balancing muscle hypertrophy and atrophy: *Nat Med*, v. 10, p. 584-5.
- Jackman, R. W., and S. C. Kandarian, 2004, The molecular basis of skeletal muscle atrophy: *Am J Physiol Cell Physiol*, v. 287, p. C834-43.
- Jaspers, S. R., and M. E. Tischler, 1986, Role of glucocorticoids in the response of rat leg muscles to reduced activity: *Muscle Nerve*, v. 9, p. 554-61.
- Johnson, J. L., 2007, Matrix metalloproteinases: influence on smooth muscle cells and atherosclerotic plaque stability: *Expert Rev Cardiovasc Ther*, v. 5, p. 265-82.
- Joulia-Ekaza, D., and G. Cabello, 2006, Myostatin regulation of muscle development: molecular basis, natural mutations, physiopathological aspects: *Exp Cell Res*, v. 312, p. 2401-14.

- Kambadur, R., M. Sharma, T. P. Smith, and J. J. Bass, 1997, Mutations in myostatin (GDF8) in double-musled Belgian Blue and Piedmontese cattle: *Genome Res*, v. 7, p. 910-6.
- Karin, M., Z. Liu, and E. Zandi, 1997, AP-1 function and regulation: *Curr Opin Cell Biol*, v. 9, p. 240-6.
- Kherif, S., C. Lafuma, M. Dehaupas, S. Lachkar, J. G. Fournier, M. Verdiere-Sahuque, M. Fardeau, and H. S. Alameddine, 1999, Expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 in regenerating skeletal muscle: a study in experimentally injured and mdx muscles: *Dev Biol*, v. 205, p. 158-70.
- Kjaer, M., 2004, Role of extracellular matrix in adaptation of tendon and skeletal muscle to mechanical loading: *Physiol Rev*, v. 84, p. 649-98.
- Koskinen, S. O., W. Wang, A. M. Ahtikoski, M. Kjaer, X. Y. Han, J. Komulainen, V. Kovanen, and T. E. Takala, 2001, Acute exercise induced changes in rat skeletal muscle mRNAs and proteins regulating type IV collagen content: *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, v. 280, p. R1292-300.
- Kovanen, V., H. Suominen, and L. Peltonen, 1987, Effects of aging and life-long physical training on collagen in slow and fast skeletal muscle in rats. A morphometric and immuno-histochemical study: *Cell Tissue Res*, v. 248, p. 247-55.
- kSato, K., Y. Li, W. Foster, K. Fukushima, N. Badlani, N. Adachi, A. Usas, F. H. Fu, and J. Huard, 2003, Improvement of muscle healing through enhancement of muscle regeneration and prevention of fibrosis: *Muscle Nerve*, v. 28, p. 365-72.
- Lecker, S. H., R. T. Jagoe, A. Gilbert, M. Gomes, V. Baracos, J. Bailey, S. R. Price, W. E. Mitch, and A. L. Goldberg, 2004, Multiple types of skeletal muscle atrophy involve a common program of changes in gene expression: *Faseb J*, v. 18, p. 39-51.
- Lecker, S. H., V. Solomon, W. E. Mitch, and A. L. Goldberg, 1999, Muscle protein breakdown and the critical role of the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states: *J Nutr*, v. 129, p. 227S-237S.
- Lee, S. J., and A. C. McPherron, 1999, Myostatin and the control of skeletal muscle mass: *Curr Opin Genet Dev*, v. 9, p. 604-7.
- Lewis, M. P., H. L. Tippet, A. C. Sinanan, M. J. Morgan, and N. P. Hunt, 2000, Gelatinase-B (matrix metalloproteinase-9; MMP-9) secretion is involved in the migratory phase of human and murine muscle cell cultures: *J Muscle Res Cell Motil*, v. 21, p. 223-33.
- Lluis, F., J. Roma, M. Suelves, M. Parra, G. Anierte, E. Gallardo, I. Illa, L. Rodriguez, S. M. Hughes, P. Carmeliet, M. Roig, and P. Munoz-Canoves, 2001, Urokinase-dependent plasminogen activation is required for efficient skeletal muscle regeneration in vivo: *Blood*, v. 97, p. 1703-11.
- Loskutoff, D. J., K. Fujisawa, and F. Samad, 2000, The fat mouse. A powerful genetic model to study hemostatic gene expression in obesity/NIDDM: *Ann N Y Acad Sci*, v. 902, p. 272-81; discussion 281-2.
- Ma, K., C. Mallidis, S. Bhasin, V. Mahabadi, J. Artaza, N. Gonzalez-Cadavid, J. Arias, and B. Salehian, 2003, Glucocorticoid-induced skeletal muscle atrophy is

- associated with upregulation of myostatin gene expression: *Am J Physiol Endocrinol Metab*, v. 285, p. E363-71.
- Ma, L. J., S. L. Mao, K. L. Taylor, T. Kanjanabuch, Y. Guan, Y. Zhang, N. J. Brown, L. L. Swift, O. P. McGuinness, D. H. Wasserman, D. E. Vaughan, and A. B. Fogo, 2004, Prevention of obesity and insulin resistance in mice lacking plasminogen activator inhibitor 1: *Diabetes*, v. 53, p. 336-46.
- Morrison, W. L., J. N. Gibson, and M. J. Rennie, 1988, Skeletal muscle and whole body protein turnover in cardiac cachexia: influence of branched-chain amino acid administration: *Eur J Clin Invest*, v. 18, p. 648-54.
- Munoz-Canoves, P., F. Miralles, M. Baiget, and J. Felez, 1997, Inhibition of urokinase-type plasminogen activator (uPA) abrogates myogenesis in vitro: *Thromb Haemost*, v. 77, p. 526-34.
- Musaro, A., K. J. McCullagh, F. J. Naya, E. N. Olson, and N. Rosenthal, 1999, IGF-1 induces skeletal myocyte hypertrophy through calcineurin in association with GATA-2 and NF-ATc1: *Nature*, v. 400, p. 581-5.
- Naderi, J., C. Bernreuther, N. Grabinski, C. T. Putman, B. Henkel, G. Bell, M. Glatzel, and K. R. Sultan, 2009, Plasminogen activator inhibitor type 1 up-regulation is associated with skeletal muscle atrophy and associated fibrosis: *Am J Pathol*, v. 175, p. 763-71.
- Nishi, M., A. Yasue, S. Nishimatu, T. Nohno, T. Yamaoka, M. Itakura, K. Moriyama, H. Ohuchi, and S. Noji, 2002, A missense mutant myostatin causes hyperplasia without hypertrophy in the mouse muscle: *Biochem Biophys Res Commun*, v. 293, p. 247-51.
- Nissi, R., H. Autio-Harmainen, P. Marttila, R. Sormunen, and K. I. Kivirikko, 2001, Prolyl 4-hydroxylase isoenzymes I and II have different expression patterns in several human tissues: *J Histochem Cytochem*, v. 49, p. 1143-53.
- Overall, C. M., 1994, Regulation of tissue inhibitor of matrix metalloproteinase expression: *Ann N Y Acad Sci*, v. 732, p. 51-64.
- Overall, C. M., J. L. Wrana, and J. Sodek, 1991, Induction of formative and resorptive cellular phenotypes in human gingival fibroblasts by TGF-beta 1 and concanavalin A: regulation of matrix metalloproteinases and TIMP: *J Periodontal Res*, v. 26, p. 279-82.
- Pette, D., and G. Vrbova, 1992, Adaptation of mammalian skeletal muscle fibers to chronic electrical stimulation: *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, v. 120, p. 115-202.
- Pross, C., M. M. Farooq, J. S. Lane, N. Angle, C. K. Tomono, A. E. Xavier, J. A. Freischlag, A. E. Collins, R. E. Law, and H. A. Gelabert, 2002, Rat and human aortic smooth muscle cells display differing migration and matrix metalloproteinase activities in response to dexamethasone: *J Vasc Surg*, v. 35, p. 1253-9.
- Rahkonen, O. P., I. M. Koskivirta, S. M. Oksjoki, E. Jokinen, and E. I. Vuorio, 2002, Characterization of the murine Timp4 gene, localization within intron 5 of the synapsin 2 gene and tissue distribution of the mRNA: *Biochim Biophys Acta*, v. 1577, p. 45-52.

- Ramakers, C., J. M. Ruijter, R. H. Deprez, and A. F. Moorman, 2003, Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data: *Neurosci Lett*, v. 339, p. 62-6.
- Reitamo, S., A. Remitz, K. Tamai, and J. Uitto, 1994, Interleukin-10 modulates type I collagen and matrix metalloproteinase gene expression in cultured human skin fibroblasts: *J Clin Invest*, v. 94, p. 2489-92.
- Reznick, A. Z., O. Menashe, M. Bar-Shai, R. Coleman, and E. Carmeli, 2003, Expression of matrix metalloproteinases, inhibitor, and acid phosphatase in muscles of immobilized hindlimbs of rats: *Muscle Nerve*, v. 27, p. 51-9.
- Riccio, A., L. R. Lund, R. Sartorio, A. Lania, P. A. Andreasen, K. Dano, and F. Blasi, 1988, The regulatory region of the human plasminogen activator inhibitor type-1 (PAI-1) gene: *Nucleic Acids Res*, v. 16, p. 2805-24.
- Richler, C., and D. Yaffe, 1970, The in vitro cultivation and differentiation capacities of myogenic cell lines: *Dev Biol*, v. 23, p. 1-22.
- Riley, D. A., S. Ellis, G. R. Slocum, F. R. Sedlak, J. L. Bain, B. B. Krippendorf, C. T. Lehman, M. Y. Macias, J. L. Thompson, K. Vijayan, and J. A. De Bruin, 1996, In-flight and postflight changes in skeletal muscles of SLS-1 and SLS-2 spaceflown rats: *J Appl Physiol*, v. 81, p. 133-44.
- Roach, D. M., R. A. Fitridge, P. E. Laws, S. H. Millard, A. Varelias, and P. A. Cowled, 2002, Up-regulation of MMP-2 and MMP-9 leads to degradation of type IV collagen during skeletal muscle reperfusion injury; protection by the MMP inhibitor, doxycycline: *Eur J Vasc Endovasc Surg*, v. 23, p. 260-9.
- Romer, J., T. H. Bugge, C. Pyke, L. R. Lund, M. J. Flick, J. L. Degen, and K. Dano, 1996, Impaired wound healing in mice with a disrupted plasminogen gene: *Nat Med*, v. 2, p. 287-92.
- Rozen, S., and H. Skaletsky, 2000, Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers: *Methods Mol Biol*, v. 132, p. 365-86.
- Saltin, B., and J. W. Helge, 2000, [Skeletal muscles, physical activity and health]: *Orthopade*, v. 29, p. 941-7.
- Sato, H., T. Takino, Y. Okada, J. Cao, A. Shinagawa, E. Yamamoto, and M. Seiki, 1994, A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumour cells: *Nature*, v. 370, p. 61-5.
- Schulze, C. J., W. Wang, W. L. Suarez-Pinzon, J. Sawicka, G. Sawicki, and R. Schulz, 2003, Imbalance between tissue inhibitor of metalloproteinase-4 and matrix metalloproteinases during acute myocardial [correction of myocardial] ischemia-reperfusion injury: *Circulation*, v. 107, p. 2487-92.
- Seebacher, T., M. Manske, J. Zoller, J. Crabb, and E. G. Bade, 1992, The EGF-inducible protein EIP-1 of migrating normal and malignant rat liver epithelial cells is identical to plasminogen activator inhibitor 1 and is a component of the ECM migration tracks: *Exp Cell Res*, v. 203, p. 504-7.
- Shimizu, M., A. Hara, M. Okuno, H. Matsuno, K. Okada, S. Ueshima, O. Matsuo, M. Niwa, K. Akita, Y. Yamada, N. Yoshimi, T. Uematsu, S. Kojima, S. L. Friedman, H. Moriwaki, and H. Mori, 2001, Mechanism of retarded liver regeneration in plasminogen activator-deficient mice: impaired activation of

- hepatocyte growth factor after Fas-mediated massive hepatic apoptosis: *Hepatology*, v. 33, p. 569-76.
- Sisson, T. H., K. E. Hanson, N. Subbotina, A. Patwardhan, N. Hattori, and R. H. Simon, 2002, Inducible lung-specific urokinase expression reduces fibrosis and mortality after lung injury in mice: *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, v. 283, p. L1023-32.
- Steinacker J.M., L. Y., 2002, Strukturanpassungen des Skelettmuskels auf Training: *Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin*, v. Jahrgang 53, Nr.12.
- Sultan, K. R., B. Henkel, M. Terlou, and H. P. Haagsman, 2006, Quantification of hormone-induced atrophy of large myotubes from C2C12 and L6 cells: atrophy-inducible and atrophy-resistant C2C12 myotubes: *Am J Physiol Cell Physiol*, v. 290, p. C650-9.
- Sulzman, F. M., 1996, Life sciences space missions. Overview: *J Appl Physiol*, v. 81, p. 3-6.
- Thornton, A. J., C. J. Bruzdinski, S. E. Raper, and T. D. Gelehrter, 1994, Plasminogen activator inhibitor-1 is an immediate early response gene in regenerating rat liver: *Cancer Res*, v. 54, p. 1337-43.
- Van Gaal, L. F., I. L. Mertens, and C. E. De Block, 2006, Mechanisms linking obesity with cardiovascular disease: *Nature*, v. 444, p. 875-80.
- Vincenti, M. P., L. A. White, D. J. Schroen, U. Benbow, and C. E. Brinckerhoff, 1996, Regulating expression of the gene for matrix metalloproteinase-1 (collagenase): mechanisms that control enzyme activity, transcription, and mRNA stability: *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, v. 6, p. 391-411.
- Wells, J. M., and S. Strickland, 1997, Regulated localization confers multiple functions on the protease urokinase plasminogen activator: *J Cell Physiol*, v. 171, p. 217-25.
- Williams, M. S., 2004, Myostatin mutation associated with gross muscle hypertrophy in a child: *N Engl J Med*, v. 351, p. 1030-1; author reply 1030-1.
- Yaffe, D., 1968, Retention of differentiation potentialities during prolonged cultivation of myogenic cells: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 61, p. 477-83.
- Yamamoto, K., K. Takeshita, T. Shimokawa, H. Yi, K. Isobe, D. J. Loskutoff, and H. Saito, 2002, Plasminogen activator inhibitor-1 is a major stress-regulated gene: implications for stress-induced thrombosis in aged individuals: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 99, p. 890-5.
- Zachwieja, J. J., S. R. Smith, I. Sinha-Hikim, N. Gonzalez-Cadavid, and S. Bhasin, 1999, Plasma myostatin-immunoreactive protein is increased after prolonged bed rest with low-dose T3 administration: *J Gravit Physiol*, v. 6, p. 11-5.

## **8. Danksagung**

Ich möchte mich ganz besonders bei meinem Betreuer PD Dr. R. Karim Sultan bedanken, für die Geduld und große Unterstützung während der gesamten Zeit meiner Doktorarbeit. Des Weiteren danke bei Frau Prof. Dr. Dr. U. Beisiegel für die sehr gute Betreuung, Frau Birgit Henkel (technischen Assistentin) für die Unterweisung in verschiedene Versuchstechniken sowie bei dem gesamten Labor für die gute Zusammenarbeit und Hilfe. Des Weiteren danke ich Prof. Dr. Seitz für die finanzielle Unterstützung bei der wissenschaftlichen Weiterbildung im Rahmen eines Stipendiums durch den Graduiertenkolleg GRK-336: „Molekulare Endokrinologie - Molekularer Stoffwechsel“.

Außerdem möchte ich Ted Putman für die Bereitstellung der Muskelproben aus Kanada danken sowie Prof. Dr. M. Glatzel aus der Neuropathologie für die Zusammenarbeit und die gemeinsame Publikation im American Journal of Pathology. Zu guter Letzt freue ich mich über die grosse Unterstützung, die mir meine Familie und mein Ehemann in der Zeit meiner Promotionsarbeit immer wieder entgegengebracht haben.

## **9. Eidesstattliche Versicherung**

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe. Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift: .....