

**Einfluss des Ras/Map-Kinase-  
Signaltransduktionsweges auf Promotoren der  
schweren Myosinketten während Proliferation  
und Differenzierung von Muskelsatellitenzellen**

**Von dem Fachbereich Chemie  
der Universität Hannover  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)**

**genehmigte Dissertation  
von**

**Diplom Biochemiker Michael Scholz**

**geboren am 2.11.1971 in Dortmund**

**2004**

Referent: PD Dr. Heiner Wolfes

Korreferent: Prof. Dr. Gerolf Gros

Tag der Promotion: 31.8.2004

## Zusammenfassung:

Skelettmuskeln sind ein hochplastisches Gewebe. Skelettmuskelzellen können sich trotz terminaler Differenzierung und Fusion zu mehrkernigen Myotuben, an wechselnde mechanische und metabolische Belastungen anpassen. Die Signaltransduktionsprozesse die den Differenzierungsprozessen und dieser Plastizität zugrunde liegen, sind von besonderem Interesse.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss des Ras/Map-Kinase Signalweges auf MHC-Promotoren während Proliferation und Differenzierung von Muskelsatellitenzellen untersucht. Zu diesem Zweck wurden geeignete Bedingungen für die Kultivierung und Transfektion von Muskelsatellitenzellen etabliert, um Luziferase-Reporterassays mit Fragmenten des MHC I- und des MHC II $\alpha$ -Promotors durchzuführen. Der Ras/Map-Kinase-Signalweg wurde durch die Koexpression von konstitutiv aktivem Ras (RasQ61L) aktiviert.

Der Vergleich von Proliferations- und Differenzierungsmedium im 2-Tage-Versuch bestätigt Literaturdaten, die dem Ras/Map-Kinase-Signalweg einen hemmenden Einfluss auf die Differenzierung und auf die Aktivität von muskelspezifischen Promotoren zuschreiben. Der Vergleich von 2-Tage- und 6-Tage-Versuchen zeigt einen Wechsel von einer Hemmung der MHC-Promotoren zu einer Aktivierung durch konstitutiv aktives Ras. Hemmstoffversuche mit dem PI-3-Kinase Hemmstoff LY294002 bestätigen die Beteiligung dieses Signalweges an der Aktivierung der MHC-Promotoren im 6-Tage Versuch. Versuche mit dem MEK1/2-Hemmstoff PD98059 belegen die Notwendigkeit einer Interaktion von Ras/Map-Kinase-Signalweg und PI-3-Kinase-Signalweg bei der Aktivierung der MHC-Promotoren im 6-Tage-Versuch. Demzufolge besitzt die Proteinkinase Akt, die Teil des PI-3-Kinase-Signalweges ist, die Möglichkeit die MAPKK-Kinase Raf-1 zu hemmen und so den hemmenden Einfluss des Ras/Map-Kinase-Signalweges auf die MHC-Promotoren zu unterbrechen. Der hemmende Einfluss von Akt auf Raf-1 ist, wie die Reporterassays belegen, abhängig vom Differenzierungsstadium der Muskelzellen. Signaltransduktionsprozesse sind somit nicht starr, sondern es kommt zu einer „Reifung der Signalwege“.

Schlagwörter: Skelettmuskel-Differenzierung, MAPK-Signalweg,  
PI3-Kinase/Akt-Signalweg

**Abstract:**

The skeletal muscle cells possess a high plasticity in respect of their biochemical properties. Terminally differentiated skeletal muscle cells can still adapt to changes of mechanical or metabolic conditions. There is a high interest in the signal transduction processes which are involved in the differentiation process and the plasticity.

The topic of this work was the examination of the influence of the ras/erk-signalling pathway on MHC-promoters in skeletal muscle satellite cells during proliferation and differentiation. For this purpose, appropriate conditions for the culture and transfection of satellite cells were established. Luciferase reporter gene assays with fragments of the MHC I- and the MHC IIx-promoter were carried out. In parallel the ras/erk-signalling pathway was activated by coexpression of constitutive active Ras (RasQ61L).

In the literature an inhibitory effect of the ras/erk-signalling pathway on differentiation and expression of muscle specific genes is reported. This effect could be confirmed by the comparison of the promoter activities in proliferation and differentiation medium in 2-day experiments.

The comparison of the 2-day and 6-day experiments shows a change in the influence of constitutive active Ras on the promoter activity. It switched from an inhibition to an activation. The use of the PI-3-Kinase inhibitor LY294002 showed the involvement of the PI-3-Kinase pathway in the activation of the MHC-promoters. 6-day experiments with the MEK1/2 inhibitor PD98059 demonstrated the interaction of the ras/erk-signalling pathway and the PI-3-Kinase pathway which activates the MHC-promoters. The protein kinase Akt - part of the PI-3-Kinase pathway - can inhibit the MAPKK-Kinase Raf-1. The inhibitory effect of the ras/erk-signalling pathway on the MHC-promoters is interrupted by Raf-1. Moreover the reporter gene assays showed a correlation between the inhibitory effect of Akt on Raf-1 and the differentiation state.

This work shows that signal transduction processes are not rigid, but develop parallel to cellular changes. It shows a maturation of signal transduction in differentiating skeletal muscle satellite cells.

**Keywords:** Skeletal muscle differentiation, MAPK-Pathway,  
PI3-Kinase/Akt-Pathway

# Inhaltsverzeichnis

<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b><i>Skelettmuskelzellen und ihre Entwicklung.....</i></b>	<b>1</b>
Differenzierung von Skelettmuskelzellen .....	1
Fasertypen und Fasertyp-Umwandlung.....	3
Satellitenzellen.....	5
<b><i>Der Ras/Map-Kinase-Signaltransduktionsweg.....</i></b>	<b>8</b>
Die Ras-Protoonkogenfamilie .....	8
Das G-Protein Ras .....	9
Ras-Mutationen.....	10
MAP-Kinase-Signaltransduktionswege .....	11
Der Erk-Signalweg.....	13
Andere Ras-Signalwege .....	15
Ras-Abhängige Signalwege im Skelettmuskel.....	16
<b>MATERIALIEN UND METHODEN .....</b>	<b>18</b>
<b><i>Molekularbiologische Methoden .....</i></b>	<b>18</b>
Plasmide.....	18
Allgemeine molekularbiologische Methoden .....	24
Isolation von DNA-Fragmenten.....	24
DNA-Präparationen .....	24
Synthetische Oligonukleotide.....	24
<b><i>Mikrobiologische Methoden.....</i></b>	<b>25</b>
Verwendete Stämme <i>E.Coli</i> -Stämme.....	25
Nährmedien.....	26
Herstellung von kompetenten Zellen .....	27
Transformation von kompetenten <i>E. coli</i> -Zellen.....	28
<b><i>Zellkultur .....</i></b>	<b>28</b>
Verwendete Zellen .....	28
Medien und Reagenzien für die Zellkultur .....	29
Passagieren von Zellen .....	30
Kryokonservierung von Zellen.....	30
Auftauen von Zellen .....	31
Mikrocarrier-Kulturen.....	31
Transfektionen.....	32
Fluoreszenzmikroskopie .....	33

Hemmstoffe .....	33
<b>Reporterassays .....</b>	<b>34</b>
Lösungen und Reagenzien .....	34
Ernte von Zellen .....	35
Luziferaseassay .....	36
$\beta$ -Galaktosidase-Assay .....	36
Auswertung der Reporterassays .....	36
<b>Biochemische Methoden .....</b>	<b>37</b>
Proteinbestimmung nach Lowry .....	37
Bestimmung der Creatinkinase-Aktivität .....	38
Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	40
Westernblot .....	42
Immunomarkierung und ECL-Detektion.....	43
<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>45</b>
<b><i>Konstruktion der Reporterplasmide.....</i></b>	<b>45</b>
Klonierung von pMHC1-EGFP-Actin.....	45
Klonierung von pMHC1-Luc .....	48
Klonierung von pMHCIIx-EGFP-Actin.....	50
Klonierung von pMHCIIx-Luc .....	54
<b><i>Etablierung eines Transfektionsprotokolls für Muskelzellen .....</i></b>	<b>57</b>
<b><i>Charakterisierung der Kaninchen Muskel-Satellitenzellen .....</i></b>	<b>59</b>
Proliferation.....	59
Differenzierung .....	60
Differenzierung in Carrier-Suspensions-Kultur.....	61
Creatinkinaseaktivität.....	61
Westernblot und Immunodetektion von Myosinisoformen.....	62
<b><i>EGFP-Transfektionen und Fluoreszenzmikroskopie.....</i></b>	<b>64</b>
Fusionsexperimente.....	66
<b><i>Luziferase-Reporterassays .....</i></b>	<b>68</b>
Etablierung und Optimierung.....	68
2-Tage-Versuche.....	69
6-Tage-Versuche.....	70
LY294002-Versuche.....	71
Rapamycin-Versuche .....	73
Insulin- und PD98059-Versuche.....	73

Weitere PD98059-Versuche .....	75
SB203580-Versuche .....	77
Versuche zur Fasertypumwandlung.....	78
<b>Westernblotuntersuchungen .....</b>	<b>81</b>
Phospho-p42/p44.....	81
Akt/Phospho-Akt .....	83
<b>DISKUSSION.....</b>	<b>84</b>
<b>Satellitenzell-Zellkultur .....</b>	<b>84</b>
<b>Transfektion von Muskelsatellitenzellen .....</b>	<b>86</b>
<b>Transfektionen mit EGFP-exprimierenden Plasmiden .....</b>	<b>87</b>
<b>Reportergenassays und Westernblots .....</b>	<b>87</b>
<b>Bedeutung von Ras für die Fasertypumwandlung .....</b>	<b>89</b>
<b>Bedeutung von Ras für Proliferation und Differenzierung von Satellitenzellen ...</b>	<b>91</b>
2-Tage-Versuche.....	91
6-Tage-Versuche.....	93
Hemmstoffversuche .....	95
Modelle der Signal-Interaktion .....	98
Modell des „Funktionswechsels“ von konstitutiv aktivem Ras .....	105
Zusammenfassung.....	106
<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>108</b>
<b>Danksagung.....</b>	<b>123</b>
<b>Eidesstattliche Erklärung.....</b>	<b>124</b>
<b>Lebenslauf .....</b>	<b>125</b>
<b>Publikationsliste.....</b>	<b>126</b>

## Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere	EDTA	Dinatriummethylendiamin-tetraacetat
ADP	Adenosindiphosphat	EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
Akt	<i>AKT8 virus oncogene cellular homolog</i> ; PKB	EGFP	<i>Enhanced green fluorescent protein</i>
Amp	Ampicillin	Elk-1	<i>Ets-like transcription factor1</i>
AMP	Adenosinmonophosphat	Erk	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
AP-1	Activator protein 1 (Heterodimer aus c-Jun und c-Fos)	EtBr	Ethidiumbromid
APS	Ammoniumperoxodisulfat	FCS	<i>Fetal calf serum</i>
ATF-2	<i>Activating transcription factor 2</i>	FGF	<i>fibroblast growth factor</i>
ATP	Adenosintriphosphat	g	Erdbeschleunigung oder Gramm
AS	Aminosäure	GAP	<i>GTPase activating protein</i>
bHLH	<i>basic helix-loop-helix</i>	GDP	Guanosindiphosphat
bp	Basenpaare	GEF	<i>GTP/GDP exchange factor</i>
Bidest	bi-destilliertes Wasser	GRB	<i>growth factor receptor-bound protein</i>
BSA	Rinderserumalbumin	GRF	<i>guanine nucleotide releasing factor</i>
c	Konzentration	GTP	Guanosintriphosphat
C-	Carboxyl-	h	Stunde
CAT	Chloramphenicoltransferase	hbFGF	<i>human basic fibroblast growth factor</i>
CK	Creatinkinase	hEGF	<i>human epidermal growth factor</i>
cm	Zentimeter	HBS	HEPES <i>Buffered Saline</i>
CREB	<i>cAMP response element binding protein</i>	HEPES	N-[2-Hydroxyethyl]-piperazin-N'[2-ethansulfonsäure]
d	desoxy-	His	Histidin
Da	Dalton	IGF	<i>Insulin-like growth factor</i>
ddH <sub>2</sub> O	bidestilliertes Wasser	IRS-1	Insulin Rezeptor Substrat 1
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium	JNK	Jun N-Terminale Kinase
DMSO	Dimethylsulfoxid	k	Kilo
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i>	Kan	Kanamycin
dNTP	Desoxynukleotid	kb	Kilobasen(paare)
DTT	1,4-Dithiothreitol	l	Liter
ECL	<i>Enhanced chemoluminescence</i>	LB	Luria-Bertani
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	Luc-	Luziferase-
EDL	<i>Extensor digitorum longum</i>	m	milli bzw. Meter



M	molar	RNA	Ribonukleinsäure
MCS	<i>Multiple cloning site</i>	rpm	<i>rounds per minute</i> /
MHC	<i>Myosin Heavy chain</i>		Umdrehungen pro Minute
ml	Milliliter	RS	<i>rabbit serum</i>
mm	Millimeter	RTK	Rezeptor-Tyrosin-Kinase
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>	s	Sekunden
MAPKK	MAP-Kinase-Kinase	SAPK	Stress-Aktivierte Proteinkinasen
MAPKKK	MAP-Kinase-Kinase-Kinase	SDS	Natriumdodecylsulfat
MEF2	<i>Myocyte enhancer factor 2</i>	SHC	<i>SH2-containing collagen-related protein</i>
MEK	MAP/Erk-Kinase	SOS	<i>Son-of-sevenless</i>
MOPS	3-Morpholinopropan-sulfonsäure	Stat1	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>
MSK-1	<i>Mitogen and stress activated kinase 1</i>	SV40	Simian Virus 40
mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i>	t	Zeit
Myc	<i>myelocytomatosis oncogene cellular homolog</i>	TCA	Trichloressigsäure
n	nano	TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
N-	Amino-	TE	Tris-EDTA-Puffer
NCS	<i>newborn calf serum</i>	TF	Transkriptionsfaktor
NF-AT	<i>Nuclear factor of activated T-cells</i>	TGF- $\beta$	Transforming growth factor beta
NF- $\kappa$ B	<i>Nuclear factor <math>\kappa</math>B</i>	Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminoethan
NLS	<i>Nuclear localization sequence</i>	U	<i>Unit</i>
OD	optische Dichte	UV	Ultraviolett
ONPG	o-Nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranosid	V	Volt oder Volumen
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>	W	Watt
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>	v/v	Volumenprozent
PDGF	<i>Platelet-derived growth factor</i>	w/v	Gewichtsprozent
PI-3-K	Phosphoinositol-3-Phosphat-Kinase	$\lambda$	Wellenlänge
PKA	Protein Kinase A	$\mu$	mikro
PKB	Protein Kinase B: Akt		
PKC	Protein Kinase C		
PP...	Proteinphosphatase		
RLU	<i>relative luminescence units</i>		



## Einleitung

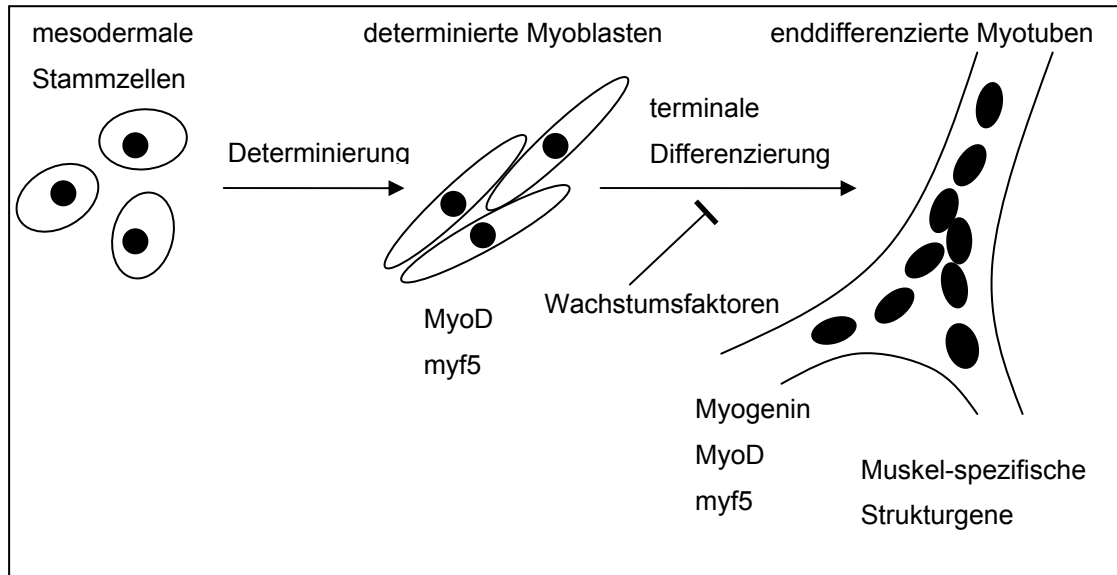
### ***Skelettmuskelzellen und ihre Entwicklung***

Muskelzellen stellen als bewegungs- bzw. kraftgenerierende Zellen einen hoch spezialisierten Zelltypus dar. Muskelzellen sind wie Nervenzellen auch erregbare Zellen, die Aktionspotentiale ausbilden können. Darüber hinaus sind Muskelzellen aber in der Lage, auf das Muskelaktionspotential mit einer Kontraktion zu reagieren. Diese Kontraktion wird im Organismus zur Generierung von Bewegung und Kraft eingesetzt. Sie kommt durch das Ineinandergleiten von Aktin- und Myosinfilamenten zustande (Gleitfilament-Theorie (Huxley und Niedergerke 1954; Huxley und Hanson 1954)). Der eigentliche Kraft- bzw. bewegungsgenerierende Prozess kommt durch die ATP-getriebene Konformationsänderung des Myosins zustande (Model des Querbrückenzyklus (Hanson und Huxley 1955; Huxley 1957; Huxley 1969)). Ein durch die Aktionspotentiale ausgelöster Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem sarkoplasmatischen Retikulum in das Zytoplasma ist dabei direkter Auslöser der Kontraktion und verbindet Erregung und Kontraktion miteinander (Elektromechanische Kopplung; *Excitation-contraction-coupling* (Sandow 1965)).

### **Differenzierung von Skelettmuskelzellen**

Skelettmuskelzellen entwickeln sich aus mesodermalen Stammzellen, die zunächst Myoblasten bilden (Knudsen und Horwitz 1977). Myoblasten sind determinierte Zellen, die jedoch nicht ausdifferenziert sind, sie exprimieren nicht die muskeltypischen Strukturgene und sind im Gegensatz zu ausdifferenzierten Muskelzellen, den so genannten Myotuben, noch fähig, sich zu teilen (Olson 1992). Unter dem Einfluss von Wachstumsfaktoren wie FGF oder TGF- $\beta$  bleiben Myoblasten in diesem Entwicklungsstadium. Erst bei Entzug der Wachstumsfaktoren wird das myogene Programm aktiviert (Olson et al. 1986; Clegg et al. 1987), die Myoblasten fusionieren zu mehrkernigen Myotuben (Stockdale 1992) und beginnen die muskeltypischen Strukturgene wie die Proteine des kontraktiven Apparates,  $\text{Ca}^{2+}$ -Pumpen oder Kreatinkinase zu exprimieren (Florini et al. 1991). Hat die myogene Enddifferenzierung und Fusion einmal begonnen, verlieren diese Wachstumsfaktoren ihren Einfluss auf

muskelspezifische Gene, da unter anderem die Expression der entsprechenden Rezeptoren gehemmt wird. Auch bei erneuter Zufuhr von Wachstumsfaktoren können die entsprechenden Gene nicht wieder inaktiviert werden (Olwin und Hauschka 1988; Hu und Olson 1990).



**Abbildung 1: Entwicklung myogener Zellen**

Abbildung 1 gibt einen Überblick über diesen Entwicklungsprozess. In der Abbildung sind auch Transkriptionsfaktoren aufgeführt, die mit den verschiedenen Stadien der Muskeldifferenzierung assoziiert werden (Olson 1992). Proteine der Familie der muskelspezifischen Regulations-Faktoren führen zu einer schnellen Ausprägung eines myogenen Phänotypes, wenn diese in Nicht-Muskelzellen exprimiert werden (Davis et al. 1987; Braun et al. 1990; Olson 1990; Weintraub et al. 1991a). Sie alle besitzen ein homologes, 70 Aminosäuren langes *basic-helix-loop-helix*-Motif. Daher werden diese Faktoren auch als myogene bHLH-Proteine bezeichnet (Olson 1990; Weintraub et al. 1991b). Die DNA-Bindungsstelle von bHLH-Proteinen enthält die Sequenz CANNTG. Diese Sequenz wird als E-Box bezeichnet und findet sich in den Promotorregionen zahlreicher muskelspezifischer Gene. Die Sequenz fungiert als Bindungsstelle für Hetero-oligomere aus myogenen und den allgemeinen bHLH-Proteinen E12 und E47, die durch das E2A-Gen codiert werden (Murre et al. 1989). Neben der Fähigkeit verschiedene muskelspezifische Gene zu aktivieren, können myogene bHLH-Proteine sich auch gegenseitig aktivieren, unterliegen also einer positiven Autoregulation, die das selbständige

Voranschreiten des einmal aktivierten myogenen Programms erklärt (Braun et al. 1989; Thayer et al. 1990).

### **Fasertypen und Fasertyp-Umwandlung**

Der Skelettmuskel ist ein hochgradig plastisches Gewebe, das seine Morphologie und seinen Stoffwechsel an wechselnde neuromuskuläre Aktivität und Belastung anpassen kann (Roy et al. 1991). Chronische Änderungen dieser Parameter führen zu qualitativen und quantitativen Veränderungen im Proteinstoffwechsel und im Expressionsmuster verschiedener muskelspezifischer Strukturgene. Diese Veränderungen passen die Muskelzellen an die jeweiligen funktionellen Bedürfnisse an (Roy et al. 1999).

Auf dieser Grundlage kann man verschiedene Fasertypen unterscheiden (Hintz et al. 1980). Sogenannte SO-Fasern (*slow oxidative*) kontrahieren langsam und haben eine hohe oxidative Kapazität. FG-Fasern (*fast-glycolytic*) kontrahieren schnell und besitzen eine hohe glykolytische Kapazität. Desweiteren gibt es einen Fasertypus der zwischen diesen zuvor beschriebenen anzusiedeln ist. FOG-Fasern (*fast oxidative glycolytic*) kontrahieren schnell und haben sowohl hohe oxidative als auch hohe glykolytische Kapazität. Diese Klassifikation beinhaltet sowohl Angaben über die Kontraktionseigenschaften (*FT, fast-twitch; ST, slow-twitch*) als auch über die Stoffwechselleistung (oxidativ, glykolytisch).

Eine andere Klassifikation (Engel 1974) teilt Muskelfasern durch ihre unterschiedliche Resistenz der ATPase-Aktivität gegenüber Alkali und Säuren ein. Die Fasern mit säureresistenter ATPase-Aktivität werden dabei als Typ I bezeichnet, die Fasern mit alkaliresistenter ATPase-Aktivität als Typ II. Dabei korrelieren Typ I Fasern gut mit ST-Fasern und Typ II-Fasern mit FT-Fasern. Diese Unterschiede der Kontraktions- und ATPase-Eigenschaften kommen durch verschiedene Myosinisoformen (Termin et al. 1989) zustande. Myosin ist sowohl Träger der ATPase-Aktivität als auch aktives Motorprotein des kontraktilen Apparates und somit auch bestimmend für die Kontraktionseigenschaften und die Klassifizierung in bestimmte Fasertypen (Pette und Staron 1993).

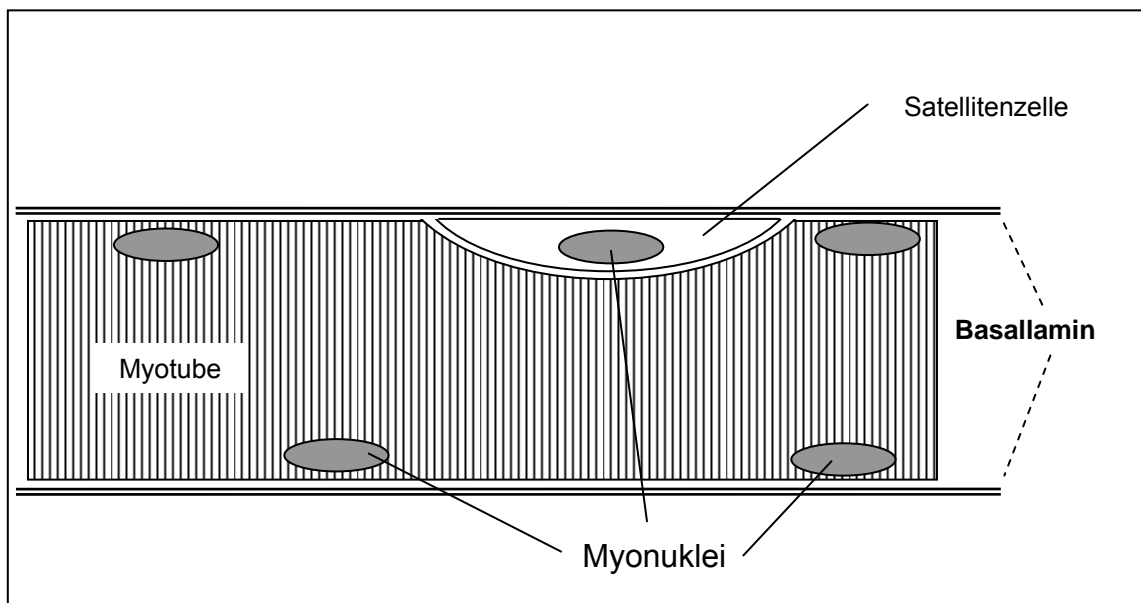
Wie eingangs erwähnt, ist der Fasertyp als solches keine völlig fixierte Eigenschaft. Fasertypen können sich *in vivo* (Salmons und Vrbova 1969; Salmons 1992) wie auch *in vitro* umwandeln. In der Literatur finden sich

zahlreiche Beispiele für *fast-to-slow-* (Pette 1992; Kubis et al. 1997) und *slow-to-fast-*Fasertypumwandlung (Salmons 1992; Bigard et al. 1998). Dabei werden physikalische Größen wie Kontraktionsfrequenz, Kontraktionsdauer, Last oder Dehnung in physiologisch bzw. biochemisch verwertbare Signale, d.h. in Signaltransduktionsprozesse umgewandelt. Diese führen dann zu veränderten Expressionsmustern der beteiligten Gene des kontraktilen Apparates und des Energiestoffwechsels (Henriksson et al. 1988; Termin und Pette 1992). Die primären Signale und die beteiligten Signaltransduktionswege waren und sind Inhalt kontroverser Diskussionen. Eine Vielzahl verschiedener initialer Auslöser wie z.B. das ATP/ADP-Verhältnis (Green et al. 1992), mechanische Belastung (Lowrie et al. 1989), Veränderungen des intrazellulären Kalziumgehaltes (Sreter et al. 1987) oder auch Gewebshypoxie (Mortola und Naso 1995) sind diskutiert worden.

Eine aktuell verbreitete Theorie bringt die kalziumabhängige Aktivierung des Calcineurin/NFATc-Signalweges mit der Ausprägung des langsamen Fasertypus in Verbindung (Kubis et al. 1997; Chin et al. 1998; Dunn et al. 1999; Meissner et al. 2001). Diskutiert wird außerdem, ob das primäre Signal in einer dauerhaften Änderung der Ruhekalziumkonzentration oder in transienten Änderungen der Kalziumkonzentration während chronischer Stimulation zu suchen ist (Kubis et al. 2003). Dagegen verbindet eine andere Theorie die Ausprägung des langsamen Fasertypus mit der Aktivierung von Ras in regenerierenden Muskeln (Murgia et al. 2000).

## Satellitenzellen

Satellitenzellen sind adulte Stammzellen der Skelettmuskulatur (Hellmuth und Allbrook 1973) und wurden zuerst von Mauro (Mauro 1961) beschrieben. Satellitenzellen liegen als einkernige myogene Zellen zwischen den Muskelfasern und der Basallamina. Sie sind die Grundlage des hypertrophen Muskelwachstums (Snow 1990) und der Muskelregeneration nach Verletzung (Maxwell und Moody 1988) oder Überbelastung (Armstrong et al. 1991).



**Abbildung 2: Schematische Darstellung einer Satellitenzellen und ihrer Lage zwischen Basallamina und Myotube**

Im Gegensatz zu den ausdifferenzierten und nicht mehr teilungsfähigen Myotuben befinden sich Satellitenzellen noch immer im Stadium von Myoblasten. Sie werden aus myogenen Vorläufern während der Embryogenese gebildet und befinden sich in einem Ruhestadium, der  $G_0$ -Phase des Zellzyklus entsprechend (Schultz et al. 1978; Bischoff 1990). Verletzungen (McGeachie und Grounds 1987), Denervierung (Schultz 1978; Snow 1983), Training, Überbeanspruchung (Darr und Schultz 1987; Armstrong et al. 1991) oder Dehnung können Satellitenzellen dazu veranlassen, den Zellzyklus wieder aufzunehmen und zu proliferieren. Die neu gebildeten adulten Myoblasten differenzieren und fusionieren mit bestehenden Myotuben, aber gerade bei schwereren Verletzungen auch miteinander, um das zerstörte und nekrotisierte Muskelgewebe zu ersetzen.

Wie alle Stammzellen müssen auch Satellitenzellen, neben der Proliferation und der Produktion spezialisierter Nachkommen, ihre eigene Erhaltung gewährleisten (Potten und Loeffler 1990). Die Zahl der myogenen Stammzellen muss auch über längere Proliferationsperioden hinweg konstant bleiben. Die Zahl der Satellitenzellen variiert zwar zwischen verschiedenen Muskeln und verschiedenen Spezies, wird aber innerhalb eines Muskels weitgehend konstant gehalten (Gibson und Schultz 1982). Lediglich im Alter oder bei Dystrophie kommt es zu einer Abnahme der Satellitenzellzahl (Gibson und Schultz 1983).

In *in-vivo* Regenerationsexperimenten konnte gezeigt werden, dass der Muskel eine beträchtliche Regenerationsfähigkeit besitzt (Basson und Carlson 1980; Schultz und Jaryszak 1985; Gulati 1986; Mong 1988; Morlet et al. 1989).

Das Myotoxin Bupicavain z.B. zerstört selektiv die Muskelfasern, aber lässt Satellitenzellen, Nerven- und Blutversorgung unbeeinflusst. Durch wiederholte Injektion in denselben Muskel, gefolgt von Regenerationsphasen, können mehrere Degenerierungs- und Regenerierungszyklen durchlaufen werden. Diese Prozedur mit wöchentlicher Myotoxininjektion wurde an Ratten über einen Zeitraum von bis zu 6 Monaten durchgeführt - dies entspricht ca. 80 Verdopplungszyklen - ohne dass sich die regenerative Kapazität des Muskels oder die Zahl der Satellitenzellen erschöpfte (Sadeh et al. 1985). Trotz ihrer beträchtlichen proliferativen und selbsterhaltenden Fähigkeiten gibt es Hinweise, dass die Differenzierungsfähigkeit der Satellitenzellen eingeschränkt ist. Satellitenzellen sind somit nicht mit myogenen Zellen der Embryogenese gleichzusetzen (Feldman und Stockdale 1991).

Auch bei Hypertrophie der Skelettmuskulatur werden Satellitenzellen aktiviert, die mit den bestehenden Myotuben fusionieren (Schiaffino et al. 1976; Snow 1990). Es erhöht sich so die Zahl der Myonuklei pro Faser und die Größe der Faser (Querschnitt) (Allen et al. 1995), das Verhältnis von Faservolumen zu der Zahl der Myonuklei bleibt weitgehend gleich (Seiden 1976; Kadi et al. 1999).

Diese Beobachtungen und die Vielkernigkeit der Muskelzelle haben zu dem Konzept der Myonukleären Domäne geführt (Cheek et al. 1971; Cheek 1985; Hall und Ralston 1989). Danach wird ein bestimmtes Volumen der Myotube von einem einzelnen Myonukleus versorgt und kontrolliert.



Nach dem Stand der Forschung wird unter Hypertrophie-Bedingungen die Zahl der Myonuklei der Faser und somit die Größe der genetischen Maschinerie durch die Fusion von Satellitenzellen erhöht. Das Volumen einer einzelnen Domäne bleibt dabei gleich (Allen et al. 1995).

Von besonderem Interesse für Forschung und Therapie sind die Signaltransduktionswege, die zur Aktivierung, Proliferation, Migration, Differenzierung und Fusion von Satellitenzellen führen. Da sich Satellitenzellen in einem Ruhezustand - der sogenannten  $G_0$ -Phase des Zellzyklus - befinden (Schultz et al. 1978; Bischoff 1990), müssen diese zunächst dazu gebracht werden, wieder in die  $G_1$ -Phase einzutreten. Danach muss sichergestellt werden, dass der Zellzyklus durchlaufen wird, um eine Zellteilung zu ermöglichen (Pardee 1989). Es werden mindestens zwei Wachstumsfaktoren für die Aktivierung einer Satellitenzelle benötigt. Es konnte gezeigt werden, dass der *Fibroblast-growth-factor* (FGF) die Fähigkeit besitzt, Satellitenzellen aus der  $G_0$ -Phase in die  $G_1$ -Phase des Zellzyklus zu überführen und dass der *Insulin-like-growth-factor* (IGF) einen Durchlauf des Zellzyklus induziert (Allen und Boxhorn 1989). Beide Faktoren finden sich in embryonalem Hühnerextrakt, der traditionell verwendet wird, um das Wachstum von Muskelzellen zu stimulieren (Kimura et al. 1989).

## **Der Ras/Map-Kinase-Signaltransduktionsweg**

Das vorherige Kapitel hat gezeigt, dass die hohe Plastizität des Skelettmuskels komplexe Kontroll- und Signalprozesse notwendig macht. Es ist bekannt, dass für den Muskel wichtige Wachstumsfaktoren wie FGF (Mohammadi 1996) und IGF (Baserga 1999; Lopaczynski 2000) oder auch Peptidhormone wie Insulin (Saltiel und Pessin 2002) in der Lage sind, den Ras/Map-Signaltransduktionsweg über ihre Rezeptoren zu aktivieren. Seine genaue Bedeutung für die Skelettmuskelzelle ist nicht eindeutig geklärt und wird sehr widersprüchlich diskutiert. Für die weitere Diskussion im Rahmen dieser Arbeit sollen in diesem Kapitel der Ras/Map-Kinase-Signaltransduktionsweg, sein Aufbau und seine Funktion näher betrachtet werden.

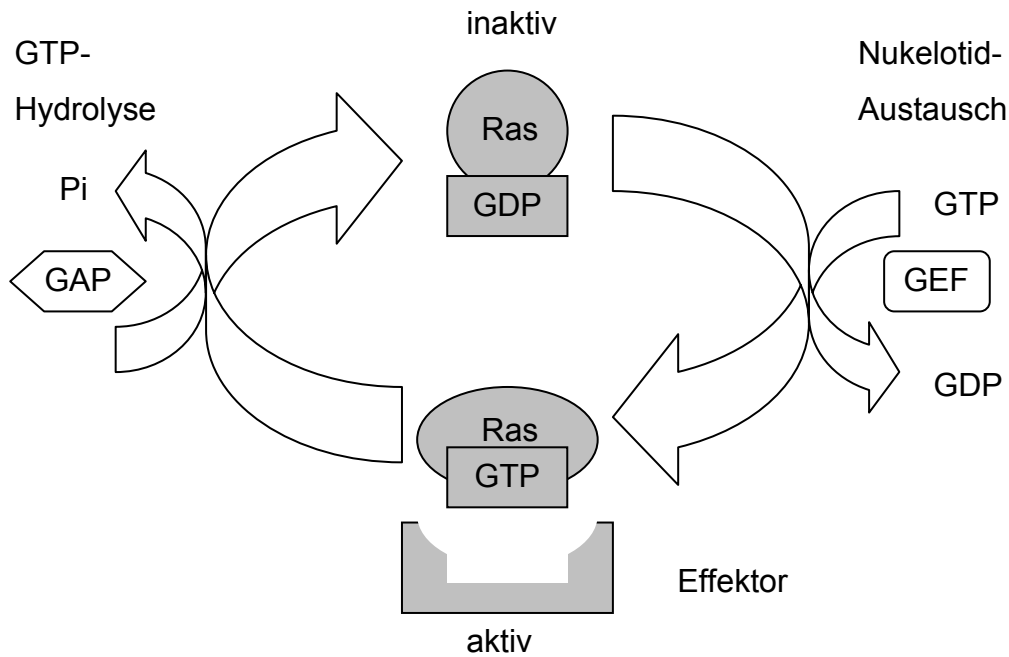
## **Die Ras-Protoonkogenfamilie**

Als erste Mitglieder der ras-Protoonkogenfamilie wurden die humanen Homologe der Harvey- und Kirsten-Murine-Sarkom-Virus-Onkogene (Coffin et al. 1981) identifiziert und entsprechend als H-ras und K-ras bezeichnet (Shih et al. 1980; Ellis et al. 1981). Ein weiteres Mitglied wurde als transformierendes Gen in humanen Neuroblastom- und Fibrosarkom-Zelllinien entdeckt und mit N-ras benannt. Die Länge der einzelnen Gene variiert stark zwischen 6kB und 50kB aufgrund unterschiedlicher Intronlängen, aber alle besitzen 4 codierende Exons. Ras-Gene werden in allen Geweben exprimiert und besitzen Promotoren mit mehrfachen GC-Boxen, aber ohne TATA- oder CCAT-Boxen, wie es auch bei Promotoren so genannter *Housekeeping*-Gene verbreitet ist (Lowndes et al. 1989).

Sequenzvergleiche der ras-Gene innerhalb der Säugetiere zeigen eine hohe Sequenzhomologie. Alle Unterschiede sind stumme Mutationen und ändern nicht die Aminosäuresequenz. Dies zeigt eine hohe evolutionäre Konservierung der Aminosäuresequenz der Ras-Proteine (Watzinger et al. 1998). Die ras-Onkogene verschiedener Tumore zeigen lediglich Punktmutationen, die zu einem Aminosäureaustausch und zu transformierender Aktivität führen (Bos 1989).

## Das G-Protein Ras

Ras-Proteine sind kleine, an der inneren Zellmembran über Farnesyl verankerte Proteine mit normalerweise 189 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 21 kDa (Splicevarianten von H-, K-Ras mit 170 bzw. 188 AS und 19 kDa) (Shimizu et al. 1983; Taparowsky et al. 1983). Sie gehören zu der Gruppe der kleinen G-Proteine, die durch die Bindung von GTP aktiviert werden. Die Bindung von GTP führt zu einer Konformationsänderung, die wiederum, die Bindung an andere Proteine und somit deren Aktivierung (oder Inaktivierung) ermöglicht. Durch die Hydrolyse von GTP zu GDP und anorganischem Phosphat werden die Ras Proteine inaktiviert. Die intrinsische GTPase Aktivität ist jedoch mit  $10^{-2} \text{ min}^{-1}$  sehr gering und nicht für eine schnelle Inaktivierung geeignet. Durch GTPase-aktivierende-Proteine (*GTPase activating protein: GAP*) wird die GTPase-Aktivität jedoch ver Hundertfacht und ermöglicht so eine schnelle Inaktivierung (Gibbs et al. 1988). Analog zu den GAPs werden Ras-Proteine durch GTP/GDP-Austauschproteine (*GTP/GDP Exchange Factor: GEF*) oder GRFs (*guanine-nucleotide releasing factor*) aktiviert (Satoh und Kaziro 1992). Die Freisetzung von GDP wird durch die Konzentration von GTP bestimmt. Ein GTP-Konzentrationsanstieg führt zu einer verstärkten GDP-Freisetzung. GEFs und GRFs katalysieren die Freisetzung von GDP, woraufhin sofort wieder GTP gebunden wird, dessen cytosolische Konzentration ca. 10-mal größer ist als die von GDP. Die Aktivität von Ras wird somit durch einen Zyklus aus GTP-Bindung und GTP-Hydrolyse bestimmt.



In einer normalen Zelle liegen fast alle Ras-Moleküle in einem GDP-gebundenen und somit inaktiven Zustand vor. Erst ein externer Stimulus führt über die Aktivierung von GEFs oder GRFs zu einer Freisetzung von GDP und durch die nachfolgende GTP-Bindung zu einer Aktivierung. Aber auch die Hemmung von GAPs kann zu einer verstärkten Aktivität führen, da Ras länger als aktiver Ras-GTP-Komplex vorliegt. Die Aktivität von Ras und der von diesem abhängenden Signalwege kann somit über eine Vielzahl von extrazellulären Signalen und verschiedene Rezeptoren wie Rezeptortyrosinkinasen (RTKs) (Porter und Vaillancourt 1998; Blume-Jensen und Hunter 2001), G-Protein-gekoppelte-Rezeptoren (Gutkind 2000) oder Integrine (Giancotti und Ruoslahti 1999) beeinflusst werden. Darüber hinaus können Ras-Proteine auch durch Protein Kinase C (PKC) aktiviert werden (Rane 1999). Es sind inzwischen sogar Ras-GRFs bekannt, deren Aktivität von der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration abhängt (Farnsworth 1995). Es ergibt sich so ein sehr breites Aktivierungsspektrum der Ras-Proteine.

### Ras-Mutationen

Die Aminosäuresequenz der Ras-Proteine ist hoch konserviert, Punktmutationen mit Aminosäureaustausch führen sehr häufig zu gesteigerter und somit transformierender Aktivität der Ras-Proteine. In den meisten natürlich auftretenden Tumoren finden sich Aminosäureaustausche an den

Positionen 12, 13 und 61 (Bos 1989). Genauere Untersuchungen von Ras-Proteinen zeigen, dass darüber hinaus auch Punktmutationen der Codons 59, 63, 116, 117, 119 und 146 zu einer Aktivierung führen (Barbacid 1990). Alle diese Mutationen befinden sich in der Nähe der Guanin-Nukleotid-Bindungsstelle. Die Wirkungsweise dieser Mutationen besteht entweder in einer Reduktion der GTPase-Aktivität, sodass die onkogenen Ras Mutanten im GTP-gebundenen, aktiven Zustand bleiben (Aminosäuren 12, 13, 59, 61, 63) oder durch eine verstärkte GDP-Freisetzung, sodass die Bindungsstelle schneller wieder mit GTP besetzt werden kann (Aminosäuren 116, 117, 119, 146). Es kommt zu einer Akkumulation von aktivierten Ras-GTP-Komplexen, die zu einer kontinuierlichen Aktivierung der nachfolgenden Signaltransduktionswege und der Ausprägung des malignen zellulären Phänotypus führen.

Im Gegensatz dazu führt der Austausch der Aminosäure 17 zu Arginin zu einer besseren Bindung von GDP, sodass die Freisetzung von GDP gehemmt und Ras im inaktiven Zustand ist. Darüber hinaus konkurrieren mutierte und native Ras-Proteine miteinander um die GEFs, sodass auch die Aktivität des Wildtyp-Ras reduziert wird.

### **MAP-Kinase-Signaltransduktionswege**

Mit der Bezeichnung „Mitogen aktiviert Protein-Kinase“ (MAPK) wird eine Familie von Kinasen zusammengefasst, die durch so genannte mitogene Faktoren zu einer Aktivierung bestimmter Gene führen, die Einfluss auf Proliferation, Differenzierung, Wachstum oder Apoptose haben (Robinson und Cobb 1997; Kolch 2000). Zu den MAP-Kinasen werden Kinasen gerechnet, die sich in Struktur und grundlegenden Mechanismen der Regulation und Funktion ähneln (Cobb 1999). Ein MAP-Kinase-Signaltransduktionsweg besteht aus einer Kaskade von drei MAP-Kinasen (Lewis et al. 1998; Whitmarsh und Davis 1998). Durch die Aktivierung eines G-Proteins über einen externen Stimulus wird eine übergeordnete Kinase (MAP-Kinase-Kinase-Kinase; MAPKKK) aktiviert, die eine weitere MAP-Kinase (MAP-Kinase-Kinase; MAPKK) aktiviert. Diese wiederum aktiviert eine noch weiter untergeordnete Kinase (MAP-Kinase; MAPK), die verschiedene Substrate im Zytosol wie auch im Zellkern phosphoryliert (Kolch 2000; Pearson 2001).

In der linken Spalte von Tabelle 1 kann man dieses grundlegende Schema eines MAPK-Signalweges erkennen.

<b>Stimulus</b>	<b>Wachstumsfaktor</b>	<b>Cytokine Stress</b>		<b>oxidativer, osmotischer Stress</b>	<b>Serum Stress</b>
↓	↓	↓		↓	↓
G-Protein	Ras	Rac/Cdc42	Rho	?	?
↓	↓	↓		↓	↓
MAPKKK	Raf	Tpl2, MEKK, MLK, TAK, ASK		MEKK2, MEKK3, Tpl-2	?
↓	↓	↓	↓	↓	↓
MAPKK	MKK1/2	MKK4/7	MKK2/6	MKK5	?
↓	↓	↓	↓	↓	↓
MAPK	ERK1/2	JNK	p38	ERK5	ERK3
<b>Reaktion</b>	<b>Proliferation Differenzierung Entwicklung Apoptose</b>	<b>Entzündung, Proliferation, Apoptose, Entwicklung</b>		<b>Proliferation</b>	<b>?</b>

**Tabelle 1: MAP-Kinase-Signalwege**

Wie man sieht, gibt es eine Reihe verschiedene MAPK-Signaltransduktionswege, die aber mehr oder weniger stark miteinander verknüpft sind und Einfluß aufeinander nehmen können (Robinson und Cobb 1997; Lewis et al. 1998; Pearson 2001).

### Der Erk-Signalweg

Der Begriff „Ras/Mapkinase-Signalweg“ wird häufig synonym für den Ras/Erk-Signalweg benutzt, obwohl Ras auch Teil anderer MAP-Kinase-Signalwege ist, wie z.B. des SAPK/JNK (Weston und Davis 2002). Abbildung 3 gibt einen Überblick über den Ras/Erk-Signalweg.

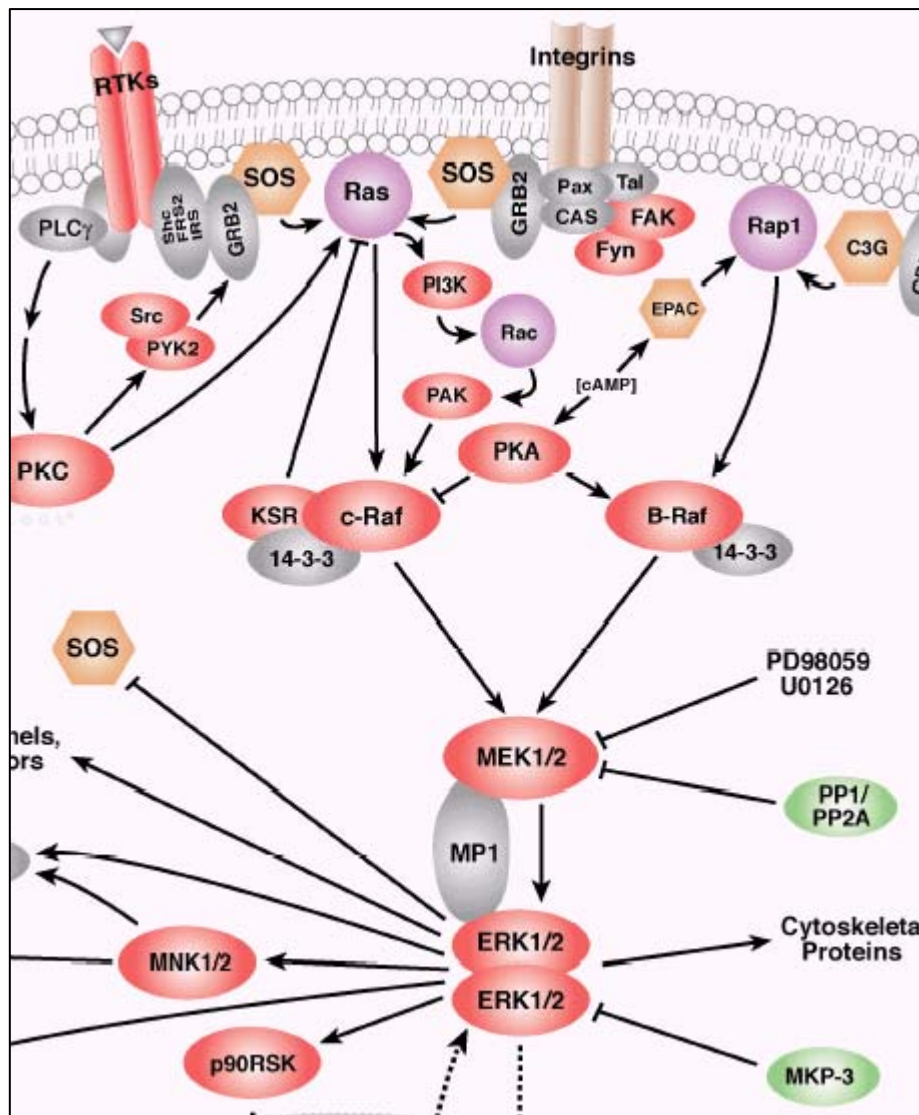


Abbildung 3: Der Ras/Erk-Signaltransduktionsweg

Adapter-Proteine wie GRB2, SHC oder *Son-of-sevenless* (SOS) werden durch verschiedene Membranrezeptoren (Rezeptor-Tyrosin-Kinasen, Integrine) aktiviert (McCormick 1993; Blume-Jensen und Hunter 2001). SOS gehört zu der Gruppe der GDP/GTP-Austauschproteine und führt über die GDP-Freisetzung zu einer GTP-Bindung und Aktivierung. Im aktiven Zustand bindet der Ras/GTP-Komplex, unterstützt durch das Gerüst- und Adapterprotein 14-3-3

(Muslin et al. 1996), an die regulatorische Untereinheit von Raf-1. Dies führt zu einer Konformationsänderung von Raf-1 (MAPKKK) und zur Aktivierung der Kinase-Domäne (Fantl et al. 1994; Li et al. 1995), die daraufhin ihre Substrate MEK1 und MEK2 (MAPKK) phosphoryliert (Avruch et al. 1994). Das Hauptsubstrat von MEK1 und MEK2 sind die MAP-Kinasen Erk1 und Erk2, für die auch die Namen p42 bzw p44 gebräuchlich sind. Sie phosphorylieren verschiedene Substrate in Cytosol und Zellkern. Insgesamt sind über 50 Substrate der Erk-Kinasen bekannt (Lewis et al. 1998). Von besonderer Bedeutung ist dabei die Phosphorylierung und damit die Aktivierung oder Inaktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren wie z.B. c-Myc oder Elk-1 (Hill und Treisman 1995). Die Inaktivierung der einzelnen MAP-Kinasen und des Signalweges erfolgt durch Dephosphorylierung, entweder durch allgemeine Proteinphosphatasen (PP1/PP2a → MEK1/2) oder durch spezielle MAP-Kinase-Phosphatasen (MKP → Erk1/2) (Sun et al. 1993). Aber die Aktivität des Erk-Signalweges wird nicht nur von Ras bestimmt, auf allen Stufen der Kaskade können andere Kinasen oder Phosphatasen Einfluss nehmen.

PKA → ( Rap1 ) →	
B-Raf → MEK1/2	Aktivierung durch PKA (Stork und Schmitt 2002)
PKA →  c-Raf	Hemmung durch PKA (Stork und Schmitt 2002)
Erk1/2 →  SOS	Rückwertshemmung und Signalabschaltung
Akt →  Raf1	Hemmung durch PI-3-K (Zimmermann und Moelling 1999)

**Abbildung 4: Interaktionen des Ras/Erk-Signalweges und anderer Signalwege**

Außerdem wurden in den letzten Jahren vermehrt Verbindungs-, Adaptor- oder Gerüstproteine beschrieben (14-3-3, *Kinase-Supressor of Ras*: KSR), deren Bindung hemmend oder unterstützend für die Signaltransduktion wichtig ist. Bei diesen Modellen ist die räumliche Nähe und Anordnung der



Signaltransduktionsproteine für den Ablauf des Transduktionsprozesses von großer Bedeutung (Kolch 2000).

Aktuelle Reviews über Signaltransduktionsprozesse zeigen, dass die traditionelle lineare Betrachtung von Signaltransduktionskaskaden eine starke Vereinfachung der tatsächlichen Verhältnisse darstellt, mit der die komplexen Signalprozesse, die für die Steuerung einer Zelle notwendig sind, nicht erklärt werden können (Lewis et al. 1998; Kolch 2000; Pearson 2001; Vivanco und Sawyers 2002). So zeigen sich immer mehr Querverbindungen zwischen verschiedenen Signalwegen. Signalflüsse konvergieren, divergieren, modulieren einander und bilden komplexe Signalnetzwerke (Kolch 2000), deren Zusammenspiel für die verschiedenen Expressionsmuster einzelner Zelltypen und unterschiedlicher zellulärer Stadien notwendig sind. Dies wird im folgenden Abschnitt noch deutlicher.

### **Andere Ras-Signalwege**

Ras kann auch andere Substrate als Raf-1 aktivieren. Ein weiteres Substrat ist die Phosphoinositol-3-Phosphat-Kinase (Cantley 2002). PI-3-Kinase stellt den Ausgangspunkt einer sehr verzweigten Signalkaskade dar, bei der über Akt (Protein Kinase B, PKB) zahlreiche Signalproteine (Kinasen, Phosphatasen) beeinflusst werden, die wichtig für die Kontrolle von Funktionen wie Zellzyklus, Zellwachstum, Zelltod bzw. -überleben oder Proteinsynthese sind (Vivanco und Sawyers 2002). Der AKT-Signalweg gilt als einer der Hauptsignalwege der Insulinwirkung (Hajdich et al. 2001). Interessanterweise führt PI-3K- und Akt-Aktivierung zu einer Hemmung von MAP-Kinasen des Erk- (Raf1) (Zimmermann und Moelling 1999) und des JNK- (ASK1, JIP1) Signalweges (Kim 2001).

Der SAPK/JNK- oder Stressaktivierte-Proteinkinase-Signaltransduktionsweg ist ein weiterer Signalweg der durch Ras beeinflusst werden kann (Weston und Davis 2002). Er wird durch eine Vielzahl verschiedener Stress-Signale wie Strahlung, oxidativen bzw. osmotischen Stress oder inflammatorische Cytokine aktiviert (Kyriakis und Avruch 2001). Ras kann die initialen G-Proteine dieses Signalweges - Rac, Rho und cdc42 - aktivieren. Die erste Kinaseebene der Kaskade (MAPKKK, s. MAP-Kinase-Signaltransduktionswege, S. 11) besteht aus einer Vielzahl von Kinasen, die Signale von verschiedenen Rezeptoren an

die Kaskade weitergeben. Die Zielkinase dieses Weges ist die Jun-N-Terminale Kinase (JNK) die zahlreiche Transkriptionsfaktoren wie c-Jun, ATF-2, Elk-1, p53 oder NF-ATc1 aktiviert (Weston und Davis 2002). Das Insulin-Rezeptorsubstrat-1 (IRS-1) ist ein cytosolisches Substrat auf das die JNK hemmend wirkt, wodurch der SAP/JNK-Signalweg Einfluß auf die Insulin- bzw. IGF-abhängige Aktivierung des Ras/Erk- und des PI-3-Kinase-Signalweges nehmen kann (Burks und White 2001). Auch die p38-MAP-Kinase nutzt Teile dieses Signalweges und kann somit potentiell über Ras aktiviert werden. Die p38-MAP-Kinase ist eine MAPK und aktiviert Transkriptionsfaktoren wie MEF2, Stat1, Myc, Elk-1, ATF-2 oder über MSK-1 indirekt CREB (Gallo und Johnson 2002). Außerdem gibt es Hinweise für eine Akt/p70<sup>S6K</sup> induzierte Aktivierung der p38-MAP-Kinase und als Resultat dessen eine NF-κB-Aktivierung (Conejo et al. 2002). Neben der Aktivierung der beschriebenen Signalwege (PI-3-K/Akt; SAPK/JNK) durch Ras werden diese Signaltransduktionswege häufig gemeinsam durch entsprechende Rezeptoren und damit assoziierte Adapterproteine aktiviert. Der Insulinrezeptor z.B. aktiviert sowohl den Ras/Erk-Signalweg wie auch den PI-3-K/Akt-Weg (Saltiel und Pessin 2002).

### **Ras-Abhängige Signalwege im Skelettmuskel**

Über die genaue Funktion und Aufgabe von Ras und dem Ras/Erk-Signalweg in Skelettmuskelzellen wird in der Literatur sehr widersprüchlich berichtet. In älteren Veröffentlichungen wurde der Einfluß der Ras-Aktivierung in Skelettmuskelzellen als Inhibition der Differenzierung und Fusion beschrieben (Lathrop et al. 1985; Clegg et al. 1987; Olson et al. 1987; Florini et al. 1991).

Ras und andere Mitglieder des Ras/Erk-Signalweges wie konstitutiv aktive MEK- oder Erk-Kinasen, c-myc oder AP1 (Fos/Jun Heterodimer) werden dabei mit einer transkriptionellen Herabregulation von myogenen bHLH-Proteinen und einer Verhinderung der Enddifferenzierung in Verbindung gebracht (Lassar et al. 1989; Konieczny et al. 1990). *In vivo* Untersuchungen im Menschen haben gezeigt, dass durch Training alle drei MAPK-Wege aktiviert werden können (Aronson et al. 1997; Aronson et al. 1998; Boppard et al. 1999; Yu et al. 2001) und dass vor allem Transkriptionsfaktoren der Jun/Fos- und der ATF/CREB-Familien durch sie beeinflusst werden (Hunter und Karin 1992).

Die Bedeutung von Ras und seinen Signalwegen für die Fasertypumwandlung ist unklar. Untersuchungen von Allen (Allen und Leinwand 2002) zeigen eine Bedeutung des Ras/Erk-Signaltransduktionsweges für die MHCIIa Promotor-Aktivierung in C2C12 Myoblasten als Antwort auf  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionophorbehandlung.

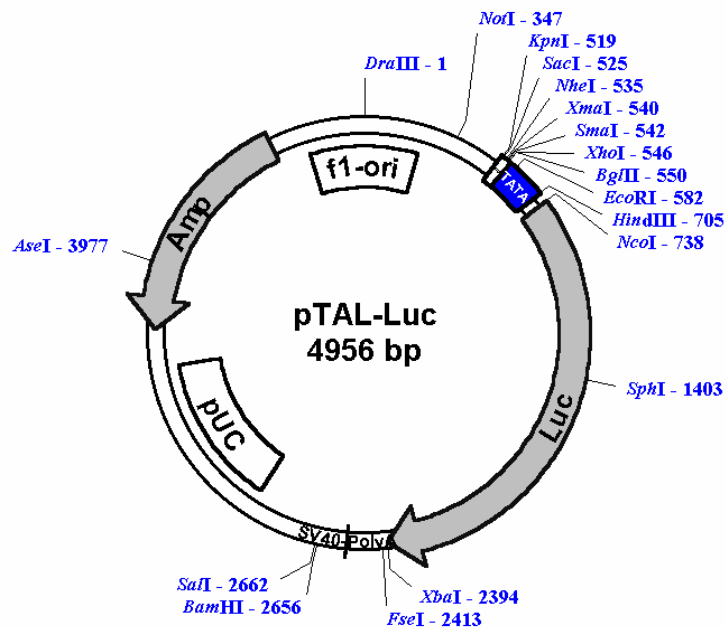
In einer anderen Veröffentlichung wird dem Ras/Erk-Weg eine Bedeutung für die Expression der langsamen schweren Myosinketten (MHCI) in regenerierenden Muskelzellen zugeschrieben (Murgia et al. 2000). Es ist jedoch fraglich, ob Ras dabei wirklich die Expression von MHCI initiiert oder nur verstärkt, da dieser Effekt nur in regenerierenden langsamen Muskeln (Soleus) zu beobachten ist und nicht in schnellen (EDL).

## Materialien und Methoden

### Molekularbiologische Methoden

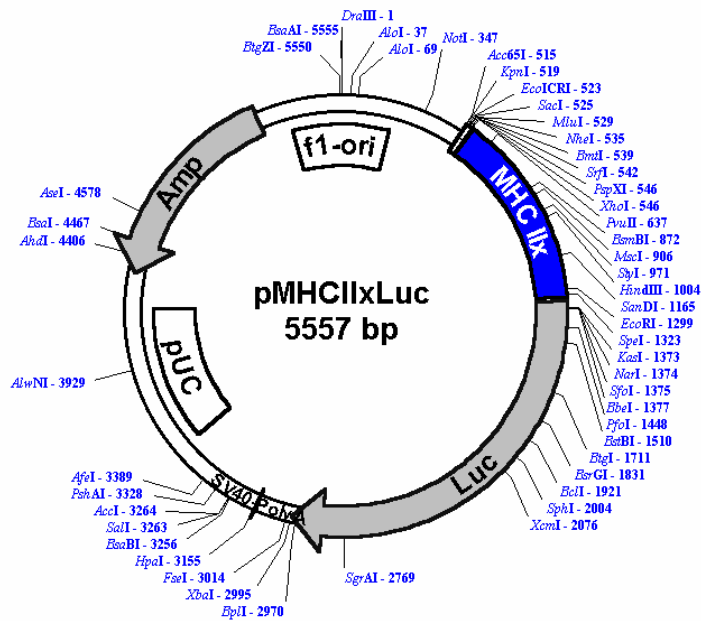
#### Plasmide

##### pTALLuc



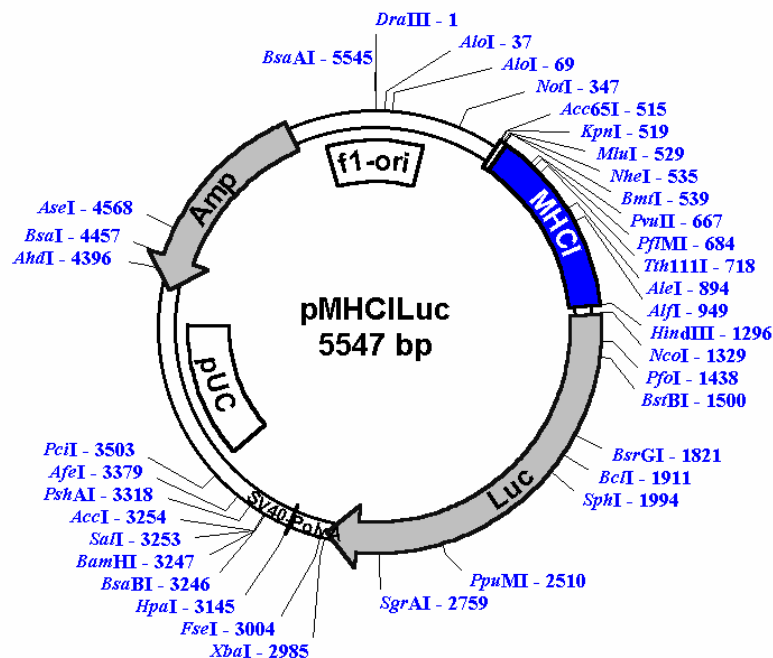
Der pTAL-Luc wurde als Ausgangsvektor für die Klonierung der Vektoren pMHCILuc und pMHCIIxLuc verwendet. Der Vektor enthält einen Minimalpromoter bestehend aus der TATA-Region des Thymidin-Kinase-Promoters des Herpes-Simplex-Virus (HSV-TK). Die kodierende Sequenz des Luziferase-Gens wird von dem SV40-Polyadenylierungssignal flankiert. Für die Vermehrung in *E.Coli* besitzt der Vektor einen pUC-Replikationsstartpunkt (*origin of replication, ori*) und das Ampicillin-Resistenz-Gen.

pMHCIIxLuc



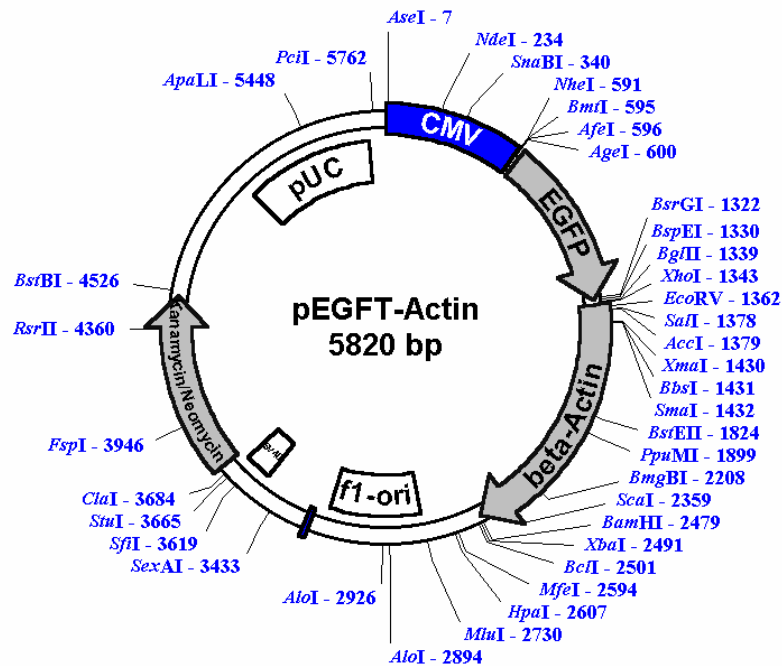
Der Minimalpromoter wurde komplett aus pTAL-Luc entfernt und durch ein proximales Fragment des *Myosin-Heavy-Chain IIx* Promoters ersetzt.

pMHCILuc



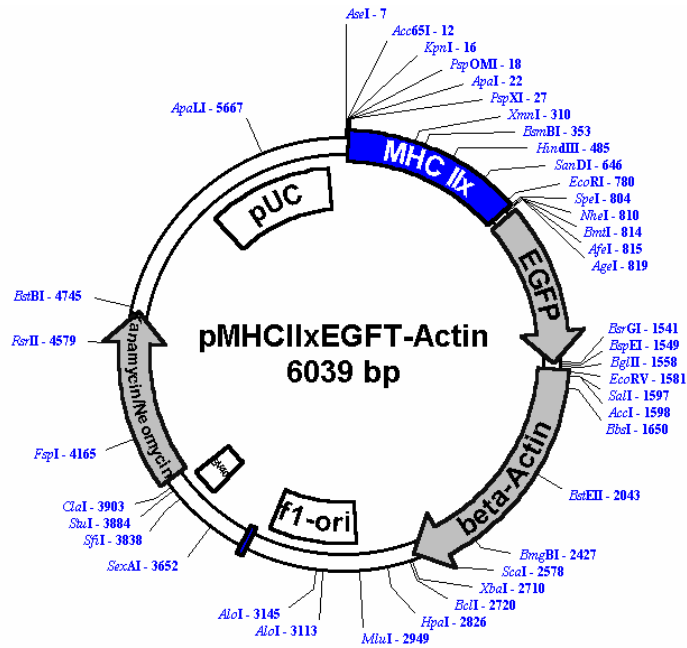
Der Minimalpromoter wurde komplett aus pTAL-Luc entfernt und durch ein proximales Fragment des *Myosin-Heavy-Chain I* Promoters ersetzt.

## pEGFP-Actin



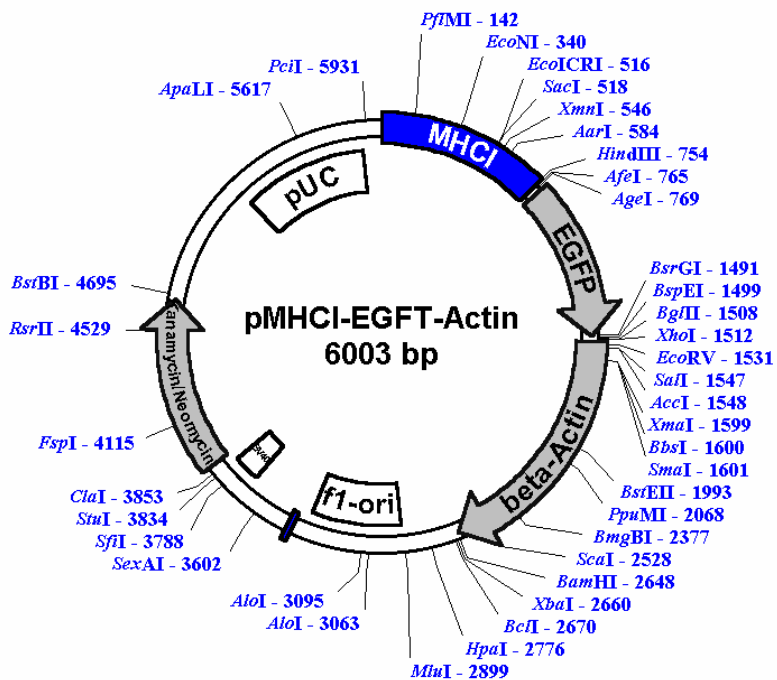
Die pEGFP-Plasmide sind Abkömmlinge des Plasmides pEGFP-Actin der Firma Clontech. Sie codieren für ein EGFP-Actin Fusionsprotein. EGFP stellt eine Variante des Wildtyp GFPs dar, dessen Emissionsmaximum zu längeren Wellenlängen hin verschoben ist (Excitationsmaximum = 488 nm; Emissionsmaximum = 507 nm) und sich durch hellere Fluoreszenz (erhöhte Quantenausbeute) und eine bessere Expression in Säugerzellen auszeichnet. Das EGFP-Gen enthält 190 stumme Basenaustausche, um die Sequenz der humanen Codon-Nutzung anzupassen. Der Actin-Fusions-Anteil wird vom humanen cytoplasmatischen  $\beta$ -Actin-Gen kodiert. Das Fusionsprotein wird durch den Cytomegalovirus-Promoter kontrolliert. Hinter der kodierenden Sequenz befindet sich ein SV40-Polyadenylierungssignal. Darüber hinaus verfügt das Plasmid über einen SV40-ori, der eine Replikation in Eukariotenzellen ermöglicht, die das *Large-T*-Antigen exprimieren. Für die Replikation des Plasmides in *E.Coli* verfügt es über eine Neomycin/Kanamycin-Resistenzkassette und einen pUC-ori.

pMHCIIxEGFP-Actin



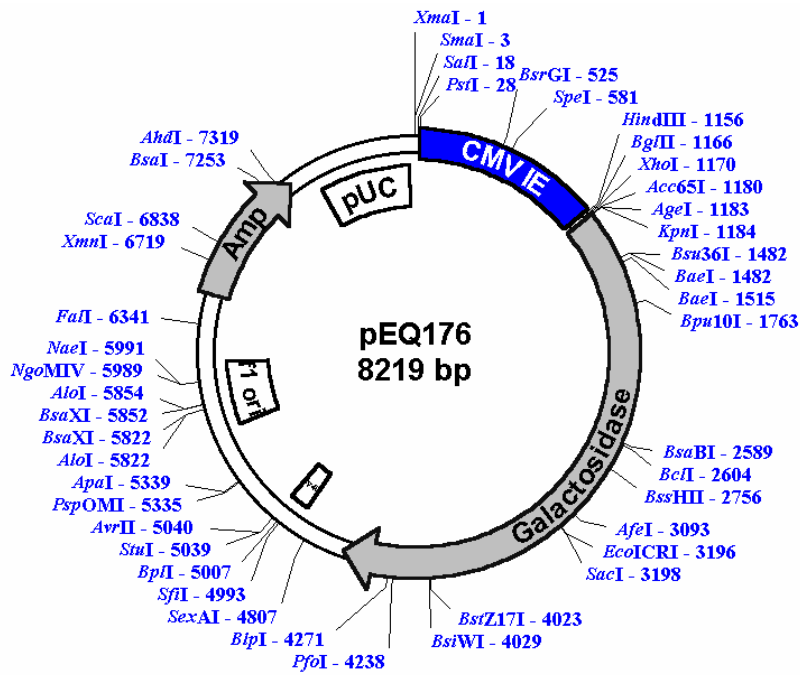
In dieser Variante des pEGFP-Actin-Plasmides wurde der CMV-Promoter entfernt und durch einen proximalen Teil des MHC IIx-Promoters ersetzt.

pMHCI-EGFP-Actin



In dieser Variante des pEGFP-Actin-Plasmides wurde der CMV-Promoter vollständig entfernt und durch einen proximalen Teil des MHC Ix-Promoters ersetzt.

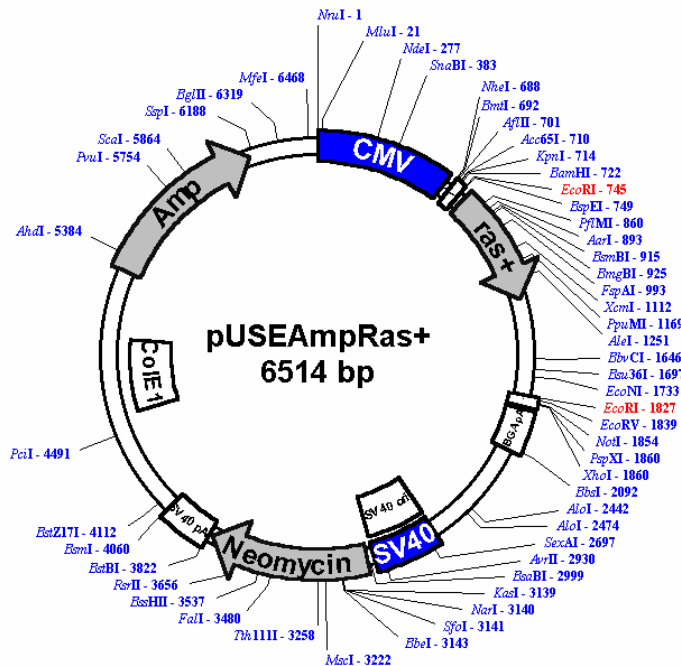
## pCMV-βGal



Unter dem Arbeitsnamen pCMV-β-Gal wurde das β-Galactosidase-Expressions-Plasmid pEQ176 verwendet. Das bakterielle β-Galactosidase-Gen steht unter der Kontrolle eines Cytomegalo-Virus-Promoters. Für die Vermehrung in *E.Coli*-Zellen verfügt das Plasmid über einen pUC-ori und ein Ampicillin-Resistenzgen.



## pUSEAmpRas+



Das Plasmid pUSEAmpRas+ wurde von der Firma Upstate Biotechnology bezogen. Es enthält die kodierende Sequenz eines konstitutiv aktiven Ras. Es handelt sich um die onkogene Ras-Form Ras(Q61L). Die Aminosäure 61 (Glutamin) ist gegen ein Leucin ausgetauscht, was zu einer fünfmal größeren GDP/GTP-Austauschrate und einer verminderten GTPase-Aktivität führt. Die Expression wird über einen CMV-Promotor kontrolliert. Für die Expression in Säugerzellen enthält das Plasmid außerdem ein SV40-Polyadenylierungssignal, ein SV40-ori für die Replikation in *Large-T*-Antigen-transformierten Zellen und eine Neomycinresistenzkassette für die Selektion. Für die Vermehrung in *E. Coli* verfügt das Plasmid über einen *CoIE1-ori* und ein Ampicillinresistenzgen.

## pRas(S17N)

Das Plasmid pRas(S17N) basiert auf der Arbeit von Feig und Cooper (Feig und Cooper 1988) und wurde von Marc Dangers, Abteilung Klinische Nephrologie der Medizinischen Hochschule Hannover, zur Verfügung gestellt. Es verfügt über ein Ampicillinresistenzgen und exprimiert eine dominant negative Mutante des H-Ras Proteins, bei dem die Aminosäure Serin an Position 17 durch ein Asparagin ersetzt wurde. Es resultiert eine etwa 40-mal geringere Affinität zu GTP. Dies hält das mutierte Ras-Protein im inaktiven Zustand.

## Allgemeine molekularbiologische Methoden

Molekularbiologische Methoden wie Restriktionsspaltungen, Agarosegelelektrophorese, Dephosphorylierung, Ligationen etc. wurden wie in Standardwerken beschrieben durchgeführt (Ausubel et al. 1993). DNA-Sequenzierungen wurden von der Firma GATC, Konstanz durchgeführt.

## Isolation von DNA-Fragmenten

DNA-Fragmente wurde mit Hilfe des Qiaquick-Kit der Firma Qiagen aus präparativen Agarosegelen isoliert. Die Isolation wurde dem Protokoll entsprechend durchgeführt.

## DNA-Präparationen

Zur Präparation von Plasmid-DNA wurden Mini- und Maxiprep-Kits der Firma Qiagen verwendet. Die Präparationen wurde dem jeweiligen Protokoll entsprechend durchgeführt.

## Synthetische Oligonukleotide

Für Klonierungen und wurden folgende Oligonukleotide verwendet:

Name	Sequenz	für Klonierung von:
LucLinkerForward	5'-GAT CAT GCA ACT AGT ACA CT-3'	pMHCIIxLuc
LucLinkerReverse	5'-CAT GAG TGT ACT AGT TGC AT-3'	pMHCIIxLuc
VKHB-Up	5'-TAATGGTACCAAGCTTACTAGTG-3'	pMHCIIxEGFP-Actin
VKHB-Down	5'-CTAGCACTAGTAAGCTTGGTACCAT-3'	pMHCIIxEGFP-Actin
BstHind-Plus	5'-TAA AGT ATA CAT CAA GCT TA-3'	pMHCIEGFP-Actin
BstHind-Minus	5'-CTA GTA AGC TTG ATG TAT ACT T-3'	pMHCIEGFP-Actin

Diese wurden von der Firma MWG im 0,01 µmol Maßstab synthetisiert und routinemäßig aufgereinigt, sodass sie keine Salze und keine Oligonukleotide abweichender Länge (vor allem n-1) mehr enthalten.

## **Mikrobiologische Methoden**

### **Verwendete Stämme *E.Coli*-Stämme**

Alle verwendeten *Escherischia-Coli*-Stämme sind Abkömmlinge des Sicherheitsstammes K12.

Top10F':

Genotyp: F' $\{lacI^q Tn10(Tet^R)\}$ , *mcrA*,  $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$ ,  $\Phi80/lacZ\Delta M15$ ,  $\Delta LacX74$ , *deoR*, *recA1*, *araD139*  $\Delta(ara-leu)7697$  *galU*, *galK*, *rpsL*, *endA1*, *nupG*

Der *E.coli* Stamm Top10`F ist ein rekombinationsdefizienter Stamm für die stabile Replikation von *high-copy-number*-Plasmiden. Der Stamm ist *recA1* für eine erhöhte Stabilität des *Inserts*, *endA* für eine bessere Miniprep-Qualität und *hsdRMS* für geringe Spaltungsaktivität endogener Nukleasen. Der *lacZ* $\Delta$ M15 Genotyp ermöglicht *blue/white-screening*.

LK1111 $\lambda$ :

Genotyp: (*r<sub>k</sub><sup>-</sup> m<sub>k</sub><sup>+</sup>*), *thi-1*, *thr-1*, *leuB6*, *tonA21*, *supE44*, *lacI<sup>q</sup>YZ* $\Delta$ M15, *hfr<sup>+</sup>*,  $\gamma^+$

TG1:

Genotyp: F', *traD36*, *lacI<sup>q</sup>*, *lacZ* $\Delta$ M15, *proA<sup>+</sup>B<sup>+</sup>l*supE,  $\Delta(hsdM-mcrB)5$ , (*r<sub>k</sub><sup>-</sup> m<sub>k</sub><sup>-</sup>*), *mcrB<sup>-</sup>*, *thi-1*,  $\Delta(lac-proAB)$

## Nährmedien

LB – Medium (Luria Bertani)

5 g	Bacto Trypton
5 g	Hefe Extrakt
5 g	NaCl
ad 500 ml mit H <sub>2</sub> O	

Agar-Platten (10 cm Kunststoff-Petrischalen der Firma Sarstedt)

2,5 g	Bacto Trypton
2,5 g	Hefe Extrakt
2,5 g	NaCl
3,75 g	Bacto Agar
ad 250 ml mit H <sub>2</sub> O	

Alle Nährmedien wurden autoklaviert (120°C, 30 Minuten). Den Festmedien wurde erst nach Abkühlung auf ca. 50°C und Flüssigmedien erst direkt vor der Verwendung Antibiotika zugesetzt. Es wurde die in der Tabelle angegebenen Endkonzentrationen verwendet.

	Flüssigmedium	Festmedium	
Ampicillin	100	75	µg/ml
Kanamycin	30	35	µg/ml

## Herstellung von kompetenten Zellen

Kompetente Zellen wurden nach der Rubidiumchlorid-Methode hergestellt. Die so erhaltenen Zellen können bis zu einem Jahr bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert werden, ohne ihre Kompetenz zu verlieren.

### TFB1- Lösung (*Transforming Buffer 1*)

30 mM	Kaliumacetat
100 mM	RbCl
10 mM	CaCl <sub>2</sub>
50 mM	MnCl <sub>2</sub>
15 % (w/v)	Glycerin

pH 5,8 mit 0,1 M Essigsäure eingestellt  
zu 100 ml aliquotiert und autoklaviert

### TFB2-Lösung (*Transforming Buffer 2*)

10 mM	MOPS
75 mM	CaCl <sub>2</sub>
10 mM	RbCl <sub>2</sub>
15 % (w/v)	Glycerin

pH 6,5 mit KOH einstellen,  
sterilfiltrieren und zu 10 ml aliquotieren

Von einer einzelnen *E. Coli*-Kolonie wurde eine 5 ml LB-Flüssigkultur beimpft. Diese wurde bei  $37^{\circ}\text{C}$  unter Schütteln über Nacht inkubiert. 2,5 ml dieser Vorkultur wurden in 250 ml LB-Medium mit 20 mM MgSO<sub>4</sub> gegeben und bis zu einer optischen Dichte bei 590 nm von 0,4-0,6 bei  $37^{\circ}\text{C}$  kultiviert. Die Zellsuspension wurde bei 4000 x g und  $4^{\circ}\text{C}$  für 5 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde in 100 ml TFB1 resuspendiert und für 5 Minuten auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden erneut bei 4000 x g und  $4^{\circ}\text{C}$  für 5 Minuten zentrifugiert und das Pellet in 10 ml TFB2 resuspendiert und für weitere 45 Minuten auf Eis gelagert. Die Zellsuspension wurde nun in Aliquots zu 150  $\mu\text{l}$  in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### **Transformation von kompetenten *E. coli*-Zellen**

Zu tiefgefrorenen kompetenten *E. Coli*-Zellen wurden 100 - 150 ng Plasmid-DNA gegeben und diese dann langsam auf Eis aufgetaut. Nach 45 Minuten wurde die Zellsuspension für 2 Minuten auf 42°C erhitzt. Anschließend wurde 1 ml LB-Medium zugegeben und die Zellen für 1 h bei 37°C inkubiert. Dann wurden die Zellen bei niedrigster Umdrehungszahl in der Tischzentrifuge abzentrifugiert, der Überstand wurde "locker" abgegossen und die Zellen in der verbleibenden Flüssigkeit resuspendiert. Die Zellsuspension wurde auf LB-Agar-Platten ausgestrichen und die Platten über Nacht bei 37°C inkubiert.

### **Zellkultur**

Alle Arbeiten mit Zellkulturen wurden unter sterilen Bedingungen und unter Verwendung steriler Materialien durchgeführt. Zellkulturflaschen und -schalen wurden von der Firma Sarstedt bezogen.

### **Verwendete Zellen**

RMK2-Zellen: Muskel-Satellitenzellen aus Wildkaninchen (*oryctolagus cuniculus*)

Die Zellen wurden von Eva Markreiter (Innsbruck) isoliert und uns zu Verfügung gestellt. Der aus Muskelgewebe isolierte Einzelklon wurde in PROMOCELL™ Medium vermehrt und für die weitere Verwendung eingefroren.

Primäre Kaninchenmuskel-Myoblasten/-tuben: neonatale Myoblasten isoliert aus Wildkaninchen (*oryctolagus cuniculus*) und in Carriersuspensionkultur vermehrt und differenziert

**Medien und Reagenzien für die Zellkultur**

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle Medium*  
(*Low-Glucose*) mit 1000mg/l Glucose, mit Glutamin und Natriumpyruvat gelagert bei 4°C (Gibco)

PROMOCELL *Skeletal Muscle Growth Medium*<sup>TM</sup>:

Basal-Medium; gelagert bei 4°C

Supplement Pack: gelagert bei -20°C

25 ml FCS

5,0 µg hEGF

0,5 µg hbFGF

25 mg Fetuin

5 mg Insulin

200 µg Dexametasone

25 mg Gentatmicin

25 µg Amphotericin B

pro 500 ml Basal Medium

*Newborn Calf Serum* (NCS): Firma Gibco (Invitrogen)

*Fetal Calf Serum* (FCS): Firma Gibco (Invitrogen)

*Rabbit Serum* (RS): Firma Gibco (Invitrogen) und Firma PROMOCELL

Penicillin/Streptomycin-Lösung:

100 Units/ml Penicillin und 10 mg/ml Streptomycin in 0.9% NaCl-Lösung,  
sterilfiltriert (Sigma)

Accutase<sup>TM</sup>: Zellablösungsreagenz der Firma PAA

PBS: *Dulbecco's Phosphat Buffered Saline*, steril, für die Zellkultur (Firma PAA)

Verwendet wurden folgende Medien:

- PROMOCCELL *Skeletal Muscle Growth Medium*<sup>TM</sup>: Proliferation
- DMEM + 5% NCS + 5 ml P/S-Lösung: Fusion und Differenzierung
- Einfriermedium: PROMOCCELL *Skeletal Muscle Growth Medium*<sup>TM</sup> + 10% DMSO

### **Passagieren von Zellen**

Die RMK2-Zellen erreichen in PROMOCCELL *Skeletal Muscle Growth Medium*<sup>TM</sup> eine Teilungsrate, die eine 1:10 Passage alle zwei Tage erforderlich macht.

Wie sich zeigte, führten große Zelldichten (>80% konfluent) zum Beginn der Fusion und Differenzierung. Die proliferativen Fähigkeiten der Zellen ließen dann nach wenigen Passagen sehr stark nach. Daher wurden die Zellen passagiert, sobald die Konfluenz des Zellrasens 80% erreichte.

Der Zellrasen wurde einmal mit ca. 10 ml PBS gewaschen. Dann wurden die Zellen für ca. 5 Minuten mit 2 ml Accutase<sup>TM</sup> bei 37°C inkubiert. Die erhaltene Zellsuspension wurde resuspendiert und mit Medium in geeignetem Maße verdünnt. Ein Milliliter der Zellsuspension wurde in einer neuen Flasche in 15 ml Medium resuspendiert.

### **Kryokonservierung von Zellen**

Die Zellen wurden bis zu 90% Konfluenz in einer 75-cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche kultiviert. Sie wurden wie beim Passagieren abgelöst, mit Medium einmal gewaschen und schließlich in 1 ml Einfriermedium aufgenommen und in spezielle Einfriergefäße, sogenannte Kryoröhrchen (Firma Nunc), überführt. Die Röhrchen wurden mit Hilfe einer mit Isopropanol gefüllten Einfrierbox, die ein langsames Abkühlen ermöglicht (<1°C/Minute), im Tiefkühlschrank auf -80°C heruntergekühlt und im Anschluss in flüssigem Stickstoff gelagert.



## **Auftauen von Zellen**

Die Zellen wurden dem flüssigem Stickstoff entnommen und schnell aufgetaut. Sobald die Zellsuspension vollständig aufgetaut war, wurde diese mit 30 ml kaltem Medium verdünnt. Nach der Zentrifugation bei 320 x g für 5 Minuten wurde der Überstand abgenommen und das Zellpellet in 20 ml warmem Medium resuspendiert. Die Suspension wurde dann in eine Zellkulturflasche überführt.

## **Mikrocarrier-Kulturen**

Für Mikrocarrier-Kulturen wurden Gelatine-Mikrocarrier der Marke CultiSpher-GL verwendet. Die Mikrocarrier wurden mit 50 ml Kalzium- und Magnesiumfreiem PBS pro Gramm trockene Mikrocarrier für eine Stunde zum Quellen gebracht. Im Anschluss wurde die Carriersuspension für 20 Minuten bei 121°C autoklaviert. Nach dem Abkühlen wurde das PBS unter sterilen Bedingungen entfernt und durch frisches PBS ersetzt. Die Waschprozedur wurde zwei weitere Male mit DMEM + 10% NCS wiederholt. Die so hergestellte Mikrocarrier-Suspension konnte für einen Monat bei 4°C aufbewahrt werden.

Es wurden 2 ml der Mikrocarrier-Suspension pro 75-cm<sup>2</sup>-Flasche vorgelegt, dazu wurde die Satellitenzellsuspension von drei 75-cm<sup>2</sup>-*Monolayer*-Kulturen gegeben und auf ein Gesamtvolumen von 15 ml mit DMEM + 10% NCS aufgefüllt. Die Mikrocarrier-Zell-Suspension wurde über Nacht bei 35 Umdrehungen pro Minute auf einem Kreisschüttler und im Brutschrank bei 37°C und 10% CO<sub>2</sub> inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Gesamtvolumen mit DMEM + 10% NCS auf 30 ml pro Flasche aufgefüllt und die Schüttelgeschwindigkeit auf 53 Umdrehungen pro Minute erhöht. Während der Kultivierung wurde alle zwei Tage ein halber Mediumwechsel durchgeführt, d.h. es wurde die Hälfte des Mediums abgenommen und durch frisches ersetzt.

Bei der Ernte wurden die Mikrocarrieraggregate in der Flasche sedimentiert und das Medium möglichst komplett abgenommen. Die Carrier wurden noch zweimal mit PBS gewaschen und im Anschluß mit 10 ml Accutase im Brutschrank bei 100 rpm für 45 Minuten inkubiert. Die erhaltene Zellsuspension wurde bei 200 x g für 5 Minuten zentrifugiert und das Pellet für weitere Analysen in flüssigem Stickstoff eingefroren.

## Transfektionen

### Kalziumphosphat-Methode:

Reagenzien:

2xHBS

280 mM	NaCl
50 mM	HEPES
1,5 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	auf pH 7,2;sterilfiltriert

TE

10 mM	Tris
1 mM	EDTA
	pH 7,4; sterilfiltriert

Kalziumchlorid-Lösung

2 M	CaCl <sub>2</sub>
	autoklaviert

Plasmid-DNA wurde in 210 µl TE vorgelegt. Anschließend wurden 30 µl Kalziumchlorid-Lösung zugetropft. Die gesamten 240 µl wurden nun zu 240 µl 2xHBS-Puffer getropft und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluß wurden die Präzipitate auf am Vortag in Petrischalen ausgesäte Zellen getropft. Nach 8h wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und mit frischem Medium versehen.

Lipid-Transfektions-Reagenz:

Es wurde das Effectene™ Lipid-Transfektionsreagenz der Firma Qiagen verwendet. Die Transfektionen wurden wie im Produktmanual beschrieben durchgeführt. Entsprechend den dort gegebenen Empfehlungen wurden verschiedene DNA-Konzentrationen und Reagenzienverhältnisse getestet. Zur Transfektion der Kaninchen-Satellitenzellen erwiesen sich folgende Werte am geeignetsten:

2 µg	Plasmid DNA in
150 µl	Puffer EC
8 µl	Enhancer™
10 µl	Effectene™
1 ml	Gesamtvolumen pro Ansatz

Entgegen den Produktangaben musste nach maximal 8h das Transfektionsmedium abgenommen, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und mit frischem Medium versehen werden, da diese 12h Transfektionsmedium nicht überlebten.

**Fluoreszenzmikroskopie**

Für die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen wurde das inverse Fluoreszenz-Mikroskop Leica DM IL der Firma Leitz verwendet. Die Dokumentation erfolgte mit der CCD-Kamera Leica DC300F der Firma Leitz und der zugehörigen IM Image Manager Software.

**Hemmstoffe**

Rapamycin:	Inhibitor für mTOR ( <i>mammalian target of Rapamycin</i> ) Stammlösung: 100 µg/ml in absolutem Ethanol Endkonzentration: 2 ng/ml
LY294002:	Inhibitor für PI-3-Kinase Stammlösung: 10 mM in DMSO Endkonzentration: 10µM

- PD98059: Inhibitor für p42/p44 Kinasen  
Stammlösung: 20 mM in DMSO  
Endkonzentration: 20  $\mu$ M
- Cyclosporin A: Inhibitor für Calcineurin  
Stammlösung: 5 mM in Ethanol  
Endkonzentrationen: 5  $\mu$ M
- A23187: Kalziumionophore  
Stammlösung:  $3,82 \times 10^{-4}$  M in Ethanol  
Endkonzentrationen:  $5 \times 10^{-8}$  –  $4 \times 10^{-7}$  M

## ***Reporterassays***

### **Lösungen und Reagenzien**

Extraktionspuffer:

25 mM	Tris
2 mM	EDTA
10 %	Glycerin
1 %	Triton X-100

Mit  $\text{H}_3\text{PO}_4$  auf pH 7,8 einstellen

ATP-Lösung:

100 mM	ATP (Sigma)
--------	-------------

mit NaOH auf pH 7,9 einstellen

Luc-Meßpuffer:

25 mM	Glycylglycin (Sigma)
15 mM	$\text{MgSO}_4$

mit NaOH auf pH 7,9 einstellen  
vor der Messung Zugabe von 5 mM ATP

**Luziferin-Lösung**

25 mM Luziferin, Kaliumsalz (Promega)  
in Luc-Meßpuffer mit KOH auf pH 7,9 einstellen  
Aliquots zu 100 µl gelagert bei -80°C; vor Gebrauch  
auf 10 ml mit Luc-Meßpuffer aufgefüllt

**Z-Puffer:**

60 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$   
40 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$   
10 mM KCl  
1 mM  $\text{MgSO}_4$   
auf pH 7 einstellen; vor der Messung 35 µl  
β-Mercaptoethanol pro 10 ml Puffer

**ONPG-Lösung:**

4 mg/ml Ortho-nitro-phenyl-galactopyranosid (Sigma)  
in Z-Puffer, aliquotiert und bei -20°C gelagert

**Ernte von Zellen**

Das Medium wird vorsichtig abgesaugt, der Zellrasen einmal mit PBS gewaschen und schließlich werden 350 µl Extraktionspuffer pro Schale zugegeben. Nach Inkubation für 10 Minuten bei Raumtemperatur werden die Zellen mit dem Zellschaber abgeschabt und die gesamte Lösung in ein 1,5 ml-Eppendorfgefäß überführt. Die Lösung wird bei maximaler Umdrehungszahl in der Tischzentrifuge für 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand wird abgenommen und in frische Eppendorfgefäße pippetiert. Zwischen den einzelnen Arbeitsschritten werden die Zellysate auf Eis gelagert.

### **Luziferaseassay**

In 5 ml Polystyrolröhrchen werden 300 µl Messpuffer mit 5 mM ATP vorgelegt. Direkt vor der Messung werde 50 µl Lysat in den Messpuffer pipetiert und gut durchmischt. Im Luminomaten werden 100 µl Luziferin-Lösung in das Röhrchen injiziert und für 10 Sekunden wird die Lichtemission detektiert. Für die Messungen wurde der Röhrchenluminomat LB 9507 der Firma Berthold Technologies verwendet.

### **β-Galaktosidase-Assay**

In 1,5 ml Eppendorfgefäßen wurden 360 µl Z-Puffer vorgelegt. Dazu wurden 40 µl Lysat pipettiert. Durch die Zugabe von 100 µl ONPG-Lösung wurde die Reaktion gestartet. Die Farbreaktion wurde durchgeführt bis eine deutliche Gelbfärbung der Proben zu erkennen war, dann wurde Reaktion durch die Zugabe von 250 µl 1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung abgestoppt. Die Extinktion der Proben bei 405 nm wurde gegen Z-Puffer gemessen.

### **Auswertung der Reporterassays**

Die Luziferase-Aktivität wurde mit Hilfe der zugehörigen β-Galaktosidase-Aktivität normiert und als RLU angegeben. Bei Mehrfachbestimmungen wurden Mittelwerte gebildet und diese zusammen mit den Standardabweichungen grafisch dargestellt.

Um Aktivitätsunterschiede zwischen Mehrfachbestimmungen auszugleichen, wurden die Aktivitäten eines Versuchsansatzes auf die Ruheaktivität des jeweiligen Reporterplasmides normiert und deren Mittelwerte und Standardabweichungen als x-fache Aktivierung grafisch dargestellt. Die Signifikanzen von Aktivitätsunterschieden wurde durch einen ungepaarten t-Test überprüft und entsprechend in den Diagrammen vermerkt.

## ***Biochemische Methoden***

### **Proteinbestimmung nach Lowry**

Um gleiche Proteinkonzentrationen in jeder Probe der Polyacrylamid-Gelelektrophorese einstellen zu können, wird zuvor der Proteingehalt durch die Proteinbestimmung nach Lowry (Lowry et al. 1951) festgestellt.

- Proben auf ein Volumen von 1 ml mit Bidest aufgefüllen
- 100  $\mu$ l DOC-Lösung zugeben, mischen und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren
- 100  $\mu$ l TCA-Lösung zugeben und mischen
- 10 Minuten bei 16.000 x g zentrifugieren
- Überstände verwerfen und Reaktionsgefäße gut ausschütteln
- 1 ml Waschlösung zugeben
- 10 Minuten bei 16.000 x g zentrifugieren
- Überstände verwenden und Reaktionsgefäße gut ausschütteln
- 500  $\mu$ l Lowry-Reagenz (Sigma) zu den Pellets geben, resuspendieren und 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren
- 250  $\mu$ l Folin-Gebrauchslösung zugeben, mischen und 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren
- Photometrische Messung bei 750 nm

Bei den Arbeitsschritten sollten zwischen den einzelnen Proben und zwischen den einzelnen Schritten konstante Zeitintervalle eingehalten werden. Die eigentliche Konzentrationsbestimmung erfolgt mittels einer Eichkurve, bei der anstelle der Proben Verdünnungen eines BSA-Standards (0,4 mg/ml, Sigma) zwischen 0 und 50  $\mu$ g verwendet werden.

DOC-Lösung:

3,47 mM      Natriumdodecylsulfat

TCA-Lösung:

4,4 M      Trichloressigsäure

Waschlösung:

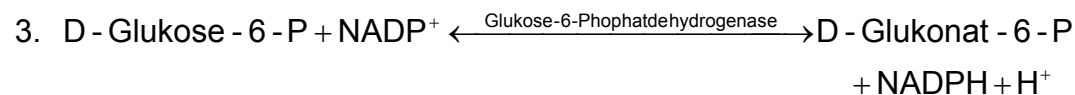
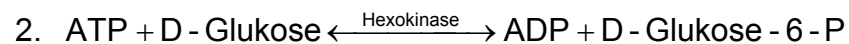
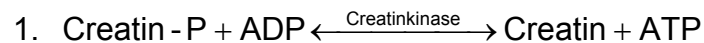
1 Teil	DOC-Lösung
1 Teil	TCA-Lösung
12 Teile	Bidest

Folin-Gebrauchslösung:

1 Teil	Folin & Ciocalteu's Phenol Reagenz 2 N
6 Teile	Bidest

### Bestimmung der Creatinkinase-Aktivität

Die Bestimmung der Creatinkinase-Aktivität erfolgte nach der Methode von Bergmeyer (Gerhardt 1987). Es handelt sich um einer UV-spektroskopische Methode, bei der in drei Reaktionsschritten die Aktivität der Kreatinkinase an die bei 340 nm messbare NADPH+H<sup>+</sup> Produktion gekoppelt wird.



### Lösungen:

Lösung 1: CK-Puffer

115 mM	Imidazol
11,5 mM	Mg-Acetat
2,3 mM	EDTA
	pH 7,5



## Lösung 2: CK-Reagenz-Stammlösung

2,3 mM	ADP-Kaliumsalz
5,8 mM	AMP-Na <sub>2</sub>
11,6 µM	p <sup>1</sup> , p <sup>5</sup> -Di-(adenosin-5')-pentaphosphat, Trilithiumsalz
23 mM	D-Glukose
2,3 mM	NADP, Dinatriumsalz
	In Lösung 1, pH 7,1 – 7,15 mit Essigsäure 1 M

## Lösung 3: CK-Reagenz-Gebrauchslösung

23 mM	N-Acetyl-Cystein
3500 U/l	Hexokinase
2300 U/l	Glukose-6-Phosphatdehydrogenase
	In Lösung 2, pH 6,6 mit Essigsäure 1 M

## Substratlösung: Creatinphosphat-Lösung

345 mM	Creatinphosphat
	In Bidest

0,667 ml bei 30 °C für 5 Minuten vorinkubiertes CK-Reagenz wurden mit 0,0333 ml Probe gemischt und für weitere 5 Minuten inkubiert. Danach wurden 0,0667 ml Creatinphosphat-Lösung zugegeben und nach einer Wartezeit von 2 Minuten wurde für 2-5 Minuten die Extinktionsänderung registriert. Aus der erhaltenen Extinktionsänderung und der separat bestimmten Proteinkonzentration der jeweiligen Proben konnte nach folgender Formel die spezifische Kreatinkinaseaktivität berechnet werden.

$$A_{\text{CK}} [\text{U/g}] = \frac{V_{\text{K}} \cdot \Delta E \cdot 1000 \cdot VF}{V_{\text{P}} \cdot t \cdot d \cdot c_{\text{Protein}} \cdot \varepsilon}$$

$V_{\text{K}}$  = Küvettenvolumen [ml]

$V_{\text{P}}$  = Probenvolumen [ml]

$\varepsilon$  = molarer Extinktionskoeffizient =  $6,3 \text{ ml} \cdot \mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

$d$  = Schichtdicke = 1 cm

$\frac{\Delta E}{t}$  = Extinktionsänderung pro Minute

$c_{\text{Protein}}$  = Proteinkonzentration [mg/ml]

### Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Polyacrylamidgelelektrophoresen wurden als denaturierende, diskontinuierliche Elektrophoresen (nach Laemmli) durchgeführt.

Trenngel:

1 ml	Bidest
3,75 ml	Gelpuffer pH 8,8
1,38 ml	Glycerin 100%
4,0 ml	Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung 30%
6,7 $\mu\text{l}$	TEMED
40 $\mu\text{l}$	Ammoniumpersulfatlösung 10% (w/v)

Sammelgel:

2,81 ml	Bidest
1,25 ml	Gelpuffer pH 6,8
0,1 ml	Orange-G-Lösung 0,3% (w/v)
0,833 ml	Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung 30%
6,7 $\mu\text{l}$	TEMED
40 $\mu\text{l}$	Ammoniumpersulfatlösung 10% (w/v)

Es wurden Minigele mit einer Größe von 9 cm x 9 cm und einer Dicke von 1 mm gegossen. Das Trenngel wurde bis ca. 2 cm unter die Taschen für den Probenauftrag gegossen. Das Sammelgel wurde sofort im Anschluss vorsichtig über das Trenngel geschichtet. Die Proben wurden mit Probenpuffer auf gleiche

Proteinkonzentration eingestellt und dann für 3 Minuten auf 95°C erhitzt. Der Proteinstandard war gebrauchsfertig und konnte ohne Erhitzen aufgetragen werden. Die Elektrophorese wurde bei max.15 mA für 60 Minuten gefolgt von max. 20 mA für 60 Minuten durchgeführt.

Gelpuffer pH 8,8:

1,5 M	Tris
0,4 % (w/v)	Natriumdodecylsulfat
0,001 % (w/v)	Natriumazid

Gelpuffer pH 6,8:

500 mM	Tris
0,4 % (w/v)	Natriumdodecylsulfat
0,001 % (w/v)	Natriumazid

Acrylamid-Bisacrylamidlösung 30%:

29,7 % (w/v)	Acrylamid
0,3 % (w/v)	Bisacrylamid
	Vernetzungsgrad = 1 %

Elektrophoresepuffer:

25 mM	Tris
200 mM	Glycin
0,1 % (w/v)	Natriumdodecylsulfat
0,001 % (w/v)	Natriumazid
	pH 8,8

Probenpuffer:

3,83 mM	Dinatriumhydrogenphosphat
2,42 mM	Natriumdihydrogenphosphat
10 % (v/v)	Glycerin
5 % (v/v)	Mercapthoethanol
2 % (w/v)	Natriumdodecylsulfat
0,001 % (w/v)	Bromphenolblau
	pH 7,0

Proteinstandard:

BenchMark Protein Ladder (Invitrogen) 15 Proteine zwischen 10 und 220 kDa

## Westernblot

Kathodenpuffer:

40 mM	Aminohexansäure
0,01 % (w/v)	Natriumdodecylsulfat
20 % (v/v)	Methanol

Anodenpuffer II:

25 mM	Tris
20 % (v/v)	Methanol

Anodenpuffer I:

300 mM	Tris
20 % (v/v)	Methanol

Der Transfer der Proteine auf Nitrozellulose erfolgte als halbtrockener Blot mit diskontinuierlichem Puffersystem. Zwischen den Graphitelektroden des Elektrolotgerätes wurden Stapel von Puffergetränkten Fliespapier, Nitrozellulosemembranen und dem Polyacrylamidgel aufgebaut.

Kathode		
3 Lagen	Fliespapier	getränkt mit Kathodenpuffer
	Polyacrylamidgel	
	Nitrozellulosemembran	
2 Lagen	Fliespapier	getränkt mit Anodenpuffer II
2 Lagen	Fliespapier	getränkt mit Anodenpuffer I
Anode		

Der Transfer erfolgt bei 12 V, 100mA und 3 W für 90 Minuten.

## Immunomarkierung und ECL-Detektion

Reagenzien:

PBS-Tween:

167	mM	NaCl
20,4	mM	Dinatriumhydrogenphosphat
1,7	mM	Natriumdihydrogenphosphat
0,025	% (v/v)	Tween-20
		pH 7,1

Milchpulverlösung:

5	% (w/v)	Magermilchpulver in PBS-Tween
---	---------	-------------------------------

Antikörper:

Primärantikörper

Name	Typ	Wirtstier	Verdünnung	Firma
Phospho-Akt (Thr 308)	Polyklonal	Kaninchen	1:1000	<i>Cell Signaling Technology™</i>
Phospho-p42/p44 (Thr202/Thr204)	Polyklonal	Kaninchen	1:1000	<i>Cell Signaling Technology™</i>
<i>Anti Myosin Heavy Chain (Fast)</i>	Monoklonal	Maus (Hybridoma)	1:100	<i>Accurate Chemical &amp; scientific Corp.</i>
<i>Anti Myosin Heavy Chain (slow)</i>	Monoklonal	Maus (Hybridoma)	1:100	<i>Accurate Chemical &amp; scientific Corp.</i>
<i>Anti Myosin Heavy Chain (neonatal)</i>	Monoklonal	Maus (Hybridoma)	1:100	<i>Accurate Chemical &amp; scientific Corp.</i>

Als Sekundärantikörper wurden peroxidasegekoppelte Ziege-anti-Kaninchen- oder Ziege-anti-Maus-Antikörper der Firma Sigma verwendet und in einer Verdünnung von 1:2000 – 1:10000 eingesetzt.

Die auf Nitrozellulose transferierten Proteine wurden durch einen primären und einen Peroxidase-gekoppelten sekundären Antikörper markiert. Im Anschluss erfolgte die Detektion mittels ECL (*Enhanced Chemoluminescence*). Die Nitrozellulosemembran wurde dabei wie folgt behandelt:

- 30 Minuten waschen in PBS-Tween
- 45 Minuten blockieren in Milchpulverlösung
- 2 Stunden Inkubation mit primärem Antikörper 1:1000 in Milchpulverlösung
- 3 x 10 Minuten waschen in PBS-Tween
- 1 Stunde Inkubation mit sekundärem Antikörper 1:5000 in Milchpulverlösung
- 3 x 10 Minuten waschen in PBS-Tween

Für die ECL-Detektion wurde das SuperSignal™-Kit der Firma Pierce Biotechnology verwendet. Die immunmarkierte Nitrozellulosemembran wurde in der Dunkelkammer für 5 Minuten in einer 1 : 1 Mischung der SuperSignal-Luminol-Lösung und der SuperSignal-Peroxid-Lösung inkubiert. Die so benetzte Membran wurde zur Belichtung eines Röntgenfilms verwendet.

## Ergebnisse

### ***Konstruktion der Reporterplasmide***

#### **Klonierung von pMHCII-EGFP-Actin**

Ausgangspunkt für die Klonierung des Vektors pMHCII-EGFP Actin waren die Vektoren pEGFP-Aktin und p0.8(H3-6/1 $\beta$ )#5. Der Vektor p0.8(H3-6/1 $\beta$ )#5 wurde unserer Abteilung von P. K. Umeda (Cribbs et al. 1989) zur Verfügung gestellt und enthält ein 780 Basenpaarfragment, das vom  $\beta$ -MHC-Gen des Kaninchens die *CAP-site*, das erste Exon und ca. 600 Basenpaare des Promotors umfasst. Die Sequenz befindet sich in einem pBluescribe M13+ Vektor. Ziel der Klonierung war die Generierung eines EGFP-Reportergenplasmides, in dem die MHCII-Promotorsequenz (*Insert*) in den EGFP exprimierenden Vektor pEGFP-Actin (Rahmen) übertragen wird und die EGFP-Expression so unter die Kontrolle des MHCII-Promotors gestellt wird. Wichtig bei dieser Klonierung war die komplette Entfernung des CMV-Promotors des pEGFP-Actin-Vektors. Bei genauer Analyse der Sequenzdaten von Rahmen (*Genbank accession number*: AY237157) und *Insert* (*Genbank accession number*: AF192306) fanden sich nach kompletter Entfernung des CMV-Promotors keine für eine Klonierung geeigneten Schnittstellen. Es wurde somit eine Klonierungsstrategie entworfen, die zunächst das Einfügen eines synthetischen Oligonukleotides vorsieht, in das dann das *Insert* hineinkloniert werden kann. Das Schema (Abbildung 5) gibt die Klonierungsstrategie und das Design des verwendeten Oligonukleotides wieder.

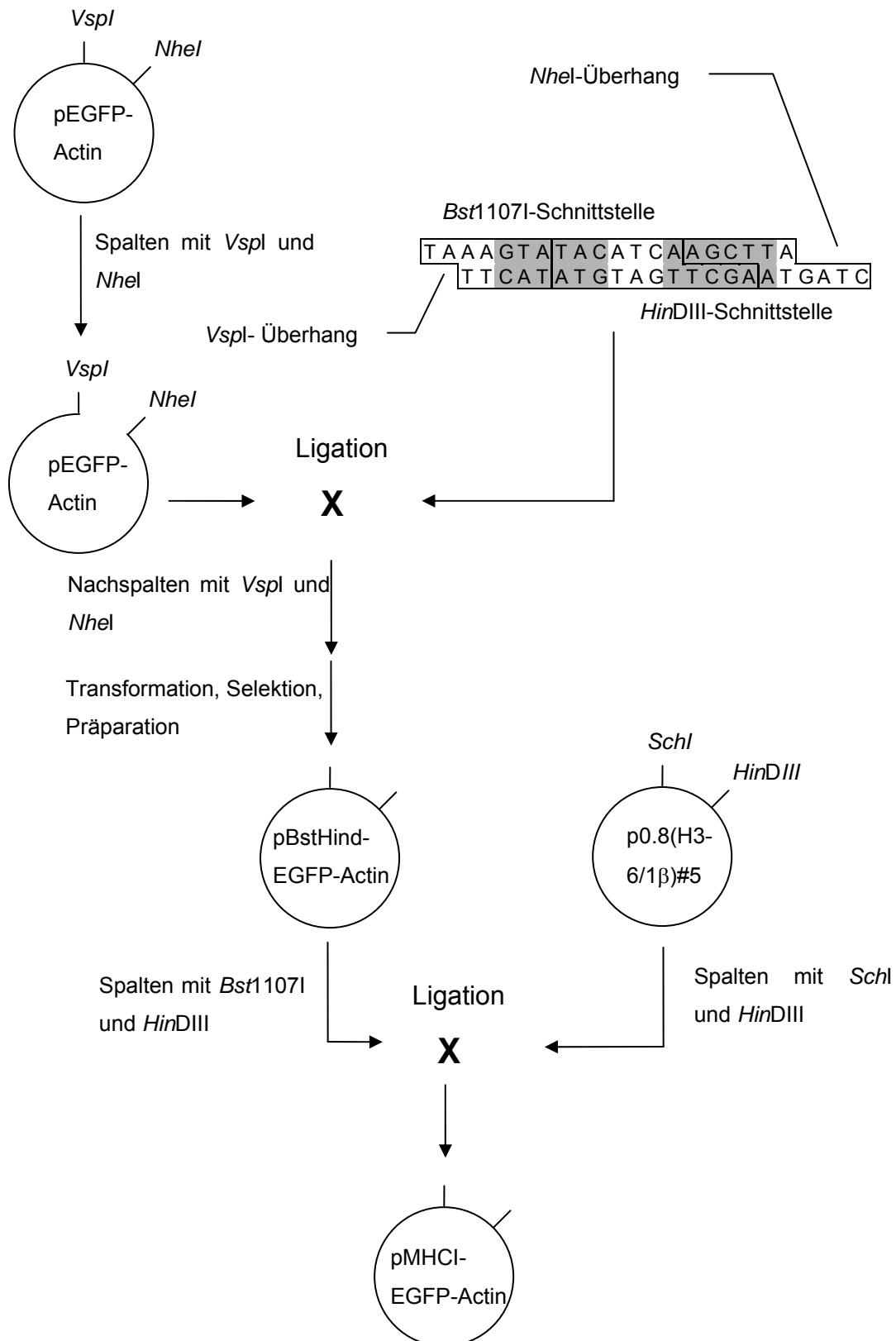


Abbildung 5: Klonierungsschema für pMHCI-EGFP-Actin

Nach der Ligation von Rahmen und Oligonukleotidlinker wurde mit den beiden für die Herstellung des Rahmens verwendeten Restriktionsendonukleasen nachgespalten.

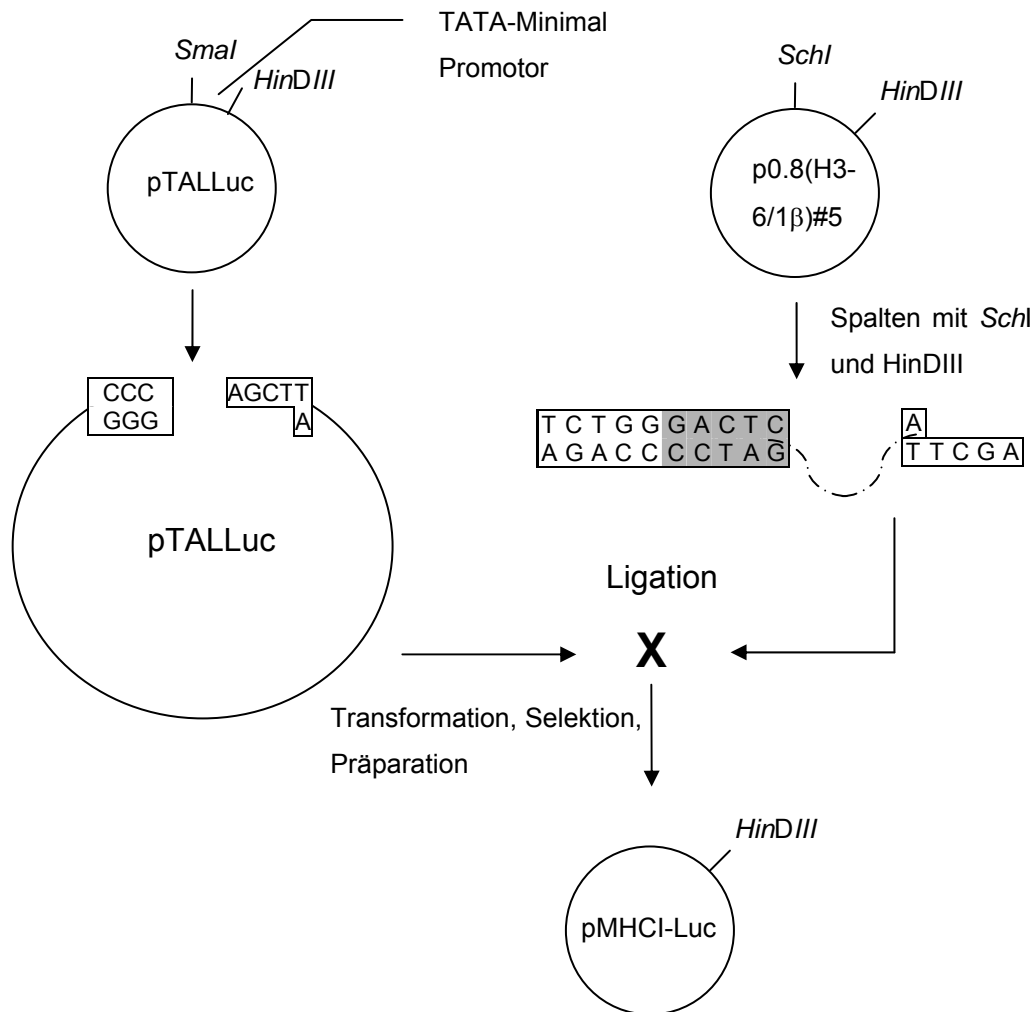




Das 2000 bp-Fragment identifiziert Klon 3 und Klon 6 als positiv. Klon 4 ist negativ, da es dieses Fragment nicht zeigt. *Lane 17* zeigt zum Vergleich das gespaltene Vorläuferplasmid pBstHindEGFP-Actin, das dieses Fragment ebenfalls nicht aufweist. Die Spaltung der Klone 1, 2 und 5 war nicht vollständig. Die zwei Klone, die sicher das MHC-I-Promotorfragment enthielten, wurden weiter verwendet.

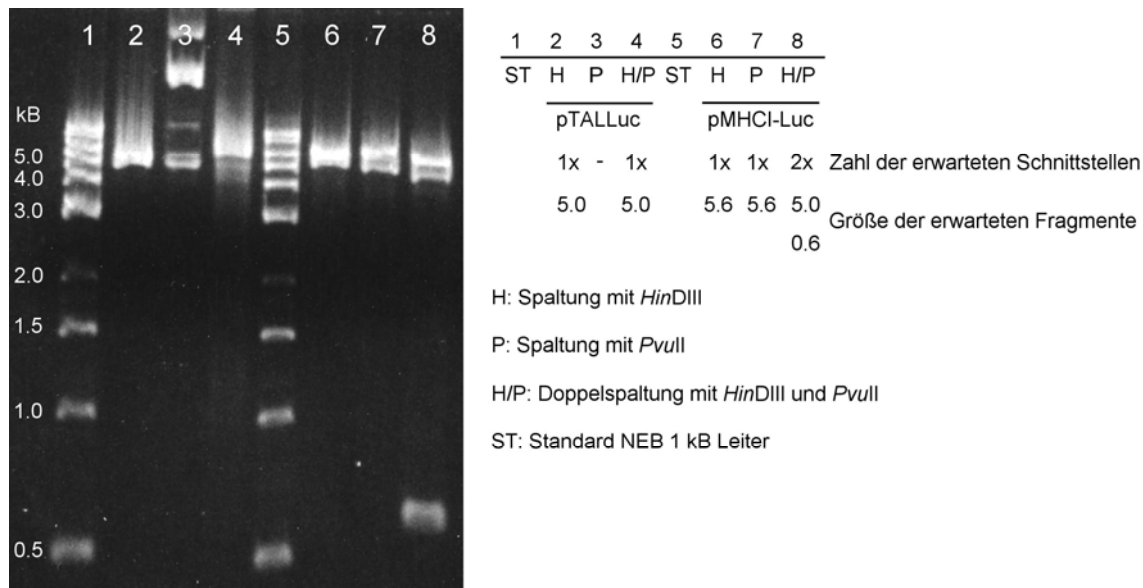
### **Klonierung von pMHC-I-Luc**

Für die Klonierung des Reporterplasmides pMHC-I-Luc wurden der pTAL-Luc-Vektor (Rahmen) und ein Promotorfragment des  $\beta$ -MHC-Gens aus dem bereits oben erwähnten Plasmid p0.8(H3-6/1 $\beta$ )#5 verwendet. Der pTAL-Luc-Vektor enthält einen TATA-Minimalpromotor, der entfernt werden sollte. Es wurden den Promotor flankierende Schnittstellen gesucht. Mit *Sma*I und *Hin*DIII fanden sich auf pTAL-Luc zwei Schnittstellen, die mit den *Sch*I- und *Hin*DIII- Schnittstellen des *Inserts* kompatibel waren. Es ergab sich folgendes Schema für eine gerichtete Klonierung.



**Abbildung 7: Klonierungsschema für pMHCI-Luc**

Rahmen und *Insert* wurden gespalten, im Agarosegel aufgetrennt, aus diesem extrahiert und in verschiedenen molaren Verhältnissen in Ligrationsreaktionen eingesetzt. Nach Transformation und Selektion auf LB<sup>Amp</sup>-Platten wurde der einzige erhaltene Klon vermehrt, seine Plasmid-DNA isoliert und auf erfolgreiche Klonierung hin durch Restriktionsspaltungen analysiert (Abbildung 8). Es wurde mit *HinDIII*, *PvuII* oder beiden Enzymen gespalten. Der Vektor pTAL-Luc enthält keine *PvuII*-Schnittstelle, es zeigt sich also ein Supercoil-Muster (*Lane 3*), die Spaltung mit *HinDIII* (*Lane 2*) und auch die Doppelspaltung mit *HinDIII* und *PvuII* (*Lane 4*) linearisieren das Plasmid. Durch das *Insert* wurde eine *PvuII*-Schnittstelle eingefügt, sodass eine Spaltung nun zu einer Linearisierung führt (*Lane 7*) und bei der Doppelspaltung ein 600 bp Fragment entsteht (*Lane 8*).



**Abbildung 8: Agarosegel der analytischen Spaltungen des pMHCII-Luc Klonen (Lanes 6-8) im Vergleich zum Ausgangsvektor pTALLuc (Lanes 2-4)**

### Klonierung von pMHCIIx-EGFP-Actin

Das Plasmid pMHCIIx-EGFP-Actin wurde aus den Vektoren pEGFP-Actin und einem Teil des MHC IIx Promotors kloniert. Die Sequenz des Promotors war in dem Vektor p10(+)-CAT enthalten, der unserer Arbeitsgruppe von Dr. K.-C. Chang, Universität Glasgow, zur Verfügung gestellt wurde. Das Plasmid enthält den proximalen Teil des Promotors, das erste Exon, das erste Intron und das zweite Exon, gefolgt von der codierenden Sequenz des CAT-Gens. Nach aktuellen Veröffentlichungen (Chang 2000) sind die auf Intron 1 enthaltenen *Enhancer*-Elemente für die korrekte Funktion des 2x-Promotors wichtig. Diese Sequenz wird auch im Weiteren als „Promotorsequenz“ bezeichnet, obwohl auch kodierende Elemente enthalten sind. Durch Restriktionsspaltungen und deren Vergleich mit den vorhandenen Vektordaten sollte zunächst die Struktur des Plasmides untersucht werden. Nach den vorliegenden Daten sollte das Plasmid zwei *HindIII*-Schnittstellen, eine am 5'-Ende der Promotorsequenz und eine im Exon 1, besitzen. Die Restriktionsspaltungen mit *HindIII* zeigten jedoch nur das linearisierte Fragment, aber keine weiteren Fragmente. Spaltungen mit anderen Enzymen wiesen die erwarteten Fragmentierungen auf. Nach genauerem Vergleich der vorhandenen Vektordaten mit Daten über verschiedene Vektoren konnte seine Struktur genauer identifiziert werden: Die Promotor-Sequenz befand sich



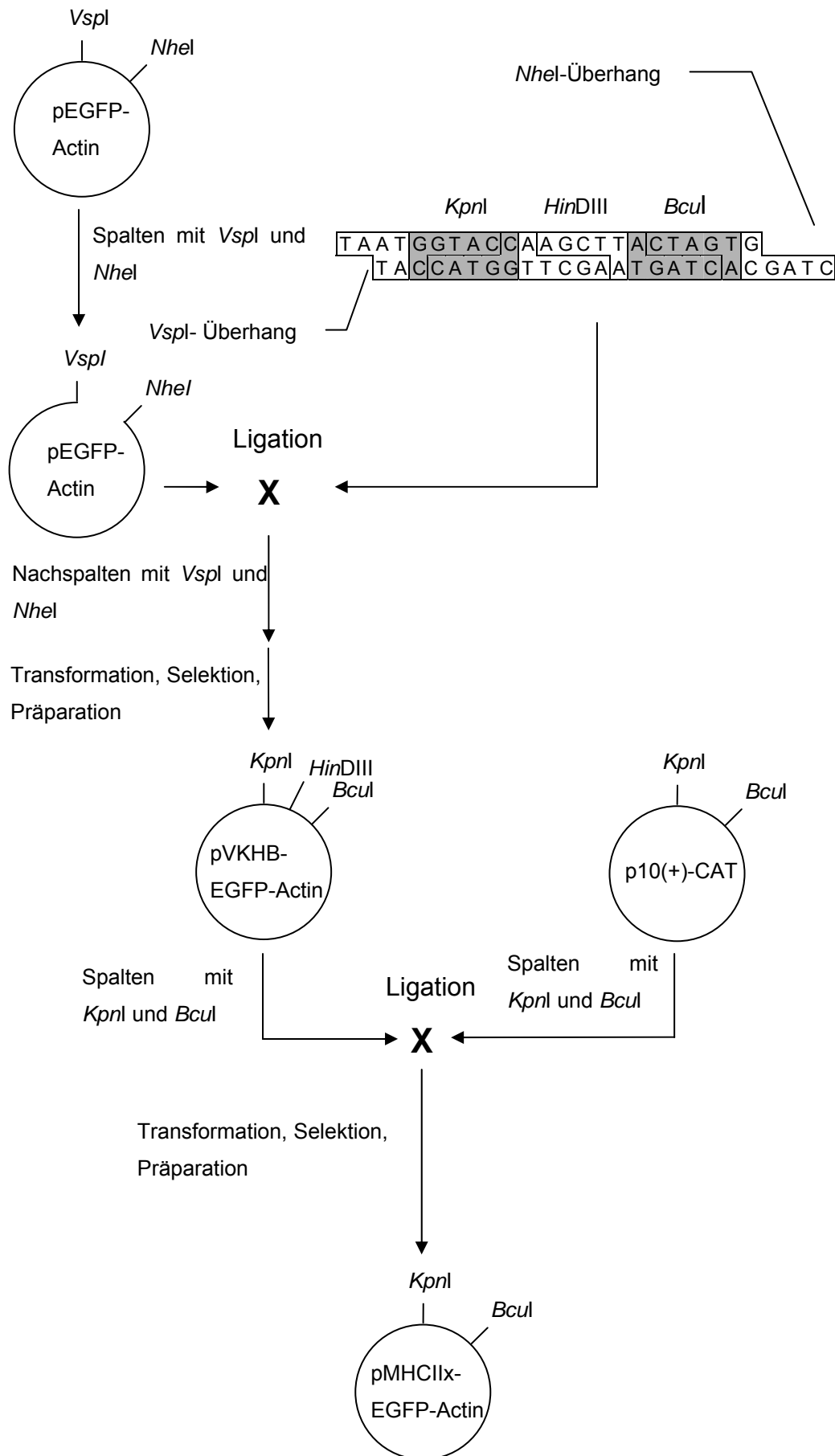


Abbildung 10: Klonierungsschema von pMHCIIx-EGFP-Actin

Zunächst wurde das beschriebene Oligonukleotid VKHB in ein *VspI/NheI*-Fragment des Vektors pEGFP-Actin eingefügt. Analog zu der zuvor beschriebenen Prozedur wurde nach der Ligation nachgespalten. Nach Transformation und Selektion auf LB<sup>Kan</sup>-Platten zeigten sich zahlreiche Klone, von denen eine Auswahl vermehrt und deren Plasmid-DNA isoliert wurde. Analytische Restriktionsspaltungen und Auftrennung auf dem Agarosegel zeigten, dass alle Klone das gewünschte Konstrukt enthielten. Ein Klon wurde daraufhin ausgewählt, vermehrt und seine Plasmid-DNA in großen Maßstab zur weiteren Verwendung isoliert.

Das so hergestellte Plasmid, sowie das Plasmid p10(+)-CAT wurden mit *KpnI* und *BclI* gespalten, mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und aus dem Gel isoliert. Die Fragmente wurden in unterschiedlichen molaren Verhältnissen in Ligationen eingesetzt. Im Anschluss wurde der *E. Coli*-Stamm LK111λ mit den Ligationen transformiert. Die Selektion auf LB<sup>Kan</sup>-Platten ergab keine Klone. Nach dem Wechsel zum *E. Coli*-Stamm Top10'F zeigten sich auf der Platte Klone. Alle ausgewählten und analysierten Klone erwiesen sich in Restriktionsspaltungen als positiv. Das Agarosegel in Abbildung 11 zeigt Doppelspaltungen mit *HinDIII* und *BglII* (Lanes 3/5/7/9/11) im Vergleich zu ungespaltener Plasmid-DNA (Lanes 2/4/6/8/10) der ausgewählten Klone. Das 1100 bp Fragment zeigt das erfolgreiche Klonierungsergebnis.

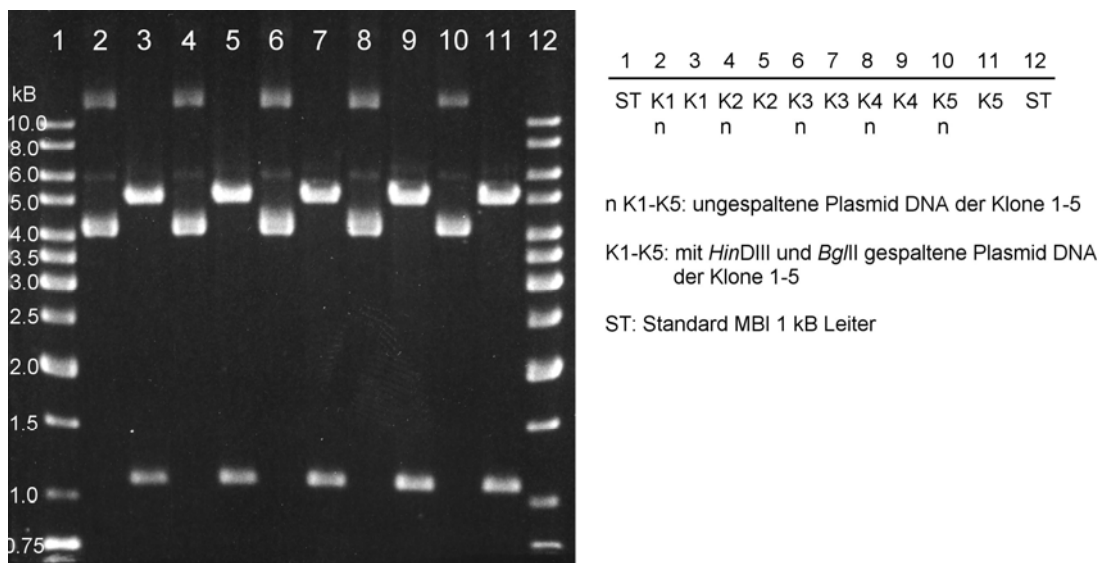


Abbildung 11: Agarosegel der analytischen Spaltungen der pMHCIx-EGFP-Actin Klone 1-5

## Klonierung von pMHCIIx-Luc

Für die Klonierung des Reportergenplasmides pMHCIIx-Luc wurden der Vektor pTALLuc (Rahmen) und das MHCIIx-Promotor-Fragment (*Insert*) aus dem oben näher beschriebenen Vektor p10(+)-CAT verwendet. Die Auswahl an geeigneten Schnittstellen erwies sich als sehr eingeschränkt, zumal auch hier sichergestellt werden sollte, dass der TATA-Minimal-Promotor komplett entfernt wird.

Eine erste Klonierungsstrategie sah vor, den Rahmen mit *XhoI/HinDIII* und das Donorplasmid mit *XhoI/SmaI* zu spalten und nach Auftrennung und Aufreinigung die beiden *XhoI*-Schnittstellen zu ligieren. Nach dem Auffüllen des *HinDIII*-Überhangs mittels Klenow-Polymerase sollten die verbleibenden *blunt*-Enden (aufgefüllter *HinDIII*-Überhang; *SmaI*-Ende) miteinander ligiert werden. Nach Transformation und Selektion auf LB<sup>Amo</sup>-Platten konnten auch in mehreren Versuchen keine positiven Klone isoliert werden. Es wurde eine neue Strategie entworfen, die unter Verwendung eines Oligonukleotid-Linkers eine geeignete Schnittstelle einbringt (Abbildung 12).



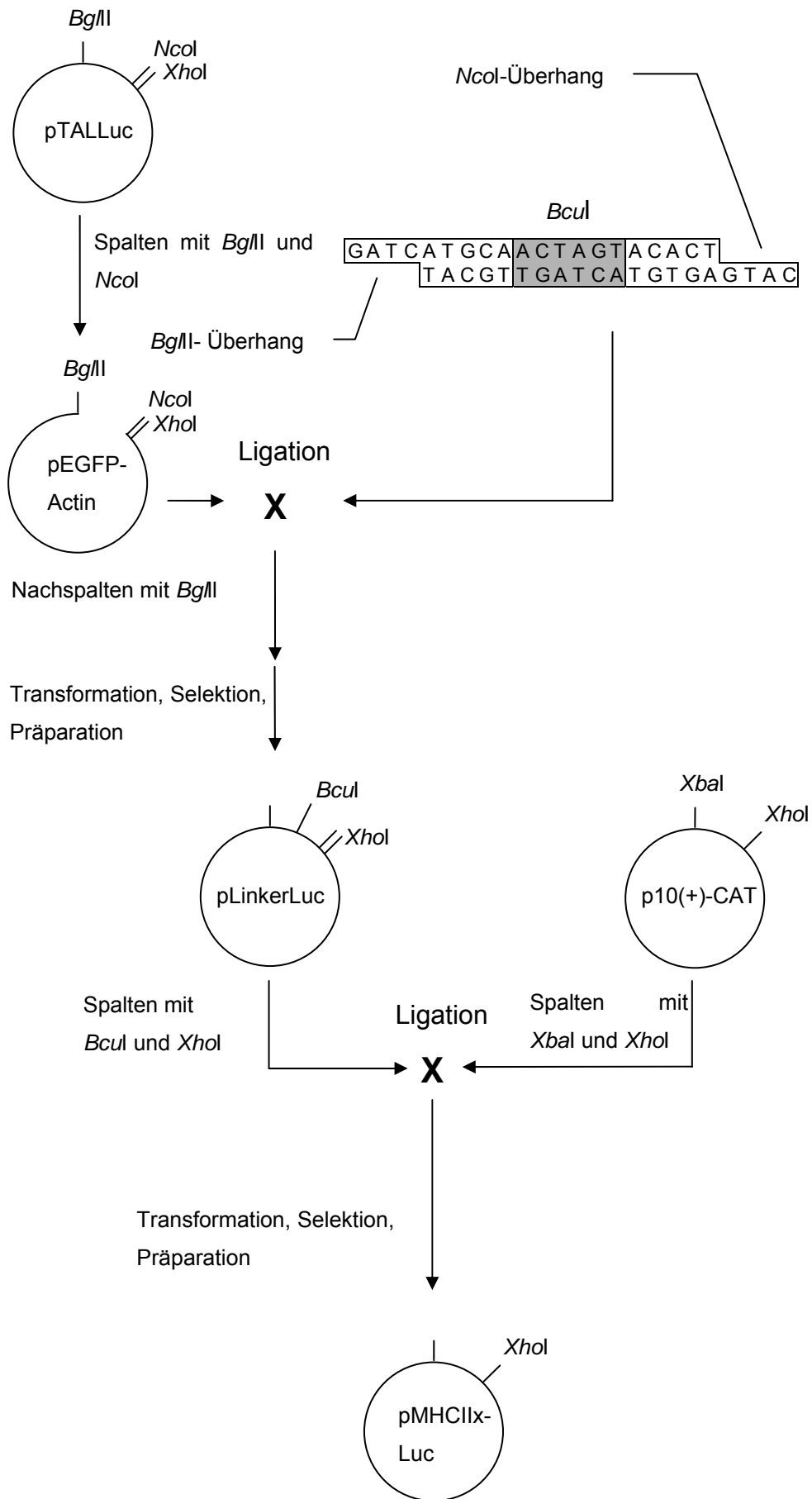
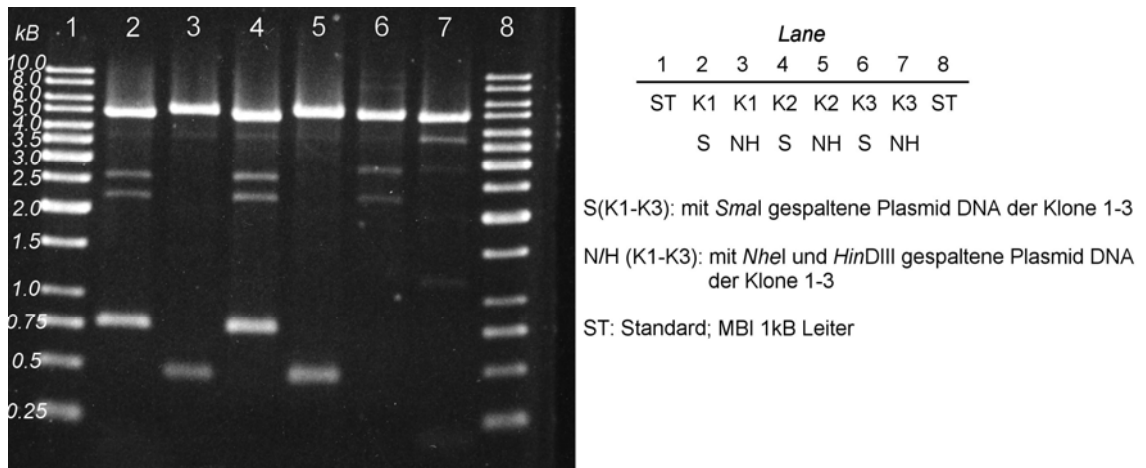


Abbildung 12: Klonierungsschema von pMHCIIx-Luc

Die Abbildung gibt die Klonierungsstrategie und das Design des verwendeten Oligonukleotidlinkers wieder. Der Linker fügt eine *Bcl*I-Schnittstelle in das Plasmid ein und verfügt an den Enden über einen *Bgl*II- und einen *Nco*I-Überhang. Das Plasmid pTALLuc wurde mit den entsprechenden Enzymen geschnitten und nach Auftrennung und Aufreinigung mit dem Oligonukleotidlinker ligiert. Da bei erfolgreicher Ligation die *Bgl*II-Schnittstelle zerstört wird, wurde mit diesem Enzym nachgespalten. Nach Transformation und Selektion wurde eine Auswahl der erhaltenen Klone vermehrt und deren Plasmid-DNA isoliert und durch Restriktionsspaltungen analysiert. Vier Klone zeigten in ihren Spaltmustern das gewünschte Ligationsergebnis. Einer wurde ausgewählt, vermehrt und seine Plasmid-DNA in großem Maßstab für weitere Verwendung isoliert. Der erhaltene Vektor wurde mit *Bcl*I/*Xho*I, der Vektor p10(+)-CAT mit *Xba*I/*Xho*I gespalten. Nach Auftrennung und Aufreinigung der gesuchten Fragmente wurden diese in unterschiedlichen molaren Verhältnissen in Ligationen eingesetzt. *Bcl*I und *Xba*I besitzen kompatible Überhänge und können ligiert werden, hierbei gehen beide Schnittstellen verloren. Dieser Umstand ermöglicht das Nachspalten mit diesen Enzymen. Nach Transformation und Selektion konnten durch die anschließende Analyse der isolierten Plasmid-DNAs zwei Klone mit positivem Klonierungsergebnis nachgewiesen werden (Abbildung 13).

Es wurden Restriktionsspaltungen mit *Sma*I und mit *Nhe*I/*Hin*DIII durchgeführt. Plasmid-DNA mit *Sma*I (S) gespalten ergibt bei positivem Klonierungsergebnis ein 780 bp Fragment. Plasmid-DNA mit *Nhe*I/*Hin*DIII (N/H) gespalten ergibt ein 480 bp Fragment. Die gewünschte Fragmentierung zeigte sich bei den Klonen 1 und 2 (*Lanes* 2-5).



**Abbildung 13: Agarosegel der analytischen Spaltungen der pMHCIIx-Luc Klone 1-3**

Die positiven Restriktionsspaltungen konnten durch eine spätere Sequenzierung bestätigt werden.

### ***Etablierung eines Transfektionsprotokolls für Muskelzellen***

Es existierten im Vorfeld keine Erfahrungen mit Transfektionen von Skelettmuskelzellen. Daher wurden verschiedene Muskelzelltypen und verschiedene Transfektionsmethoden getestet. Um die Transfizierbarkeit zu testen, wurden die Zellen zunächst mit pEGFP-Actin transfiziert. Das Transfektionsergebnis kann schnell mit dem Fluoreszenzmikroskop überprüft werden und die zeitliche Entwicklung ist leicht zu verfolgen. Um eine bessere Quantifizierung zu ermöglichen wurde schließlich auch mit  $\beta$ -Galaktosidase-Plasmiden transfiziert. Es wurde festgestellt, dass primäre Muskelsatellitenzellen die besten Transfektionseffizienzen zeigten.

Es wurde zunächst die klassische Kalziumphosphat-Methode (Graham und van der Eb 1973) getestet. Da auch mit großen DNA-Mengen von 10-20  $\mu$ g nur geringe Transfektionseffizienzen erreicht werden konnten (<10% mittels EGFP-Fluoreszenz), wurde das *Transfection-Reagent-Selector-Kit* der Firma Qiagen verwendet. Dies enthält zwei verschiedene Transfektionsreagenzien: Superfect™ und Effectene™. Superfect™ ist ein Komplex aus aktivierten Dendrimeren und Effectene™ ist ein nicht-liposomales Lipid-Transfektionsreagenz. Es war nicht möglich, die Zellen mit dem Superfect-Transfektionsreagenz zu transfizieren, da die Zellen auch nach kurzer Inkubation mit dem Reagenz im Laufe der folgenden 24h starben.

Mit Effectene™ ließen sich geeignete Transfektionseffizienzen erzielen. Entgegen den Herstellerangaben durften die Zellen max. 8-9 Stunden mit den Transfektionsmischungen inkubiert werden, da auch bei diesem Reagenz die Zellen sonst starben. Der Hersteller gibt an, dass ein Mediumwechsel aufgrund der geringen Zytotoxizität nicht notwendig sei. Es wurden, wie vom Hersteller vorgeschlagen, verschiedene Plasmid-DNA-Konzentrationen und verschiedene Enhancer- und Effectene™-Mengen getestet. Die besten Ergebnisse wurden mit einer für diese Technik großen DNA-Menge von 2 µg pro Ansatz und einer mit 25 µl vergleichsweise großen Effectene™-Menge erzielt. Es konnte jedoch schließlich ein ökonomischer Kompromiss aus Transfektionseffizienz und Materialverbrauch gefunden werden. Es ergaben sich folgende Transfektionsparameter:

2 µg Plasmid-DNA, 8 µl Enhancer, 10 µl Effectene™

Die damit erzielte Transfektionseffizienz wurde über die EGFP-Fluoreszenz auf ca. 40% bestimmt.

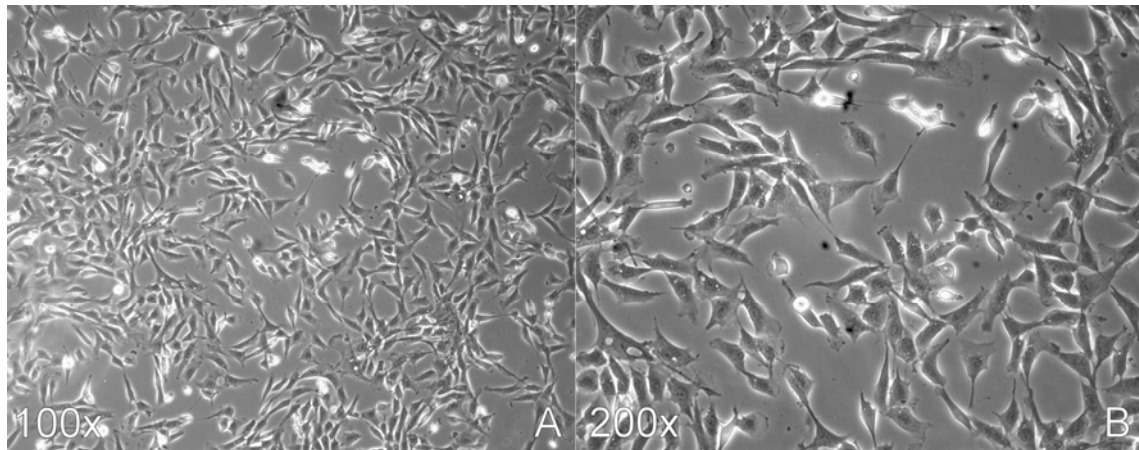
## ***Charakterisierung der Kaninchen Muskel-Satellitenzellen***

Die Satellitenzellen wurden zunächst in ihren Eigenschaften, wie Proliferationsrate, bevorzugter Dichte oder maximaler Kulturdauer und in bestimmten biochemischen Parametern, wie MHC- und Kreatinkinase-Expression charakterisiert.

### **Proliferation**

Die Zellen konnten gut in PROMOCCELL-Medium zur Proliferation gebracht werden. Sie wurden im großen Maßstab vermehrt und für spätere Verwendung eingefroren. Nach dem Auftauen brauchten die Satellitenzellen zwei Passagen niedriger Verdünnung (1:3 - 1:4), bis sich eine gleichbleibende Proliferationsrate einstellte. Dann mussten die Zellen alle 2-3 Tage mit einem Verdünnungsfaktor 1:8 bis 1:12 passagiert werden. Eine Kultur konnte so bis über die 30. Passage hinaus erhalten werden, bevor die Zellteilungsrate stark nachließ und die Zellen sich morphologisch zu verändern begannen. Üblicherweise wurden die Satellitenzellkulturen jedoch nur bis maximal zur 15. - 20. Passage kultiviert und für Transfektionsexperimente verwendet, da sich zu höheren Passagenzahlen hin die Ergebnisse deutlich verschlechterten (s. Luziferasereporterassays).

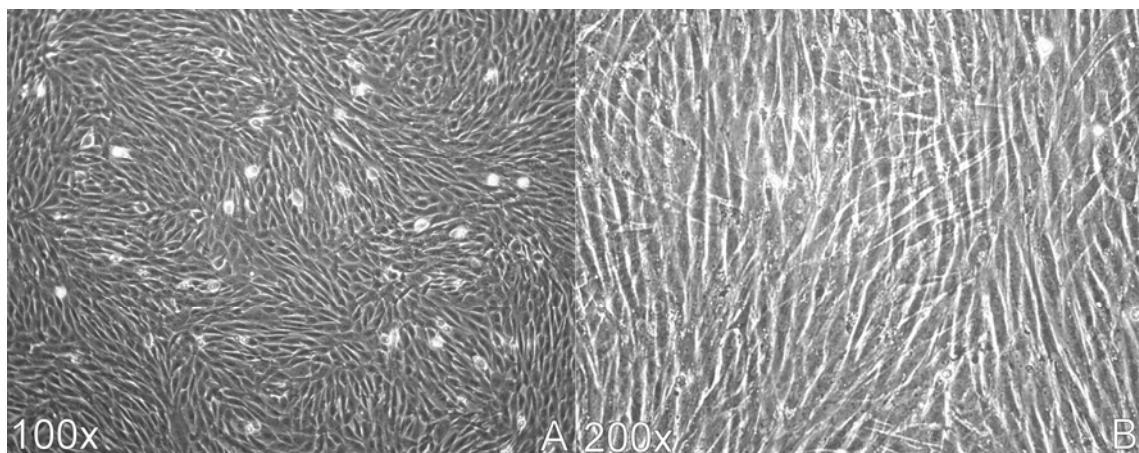
Bei der Kultivierung wurde klar, dass hohe Verdünnungen die Proliferation der Zellen stark verlangsamte und die Zellen überproportional lange brauchten, bevor sie erneut passagiert werden konnten. Bei hohen Dichten bis hin zur Konfluenz wuchsen die Zellen am besten. Dies führte aber zu beginnender Differenzierung und zur Fusion der Satellitenzellen. Dies äußerte sich auch in der zunehmenden Schwierigkeit die Zellen beim Passagieren vom Boden der Zellkulturflasche abzulösen. Bei Kulturen niedriger Passagenzahl oder immer „subkonfluent“-passagierten Kulturen betrug die Ablösezeit 2-3 Minuten. In konfluenten Kulturen dauerte das Ablösen 10-15 Minuten und bedurfte mechanischer Hilfe durch starkes Klopfen der Zellkulturflasche. Die Zellen lösten sich dann nicht einzeln ab, sondern in großen Aggregaten. Es wurde daher darauf geachtet, die Zellen zwischen den Passagen nur bis zu einer maximalen Konfluenz von 70-80% wachsen zu lassen. Die Abbildung 14 zeigt proliferierende Satellitenzellen in Kultur.



**Abbildung 14: Proliferierende Satellitenzellen bei 100-facher (A) und bei 200-facher (B) Vergrößerung**

### **Differenzierung**

Um die Expression muskelspezifischer Gene wie Kreatinkinase oder Myosin zu induzieren, mussten die Satellitenzellen zur Differenzierung gebracht werden. Zu diesem Zweck wurden die Zellen bis zur Konfluenz kultiviert (Abbildung 15A). Daraufhin wurde das Proliferations-Medium durch Differenzierungsmedium ersetzt. DMEM mit 5% NCS erwies sich als geeignet. Nach wenigen Tagen begannen die Zellen zu fusionieren, bildeten mehrkernige Myotuben und begannen in mehreren Schichten übereinander zu wachsen, wie in Abbildung 15B zu erkennen ist.



**Abbildung 15: Konfluente Satellitenzellen vor dem Wechsel zu Differenzierungsmedium (A); Satellitenzellen nach 4 Tagen in Differenzierungsmedium (B)**

### Differenzierung in Carrier-Suspensions-Kultur

Neben der beschriebenen Differenzierungsmethode wurde ein im Labor etabliertes Differenzierungsprotokoll für Myoblasten/Myotuben auf Mikrocarriern eingesetzt. Bei dieser Methode wachsen die Muskelzellen auf Gelatine-Carriern. Einige Myotuben wachsen zwischen einzelnen Carriern und bilden so größere Aggregate.

Mit diesem Versuchsansatz ist es möglich, die differenzierten Myotuben elektrisch zu reizen und zur Kontraktion zu bringen, ohne dass diese vom Substrat abreißen, da die Carrier-Aggregate in sich flexibel sind. Bei analogen Reizversuchen mit Monolayer-Kulturen reißen die Tuben durch die Kontraktion ab und werden dann beim Mediumwechsel gewaschen.

Proliferierende Satellitenzellen wurden abgelöst und mit Microcarriern unter Schütteln inkubiert. Es wurden verschiedene Differenzierungsmedien getestet. Bereits nach wenigen Tagen zeigten sich erste Myotuben auf und zwischen den Carriern. Die Satellitenzellen wurden über einen Zeitraum von bis zu vier Wochen beobachtet. Versuche, die durch Fusion von Satellitenzellen entstandenen Myotuben durch elektrische Reizung zur Kontraktion zu veranlassen, scheiterten.

### Creatinkinaseaktivität

Ein Charakterisierungsmerkmal von Muskelzellen ist die Creatinkinaseaktivität, darüber hinaus ist es ein Merkmal für den Differenzierungsgrad, da Creatinkinase erst im Myotuben-Stadium exprimiert wird. Für die Messung der Creatinkinaseaktivität wurden differenzierte Zellen aus Mikrocarrier-Kulturen geerntet und aus den Lysaten die Creatinkinase-Aktivität und der Proteingehalt bestimmt. Es ergaben sich folgende Aktivitäten:

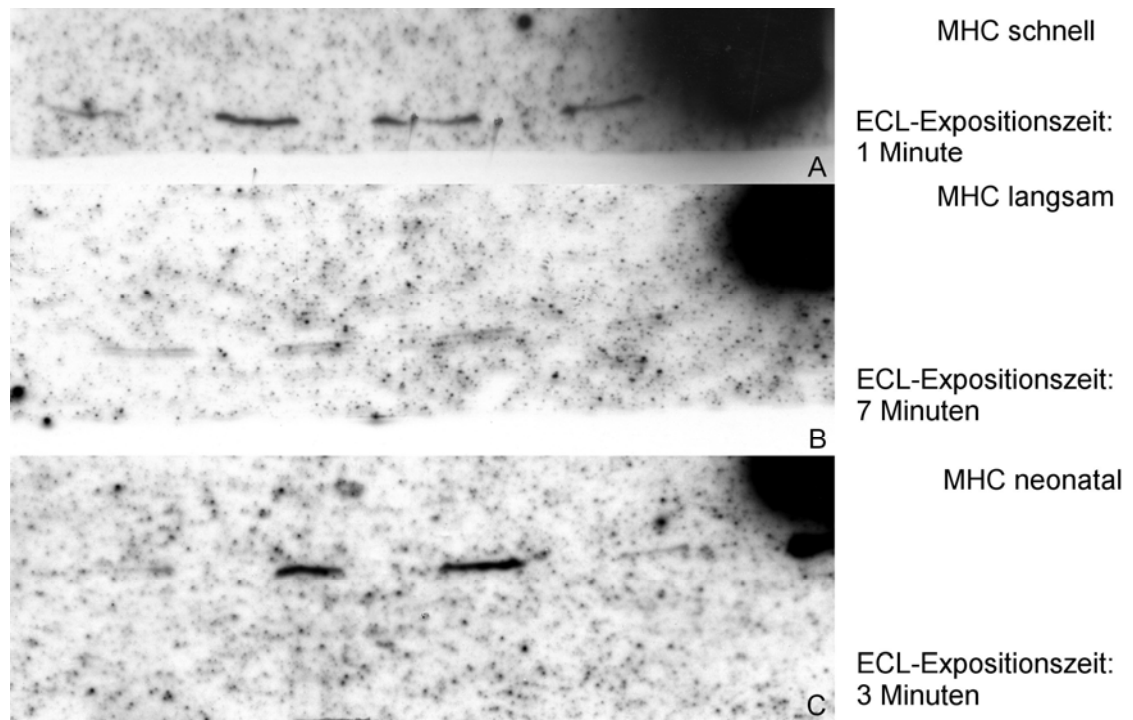
	$\Delta E$ [OD/min]	Proteinkonzentration [mg/ml]	spezifische Aktivität [U/g]
DMEM + 2% HS „A“	0,305	3,6	1549
DMEM + 2% HS „B“	0,327	3,81	1569
DMEM +10% RS P	0,5075	5,99	1549
DMEM +10% RS G	0,401	4,87	1505

Zwei Kulturen (A und B) enthielten 2% Pferdeserum (*Horse serum*; HS), die beiden anderen Kulturen enthielten 10% Kaninchenserum (*Rabbi serum*; RS) von zwei verschiedenen Anbietern (PROMOCELL: P; Gibco: G). Die gemessenen Creatinkinaseaktivitäten zeigen, dass die aus Satellitenzellen gebildeten Myotuben ebenso Creatinkinase exprimieren, wie aus neonatalen Myoblasten gebildete Myotuben.

### **Westernblot und Immunodetektion von Myosinisoformen**

Ein weiteres charakteristisches Merkmal von Muskelzellen ist die Expression der schweren Myosinketten, die erst im Myotubenstadium beginnt (s. Einleitung). Myosinisoformen können in einfacher Weise im Westernblot detektiert werden. Im Monolayer über vier Wochen differenzierte Satellitenzellen wurden wie beschrieben abgelöst und pelletiert. Die Pellets wurden in SDS-Auftragspuffer aufgenommen. Die Proben wurden auf einem 8%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Im Anschluss wurde ein Westernblot durchgeführt. Es wurden Primärantikörper gegen verschiedene Myosin-Heavy-Chain-Isoformen verwendet. Der Peroxidase-gekoppelte Sekundärantikörper ermöglichte eine Detektion mittels ECL.



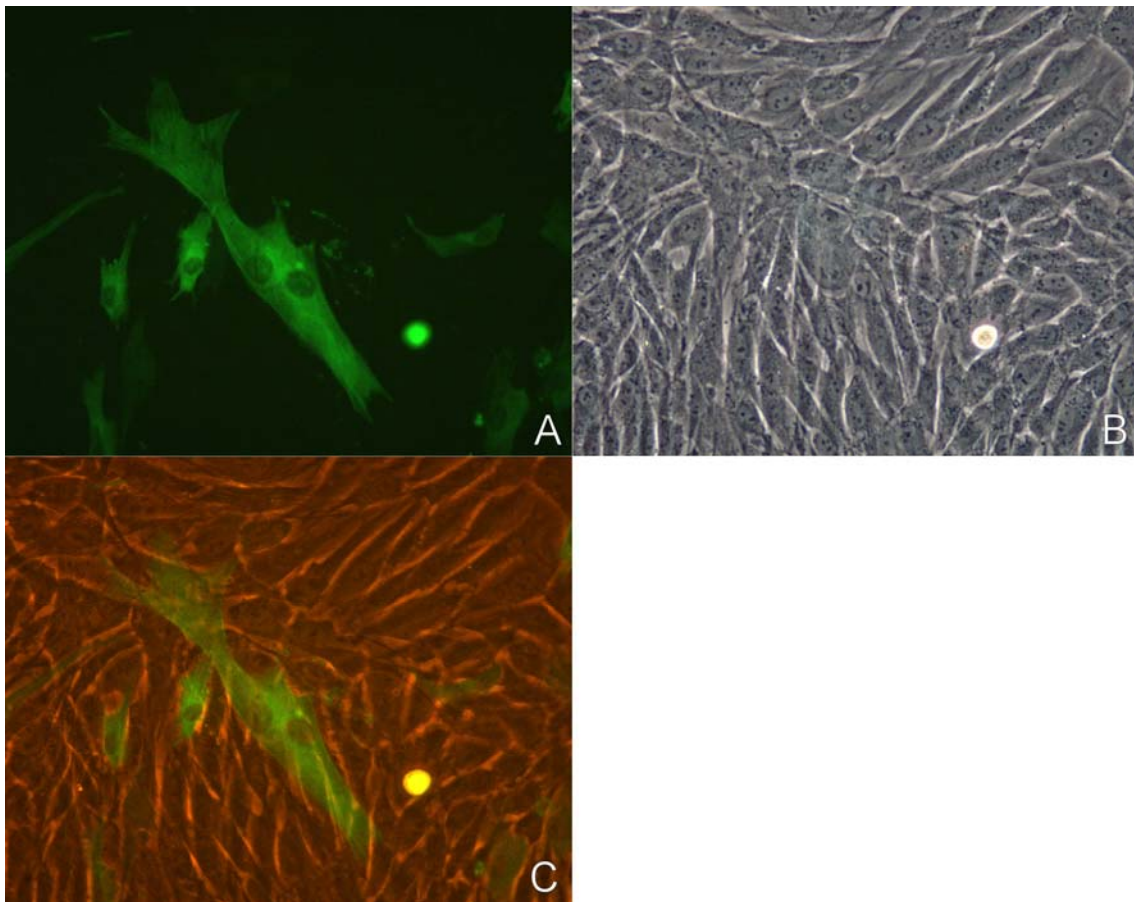


**Abbildung 16: Myosinisoformen, ECL-Detektion nach Westernblot mit verschiedenen Primärantikörpern von vier Einzelkulturen**

Wie man in Abbildung 16 sieht, sind der schnelle (A) und der neonatalen (C) Typus die vorherrschenden Isoformen. Die langsame MHC-Isoform (B) ist nur in geringen Mengen vorhanden, aber nachweisbar.

### ***EGFP-Transfektionen und Fluoreszenzmikroskopie***

Zunächst wurden EGFP-exprimierende Vektoren unter Kontrolle des CMV-Promotors verwendet, um die Transfizierbarkeit der Zelle und den zeitlichen Verlauf zu untersuchen. Darüber hinaus war es möglich, die Tubenform und die Mehrkernigkeit der fusionierten Satellitenzellen deutlich zu machen, wie man in Abbildung 17 gut erkennen kann. Die Fluoreszenz konnte für bis zu 6 Tage beobachtet werden.



**Abbildung 17: Mikroskopische Aufnahmen von pEGFP-Actin transfizierten Satellitenzellen bei 400-facher Vergrößerung; A: Fluoreszenzaufnahme; B: Durchlichtaufnahme desselben Bildausschnittes; C: optische Überlagerung von Durchlicht- und Fluoreszenzkanal**

Desweiteren sollte die Aktivierung der MHC I- bzw. MHC II $\alpha$ -Promotoren studiert werden. Der MHC I-Promotor stand zuerst zu Verfügung. Die Transfektionen mit diesem EGFP-Reporterplasmid zeigten nur eine sehr schwache EGFP-Fluoreszenz.

Da in ruhenden, nicht inervierten Myotuben schnelles Myosin (MHCII Subtypen) die vorherrschende Myosinisoform ist, wurde davon ausgegangen, dass die Bedingungen in der Zelle die Expression von MHCI nicht induzieren. Versuche, diese künstlich z.B durch Kalziumionophor zu induzieren, blieben aufgrund der schwachen Signale und der daraus resultierenden kurzen Beobachtungsdauer und des frühen Differenzierungsstadiums erfolglos.

Als das entsprechende Plasmid mit MHCIIx-Promotor zur Verfügung stand, konnte diese Vermutung zum Teil bestätigt werden. Die beobachtbare Fluoreszenz war stärker, aber dennoch nur ein Teil der unter CMV-Pomotor-Kontrolle beobachtbaren EGFP-Fluoreszenz. Da die Ausgangsfluoreszenz gering war, konnte die Fluoreszenz nur für maximal drei Tage gut beobachtet werden.

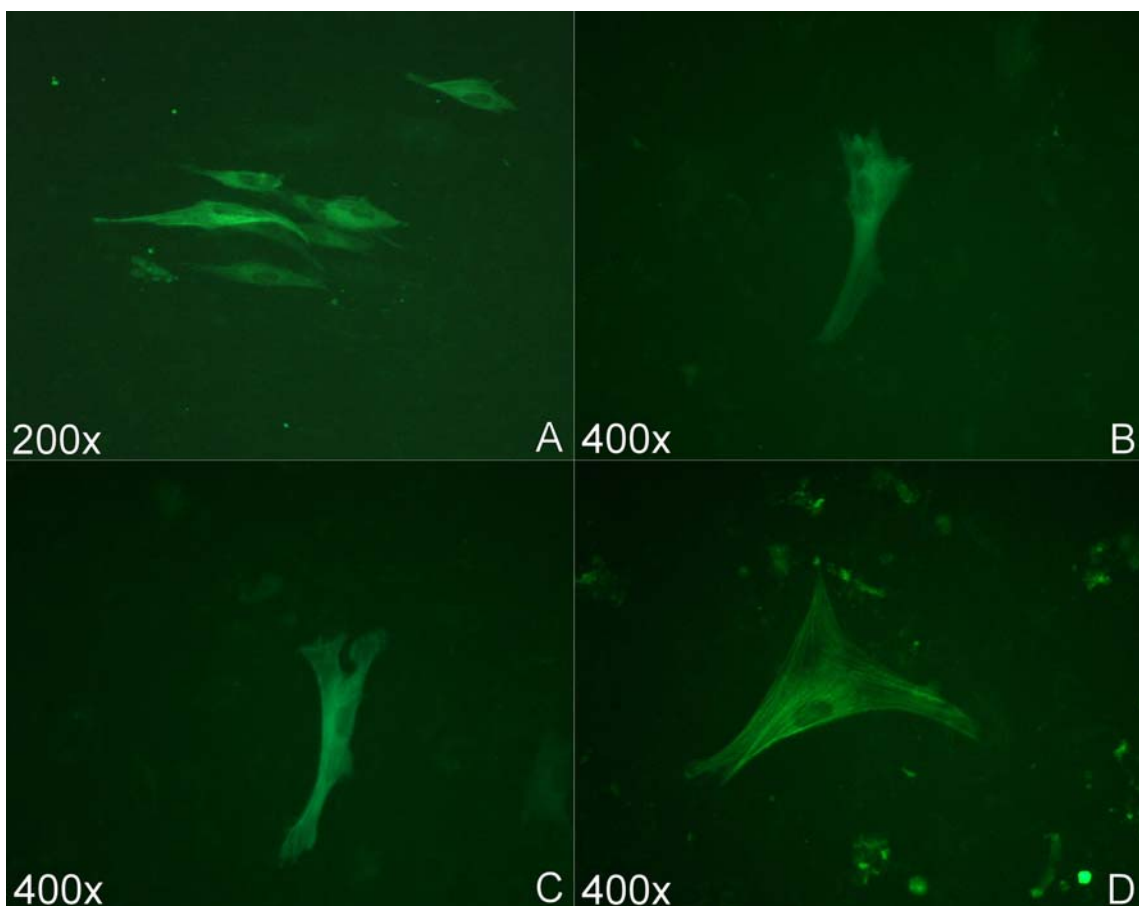
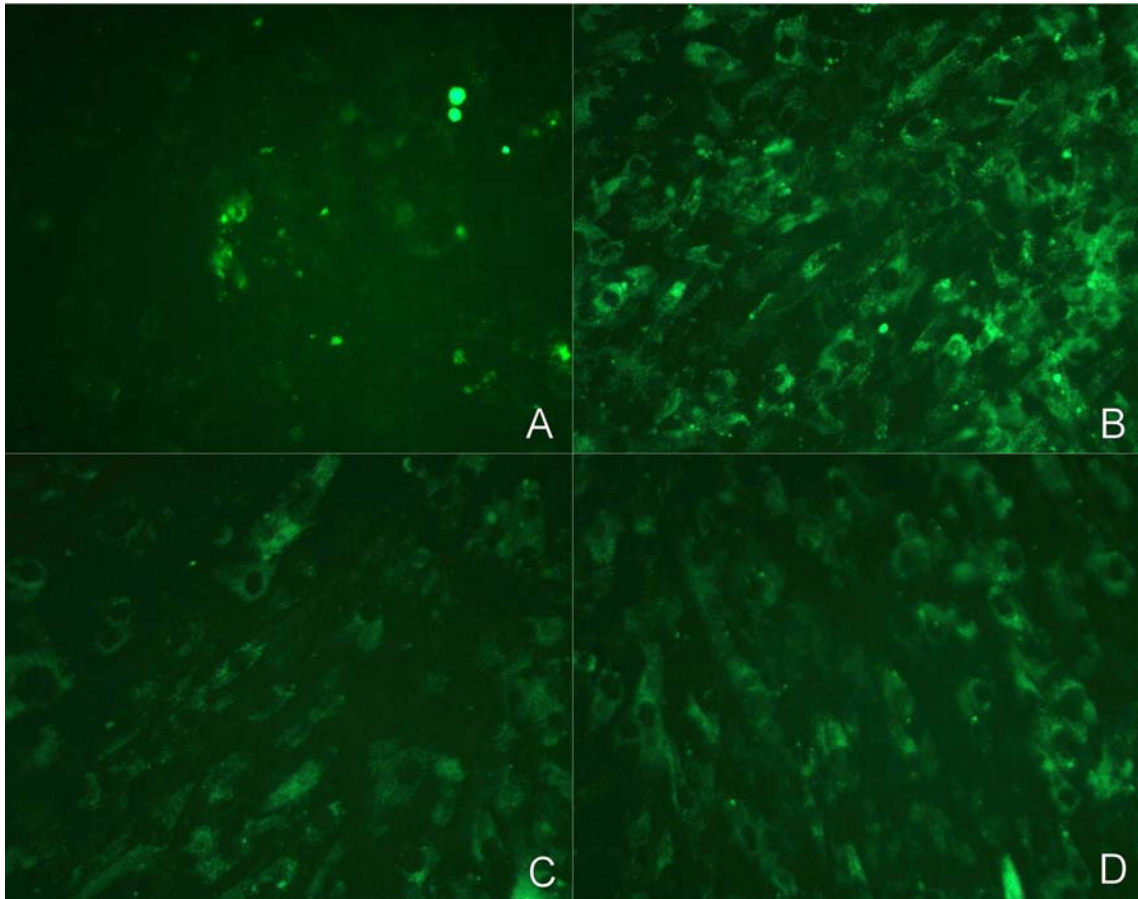


Abbildung 18: Mit pMHCIIx-EGFP-Actin transfizierte Satellitenzellen

## **Fusionsexperimente**

Da die Möglichkeit, mit transienten Transfektionen die Differenzierungs- und eventuell daran anschließende Fasertypumwandlungsprozesse zu untersuchen, begrenzt ist und eine Transfektion differenzierter Myotuben mit konventionellen Methoden kein nennenswertes Transfektionsresultat lieferte, wurde versucht, transient transfizierte Satellitenzellen mit differenzierten primären Myotuben zu fusionieren und so die Reporterplasmide in die Myotuben einzubringen.

Zu diesem Zweck wurden mit pEFGP-Actin, pMHC1-EGFP-Actin oder pMHCIIx-EGFP-Actin transfizierte Satellitenzellen einen Tag nach der Transfektion abgelöst und zu zuvor in 6-Well-Platten ausgesäten primären Kaninchenmyotuben gegeben. Die Zellen wurden einen weiteren Tag später fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Leider zeigte sich eine deutliche Eigenfluoreszenz der Zellen im gleichen Wellenlängenbereich wie die EFGP-Fluoreszenz, die bei anderen Versuchen bisher nicht zu beobachten war und mit dem Fusionsprozess zusammenzuhängen scheint. Es war daher nicht möglich, die Signale der relativ schwachen MHC-Promotoren von der Eigenfluoreszenz zu unterscheiden. Abbildung 19 gibt einen Überblick über diese Problematik.



**Abbildung 19: A: Satellitenzellen untransfiziert; B: Satellitenzellen untransfiziert + primäre Myotuben; C: Satellitenzellen pMHCI-EGFP-Actin-transfiziert + primäre Myotuben; D: Satellitenzellen pMHCIIX-EGFP-Actin-transfiziert + primäre Myotuben; 400-fache Vergrößerung**

Abbildung 19A zeigt untransfizierte Satellitenzellen. Man erkennt eine nur geringe Eigenfluoreszenz. Dagegen sieht man in Abbildung 19B eine deutliche Eigenfluoreszenz, obwohl in diesem Bild nur primäre Myotuben mit untransfizierten Satellitenzellen kokultiviert wurden. Abbildung 19C und Abbildung 19D zeigen primäre Myoblasten, zu denen transfizierte Satellitenzellen gegeben wurden. Die Satellitenzellen in Abbildung 19C wurden mit pMHCI-EGFP-Actin, die in Abbildung 19D wurden mit pMHCIIX-EGFP-Actin transfiziert. Es war nicht möglich, zwischen Eigenfluoreszenz und EGFP-Fluoreszenz zu unterscheiden.

## ***Luziferase-Reportergenassays***

### **Etablierung und Optimierung**

Satellitenzellen wurden, wie beschrieben, mit pMHC1-Luc oder mit pMHC1 $\alpha$ -Luc transfiziert. Darüber hinaus wurden Transfektionen durchgeführt, bei denen diese Plasmide zusammen mit Expressionsplasmiden für aktiviertes H-Ras (pUSEAmpRas+) bzw. für dominant negatives H-Ras (pCMVdRas(S17N)) kotransfiziert wurden.

Bei allen Reporterplasmid-Transfektionen wurde außerdem pCMV- $\beta$ Gal für die Normierung mittransfiziert. Es wurde keine absolute  $\beta$ -Galaktosidase-Normierung durchgeführt. Stattdessen wurden die Entwicklungszeiten des  $\beta$ -Galaktosidase-Assays konstant gehalten. Bei 2-Tage-Versuchen wurde für 11 Minuten bei Raumtemperatur entwickelt, bei 6-Tage-Versuchen wurde zunächst für 10 Minuten bei Raumtemperatur und danach für 30 Minuten bei 37°C entwickelt. Diese Werte erwiesen sich in den ersten Versuchen als geeignet, um p-Nitrophenyl-Färbungen von max. 3 OD zu erzielen und wurden im Weiteren beibehalten.

Da es sich nicht um eine absolute Normierung handelt und die unterschiedlichen Entwicklungszeiten bei der Normierung nicht berücksichtigt wurden, sind 2-Tage- und 6-Tage-Versuche nicht miteinander vergleichbar. In allen folgenden Diagrammen werden mittels der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität normierte Luziferaseaktivitäten angegeben.

## 2-Tage-Versuche

Es wurden 2-Tage-Versuche durchgeführt, um den Effekt von Ras auf die MHC-Promotoren zu studieren. Dies wurde sowohl unter Proliferations-, als auch unter Differenzierungs-Medium durchgeführt, d.h. es wurden zwei parallele Sätze Transfektionen durchgeführt und nach der 8-stündigen Inkubation mit den Transfektionslösungen wurde ein Teil der Transfektionsansätze auf Differenzierungs-Medium umgestellt. Alle Ansätze wurden 48h nach der Transfektion geerntet und gemessen. Die Diagramme A, B und C geben die Luziferase-Aktivität als *relative-luminescence-units* (RLU) nach der Normierung über die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität wieder. Das Diagramm D gibt die Aktivierung des jeweiligen Promotors bezogen auf die Grundaktivität in Proliferationsmedium wieder.

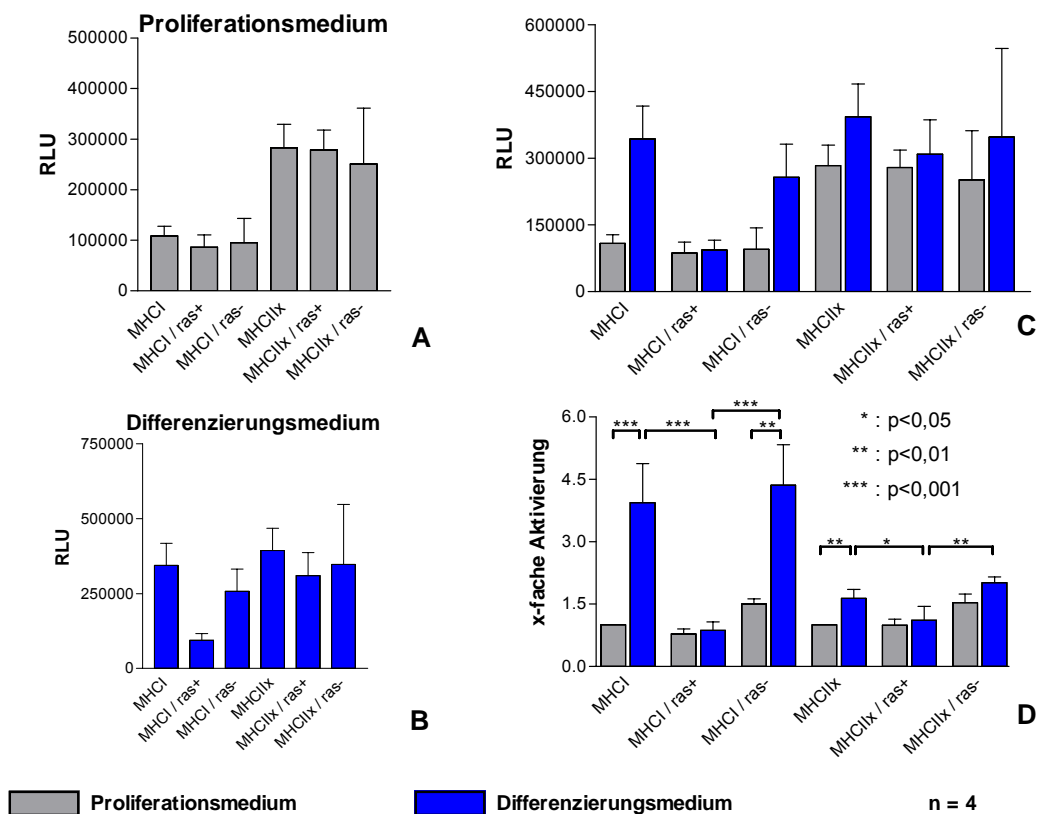
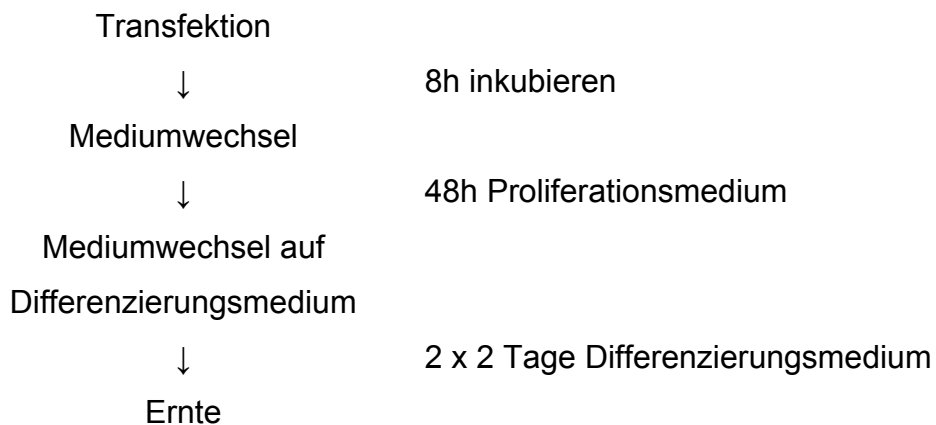


Diagramm A zeigt die Aktivität in Proliferationsmedium. Man erkennt, dass aktiviertes Ras keinen Effekt zeigt, weder auf den MHC1-, noch auf den MHCIIx-Promotor. Dagegen zeigt Diagramm B die Aktivität in Differenzierungsmedium. Die Aktivität beider Promotoren ist größer, wird aber durch die Koexpression von konstitutiv aktivem Ras auf das Niveau des Proliferationsmediums

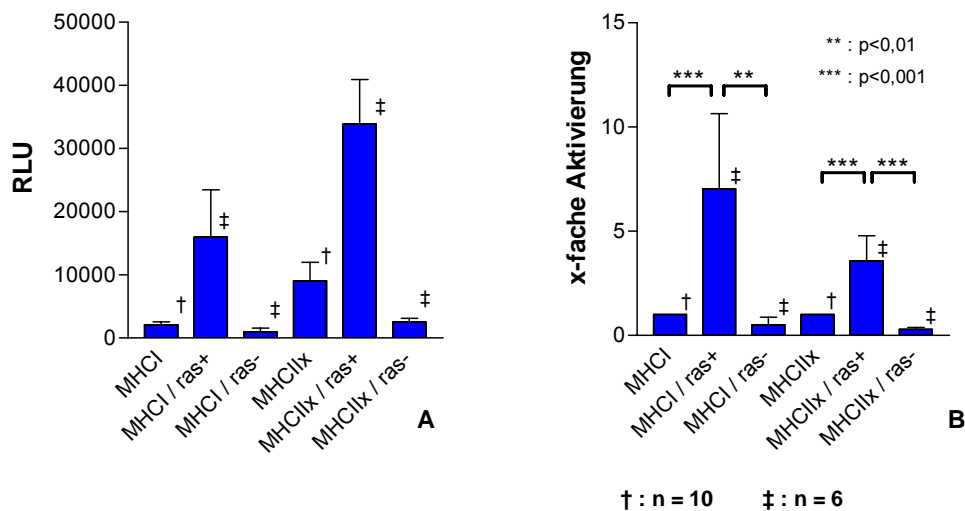
reduziert. Der Effekt ist beim MHCI-Promotor ausgeprägter, wie der direkte Vergleich (Diagramm C und D) zeigt.

## 6-Tage-Versuche

Um den Einfluß von Ras auf den Differenzierungsprozess zu bestimmen, wurden 6-Tage-Versuche durchgeführt. Das unten aufgeführte Schema gibt den Verlauf eines 6-Tage-Versuches wieder.



Die unten dargestellten Diagramme zeigen die Aktivität des MHCI- und des MHCIIx-Promotors und den Einfluss von konstitutiv aktivem und dominant negativem Ras auf diese Promotoren. Das rechte Diagramm (B) gibt die Aktivität des Promotors als Vielfaches der Grundaktivität des jeweiligen Promotors wieder.





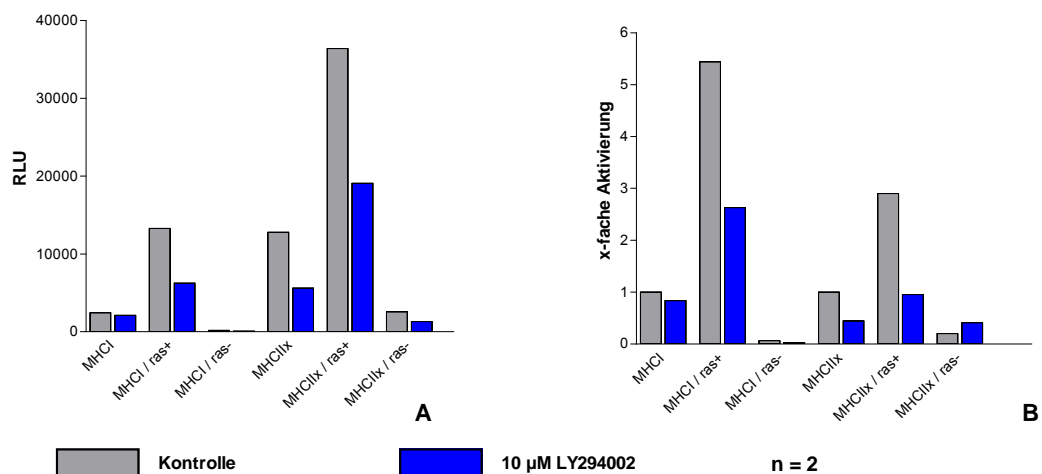
Man erkennt eine deutliche Aktivierung beider Promotoren in dieser Differenzierungsphase durch die Koexpression von konstitutiv aktivem Ras. Dominant negatives Ras reduziert die Aktivität noch unter das Grundniveau des jeweiligen Promotors.

### LY294002-Versuche

Ras aktiviert neben dem Ras/Erk-Signaltransduktionsweg auch den PI-3-Kinase-Signalweg (s. Einleitung). Um den Effekt zu untersuchen, den Ras über den PI-3-Kinase-Weg auf die MHCII- und MHCIIx-Promotoren ausübt, sollte dieser Weg durch den Inhibitor LY294002 gehemmt werden. LY294002 wurden in einer Konzentration von 10  $\mu$ M eingesetzt (Sumitani et al. 2002).

6-Tage-Versuch:

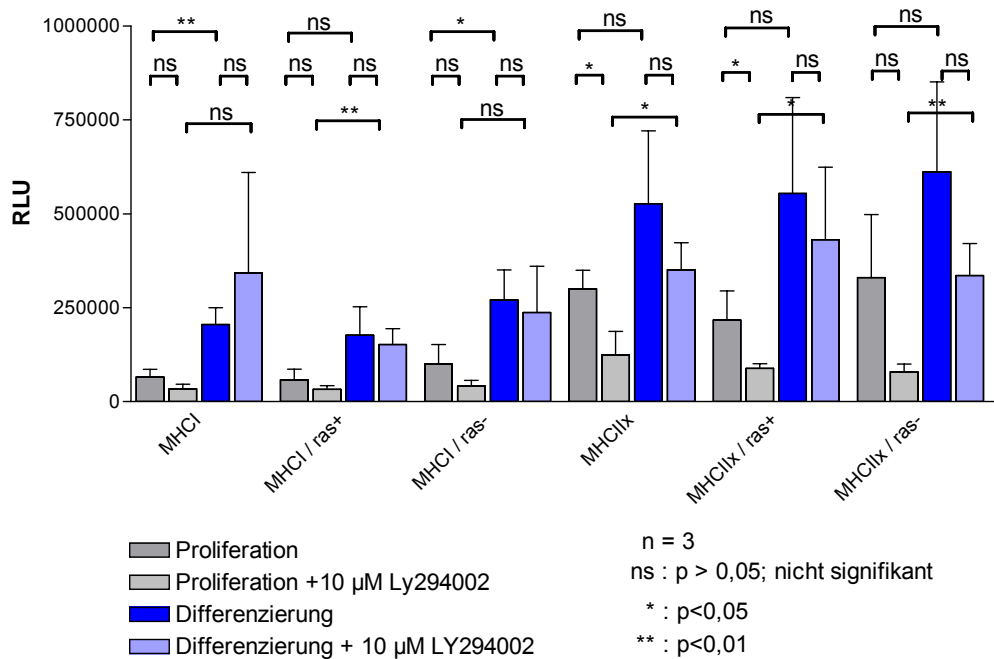
Es wurden 6-Tage-Versuche analog den zuvor beschriebenen durchgeführt. Zwei parallele Ansätze von Transfektionen wurden bis zu Tag 4 identisch kultiviert. Für die letzten 48h wurde einem der beiden Ansätze im Medium 10  $\mu$ M LY294002 zugesetzt.



Die Diagramme zeigen Mittelwerte von zwei Versuchen mit LY294002. Bis auf den MHCII-Transfektionsansatz, bei dem LY294002 zu keiner Reduktion der Promotoraktivität führt, wird in allen anderen Ansätzen die Promotoraktivität um etwa 50% reduziert. Die Hälfte des aktivierenden Einflusses von konstitutiv-aktivem Ras auf die MHC-Promotoren scheint über den PI-3-Kinase-Signalweg vermittelt zu werden.

## 2-Tage-Versuch:

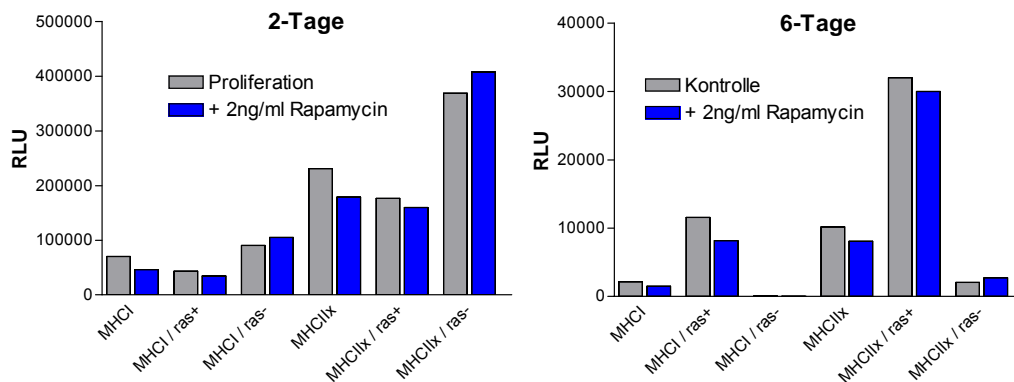
Es wurde auch der 2-Tage-Versuch mit beiden Medien durchgeführt. Statt je einem Satz-Transfektionen pro Medium wurden zwei Sätze pro Medium verwendet, ein Satz als Kontrolle, einem Satz wurden 10  $\mu$ M LY294002 zugesetzt.



Die Ergebnisse des 2-Tage-Versuches mit LY294002 waren nicht eindeutig zu interpretieren. Die Streuung der Messwerte zwischen den einzelnen Versuchen war sehr ausgeprägt und die Aktivitätsänderungen sind meist nicht signifikant. Lediglich die MHC1lx- und MHC1lx/Ras<sup>+</sup>-Ansätze in Proliferationsmedium mit und ohne LY294002 zeigen einen signifikanten Unterschied und deuten somit einen hemmenden Effekt an. Die anderen signifikanten Unterschiede sind keine Hemmstoffeffekte, sondern auf die unterschiedlichen Einflüsse der Medien zurückzuführen. Es lassen sich keine exakten Schlüsse über den Effekt des Hemmstoffs auf die Promotoraktivität in diesem Differenzierungsstadium ziehen. Um exaktere Aussagen zu erhalten, müsste die n-Zahl dieses Versuches erhöht werden, um so die große Streuung zu kompensieren und signifikante Aktivitätsunterschiede zu ermitteln.

## Rapamycin–Versuche

Rapamycin ist der namensgebende Hemmstoff von mTOR (*mammalian target of Rapamycin*). Akt/mTOR ist ein Substrat der PI-3-Kinase. Durch die Verwendung von Rapamycin sollte der Verlauf dieses Signalweges weiterverfolgt werden. Rapamycin wurde in einer Konzentration von 2 ng/ml eingesetzt (Sumitani et al. 2002).

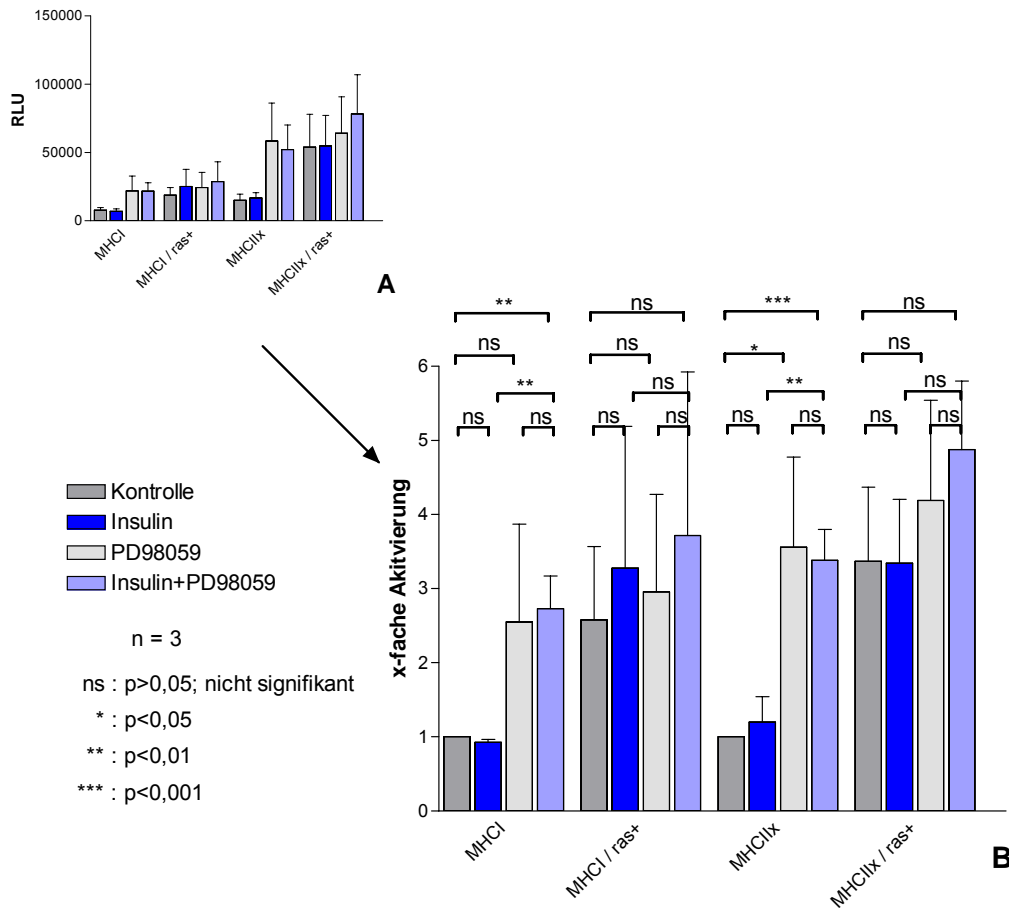


Wie in den Diagrammen von zwei Einzelversuchen zu erkennen ist, hat Rapamycin weder im 2-Tage-Versuch mit Proliferationsmedium, noch im 6-Tage-Versuch einen Effekt auf die MHC-Promotoren.

## Insulin- und PD98059-Versuche

Resultierend aus den Versuchen mit LY294002 und Rapamycin und angeregt durch eine Veröffentlichung, in der Insulin und PD98059 verwendet wurden, um die Differenzierungsfähigkeit von Ras-transformierten C2C12-Myoblasten wiederherzustellen (Conejo et al. 2002), wurden diese Substanzen in 6-Tage-Transfektionsexperimenten eingesetzt. PD98059 ist ein Hemmstoff von MEK1/2 (MAPKK s. Einleitung) und verhindert somit eine Aktivierung der p42/p44-Erk-Kinasen. Insulin aktiviert über den Insulinrezeptor den PI-3-Kinase- und den Ras/MAP-Kinase-Signaltransduktionsweg. Die Substanzen wurden jeweils alleine und zusammen in verschiedenen Transfektionsansätzen verwendet. Es wurden pro Experiment vier parallele Transfektionsansätze durchgeführt. Nach vier Tagen wurden drei Ansätzen Insulin in einer Konzentration von 100 nM, PD98059 in einer Konzentration von 20 µM oder beides in der angegebenen

Konzentration zugesetzt (Conejo et al. 2002). Da vierfache Ansätze einen beträchtlichen Materialaufwand mit sich brachten, wurde auf die Transfektion von dominant negativem Ras verzichtet.



Die Analyse der Luziferaseaktivitäten nach Normierung ergibt kein klares Bild (Diagramm A). Da die Mehrfachbestimmungen aufgrund des Umfangs dieses Experimentes in separaten Experimenten durchgeführt werden mussten, ist die Streuung zwischen den Einzelerperimenten recht groß, wie man der Größe der Fehlerbalken entnehmen kann. Die Normierung innerhalb der Einzelerperimente auf die Grundaktivität des jeweiligen Promotors (Diagramm B) verringert die Streuung nur unerheblich. Wie man sieht, hat Insulin in einer Konzentration von 100 nM weder auf den MHCI- noch auf den MHCIIx-Promotor einen Einfluss. Dagegen aktiviert PD98059 beide Promotoren um den gleichen Faktor wie die Expression von konstitutiv aktivem Ras. Die Transfektionsansätze mit PD98059 und Insulin zeigen vergleichbare Aktivitäten wie die Ansätze nur mit PD98059. Insulin scheint auch hier keinen Einfluss zu

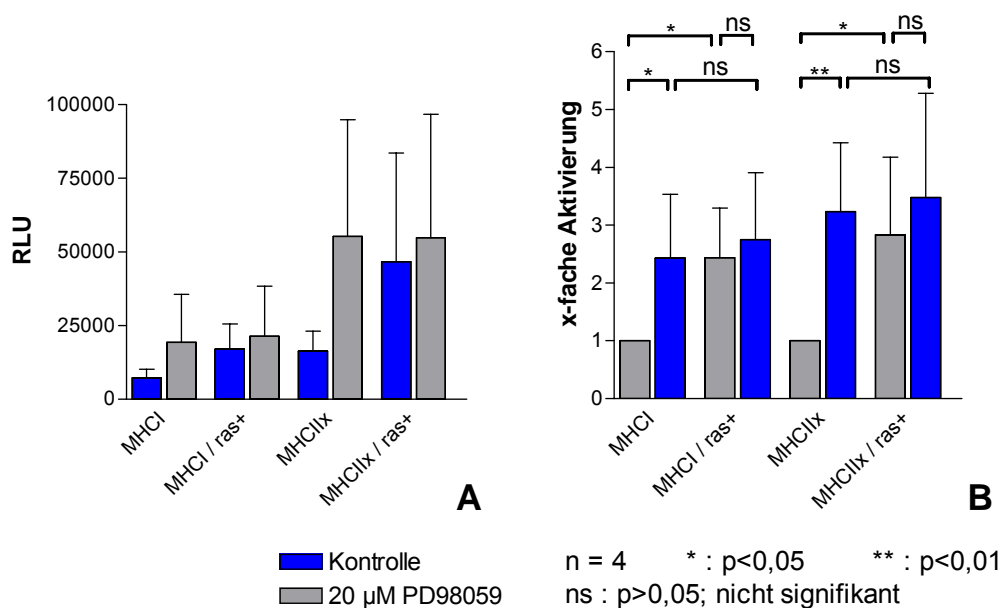
haben. Ob es durch PD98059 in den Ansätzen mit konstitutiv aktivem Ras zu einer weiteren Aktivierung kommt, ist wegen der Streuung nicht zu beurteilen.

### Weitere PD98059-Versuche

Die Resultate des Insulin/PD98059-Versuches waren Anlass dazu, weitere Versuche mit dem MEK1/2 Hemmstoff durchzuführen. Dazu gehörten ein weiterer 6-Tage-Versuch, aber auch 2-Tage-Versuche.

#### 6-Tage-Versuche:

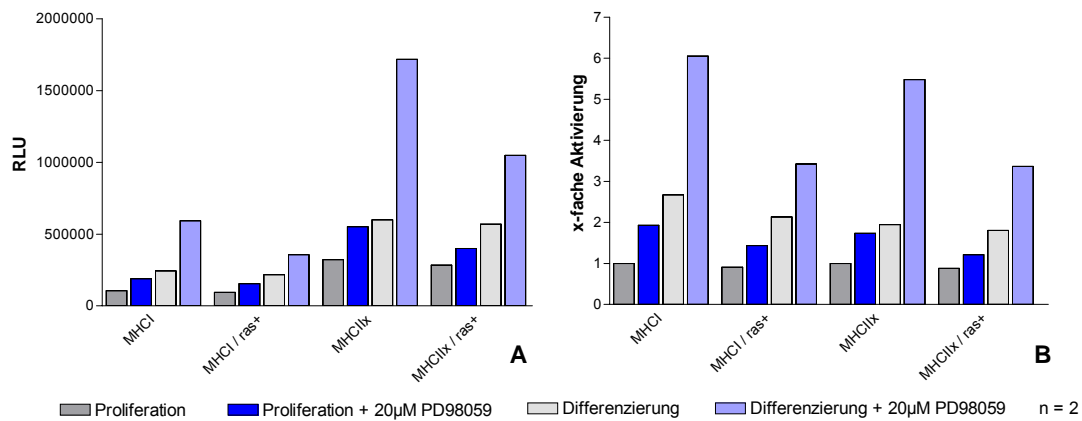
In den hier dargestellten Diagrammen wurden Messwerte aller 6-Tage-Versuche mit PD98059 und die dazugehörigen Kontrollen verwendet.



Die Diagramme zeigen noch einmal deutlich die Aktivierung der MHC-Promotoren, durch PD98059 im 6-Tage-Versuch. In Diagramm A die normierte Luziferaseaktivität, in Diagramm B die Aktivierung des Promotors bezogen auf die Basalaktivität. PD98059 aktiviert die Promotoren interessanterweise in ähnlichem Maße wie die Expression von konstitutiv aktivem Ras. Außerdem konnte keine signifikante Verstärkung der Aktivierung durch den gemeinsamen Einsatz von konstitutiv aktivem Ras und PD98059 erzielt werden.

## 2-Tage-Versuche:

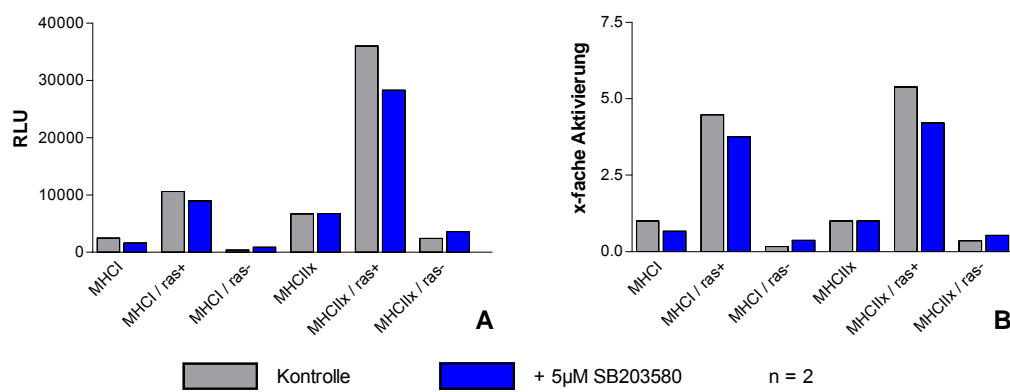
Für die 2-Tage-Versuche wurden vier parallele Transfektionsansätze durchgeführt, jeweils zwei pro Medium, ein Ansatz als Kontrolle, dem anderen wurde beim Mediumwechsel nach der Transfektion 20  $\mu$ M PD98059 zugesetzt.



Die Diagramme geben die normierten Luziferaseaktivitäten (Diagramm A) und die Promotoraktivierung bezogen auf die Basalaktivität des jeweiligen Promotors in Proliferationsmedium (Diagramm B) als Mittelwerte zweier Experimente wieder. Auch im 2-Tage-Versuch und in beiden Medien findet eine Aktivierung durch den Hemmstoff statt. Die Aktivierung ist jedoch weniger stark, wenn konstitutiv aktives Ras koexprimiert wird.

## SB203580-Versuche

Die bereits erwähnte Veröffentlichung (Conejo et al. 2002) postuliert außer den beschriebenen Einflüssen eine Bedeutung der p38-Kinase auf den Differenzierungsprozess von C2C12-Myoblasten. Es wurde daher ein 6-Tage-Versuch mit dem p38-Hemmstoff SB203580 durchgeführt. Zwei parallele Transfektionsansätze wurden bis zum 4. Tag identisch kultiviert. Einem der Ansätze wurde daraufhin SB203580 in einer Konzentration von 5  $\mu$ M im Medium zugesetzt.



In den Diagrammen sind die Mittelwerte aus zwei Einzelerperimenten dargestellt. Wie man den Luziferaseaktivitäten entnehmen kann, die in Diagramm A dargestellt sind, hat SB203580 keinen erkennbaren Einfluss auf die Aktivität des MHC1- bzw. MHC1ix-Promotors. Die Koexpression von Ras aktiviert beide Promotoren, wie man gut aus Diagramm B, in dem die auf Basalaktivität normierte Promotoraktivierung dargestellt ist, erkennen kann. Auch die Aktivierung wird durch SB203580 nicht in signifikanter Weise beeinflusst.

Es konnte somit kein Hinweis für einen Einfluß der p38-MAP-Kinase auf die MHC-Promotoren während der Differenzierung von Satellitenzellen gefunden werden, weder auf die Basalaktivität, noch auf die Ras-induzierte Aktivierung.

## **Versuche zur Fasertypumwandlung**

Neben den Differenzierungsversuchen wurden auch Versuche durchgeführt, die eine Fasertyp-Umwandlung herbeiführen sollten. In diesem Fall wäre nicht eine synchrone, sondern eine gegenläufige Beeinflussung oder zumindest die Reaktion nur eines der beiden Promotoren zu erwarten.

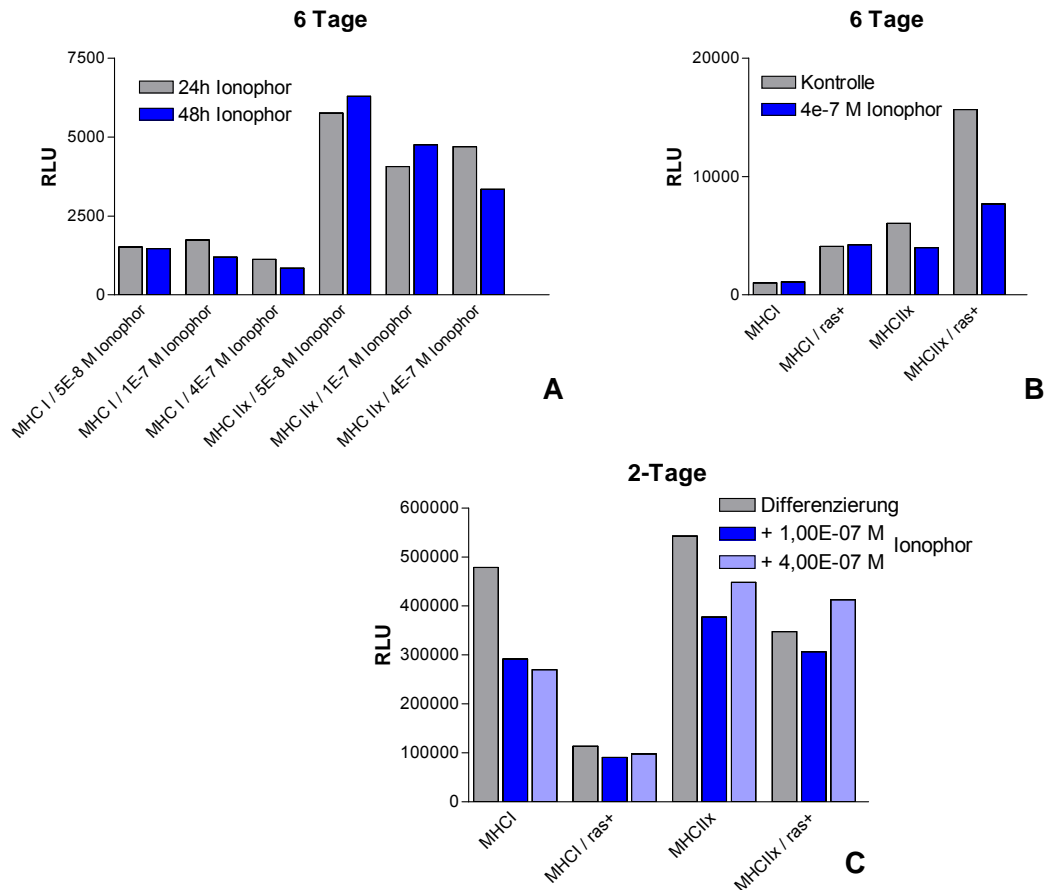
Wie bereits erwähnt, ließen sich in den fusionierten Satellitenzellen durch elektrische Reize keine Kontraktionen auslösen. Die in der Arbeitsgruppe etablierten elektrischen Reizmuster ließen sich somit nicht für eine Fasertypumwandlung einsetzen. Stattdessen wurde Kalziumionophor verwendet, um eine Fasertypumwandlung zu induzieren. Der Kalziumionophor A23187 ist in der Lage, eine Weiß-Rot-Umwandlung zu induzieren (Meissner et al. 2001). Die intrazelluläre Kalziumkonzentration wird so erhöht, dass der Calcineurin-Signalweg aktiviert wird. Dies führt dann zur Ausprägung des langsamen Fasertypus, indem die MHCI-Expression induziert und die MHCIIx-Expression reprimiert wird.

Der Hemmstoff Cyclosporin-A (CsA) wurde verwendet, um eine selektive Inaktivierung des MHCI-Promotors herbeizuführen. Cyclosporin A hemmt Calcineurin und verhindert somit die Ausprägung des langsamen Fasertypus (Meissner et al. 2001). In Reporterassays sollten diese Effekte durch eine Aktivierung des MHCI-Promotors als Antwort auf Ionophorbehandlung und durch eine Inaktivierung als Antwort auf Cyclosporin-A zu erkennen sein.



## Ionophor Versuche:

Es wurden verschiedene Einzelversuche mit Kalziumionophor durchgeführt, deren Ergebnisse in den unten abgebildeten Diagrammen zusammengefasst sind.

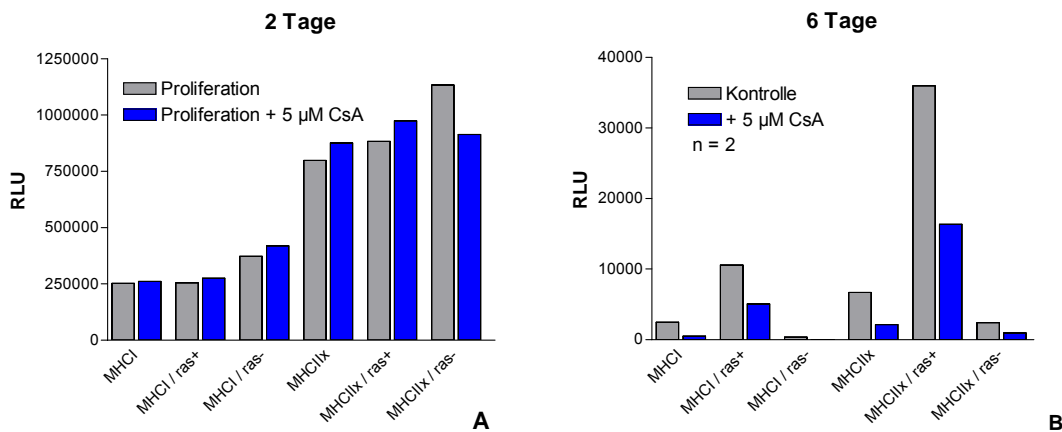


Das Diagramm A zeigt das Ergebnis einer aufsteigenden Reihe von Ionophorkonzentrationen im 6-Tage-Versuch. Mit MHC I- oder MHC IIx-Reportergenplasmiden transfizierte Satellitenzellen wurden bis zum 4. Tag wie beschrieben kultiviert. 24h oder 48h vor der Ernte wurden drei verschiedene Ionophorkonzentrationen zugesetzt. Das Diagramm B zeigt einen analog durchgeführten Versuch. Es wurde jedoch auch konstitutiv aktives Ras koexprimiert und nur die größte Ionophor-Konzentration verwendet. In keinem der beiden Experimente, bei keiner Ionophorkonzentration konnte eine selektive Aktivierung des MHC I-Promotors beobachtet werden. Nur die Reduktion der MHC IIx-Promotoraktivität, die man in den Diagrammen erkennen kann, liefert einen Anhaltspunkt für eine Fasertypumwandlung.

Das Diagramm C, gibt das Ergebnis eines 2-Tag-Versuches mit Ionophor in Differenzierungsmedium wieder. Auch hier konnte keine Aktivierung des MHCII-Promotors beobachtet werden, stattdessen führen beide Ionophor-Konzentrationen zu einer Reduktion der Promotoraktivität beider Promotoren.

Cyclosporin A-Versuche:

In den unten abgebildeten Diagrammen sind die Ergebnisse der Cyclosporin A-Versuche zusammengefasst. Cyclosporin A wurde in einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  im jeweiligen Medium eingesetzt. Der 2-Tage-Versuch wurde als Einzelversuch durchgeführt. Die dargestellten Daten des 6-Tage-Versuches sind Mittelwerte aus zwei Experimenten.



Das linke Diagramm (A) zeigt das Ergebnis eines 2-Tage-Versuches mit Proliferationsmedium. Wie man erkennen kann, hat Cyclosporin A in keinem der Transfektionsansätze einen Effekt. Nur im 6-Tage-Versuch, der im rechten Diagramm (B) dargestellt ist, erkennt man eine deutliche Hemmung durch Cyclosporin A. Der Effekt ist jedoch nicht auf den MHCII-Promotor beschränkt, sondern betrifft in gleicher Weise auch den MHCIIx-Promotor.

Es konnte durch keinen der durchgeführten Versuche in dem verwendeten System vollständige Merkmale einer Fasertypumwandlung, wie sie beschrieben wurde, gefunden werden. Lediglich die beobachtete Reduktion der Promotoraktivität des MHCIIx-Promotors in den Ionophorversuchen liefert Hinweise für eine Fasertypumwandlung. Eine Aktivierung des MHCII-Promotors konnte nicht gezeigt werden.

### **Westernblotuntersuchungen**

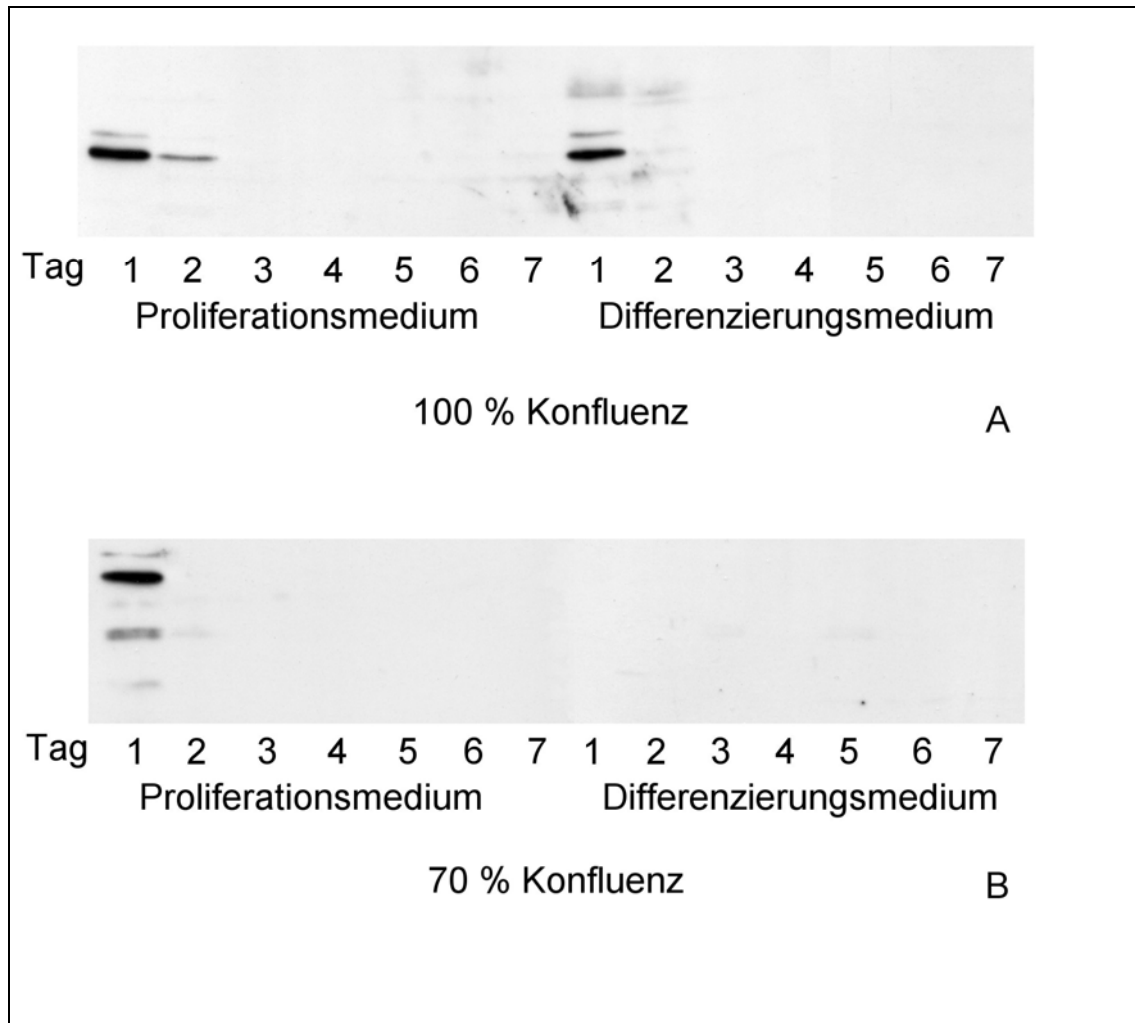
Um einen Eindruck von den nativen Phosphorylierungszuständen zu erhalten, wurden Westernblots mit Antikörpern gegen Phospho-p42/p44 und Phospho-Akt durchgeführt. Es wurden zwei verschiedene Kulturen verwendet. Eine Kultur wurde immer erst bei Erreichen der Konfluenz passagiert (100% Kultur), die andere Kultur wurde subkonfluent gehalten und bei etwa 70% Konfluenz passagiert (70% Kultur), um einen Einfluss der Dichte untersuchen zu können. Nach mehreren Passagen wurden aus beiden Kulturen Zellen in gleicher Dichte (25% Konfluenz) in je 14 60-mm Schalen ausgesät. Jeweils sieben dieser Schalen wurden mit Proliferationsmedium und sieben mit Differenzierungsmedium kultiviert. Es ergaben sich 4 unterschiedliche Probenreihen:

100% Kultur	Proliferationsmedium	7 Schalen
100% Kultur	Differenzierungsmedium	7 Schalen
70% Kultur	Proliferationsmedium	7 Schalen
70% Kultur	Differenzierungsmedium	7 Schalen

Über einen Zeitraum von 7 Tagen wurde von jeder Reihe je eine Probe mit Probenpuffer geerntet und eingefroren. Die Proben wurden dann durch Gelelektrophorese und anschließenden Westernblot mit Phospho-Akt und Phospho-p42/p44-Antikörpern analysiert. Alle Proben wurden in gleicher Proteinmenge auf die Gele aufgetragen.

### **Phospho-p42/p44**

In Abbildung 20 ist das Ergebnis des Phospho-p42/p44-Westernblots dargestellt. Abbildung 20A zeigt die Proben der immer bis zur Konfluenz, Abbildung 20B die Proben der immer subkonfluent kultivierten Zellen. Es sind jeweils 7 Proben aus Proliferations- und 7 Proben aus Differenzierungsmedium dargestellt.

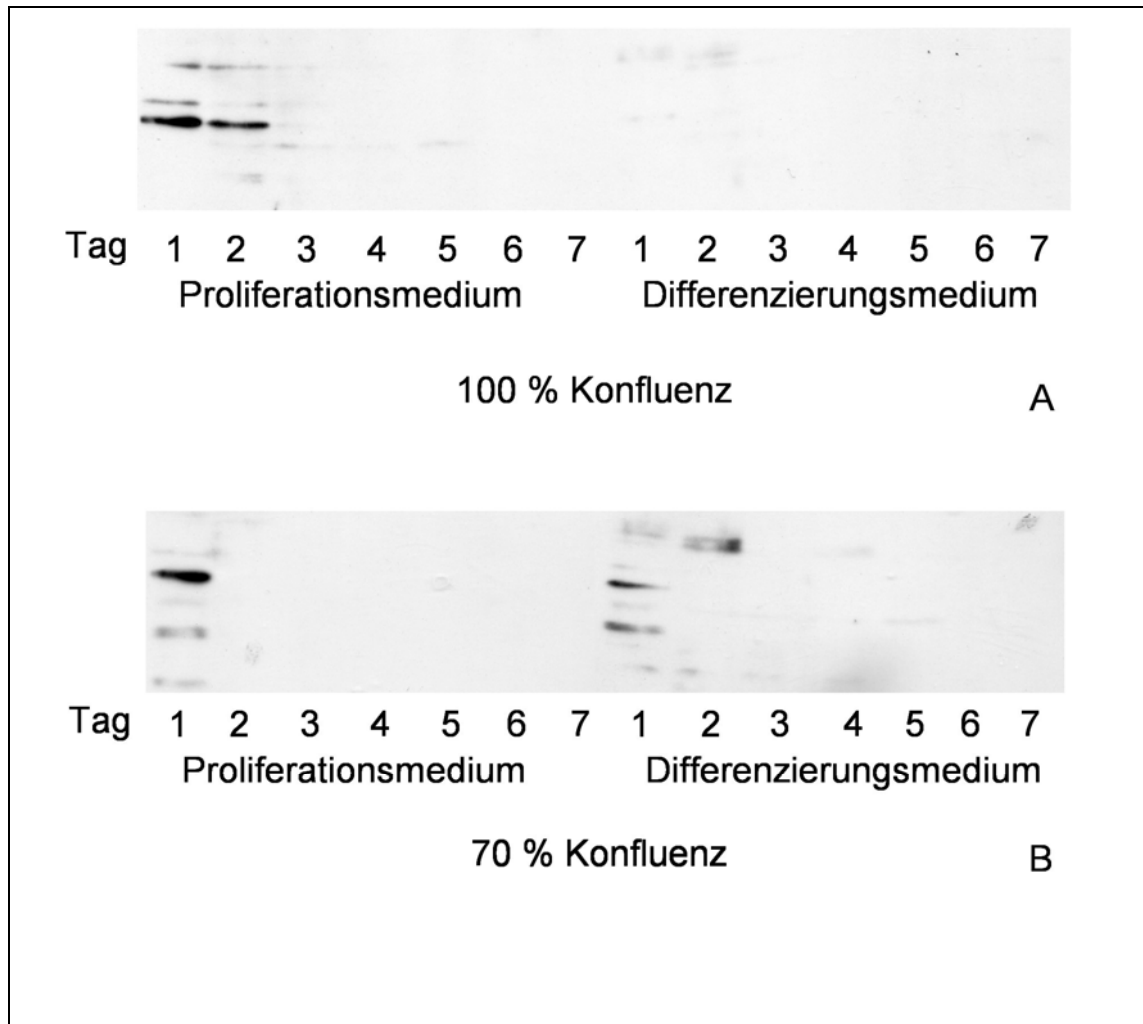


**Abbildung 20: ECL-Belichtung des Phospho-p42/p44-Westernblots**

Man erkennt in allen vier Probenreihen, dass die Phosphorylierung von p42/p44 nach spätestens 2 Tagen bis an die Detektionsgrenze absinkt auch in Proliferationsmedium, obwohl das im Medium enthaltene FGF und Insulin den Ras/Erk-Signalweg aktivieren sollte. Auch ein Unterschied zwischen den konfluent und subkonfluent kultivierten Zellen ist zu erkennen. Bei den subkonfluenten Proben (B) in Differenzierungsmedium ist bereits nach einem Tag kaum noch eine p42/p44-Phosphorylierung zu erkennen. Bei den konfluent kultivierten Proben (A) ist die Phosphorylierung erst nach 3 Tagen so weit zurückgegangen. Auch in Proliferationsmedium geht das Signal bei den 70%-Proben schneller zurück als bei den 100%-Proben. Dieser Befund überrascht, da bei Beginn des Experimentes die Zellen in gleicher Dichte ausgesät wurden und kein Konfluenzunterschied mehr bestand.

### Akt/Phospho-Akt

Abbildung 21 zeigt das Ergebnis des Phospho-Akt-Westernblots. Abbildung 21A gibt den Zeitverlauf der Akt-Phosphorylierung der konfluent kultivierten Zellen, Abbildung 21B den Zeitverlauf der subkonfluent kultivierten Zellen wieder.



**Abbildung 21: ECL-Belichtung des Phospho-Akt-Westernblots**

Die Akt-Phosphorylierung sinkt nach spätestens zwei Tagen ab auch in Proliferationsmedium. Die Akt-Phosphorylierung sollte durch das Proliferationsmedium erhöht sein, da große Mengen Insulin enthalten sind. Der schon bei der p42/p44-Phosphorylierung beobachtete Unterschied zwischen den konfluenten und subkonfluenten Proben ist auch in der Akt-Phosphorylierung erkennbar. Die Akt-Phosphorylierung der konfluent kultivierten Zellen in Differenzierungsmedium ist nach einem Tag auf die Detektionsgrenze zurückgegangen.

## Diskussion

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung des Einflusses von Ras und des Ras/Erk-Signaltransduktionsweges auf Differenzierungs- und Fasertypumwandlungsprozesse von Skelettmuskelzellen. Zu diesem Zweck musste ein geeignetes Zellkultursystem etabliert werden, das eine Transfektion von Skelettmuskelzellen zur Durchführung von Reporterassays und zur Überexpression von konstitutiv aktivem Ras ermöglichte.

### **Satellitenzell-Zellkultur**

Zellkulturen sind als wichtiges Werkzeug zur Untersuchung von Differenzierungs- und (Fasertyp)-Umwandlungsprozessen sowie der metabolischen Anpassung von Muskelzellen etabliert. Es gibt verschiedene Ausgangsmaterialien für diese Zellkulturen. Da es sich bei differenzierten Muskelzellen um ein postmitotisches Gewebe handelt, ist es notwendig, von geeigneten Stammzellen, in den meisten Fällen von neonatalen Myoblasten, auszugehen. Diese müssen immer wieder aufs Neue aus Jungtieren gewonnen und zur Differenzierung gebracht werden.

Eine andere Möglichkeit liegt in der Verwendung von Muskelzelllinien wie C2C12 oder L6. Es handelt sich dabei meist um Zelllinien transformierter Myoblasten, die leicht durch die Wahl des Mediums in einem proliferierenden Zustand gehalten werden können. Die Zellen können leicht vermehrt werden, was sie zu einem gängigen Modell für die Untersuchung von Muskelzellen gemacht hat.

Es zeigt sich jedoch, dass gerade bei der Untersuchung von Differenzierungsprozessen diese Modelle wegen ihres transformierten Phänotyps an Grenzen stoßen. Aktuelle Untersuchungen belegen, dass verschiedene Muskelzelllinien auf die Aktivierung verschiedener Signalwege völlig unterschiedlich und vor allem anders als Muskelzellen *in vivo* reagieren (McCall et al. 2003).

Die verwendeten Kaninchenmuskel-Satellitenzellen haben sich als geeignetes System für die Untersuchung von Differenzierungsprozessen erwiesen. Die Satellitenzellen konnten durch die Verwendung von PROMOCCELL *Skeletal muscle growth-medium*<sup>TM</sup> als Proliferationsmedium vermehrt und über ca. 15 Passagen in *Monolayer*-Kultur gehalten werden.

Durch die Verwendung von serumarmem Differenzierungsmedium konnten die Satellitenzellen zur Differenzierung, Fusion und Bildung von mehrkernigen Myotuben veranlasst werden. Es konnte gezeigt werden, dass die Satellitenzellen nach der Differenzierung und Fusion charakteristische Muskelproteine wie Kreatinkinase, schnelle und langsame adulte und neonatale MHC-Isoformen exprimieren. Der Effekt von im Medium enthaltenen Wachstumsfaktoren und konstitutiv aktivem Ras auf die Differenzierung, der in den Reporterassays beobachtet werden konnte, stimmt ebenfalls mit der Literatur überein (Olson et al. 1986; Clegg et al. 1987). Satellitenzellen als Ausgangsmaterial für Muskelzellkulturen haben sich in der Handhabung und Kultivierung als vergleichbar mit Muskelzelllinien erwiesen. Sie lassen sich vermehren und cryopräservieren, können durch die erreichbare Passagenzahl über mehrere Wochen hinweg kultiviert und einfach und zuverlässig zur Differenzierung gebracht werden. Die oft unabsehbaren Folgen eines transformierten Phänotyps bleiben aus.

Dennoch ist eine solche Kultur nicht mit einer primären Myotubenkultur gleichzusetzen. In der Literatur gibt es Hinweise auf Unterschiede zwischen Myoblasten und Satellitenzellen (Feldman und Stockdale 1991). Es konnte unter den gegebenen Wachstumsbedingungen kein Anzeichen von Spontankontraktionen, wie sie für Kulturen primärer Myotuben üblich sind, gefunden werden und es war außerdem nicht möglich - weder in Monolayerkulturen noch als Mikrocarrier-Suspensionkultur - die aus Satellitenzellen gebildeten Myotuben durch elektrische Reizung zur Kontraktion zu bringen.

### ***Transfektion von Muskelsatellitenzellen***

Aus der Literatur ist bekannt, dass Muskelzellen und Primärzellen schwierig zu transfizieren sind (Chen und Okayama 1987). Im undifferenzierten Stadium lassen sich diese Zellen besser transfizieren als im differenzierten, aber die Transfektionseffizienzen liegen deutlich unter denen, die bei Zelllinien erreicht werden. Die nach klassischen Methoden wie der DEAE-Dextran- oder der Kalziumphosphat-Methode erreichten Transfektionseffizienzen liegen bei unter 10%. Erst Lipid-Transfektionsreagenzien haben die in diesen Zelltypen erreichbaren Transfektionseffizienzen auf über 20% gesteigert (Liu et al. 2003). Die verwendeten Muskelsatellitenzellen ließen sich im Myoblastenstadium mit Transfektionseffizienzen von bis zu 40% vergleichsweise gut transfizieren. Der beschriebene Materialaufwand an Plasmid-DNA und Reagenzien für diese Transfektionseffizienz liegt aber über den üblichen Mengen für Standardzelllinien wie z.B. COS-7-Zellen.

Bei all diesen Methoden muss die Zelle die DNA aktiv aufnehmen. Da es bei diesem Vorgang auf die zu Verfügung stehende Zelloberfläche ankommt, geschieht diese Aufnahme in nennenswerter Menge nur im Myoblastenstadium und bei etwa 50% Konfluenz, andernfalls sinkt die Transfektionseffizienz stark ab. Man ist bei der Untersuchung von Differenzierungsprozessen am Muskel somit auf einen Zeitpunkt der Transfektion direkt vor dem Einleiten der Differenzierung eingeschränkt. Die Transienz der Transfektion begrenzt zusätzlich den Beobachtungszeitraum auf maximal eine Woche.

Ein inzwischen übliches Verfahren für die Transfektion von Muskelzellen ist die Verwendung viraler Transfektionssysteme. Diese Technik ermöglicht eine permanente Transfektion mit nahezu 100% Transfektionseffizienz (Diehl et al. 1996; Arai et al. 1999). Somit ist nach der viralen Transfektion im Myoblastenstadium eine beliebige Wahl des Beobachtungszeitraumes möglich. Sogar postmitotische Myotuben lassen sich mit etablierten viralen Transfektionsmethoden transfizieren (Kafri et al. 2000).

Zu Beginn dieser Arbeit wurden auch diese Techniken in Betracht gezogen. Zu diesem Zeitpunkt gab es jedoch nur wenige kommerziell erhältliche Systeme, die zudem in ihren Möglichkeiten eingeschränkt waren. So hätte die Verwendung von Kaninchenzellen die Nutzung pantroper Oberflächenepitope, die die Infektion vermitteln, notwendig gemacht. Diese pantropen



Oberflächenepitope sind, wie der Name schon sagt, auf keine bestimmte Spezies festgelegt, sondern ermöglichen generell die Infektion von zahlreichen Säugetier- und Nichtsäugetierzellen (Emi et al. 1991; Burns et al. 1993). Dieser Sachverhalt allein hätte erhöhte biologische Sicherheitsmaßnahmen erfordert. Die geplante Überexpression von onkogenem Ras in einem solchen System hätte zudem ein beträchtliches Risiko mit sich gebracht.

### ***Transfektionen mit EGFP-exprimierenden Plasmiden***

Die Versuche EGFP-Actin unter der Kontrolle von MHC-Promotoren in Satellitenzellen zu exprimieren, führte nicht zu den erwarteten Ergebnissen. Nur die Expression von EGFP-Actin unter Kontrolle des CMV-Promotors brachte ausreichend starke Signale, die über mehrere Tage hinweg beobachtet werden konnten. Diese Tatsache wurde für die Optimierung der Transfektionsprotokolle und die Fusionsexperimente genutzt. Die MHC-Promotoren erwiesen sich als zu schwach, um eine Untersuchung oder Quantifizierung der EGFP-Fluoreszenz zu ermöglichen. Zudem zeigte sich, dass bei Fusionsexperimenten eine Eigenfluoreszenz der Muskelzellen die Detektion der ohnehin schwachen EGFP-Fluoreszenz noch erschwerte. Es war nicht möglich, ein Reportersystem zur Verfolgung der zeitlichen Entwicklung der MHC-Promotoraktivität ohne Lyse der Zellen zu etablieren.

### ***Reporterassays und Westernblots***

Reporterassays werden zur Untersuchung von Genregulations- und Signaltransduktionsprozessen verwendet. Westernblots mit phosphorylierungs-sensitiven Antikörpern werden genutzt, um die Aktivität einzelner Proteine innerhalb einer Signalkaskade zu untersuchen und deren Beteiligung an Signaltransduktionsprozessen zu belegen.

In den 6-Tage-Versuchen lieferten die Reporterassays gut reproduzierbare Ergebnisse mit geringer Streuung. Es zeigte sich eine Korrelation zwischen Signalstärke und Passagenzahl, sodass Kulturen nur bis zur 15. Passage für Reporterassays verwendet wurden. Bei 2-Tage-Versuchen war die Streuung deutlich höher als bei 6-Tage-Versuchen. Dieser Effekt war besonders ausgeprägt, wenn die Versuche wegen der großen Probenzahl

nacheinander oder aus unterschiedlichen Kulturen durchgeführt wurden. Es wurden zahlreiche Nebenwirkungen auf die Signale der 2-Tage-Versuche beobachtet. Die Passagenzahl hatte in 2-Tage-Versuchen einen stärkeren Einfluss auf die absolute Signalstärke. In Abhängigkeit von Passagenzahl und Konfluenz variierte die Stärke der Aktivierung durch den Entzug von Wachstumsfaktoren oder die Repression dieser Aktivierung durch die Koexpression von konstitutiv aktivem Ras.

Bestätigt wird diese Beobachtung auch durch die Phospho-p42/p44- und die Phospho-Akt-Westernblots. Es wurden zwei verschiedene Kulturen verwendet (s. Ergebnisse), eine Kultur wurde erst bei Erreichen der Konfluenz passagiert, die andere wurde immer im subkonfluenten Zustand gehalten. Die Zellen wurden dann in gleicher Zelldichte für das Experiment ausgesät. In der p42/p44-Phosphorylierung wie auch in der Akt-Phosphorylierung wurde ein Unterschied zwischen den beiden Ansätzen beobachtet. Dies belegt den Einfluss der Konfluenz auf die untersuchten Signalwege. Die Zellen weisen unterschiedliche Zeitverläufe der Phosphorylierung auf, obwohl bei Beginn des Experimentes gleiche Ausgangsbedingungen herrschten. Die unterschiedlichen Zelldichten bei der Kultivierung scheinen die Zellen dauerhaft geprägt zu haben. Der Verlauf der Differenzierung und die Stärke der Aktivierung einzelner Signalwege scheint (in undifferenzierten Satellitenzellen) stark von den Ausgangsbedingungen abzuhängen. Es gestaltet sich daher schwierig, 2-Tage-Versuche exakt unter gleichen Bedingungen zu wiederholen, zumal nicht alle Faktoren bekannt sind, die einen Einfluss haben können. Dieser Sachverhalt mag auch Ursache widersprüchlicher Literaturdaten sein.

### ***Bedeutung von Ras für die Fasertypumwandlung***

Ein besonderes Merkmal von Skelettmuskelzellen ist ihre Plastizität, also die Fähigkeit, sich an wechselnde mechanische und metabolische Belastungen anzupassen (Roy et al. 1991; Roy et al. 1999). Die Änderung der Expressionsmuster der Myosinisoformen ist dabei von besonderem Interesse, da diese als wichtiges Indiz für die Fasertypumwandlung genutzt wird (Salmons und Vrbova 1969; Salmons 1992). Intensive Forschungen beschäftigen sich mit Signaltransduktionsprozessen, die diesen Fasertypwechsel vermitteln. Veröffentlichungen belegen die Bedeutung der Proteinphosphatase Calcineurin für die Induktion der langsamen MHC-Proteine. Ferner ist bekannt, dass die schnellen MHC-Ketten nicht über diesen Signalweg reprimiert werden (Chin et al. 1998; Dunn et al. 1999; Meissner et al. 2001).

Das Thema dieser Arbeit wurde unter anderem von einer Veröffentlichung, die Ras-Aktivität mit der Expression von langsamem MHC-Ketten in regenerierenden Muskeln korreliert (Murgia et al. 2000), inspiriert. In anderen Veröffentlichungen konnte eine unterschiedliche Sensibilität von MHCII Isoformen für Inaktivierung durch den Ras/Erk-Signalweg bei gleichzeitiger Induktion durch Kalzium gezeigt werden (Allen und Leinwand 2002).

Bis auf die Aktivitätssenkung des MHCII $\alpha$ -Promotors durch Ionophorbehandlung (s. Ergebnisse, S. 78f) konnte in den Reporterassays kein Anzeichen für eine Fasertypumwandlung gefunden werden. Die Koexpression von konstitutiv aktivem Ras führt zu einer Aktivitätssteigerung beider Promotoren. Eine selektive Steigerung der MHCI-Expression wie Murgia (Murgia et al. 2000) sie beschreibt, konnte nicht erreicht werden. Nach den vorliegenden Ergebnissen ist Ras nicht an der Fasertypdeterminierung beteiligt, sondern ist als genereller Aktivator der Expression in differenzierten Muskelzellen zu sehen. Da auch Murgia (Murgia et al. 2000) den beschriebenen Effekt nur in einem langsamen Muskel (soleus) zeigen konnte, ist wahrscheinlich, dass die Expression von konstitutiv aktivem Ras nur eine Verstärkung des bestehenden Expressionsmusters und nicht eine echte Fasertypumwandlung bewirkte. Eine bekannte Methode zur Auslösung einer Fasertypumwandlung wie Kalziumionophor (Kubis et al. 1997) konnte in den Reporterassays keine Aktivitätsänderungen auslösen, die klar eine Fasertypumwandlung angezeigt hätten. Auch ein selektiver, hemmender Einfluss von Cyclosporin A auf den

MHCI-Promotor konnte nicht gezeigt werden. Der Nachweis neonatalen, schnellen und langsamen Myosins im Westernblot zeigt, dass die Satellitenzellen nicht auf einen Fasertypus vorgeprägt sind und prinzipiell alle Myosinisoformen ausbilden können.

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Promotorfragmente sind nach Literaturangaben ausreichend für eine muskelspezifische Expression (Thompson et al. 1991; Allen et al. 2001). Ergebnisse von Baldwin deuten jedoch an, dass für die optimale Aktivierbarkeit des MHCI-Promotors Sequenzen bis zu 3500 bp *upstream* vom Transkriptionsstartpunkt notwendig sind (Wright et al. 1999; Giger et al. 2000). Es wäre denkbar, dass das verwendete MHCI-Promotorfragment zu kurz für eine kalziumabhängige Aktivierung ist.

## ***Bedeutung von Ras für Proliferation und Differenzierung von Satellitenzellen***

### **2-Tage-Versuche**

In der Literatur wird die Wirkung von konstitutiv aktivem Ras bzw. einer Ras-Aktivierung durch Wachstumsfaktoren als Hemmung der Differenzierung und Förderung der Proliferation beschrieben. Es werden drei Hauptmechanismen diskutiert, über die aktiviertes Ras die Differenzierung von Myoblasten verhindert:

1. Hemmung der Aktivität und der Expression von myogenen bHLH-Proteinen (Lassar et al. 1989; Konieczny et al. 1990)
2. Verhinderung des Eintritts in die G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Phase durch Aktivierung von c-Myc (Falcone et al. 1985; Olson et al. 1987)
3. Aktivierung von Fos und Jun (Stacy et al. 1987; Binetruy et al. 1991) (Hunter und Karin 1992)

Erst bei Entzug von Wachstumsfaktoren werden die muskelspezifischen Transkriptionsfaktoren durch die verminderte Aktivität des Ras/MAP-Kinase-Signalweges aktiv (Konieczny et al. 1990). Welcher der drei oben erwähnten Mechanismen ausschlaggebend ist oder ob es die gemeinsame Wirkung aller drei Mechanismen ist, ist noch nicht geklärt.

Die Kurzzeitversuche (2 Tage) mit Proliferations- und Differenzierungsmedium haben gezeigt, dass unter proliferativen Bedingungen die untersuchten MHC-Promotoren reprimiert werden. In Proliferationsmedium ist die Promotoraktivität auf einem basalen Niveau und wird auch durch zusätzliche Expression von aktiviertem Ras nicht weiter abgesenkt. In Differenzierungsmedium dagegen zeigt sich eine etwa 4-mal größere Grundaktivität der Promotoren, die bei Koexpression von konstitutiv aktivem Ras wieder auf ein dem Proliferationsmedium ähnliches Niveau abgesenkt wird. Diese Beobachtung legt den Schluss nahe, dass die geringe Promotoraktivität in Proliferationsmedium auf die Aktivität des Ras/MAP-Kinase Signalweges zurückzuführen ist und die Aktivierung von Ras die Expression der Myosine verhindert.

Diese Vermutung wird zusätzlich durch die Tatsache gestützt, dass das Proliferationsmedium große Mengen an Insulin und FGF enthält. Beide Substanzen sind bekannte Aktivatoren des Ras/MAP-Kinase-Signalweges (Mohammadi 1996; Saltiel und Pessin 2002) und die proliferationsfördernde und differenzierungsblockierende Wirkung von FGF auf Myoblasten und Satellitenzellen ist in der Literatur eingehend beschrieben (Olson et al. 1986; Clegg et al. 1987; Allen und Boxhorn 1989). Die 2-Tage-Versuche geben den in der Literatur beschriebenen Effekt von Wachstumsfaktoren und von konstitutiv aktivem Ras auf die Differenzierung von Myoblasten gut wieder:

- In Proliferationsmedium - unter dem Einfluss von Wachstumsfaktoren - wird die Differenzierung unterbunden.
- Differenzierungsmedium - der Entzug von Wachstumsfaktoren - dagegen führt über die Inaktivierung des Ras/Erk-Signalweges zu einer Induktion der Myosin Promotoren.
- Die Expression von konstitutiv aktivem Ras verhindert wie Wachstumsfaktoren diesen Prozess.

Ein Vergleich der Phospho-p42/p44-Westernblots von Satellitenzellen in Proliferations- bzw. in Differenzierungsmedium zeigt, dass auch andere Faktoren die Aktivität dieses Signalweges beeinflussen können. Auch in Proliferationsmedium nimmt der Phosphorylierungsgrad nach einigen Tagen ab, obwohl große Mengen an Insulin und FGF vorhanden sind. Das Erreichen der Konfluenz ist wahrscheinlich Auslöser dieses Effektes.

Es gibt Berichte über die Einleitung der Differenzierung durch Zell-Zell-Kontakt in durch Transformation differenzierungsdefizienten Myoblasten (La Rocca et al. 1989). Außerdem gibt es Hinweise in der Literatur, dass Integrine auf komplexe Weise den Ras/MAP-Kinase-Signaltransduktionsweg modulieren und Einfluss auf den Zellzyklus und die Proliferation nehmen können (Schwartz und Ginsberg 2002).

## 6-Tage-Versuche

In den 6-Tage-Versuchen zeigt sich ein Effekt, der einen Hinweis auf die Beteiligung weiterer Signalwege liefert. Nach 4 Tagen in Differenzierungsmedium führt die Überexpression von konstitutiv aktivem Ras zu einer Aktivierung beider MHC-Promotoren (s. Seite 70). Der Einfluss von Ras auf die MHC-Promotoren hat sich mit dem Differenzierungsprozess von einer Hemmung zu einer Aktivierung gewandelt. Der hemmende Einfluss einer Ras-Aktivierung auf myogene bHLH-Proteine, auf die Differenzierung und auf muskelspezifische Gene verschwindet anscheinend. Ein solch fundamentaler Wechsel eines Effektes macht die Beteiligung von anderen Signaltransduktionswegen sehr wahrscheinlich.

Die konstitutive Aktivierung von Ras wird in der Literatur häufig mit einer Differenzierungsdefizienz von Myoblasten in Verbindung gebracht (Lathrop et al. 1985; Clegg et al. 1987; Olson et al. 1987; Florini et al. 1991). Die Expression von konstitutiv aktivem Ras während der 6-Tage-Versuche sollte demnach die Differenzierung über die weiter oben beschriebenen Mechanismen unterbinden. Die Signalweiterleitung muss unterhalb von Ras unterbrochen oder gehemmt sein, sonst müsste die Ras-Aktivität und die Aktivierung des Erk-Signalweges die Differenzierung unter anderem durch den hemmenden Einfluss auf myogene bHLH-Proteine verhindern und auch der hemmende Effekt auf die MHC-Promotoren sollte erhalten bleiben.

Die p42/p44-Westernblots zeigen, dass der Erk-Signalweg zwischen Tag 4 und 7 nicht von sich aus aktiviert ist. Obwohl in Proliferationsmedium der Ras/Erk-Weg kontinuierlich aktiviert sein sollte, zeigen die p42/p44-Westernblots, dass mit fortschreitender Proliferation und Konfluenz der Phosphorylierungsgrad und damit die Aktivität der Erk-Kinasen abnimmt. Nach 3 Tagen ist kaum noch eine Phosphorylierung nachweisbar. Diese Beobachtung wird in der Literatur dadurch erklärt, dass mit Beginn der Differenzierung und Fusion der Myoblasten die muskelspezifischen Gene durch die Herabregulation der Expression von Wachstumsfaktor-Rezeptoren ihre Sensibilität für Wachstumsfaktoren verlieren (Olwin und Hauschka 1988; Hu und Olson 1990). Dies erklärt, warum es trotz Anwesenheit von Wachstumsfaktoren nicht zu einer Aktivierung des Ras/Erk-Signaltransduktionsweges kommt.

Es ist unbekannt, was initial den Ras/Erk-Signalweg unterbricht und damit die myogene Differenzierung und die Herabregulation der Rezeptoren für Wachstumsfaktoren einleitet. Warum die künstliche Aktivierung des Signalweges durch konstitutiv aktives Ras nicht die Differenzierung verhindert und stattdessen zu einer Aktivierung der MHC-Promotoren führt, kann so nicht erklärt werden.

Die MAP-Kinase-Kaskaden integrieren eine Vielzahl von Signalen. Die Aktivität jeder Stufe der Kaskade wird durch das Gleichgewicht zwischen Aktivierung und Inaktivierung bestimmt. Möglich wäre, dass ein anderer Ras-abhängiger Signalweg an Einfluss gewinnt oder dass bei der Aktivierung muskelspezifischer Gene auch spezifische Wachstumsfaktoren induziert werden, die durch Ras-abhängige Signaltransduktionswege positiv beeinflusst werden, die dann aktivierend auf die Expression von muskelspezifischen Genen wirken.

Eine Veröffentlichung von Sherwood (Sherwood et al. 1999) bringt die Aktivierung der Erk-Kinasen p42/p44 und p90RSK, gefolgt von stark gesteigerter c-fos-Transkription in Rattenmuskeln durch einen Ras-abhängigen Mechanismus, mit kontraktile Aktivität in Verbindung. Die Aktivierung des Ras/Erk-Signalweges durch die kontraktile Aktivität ist dabei deutlich stärker als die Aktivierung durch Insulin oder EGF. Die Ras-Aktivierung erfolgt nach dieser Veröffentlichung unabhängig von IRS- oder Shc-Tyrosin-Phosphorylierung und von Shc/Grb2- oder IRS1/Grb2-Komplexbildungen. Diese Befunde passen zu dem beschriebenen Effekt von Ras nach der Differenzierung.

Ras-Aktivierung führt zu einer gesteigerten Aktivität der MHC-Promotoren und scheint - wie die Phospho-p42/p44-Westernblotts von Satellitenzellen in Proliferationsmedium zeigen - unabhängig von einer Aktivierung durch Rezeptortyrosinkinasen.

Der Mechanismus des „Funktionswechsels“ von Ras bleibt unklar, ist aber nach den Ergebnissen von Sherwood auf Ebene der Transkriptionskontrolle zu suchen, da der Ras/Erk-Signalweg in bekannter Weise abzulaufen scheint.



## Hemmstoffversuche

### *Hemmung der PI-3-Kinase*

Die Ergebnisse der 2-Tage- und 6-Tage-Versuche belegen, dass andere Ras-abhängige Signalwege als der Ras/Erk-Weg Einfluss auf die MHC-Promotoren nehmen können. Der bedeutsamste Ras-abhängige Signalweg neben dem Ras/Erk-Signaltransduktionsweg ist der PI-3-Kinase-Weg, der z.B. einen Teil der Insulinwirkung vermittelt (Saltiel und Pessin 2002). Es wird berichtet, dass Wachstumsfaktoren wie FGF oder IGF-1 verschiedene Effekte auf Muskelzellen haben können, die durch die Nutzung unterschiedlicher Signalwege zustande kommen (Milasincic et al. 1996; Coolican et al. 1997; Tortorella et al. 2001). Nach diesen Veröffentlichungen wird Proliferation durch den Ras/Erk-Signalweg und Differenzierung durch PI-3-Kinase-abhängige Signaltransduktionswege vermittelt.

Es wurden Versuche mit dem PI-3-Kinase-Inhibitor LY294002 durchgeführt. Der alternative PI-3-Kinase-Inhibitor Wortmannin wurde nicht verwendet, da von ihm bekannt ist, dass er die Myosin-Light-Chain-Kinase (Nakanishi et al. 1992) sowie PDGF-vermittelte MAP-Kinase-Aktivierung inhibiert (Ferby et al. 1996). Die 6-Tage-Versuche mit LY294002 zeigen, dass die Aktivität der MHC-Promotoren um etwa 50% reduziert wird. Dieser Effekt ist besonders gut bei den Versuchen mit Koexpression von konstitutiv aktivem Ras zu beobachten. Da die Signale durch die Aktivierung stärker sind, ergibt sich ein besseres Signal-Rauschverhältnis und die Streuung ist im Vergleich zur Basalaktivität geringer. Dass die Ras-abhängige Aktivierung der MHC-Promotoren durch LY294002 reduziert wird, belegt die Beteiligung von PI-3-Kinase-abhängigen Signalwegen an der MHC-Promotor-Aktivierung.

Die Ergebnisse des 2-Tage-Versuches mit LY294002 sind aufgrund der großen Streuung nicht eindeutig interpretierbar. Lediglich in Proliferationsmedium lässt sich ein hemmender Einfluss erkennen. Die 6-Tage-Versuche mit LY294002 verdeutlichen die Bedeutung des PI-3-Kinase-Signalweges für die Expression von muskelspezifischen Genen.

### **Hemmung von mTor und p38**

Der genaue Verlauf des Signalweges, durch den PI-3-Kinase Einfluss auf die Aktivität der MHC-Promotoren nimmt und welcher Zweig des komplexen PI-3-Kinase/Akt-Signalweges diesen Einfluss vermittelt, ist in der Literatur nicht einheitlich beschrieben. Ein wichtiges Substrat des PI-3-K/Akt-Signalweges ist mTor (*mammalian target of rapamycin*). Außerdem wird die MAP-Kinase p38 als Substrat von PI-3-Kinase/Akt bei der Muskelzellendifferenzierung diskutiert (Conejo et al. 2002).

Die p38-MAP-Kinase hat zahlreiche Transkriptionsfaktoren als Substrat, darunter auch für die Muskeldifferenzierung wichtige Faktoren wie c-Myc (Falcone et al. 1985; Olson et al. 1987) oder MEF2 (Zhao et al. 1999a). Die Versuche mit dem mTor-Hemmstoff Rapamycin und mit dem p38-Hemmstoff SB203580 konnten keinen Einfluss einer dieser Proteinkinasen auf die Aktivität der MHC-Promotoren nachweisen.

Zur Interpretation der Rapamycin-Versuche muss beachtet werden, dass der Hemmstoff in einer Konzentration von 2 ng/ml eingesetzt wurde in Anlehnung an eine Veröffentlichung zur Akt- und mTOR-Signaltransduktion in C2C12-Myoblasten (Sumitani et al. 2002). In anderen Arbeiten, ebenfalls mit C2C12-Myoblasten, wurde mit Konzentrationen von bis zu 25 ng/ml gearbeitet (Conejo et al. 2002). Die Notwendigkeit von mTOR für die MHC-Expression, die durch den Einsatz von 2 ng/ml Rapamycin in C2C12-Zellen gezeigt wurde (Sumitani et al. 2002), konnte im Rahmen dieser Arbeit ebensowenig bestätigt werden, wie eine Bedeutung von p38 für die Differenzierung (Conejo et al. 2002).

Die Komplexität und Verzweigung des PI-3-K/Akt-Signalweges ermöglicht jedoch noch andere Interaktionen. Sherwood z.B. beschreibt die Insulin-abhängige p70<sup>S6K</sup>-Aktivierung in differenzierten Muskelzellen der Ratte. Die p70<sup>S6K</sup> ist wichtig für die Translationskontrolle (Dufner und Thomas 1999) und hat nach verschiedenen Veröffentlichungen eine positive Wirkung auf die Myogenin Expression (Xu und Wu 2000; Sumitani et al. 2002). Die Myogenin-Aktivität wiederum soll durch Akt inhibiert werden (Sumitani et al. 2002). Diese Aussage steht aber im Gegensatz zu den erwähnten Veröffentlichungen, die dem PI-3-Kinase-Signalweg die Differenzierungskontrolle zuschreiben (Milasincic et al. 1996; Coolican et al. 1997; Tortorella et al. 2001).

***Hemmung der Erk-Kinasen p42/p44***

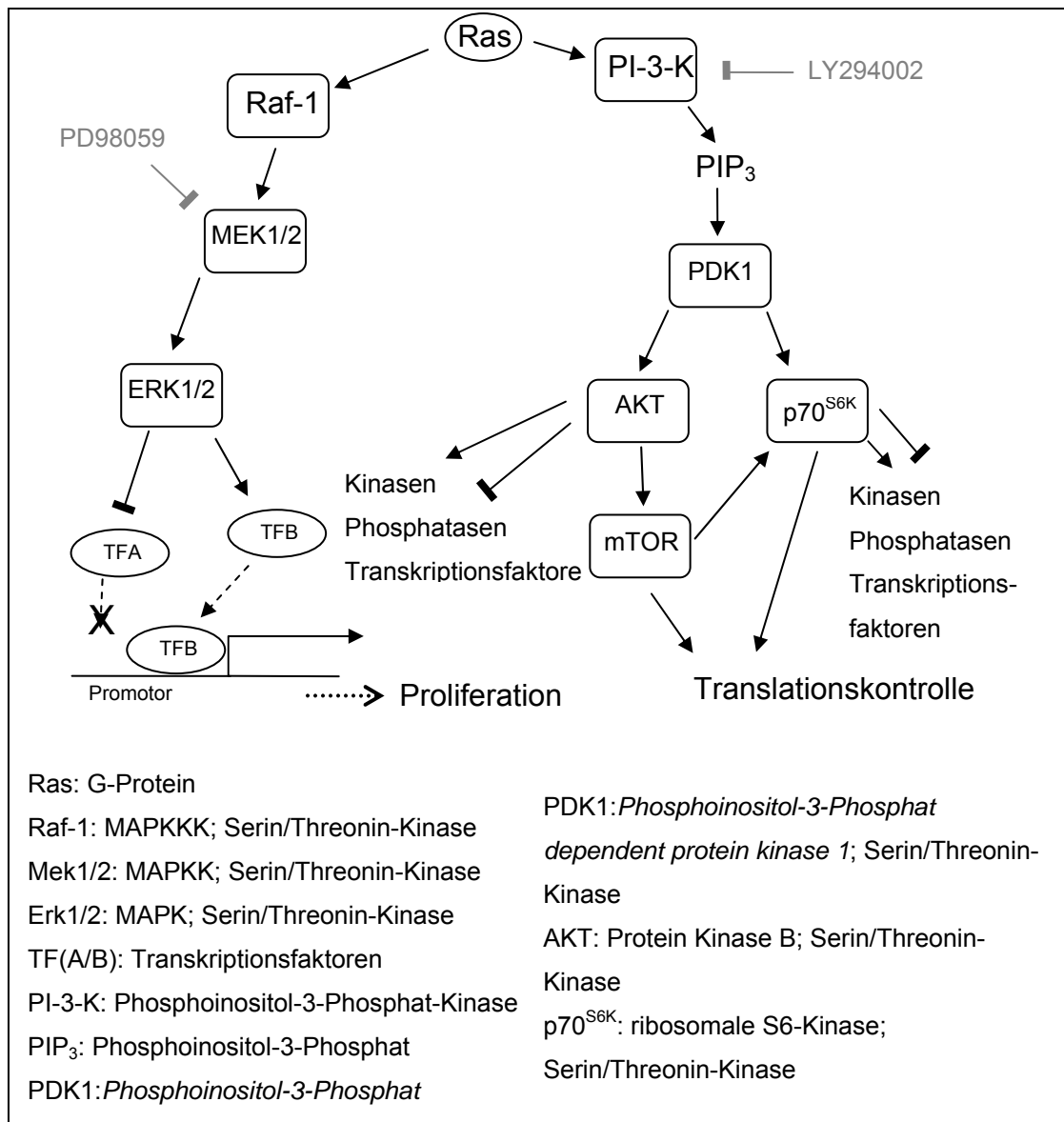
Die Versuche mit dem MEK1/2-Inhibitor PD98059 passen am wenigsten in das bisherige Bild. PD98059 führt sowohl im 2-Tage- wie auch im 6-Tage-Versuch zu einer Aktivierung der MHC-Promotoren.

Die in den 2-Tage-Versuchen erkennbare Aktivierung der MHC-Promotoren durch PD98095 ließe sich mit einer durch die verringerte Erk-Aktivität beschleunigte Differenzierung erklären. Die stärkere und schnelle Expression myogener bHLH-Proteine induziert die MHC-Promotoren. Warum aber PD98095 im 6-Tage-Versuch die gleiche Aktivierung der MHC-Promotoren wie die Koexpression von konstitutiv aktivem Ras zeigt, ist überraschend.

Nach den Ergebnissen der 2-Tage-, 6-Tage- und insbesondere der LY294002-Versuche wäre eine Inhibition der Ras-induzierten Aktivierung zu erwarten gewesen. Die Koexpression von konstitutiv aktivem Ras führt zu einer Aktivierung der MHC-Promotoren, die durch den Einsatz des PI-3-Kinase Hemmstoffes LY294002 um die Hälfte reduziert werden kann. Die naheliegende Annahme, dass die andere Hälfte der Aktivierung über den Ras/Erk-Signalweg vermittelt wird, hätte auch eine Reduktion der Signalstärke bei Einsatz des MEK1/2-Hemmstoffes PD98059 erfordert. Stattdessen kann durch eine Hemmung des Ras/Erk-Signalweges eine ebenso starke Aktivierung der MHC-Promotoren ausgelöst werden, wie durch die Koexpression von konstitutiv aktivem Ras. Außerdem sind die beiden Effekte nicht additiv, d.h. Koexpression von konstitutiv aktivem Ras und Hemmung von MEK1/2 führen nicht zu einer noch größeren Aktivierung, sondern die Aktivierung bleibt im selben Bereich, der auch durch PD98059 oder konstitutiv aktives Ras allein erzielt wird. Die Ergebnisse der PD98059 Versuche machen eine genauere Betrachtung der möglichen Signalwege und ihrer Interaktionen notwendig.

## Modelle der Signal-Interaktion

Ras wird als Ausgangspunkt und Teil des Ras/Erk-Signalweges dargestellt, induziert aber auch den PI-3-Kinase-Signalweg. Die Expression von konstitutiv aktivem Ras aktiviert nicht nur den Ras/Erk-Signalweg, sondern auch den PI-3-Kinase-Signalweg. Abbildung 22 gibt eine schematische Übersicht beider Signalwege.



**Abbildung 22:** Ras-abhängige Aktivierung des Ras/Erk- und des PI-3-Kinase-Signalweges

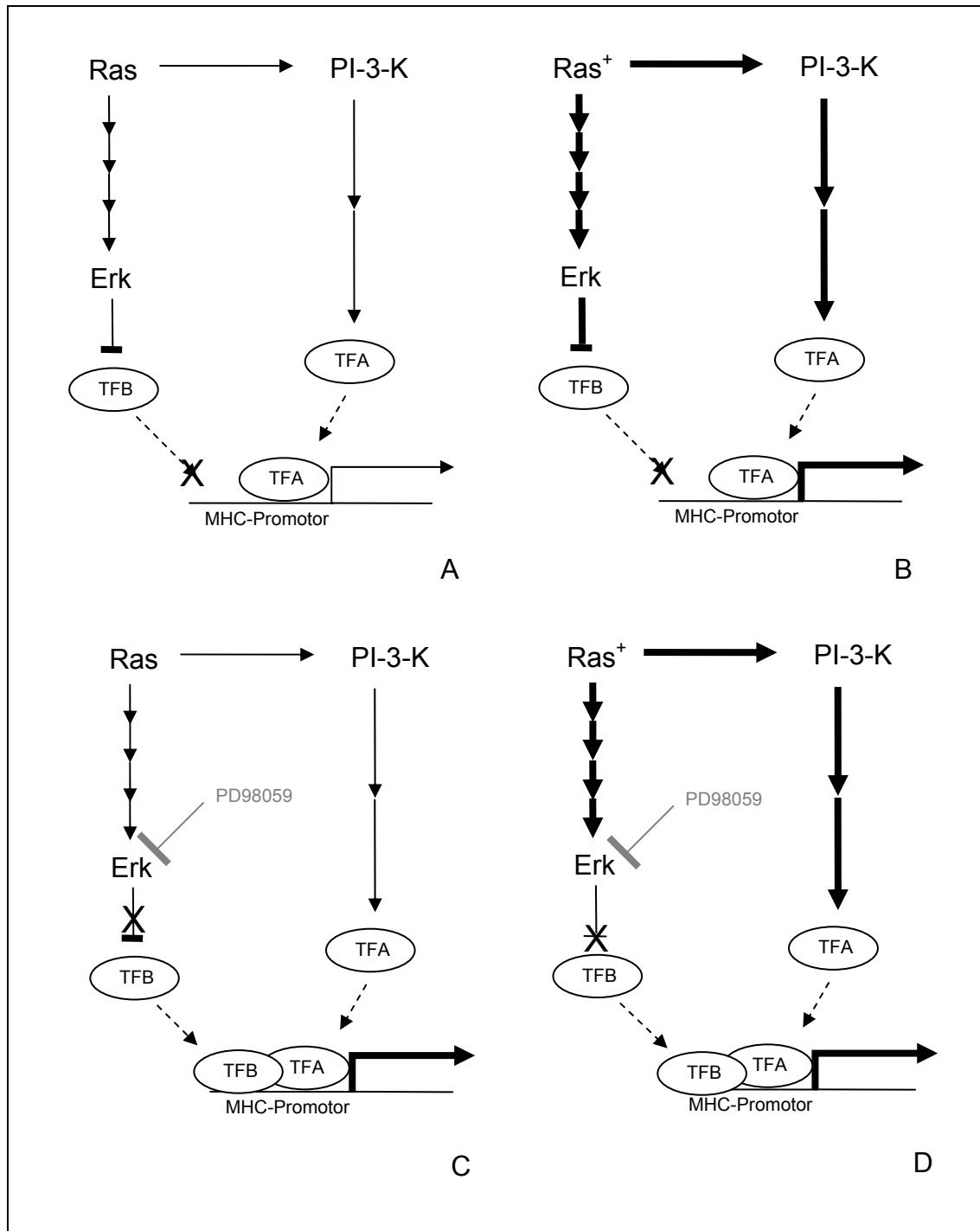
Die Erk-Kinasen können verschiedene Substrate, darunter zahlreiche Transkriptionsfaktoren phosphorylieren. Die Phosphorylierung kann Transkriptionsfaktoren aktivieren (TFB), aber auch inhibieren (TFA), je nach

den Eigenschaften des Transkriptionsfaktors. PD98049 hemmt die MEK1/2-Kinasen und reduziert so die Aktivität der Erk-Kinasen. Damit PD98059 trotzdem zu einer Aktivierung eines Promotors führen kann, müssen die Erk-Kinasen einen hemmenden Einfluss auf die MHC-Promotoren besitzen. Dieser Einfluss wird durch PD98059 unterbunden, sodass die Promotoraktivität gesteigert wird. Für den exakten Mechanismus der Hemmung durch die Erk-Kinasen gibt es zahlreiche Möglichkeiten, die an dieser Stelle nicht im Detail erläutert werden sollen.

Der PI-3-Kinase/Akt-Signalweg verzweigt sich sehr stark und ist an zahlreichen zellulären Funktionen wie der Kontrolle der Translation, des Zellzyklus oder der Apoptose beteiligt. Signalproteine wie p38, NF- $\kappa$ B, p70<sup>S6K</sup> oder die GSK-3 (Glykogen-Syntase-Kinase-3) werden durch diesen Signalweg beeinflusst. Eine Reduktion der Promotoraktivität durch den PI-3-Kinase-Inhibitor LY294002 zeigt an, dass der PI-3-Kinase-Signalweg beteiligt ist und einen positiven Einfluss auf den Promotor besitzen muss. Der weitere Signalverlauf bleibt unklar, da in Hemmstoffversuchen kein Einfluss von p38 oder mTOR gezeigt werden konnte.

### ***Modell der Kontrolle der MHC-Promotoren durch Ras/Erk- und PI-3-Kinase-Signalwege***

Die beobachteten Effekte lassen sich in einem Modell zusammenfassen. Dabei muss berücksichtigt werden, dass die Aktivierung der MHC-Promotoren durch konstitutiv aktives Ras nicht über den Ras/Erk-Signalweg vermittelt werden muss. Die Ergebnisse der PD98059-Versuche belegen einen hemmenden Einfluss des Ras/Erk-Signalweges auf die MHC-Promotoren. Die LY294002-Versuche verlangen einen aktivierenden Einfluss des PI-3-Kinase-Weges. Nimmt man all diese Fakten, kommt man zu dem in Abbildung 23 dargestellten Modell.



**Abbildung 23: Modelle der MHC-Promotorregulation durch Interaktionen des Ras/Erk- und des PI-3-Kinase-Signalweges**

Das Modell postuliert zwei aktivierende Transkriptionsfaktoren, einen, der Ras-abhängig aktiviert (TFA) und einen, der Ras-abhängig inhibiert (TFB) wird. In Abbildung 23A ist der Ruhezustand dargestellt. TFB wird durch die endogene Ras/Erk-Aktivität inhibiert, TFA wird durch die Ras-induzierte PI-3-Kinase-Aktivität aktiviert. Dies ist für die Basalaktivität der MHC-Promotoren verantwortlich. Die Koexpression von konstitutiv aktivem Ras steigert die

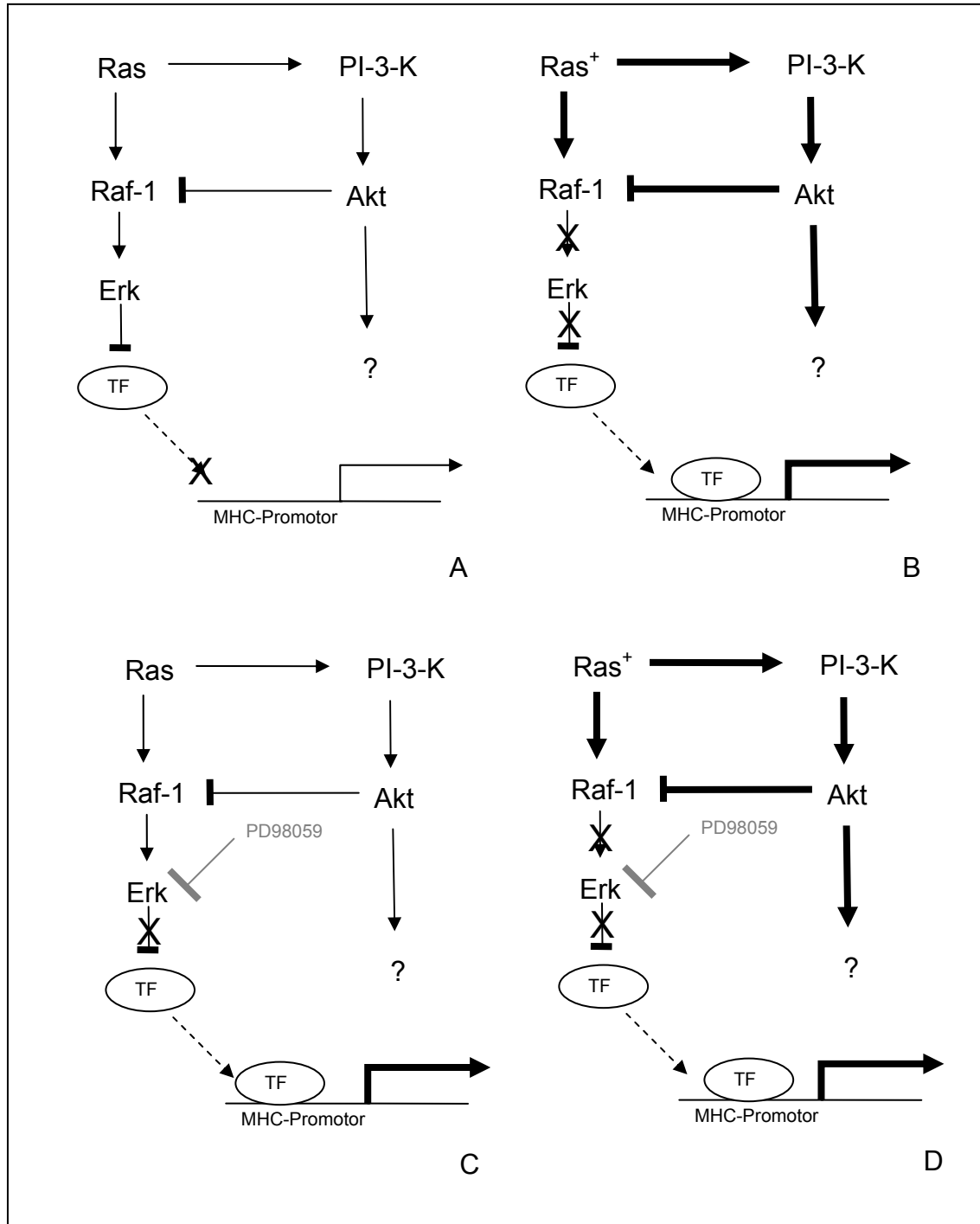
Aktivität beider Signalwege (Abbildung 23B), dieser Effekt führt durch verstärkte TFA-Aktivierung zu einer gesteigerten Transaktivierung der MHC-Promotoren. Wird stattdessen, wie in Abbildung 23C dargestellt, die Erk-Aktivität durch PD98059 reduziert, fällt der hemmende Einfluss von Erk auf TFB weg und dieser kann die Aktivität der MHC-Promotoren steigern. Wird konstitutiv aktives Ras koexprimiert und die Erk-Aktivität durch PD98059 verringert (Abbildung 23D), wird die Aktivität des PI-3-Kinase-Signalweges erhöht und TFA aktiviert. Die Aktivität der Erk-Kinasen wird reduziert und auch TFB kann den Promotor aktivieren.

Dieses Modell postuliert, dass der kombinierte Einsatz von konstitutiv aktivem Ras und PD98059 zu einer weiteren Steigerung der Transaktivierung führt. Daher sollten sich der Effekt von Erk-Inaktivierung und PI-3-Kinase-Aktivierung addieren. Ferner wäre es unwahrscheinlich, dass die Aktivierung durch PD98059 genauso stark sein sollte, wie die Aktivierung durch Koexpression von konstitutiv aktivem Ras.

### ***Modell mit hemmendem Einfluss des PI-3-Kinase-Weges auf den Ras/Erk-Weg***

Die komplexe Regulation und Wechselwirkungen der beiden Signalwege erlauben aber Modifikationen dieses Modells. So wird die Aktivität von Raf-1 z.B. als Gleichgewicht zwischen Aktivierung und Auto-Inhibition beschrieben (Hall-Jackson et al. 1999a; Hall-Jackson et al. 1999b). Durch die Auto-Inhibition führt die Aktivierung von Raf-1 zu einer schnellen Inaktivierung von Raf-1. Nach einer kurzen starken Aktivierung des Erk-Signalweges wird durch die Raf-1-Auto-Inhibition die Aktivität dieses Signalweges herunterreguliert. Diese Beobachtung stimmt mit den für die MAPK-Signalwege beschriebenen kurzen Aktivierungstransienten überein (Falcone et al. 1985; Kolch 2000). Dann sollte die aktivierende Wirkung von konstitutiv aktivem Ras auf die MHC-Promotoren zu einem großen Teil über den PI-3-Kinase-Weg vermittelt werden. Eine kurze Aktivierung des Erk-Signaltransduktionsweges macht es aber nicht plausibel, dass der oben beschriebene additive Effekt von Ras-Aktivierung und PD98059-Hemmung ausbleibt. Es gibt Berichte in der Literatur über die Interaktion von Ras/Erk- und PI-3-Kinase/Akt-Signaltransduktionswegen (Zimmermann und Moelling 1999; Kolch 2000), die ein alternatives Modell ermöglichen.

Demzufolge ist Akt (Protein Kinase B), das PI-3-Kinase-abhängig aktiviert wird, in der Lage, die Aktivität von Raf-1 zu reduzieren. Berücksichtigt man diesen Sachverhalt, so ergibt sich ein verbessertes Modell (Abbildung 24).



**Abbildung 24: Modell mit Interaktion zwischen Ras/Erk- und PI-3-Kinase-Signaltransduktionsweg**

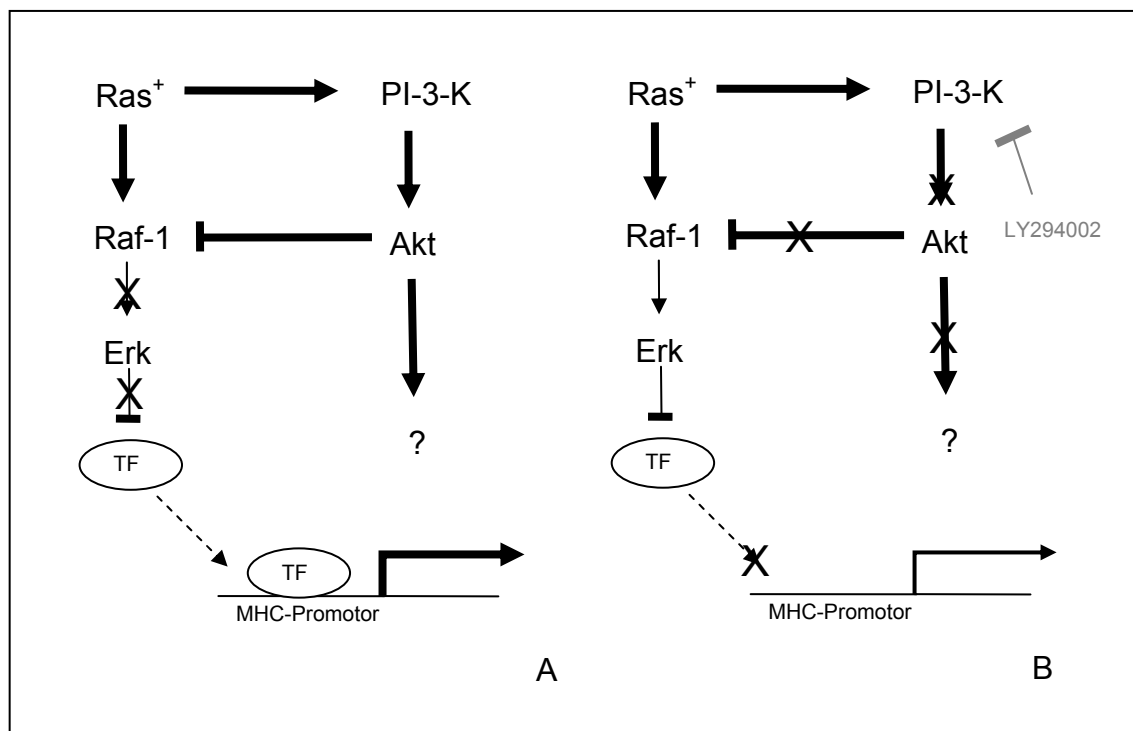
Die in Abbildung 24 A-D dargestellten Schemata zeigen das Verhalten des Modells in den verschiedenen Situationen. Abbildung 24A gibt den



Ruhezustand wieder und führt zur Basalaktivität der Promotoren. Abbildung 24B zeigt die Reaktion des Modells auf Koexpression von konstitutiv aktivem Ras. Die starke Ras-Aktivität aktiviert Raf-1 und PI-3-Kinase. Die Aktivität von Raf-1 wird daraufhin durch Autoinhibition und nach Phosphorylierung durch Akt inhibiert. Es kommt zu verringerter Aktivität der Erk-Kinasen und somit zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors und der Transaktivierung der MHC-Promotoren.

Der Effekt von PD98059 wird ebenfalls durch die Reduktion der Erk-Kinase-Aktivität vermittelt (Abbildung 24C). Der gemeinsame Einsatz von konstitutiv aktivem Ras und PD98059 führt in diesem Modell (Abbildung 24D) nicht zu einer weiteren Aktivierung, da beide Hemmungen den gleichen Signalweg unterbrechen, nur an unterschiedlicher Stelle. Es gibt keinen additiven Effekt, es sei denn eine der Hemmungen wäre nicht vollständig. Das Modell stimmt perfekt mit den Ergebnissen der Reporterassays überein.

Dieses Modell ist elegant, weil es nur einem Transkriptionsfaktor benötigt, ein zweiter durch die PI-3-Kinase aktivierter Transkriptionsfaktor ist nicht erforderlich. In Abbildung 25 ist der Effekt von LY294002 auf die Interaktion zwischen Ras/Erk- und PI-3-Kinase-Signalweg dargestellt.



**Abbildung 25: Effekt von LY294002 auf die Interaktion zwischen Ras/Erk- und PI-3-Kinase-Signaltransduktionsweg bei der Kontrolle von MHC-Promotoren**

Abbildung 25A zeigt den bereits beschriebenen Effekt der Expression von konstitutiv aktivem Ras. Wird zusätzlich der PI-3-Kinase-Inhibitor LY294002 eingesetzt, wird so die Aktivität von Akt und seine hemmende Wirkung auf Raf-1 reduziert. Es resultiert eine erhöhte Aktivität des Erk-Signalweges und eine verstärkte Hemmung des Transkriptionsfaktors. Die Transaktivierung der MHC-Promotoren geht daher zurück. Auch in diesem Punkt stimmt das Modell mit den experimentellen Daten überein.

### ***Myogene Transkriptionsfaktoren***

Es stellt sich die Frage, welcher oder welche Transkriptionsfaktoren durch den Ras/Erk-Signalweg gehemmt werden und die Aktivierung der MHC-Promotoren steigern können. Wie bereits erwähnt, muss der hemmende Einfluss von Ras kein direkter Effekt sein. Mögliche Kandidaten sind die zuvor beschriebenen myogenen bHLH Proteine, weil sie diese Merkmale aufweisen. Myogene bHLH-Proteine besitzen eine charakteristische *basic-helix-loop-helix*-DNA-Bindungsdomäne und interagieren an muskelspezifischen Promotoren mit allgemeinen bHLH-Proteinen. Sie werden in Expressionsstärke und Aktivität durch den Ras/Erk-Signalweg gehemmt und aktivieren muskelspezifische Gene wie z.B. die MHC-Gene.

Auch c-Fos kann durch den Ras/Erk-Signalweg in der Expression gesteigert und aktiviert werden. Der hemmende Einfluss von c-Fos auf myogene bHLH-Proteine wurde bereits erwähnt (Lassar et al. 1989; Rahm et al. 1990; Li et al. 1992).

Von besonderer Bedeutung in Muskelzellen ist der Transkriptionsfaktor MEF2 oder *Myocyte Enhancer Factor 2*. MEF2-Bindungsstellen finden sich auf zahlreichen Promotoren von muskelspezifischen Genen, so auch auf MHC-Promotoren. Eine große Zahl von Aktivierungs- und Interaktionsmöglichkeiten wird in der Literatur beschrieben (Zhao et al. 1999b; Wu et al. 2000; Allen und Leinwand 2002). Besonders wichtig ist die Interaktion mit NF-AT (*nuclear factor of activated T-cells*), der Histon-acetyltransferase-Aktivität rekrutiert und die Dimerisierung von MEF2 und Assoziation mit Koaktivatoren wie MyoD ermöglicht. Inaktives MEF2 liegt als Komplex mit Klasse 2 Histondeacetylasen vor (McKinsey et al. 2002). Die Assoziation und Interaktion mit NF-AT scheint besonders wichtig für eine fasertypspezifische Aktivierung der MHC-

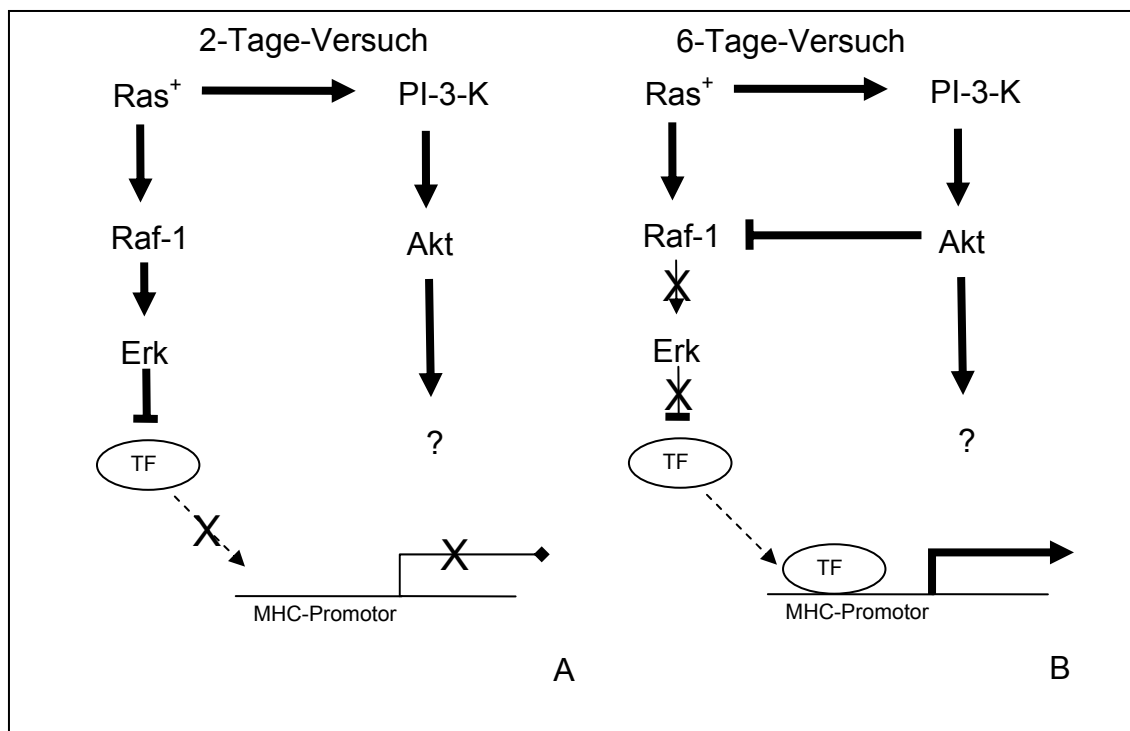
Promotoren zu sein (Meissner et al. 2001; Allen und Leinwand 2002; Kubis et al. 2003).

Es finden sich Hinweise auf eine Aktivierung durch p38-abhängige Phosphorylierung bestimmter Threoninreste (Zhao et al. 1999b). MEF2 kann aber auch durch Calcineurin-abhängige Dephosphorylierung aktiviert werden (Wu et al. 2000). Phosphorylierung führt demzufolge zur Inaktivierung. MEF2 kann also durch Phosphorylierung sowohl aktiviert wie auch inaktiviert werden, je nachdem an welcher Stelle die Phosphorylierung erfolgt. Die Inaktivierung durch Phosphorylierung entspricht dem hier entwickelten Modell und macht MEF2 zu einem guten Kandidaten für die beschriebenen Effekte auf die MHC-Promotoren. Die verwendeten Promotorfragmente besitzen beide MEF2-Bindungsstellen.

### **Modell des „Funktionswechsels“ von konstitutiv aktivem Ras**

Das im vorigen Abschnitt erarbeitete Modell der Signalinteraktion zwischen Ras/Erk- und PI-3-Kinase-Signaltransduktionsweg ermöglicht auch die Erklärung des beobachteten Wechsels von einer Inaktivierung zu einer Aktivierung durch konstitutiv aktives Ras im Vergleich zwischen 2-Tage- und 6-Tage-Versuch.

In der Literatur wird eine vom Differenzierungsstadium abhängige Hemmung des Ras/Raf/Erk-Signalweges durch Akt in C2C12-Myoblasten beschrieben (Rommel et al. 1999). Im Myotubenstadium hat demzufolge Akt einen hemmenden Einfluss auf Raf-1, der im Myoblastenstadium nicht nachweisbar ist. Dies legt die Schlussfolgerung nahe, dass der hemmende Einfluss von Akt auf Raf-1 erst durch die Differenzierung ausgebildet und die Signalweiterleitung und -verarbeitung in Myotuben stark modifiziert wird. Abbildung 26 verdeutlicht diesen Sachverhalt.



**Abbildung 26: Vergleich des Effektes von konstitutiv aktivem Ras auf MHC-Promotoren im 2-Tage- und im 6-Tage-Versuch.**

Abbildung 26A gibt den Signalfluss bei Koexpression von konstitutiv aktivem Ras oder bei Ras-Aktivierung durch Wachstumsfaktoren im 2-Tage-Versuch wieder. Der hemmende Einfluss von Akt auf Raf-1 ist noch nicht ausgebildet. Der Raf/Erk-Signalweg wird nicht gehemmt, sodass es zur Repression der MHC-Promotoren kommt. Abbildung 26B gibt den Zustand im 6-Tage-Versuch wieder, wie er bereits detailliert erläutert wurde. Auch der „Funktionswechsel“ der Ras-Aktivierung kann somit mit diesem Signaltransduktionsmodell erklärt werden.

## Zusammenfassung

Das hier gezeigte Modell einer Interaktion von Ras/Erk- und PI-3-Kinase-Signaltransduktionswegen bei der Kontrolle von MHC-Promotoren vor und während der Differenzierung befindet sich im Einklang mit den Literaturdaten und den hier gezeigten experimentellen Befunden.

Die 2-Tage-Versuche mit verschiedenen Medien geben die bekannten Effekte von Wachstumsfaktoren und onkogenem Ras gut wieder. Die Aktivierung von Ras hat in undifferenzierten Satellitenzellen einen hemmenden Einfluss auf die

MHC-Promotoren. Während der Differenzierung kommt es neben der eigentlichen Reifung der Satellitenzellen auch zu einer Reifung der Signalwege. Der Effekt einer Expression von konstitutiv aktivem Ras wandelt sich von einer Hemmung zu einer Aktivierung, obwohl der direkte hemmende Einfluss des Ras/Erk-Signalweges auf die Promotoren erhalten bleiben muss, wie die PD98059-Versuche belegen. Stattdessen wird eine Verknüpfung zwischen dem Ras/Erk- und dem PI-3-Kinase-Signalweg etabliert, dessen Beteiligung durch den Hemmstoff LY294002 belegt werden konnte. Dies führt zu einer Modulation der Signalverarbeitung und zur Aktivierung der MHC-Promotoren durch die Aktivierung von Ras.

Die bereits erwähnten Veröffentlichungen zur Nutzung unterschiedlicher Signaltransduktionswege in Muskelzellen, die dem Ras/Erk-Signalweg eine Bedeutung für die Proliferation und dem PI-3-Kinase/Akt-Signalweg eine Bedeutung für die Differenzierung zuweisen (Milasincic et al. 1996; Coolican et al. 1997; Tortorella et al. 2001), sowie die Veröffentlichungen über den hemmenden Einfluss von Akt auf den Ras/Erk Signalweg (Rommel et al. 1999; Zimmermann und Moelling 1999), werden durch die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigt und untermauern ihrerseits die entwickelten Modelle der Ras-abhängigen Signaltransduktion in Muskelsatellitenzellen. Durch Versuche mit Akt-Inhibitoren oder dominant negativen Raf-1-Mutaten in unterschiedlichen Differenzierungsstadien könnten diese Modelle weiter gefestigt werden. Von besonderem Interesse wären die Details der vom Differenzierungsstadium abhängigen Interaktion zwischen Akt und Raf-1.

Diese Arbeit hat verdeutlicht, dass die Aktivierung eines Signalproteins wie Ras weitgehende Folgen hat. Es löst durch seine zahlreichen Interaktionsmöglichkeiten komplexe Änderungen in der gesamten Signaltransduktion der Zelle aus. Signaltransduktionswege und Interaktionen von Signaltransduktionswegen sind nicht starr, sondern unterliegen Reifungsprozessen und passen sich neuen zellulären Funktionen an.

## Literaturverzeichnis

- Allen, D. L. und Leinwand, L. A. (2002). "Intracellular Calcium and Myosin Isoform Transition."  
*J Biochem Chem* **277**(47): 45323-45330.
- Allen, D. L., Monke, S. R., Talmadge, R. J., Roy, R. R. und Edgerton, V. R. (1995). "Plasticity of myonuclear number in hypertrophied and atrophied mammalian skeletal muscle fibers."  
*J Appl Physiol* **78**: 1969-1976.
- Allen, D. L., Sartorius, C. A., Sycuro, L. K. und Leinwand, L. A. (2001). "Different Pathways Regulate Expression of the Skeletal Myosin Heavy Chain Genes."  
*J Biol Chem* **276**(47): 42524-43533.
- Allen, R. E. und Boxhorn, L. K. (1989). "Regulation of skeletal muscle satellite cell proliferation and differentiation by transforming growth factor-beta, insulin like growth factor I and fibroblast growth factor."  
*J Cell Physiol* **25**: 1333-1345.
- Arai, T., Takada, M., Ui, M. und Ilba, H. (1999). "Dose-dependent transduction of vesicular stomatitis virus G protein-pseudotyped retrovirus vector into solid tumors and murine fibroblasts."  
*Virology* **260**(1): 109-115.
- Armstrong, R. B., Warren, G. L. und Warren, J. A. (1991). "Mechanisms of exercise-induced muscle-fiber injury."  
*Sports Med* **12**: 184-207.
- Aronson, D., Boppard, M. D., Dufresne, S. D., Fielding, R. A. und Goodyear, L. J. (1998). "Exercise stimulates c-Jun NH2 kinase activity and c-Jun transcriptionally activity un human skeletal muscle."  
*Biochem Biophys Res Commun* **251**: 106-110.
- Aronson, D., Violan, M. A., Dufresne, S. D., Zangen, D., Fielding, R. A. und Goodyear, L. J. (1997). "Exercise stimulates the mitogen activated protein kinase pathway in human skeletal muscle."  
*J Clin Invest* **99**: 1251-1257.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G. und Struhl, K., Eds. (1993). Current Protocols in Molecular Biology, Wiley.
- Avruch, J., Zhang, X. F. und Kyriakis, J. M. (1994). "Raf meets Ras: completing the framework of a signal transduction pathway."  
*Trends Biochem Sci* **19**: 279-283.
- Barbacid, M. (1990). "Ras oncogenes: Their role in neoplasia."  
*Eur J Clin Invest* **20**(3): 225-235.

- Baserga, R. (1999). "The IGF-1 receptor in cancer research."  
*Exp Cell Res* **253**: 1-6.
- Basson, M. D. und Carlson, B. M. (1980). "Myotoxicity of single and repeated injections of mepivacaine (Carbocaine) in the rat."  
*Anesth Analg* **59**: 275-282.
- Bigard, A.-X., Boehm, E., Veksler, V., Mateo, P., Anflous, K. und Ventura-Clapier, R. (1998). "Muscle unloading induces shift to fast transitions in myofibrillar but not Mitochondrial properties. Relevance to skeletal muscle abnormalities in heart failure."  
*J Mol Cell Cardiol* **30**: 2391-2401.
- Binetruy, B., Smeal, T. und Karin, M. H. (1991). "Ha-ras augments c-Jun activity and stimulates phosphorylation of its activation domain."  
*Nature* **351**: 122-127.
- Bischoff, R. (1990). "Cell cycle commitment of rat muscle satellite cells."  
*J Cell Biol* **111**: 201-207.
- Blume-Jensen, P. und Hunter, T. (2001). "Oncogenic kinase signalling."  
*Nature* **411**: 355-365.
- Boppard, M. D., Aronson, D., Gibson, L., Roubenoff, R., Abad, L. W., Bean, J., Goodyear, L. J. und Fielding, R. A. (1999). "Eccentric exercise markedly increases c-Jun NH(2)-terminal kinase activity in human skeletal muscle."  
*J Appl Physiol* **87**: 1668-1673.
- Bos, J. L. (1989). "Ras oncogenes in human cancer: a review."  
*Cancer Res* **49**(17): 4682-4689.
- Braun, T., Bober, E., Buschhausen-Denker, G., Kotz, S., Grzeschik, K. und Arnold, H. H. (1989). "Differential expression of myogenic determination genes in muscle cells: possible autoactivation by the Myf gene products."  
*EMBO J* **8**: 3617-3625.
- Braun, T., Buschhausen-Denker, G., Bober, E., Tanich, E. und Arnold, H. H. (1990). "A novel human muscle factor related to but distinct from MyoD1 induces myogenic conversion in 10T1/2 fibroblasts."  
*EMBO J* **8**(701-709).
- Burks, D. J. und White, M. F. (2001). "IRS proteins and  $\beta$ -cell function."  
*Diabetes* **50**(Suppl 1): S140-S145.
- Burns, J. C., Friedmann, T., Driever, W., Burrascano, M. und Yee, J. K. (1993). "Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells."  
*Proc Natl Acad Sci* **90**(17): 8033-8037.

- Cantley, L. C. (2002). "The Phosphoinositide 3-Kinase Pathway." *Science* **296**: 1655-1657.
- Chang, K. C. (2000). "Critical regulatory domains in intron 2 of a porcine sarcomeric myosin heavy chain gene." *J Muscle Res Cell Mot* **21**: 451-461.
- Cheek, D. B. (1985). "The control of cell mass and replication. The DNA unit - a personal 20 year study." *Early Hum Dev* **12**: 211-239.
- Cheek, D. B., Holt, A. B., Hill, D. E. und Talbert, J. L. (1971). "Skeletal muscle cell mass and growth: the concept of the desoxyribonucleic unit." *Pediat Res* **5**: 312-328.
- Chen, C. und Okayama, H. (1987). "High Efficiency Transformation of Mammalian Cells by Plasmid DNA." *Mol Cell Biol* **7**(8): 2745-2752.
- Chin, E. R., Olson, E. N., Richardson, A. J., Yang, Q., Humphries, C., Shelton, J. M., Wu, H., Zhu, W., Bassel-Duby, R. und Williams, R. S. (1998). "A calcineurin-dependent transcriptional pathway controls skeletal muscle fiber type." *Genes Dev* **12**: 2499-2509.
- Clegg, C. H., Linkhart, T. A., Olwin, B. B. und Hauschka, S. D. (1987). "Growth factor control of skeletal muscle differentiation occurs in G1-phase and is repressed by fibroblast growth factor." *J Cell Biol* **105**: 949-956.
- Cobb, M. H. (1999). "MAP kinase pathways." *Prog Biophys Mol Biol* **71**: 479-500.
- Coffin, J. M., Varmus, H. E., Bishop, J. M., Essex, M., Hardy, W. D., Martin, G. S., Rosenberg, N. E., Scolnick, E. M., Weinberg, R. A. und Vogt, P. K. (1981). "Proposal for naming host cell-derived inserts in retrovirus genomes." *J Virol* **40**(3): 953-957.
- Conejo, R., de Alvaro, C., Benito, M., Cuadrado, A. und Lorenzo, M. (2002). "Insulin restores differentiation of Ras-transformed C2C12 myoblasts by inducing NF- $\kappa$ B through an Akt/P70S6K/p38-MAPK pathway." *Oncogene* **21**: 3739-3753.
- Coolican, S. A., Samuel, D. S., Ewton, D. Z., McWade, F. J. und Florini, J. R. (1997). "The mitogenic and myogenic actions of insulin-like growth factor utilize distinct signaling pathways." *J Biol Chem* **272**: 6653-6662.



- Cribbs, L. L., Shimitzu, N., Yockey, C. E., Levin, J. E., Jakovcic, R. S., Zak, R. und Umeda, P. K. (1989). "Muscle-specific regulation of a transfected rabbit myosin heavy chain beta gene promotor."  
*J Biol Chem* **264**: 10672-10678.
- Darr, K. C. und Schultz, E. (1987). "Exercise-induced satellite cell activation in growing and mature skeletal muscle."  
*J Appl Physiol* **63**: 1816-1821.
- Davis, R. L., Weintraub, H. und Lassar, A. B. (1987). "Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts."  
*Cell* **51**: 987-1000.
- Diehl, A. M., Johns, D. C., Yang, S., Lin, H., Yin, M., Matelis, L. A. und Lawrence, J. H. (1996). "Adenovirus-mediated transfer of CCAAT/enhancer-binding protein identifies a dominant antiproliferative role for this isoform."  
*J Biol Chem* **271**(13): 7343-7350.
- Dufner, A. und Thomas, G. (1999). "Ribosomal S6 kinase signaling and the control of translation."  
*Exp Cell Res* **253**: 100-109.
- Dunn, S. E., Burns, J. L. und Michael, R. N. (1999). "Calcineurin is required for skeletal muscle hypertrophy."  
*J Biol Chem* **274**: 21908-21912.
- Ellis, R. W., Defeo, D., Shih, T. Y., Gonda, M. A., Young, H. A., Tsuchida, N., Lowy, D. R. und Scolnick, E. M. (1981). "The p21 src genes of Harvey and Kirsten sarcoma viruses originate from divergent members of a family of normal vertebrate genes."  
*Nature* **292**(5823): 506-511.
- Emi, N., Friedmann, T. und Yee, J. K. (1991). "Pseudotype formation of murine leukemia virus with the G protein of vesicular stomatitis virus."  
*J Virol* **65**(3): 1202-1207.
- Engel, W. K. (1974). "Fibre-type nomenclature of human skeletal muscle for histochemical purposes."  
*Neurology* **24**: 344-348.
- Falcone, G., Tato, F. und Alema, S. (1985). "Distinctive effects of the viral oncogenes *myc*, *erb*, *fps* and *src* on the differentiation program of quail myogenic cells."  
*Proc Natl Acad Sci* **82**: 426-430.
- Fantl, W. J., Muslin, A. J., Kikuchi, A., Martin, J. A., MacNicol, A. M., Gross, R. W. und Williams, L. T. (1994). "Activation of Raf-1 by 14-3-3 proteins."  
*Nature* **371**: 612-614.

- Farnsworth, C. L. (1995). "Ca<sup>2+</sup> activation of Ras mediated by neuronal exchange factor Ras-GRF."  
*Nature* **376**: 524-527.
- Feig, L. A. und Cooper, G. M. (1988). "Inhibition of NIH 3T3 cell proliferation by a mutant ras protein with preferential affinity for GDP."  
*Mol Cell Biol* **8**(8): 3235-3243.
- Feldman, J. L. und Stockdale, F. E. (1991). "Skeletal-muscle satellite cell diversity - Satellite cells form fibers of different types in cell-culture."  
*Dev Biol* **143**: 320-334.
- Ferby, I. M., Waga, I., Hoshino, M., Kume, K. und Shimizu, T. (1996). "Wortmannin inhibits mitogen-activated protein kinase activation by platelet-activating factor through a mechanism independent of p85/p110-type phosphatidylinositol 3-kinase."  
*J Biol Chem* **271**(20): 11684-11688.
- Florini, J. R., Z., E. D. und Magri, K. A. (1991). "Hormones, growth factors and myogenic differentiation."  
*Annual Rev Physiol* **53**(201-216).
- Gallo, K. A. und Johnson, G. L. (2002). "Mixed-lineage control of JNK and p38MAPK pathways."  
*Nature Rev Mol Cell Biol* **3**: 663-672.
- Gerhardt, W. (1987). Creatine Kinase, Routine UV-method.  
Methodes of Enzymatic Analysis.  
Bergmeyer. Weinheim, Verlag Chemie. **3**:510-517.
- Giancotti, F. G. und Ruoslahti, E. (1999). "Integrin signaling."  
*Science* **285**: 1028-1032.
- Gibbs, J. B., Schaber, M. D., Allard, W. J., Sigal, I. S. und Scolnick, E. M. (1988). "Purification of ras GTPase activating protein from bovine brain."  
*Proc Natl Acad Sci* **85**(14): 5026-5030.
- Gibson, M. C. und Schultz, E. (1982). "The distribution of satellite cells and their relationship of specific fiber types in soleus and extensor digitorum longus muscles."  
*Anat Rec.* **202**: 329-337.
- Gibson, M. C. und Schultz, E. (1983). "Age-related differences in absolute numbers of skeletal muscle satellite cells."  
*Muscle Nerve* **6**: 574-580.
- Giger, J. M., Haddad, F., Qin, A. und Baldwin, K. M. (2000). "I vivo regulation of  $\beta$ -Myosin heavy chain gene in soleus muscle of suspended and weigt-bearing rats."  
*Am J Physiol Cell Physiol* **278**: C1153-C1161.

- Graham, F. und van der Eb, A. (1973). "A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA." *Virology* **52**(2): 456-467.
- Green, H., Düsterhöft, S., Dux, L. und Pette, D. (1992). "Metabolite patterns related to exhaustion, recovery and transformation of chronically stimulated rabbit fast-twitch muscle." *Pflügers Archiv* **420**: 359-366.
- Gulati, A. K. (1986). "Pattern of skeletal muscle regeneration after reautotransplantation of regenerated muscle." *J Embryol Exp Morphol* **92**: 1-10.
- Gutkind, J. S. (2000). "Regulation of mitogen-activated protein kinase signaling networks by G-Protein-coupled receptors." *Sci STKE* **2000**(40): RE1.
- Hajdуч, E., Litherland, G. J. und Hundal, H. S. (2001). "Proteinkinase B (PKB/Akt) - a key regulator of glucose transport?" *FEBS Letter* **492**: 199-203.
- Hall, Z. W. und Ralston, E. (1989). "Nuclear domains in muscle cells." *Cell*(59): 771-772.
- Hall-Jackson, C. A., Evers, P. A., Cohen, P., Goedert, M., Boyle, F. T., Hewitt, N., Plant, H. und Hedge, P. (1999a). "Paradoxical activation of Raf by a novel Raf inhibitor." *Chem Biol* **6**: 559-568.
- Hall-Jackson, C. A., Goedert, M., Hedge, P. und Cohen, P. (1999b). "Effect of SB203580 on the activity of c-Raf in vitro and in vivo." *Oncogene* **18**: 2047-2054.
- Hanson, J. und Huxley, H. E. (1955). "The structural basis of contraction in striated muscle." *Ann N Y Acad Sci* **81**: 403-408.
- Hellmuth, A. E. und Allbrook, D. (1973). Satellite cells as the stem cells of skeletal muscle. Basic Research in Myology. B. A. Kakulas. Amsterdam, Excerpta Medica: 343.
- Henriksson, J., Salmons, S., Chi, M. M.-Y., Hintz, C. S. und Lowry, O. H. (1988). "Chronic stimulation of mammalian muscle: changes in metabolite concentrations in individual fibers." *Am J Physiol* **255**: C543-C551.
- Hill, C. S. und Treisman, R. (1995). "Transcriptional regulation by extracellular signals: mechanisms and specificity." *Cell* **80**: 199-211.

- Hintz, C. S., Lowry, C. V., Kaiser, K. K., McKee, D. und Lowry, O. H. (1980). "Enzyme levels in individual rat muscle fibres." *Am J Physiol* **239**(8): C58-C65.
- Hu, J. S. und Olson, E. N. (1990). "Functional receptors for transforming growth factor- $\beta$  are retained by biochemically differentiated C2 myocytes in growth factor deficient medium containing EGTA but down-regulated during terminal differentiation." *J Biol Chem* **265**: 7914-7919.
- Hunter, T. und Karin, M. (1992). "The regulation of transcription by phosphorylation." *Cell* **70**: 375-387.
- Huxley, A. F. (1957). "Muscle structure and theories of contraction." *Prog Biophys Biophys Chem* **7**: 255-318.
- Huxley, A. F. und Niedergerke, R. (1954). "Structural changes in muscle during contraction. Interference microscopy of living muscle fibres." *Nature* **173**: 971-973.
- Huxley, H. E. (1969). "The mechanism of muscular contraction." *Science* **164**: 1356-1365.
- Huxley, H. E. und Hanson, J. (1954). "Changes in the cross-striation of muscle during contraction and stretch and their structural interpretation." *Nature* **173**: 973-976.
- Kadi, F., Ericsson, A., Holmner, S., Butler-Browne, G. S. und Thornell, L. E. (1999). "Cellular adaptation of the trapezius muscle in strength-trained athletes." *Histochem Cell Biol* **111**: 189-195.
- Kafri, T., van Praag, H., Gage, F. H. und Verma, I. M. (2000). "Lentiviral vectors: regulated gene expression." *Mol Ther* **1**(6): 516-521.
- Kim, A. H. (2001). "Akt phosphorylates and negatively regulates apoptosis signal-regulating kinase 1." *Mol Cell Biol* **21**: 893-901.
- Kimura, I., Gotoh, Y. und Ozawa, E. (1989). "Further purification of a fibroblast growth factor-like factor from chick embryo extract by heparin-affinity chromatography." *In Vitro Cell Dev Biol* **25**: 236-242.
- Knudsen, K. und Horwitz, A. F. (1977). "Tandem events in myoblast fusion." *Develop Biol* **58**: 328-338.
- Kolch, W. (2000). "Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interaction." *Biochemical J* **351**: 289-305.

- Konieczny, S. F., Drobles, B. L., Menke, S. L. und Taparowsky, E. J. (1990). "Inhibitor of myogenic differentiation by the H-ras oncogene is associated with the down regulation of the MyoD1 gene." *Oncogene* **4**: 473-481.
- Kubis, H.-P., Haller, E. A., Wetzel, P. und Gros, G. (1997). "Adult fast myosin pattern and Ca<sup>2+</sup>-induced slow myosin pattern in primary skeletal muscle culture." *Proc Natl Acad Sci* **94**: 4205-4210.
- Kubis, H.-P., Hanke, N., Scheibe, R. J., Meissner, J. D. und Gros, G. (2003). "Ca<sup>2+</sup> transients activate calcineurin/NFATc1 and initiate fast-to-slow transformation in a primary skeletal muscle culture." *Am J Physiol* **285**: C56-C63.
- Kyriakis, J. M. und Avruch, J. (2001). "Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation." *Physiol Reviews* **81**: 807-886.
- La Rocca, S. A., Grossi, M., Falcone, G., Alema, S. und Tato, F. (1989). "Interaction with normal cells suppresses the transformed phenotype of v-myc transformed quail muscle cells." *Cell* **58**: 123-131.
- Lassar, A. B., Thayer, M. J., Overell, R. W. und Weintraub, H. (1989). "Transformation by activated RAS or FOS prevents myogenesis by inhibiting expression of MyoD1." *Cell* **58**: 659-667.
- Lathrop, B. K., Thomas, K. und Glaser, L. (1985). "Control of myogenic differentiation by fibroblast growth factor is mediated by position of the G<sub>1</sub> phase of the cell cycle." *J Cell Biol* **101**: 2194-2198.
- Lewis, T. S., P.S., S. und Ahn, N. G. (1998). "Signal transduction through MAP-Kinase cascades." *Adv Cancer Res* **74**: 49-139.
- Li, L., Chambard, J.-C., Karin, M. und Olson, E. N. (1992). "Fos and Jun repress transcriptional activation by myogenin and MyoD: the amino-terminus of Jun mediates repression." *Genes Dev* **6**(4): 676-689.
- Li, S., Janosch, P., Tanjii, M., Rosenfeld, G. C., Waymire, J. C., Mischak, H., Kolch, W. und Sedivy, J. M. (1995). "Regulation of Raf-1 kinase activity by the 14-3-3 family of proteins." *EMBO J* **14**: 685-696.
- Liu, D., Ren, T. und Gao, X. (2003). "Cationic transfection lipids." *Curr Med Chem* **10**(14): 1307-1315.

- Lopaczynski, W. (2000). "Autophosphorylation of the insulin-like growth factor receptor cytoplasmic domain."  
*Biochem Biophys Res Commun* **279**: 955-960.
- Lowndes, N. F., Paul, J., Wu, J. und Allan, M. (1989). "c-Ha-ras gene bidirectional promoter expressed in vitro: location and regulation."  
*Mol Cell Biol* **9**(9): 3758-3770.
- Lowrie, M. B., More, A. F. K. und Vrbova, G. (1989). "The effect of load on the phenotype of the developing rat soleus muscle."  
*Pflügers Archiv* **415**: 203-208.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. und Randall, R. J. (1951). "Protein measurement with the Folin phenol reagent."  
*J Biol Chem* **193**(1): 265-275.
- Mauro, A. (1961). "Satellite cells of skeletal muscle fibers."  
*J Biophys Biochem Cytol* **9**: 493-495.
- Maxwell, L. C. und Moody, M. R. (1988). "Muscle fiber regeneration in grafted skeletal muscle."  
*J Reconstr Microsurg* **4**: 161-166.
- McCall, G. E., Allen, D. L., Haddad, F. und Baldwin, K. M. (2003). "Transcriptional regulation of IGF-1 expression in skeletal muscle."  
*Am J Physiol Cell Physiol* **285**: C831-C839.
- McCormick, F. (1993). "How receptors turn Ras on."  
*Nature* **363**: 15-16.
- McGeachie, J. K. und Grounds, M. D. (1987). "Initiation and duration of muscle precursor replication after mild and severe injury to skeletal muscle of mice: An autoradiographic study."  
*Cell Tissue Res* **248**: 125-130.
- McKinsey, T. A., Zhang, C. L. und Olson, E. N. (2002). "MEF2: a calcium-dependent regulator of cell division, differentiation and death."  
*Trends Biochem Sci* **27**: 40-47.
- Meissner, J. D., Gros, G., Scheibe, R. J., Scholz, M. und Kubis, H.-P. (2001). "Calcineurin regulates slow myosin, but not fast myosin or metabolic enzymes, during fast-to-slow transformation in rabbit skeletal muscle cell culture."  
*J Physiol* **533**(1): 215-226.
- Milasincic, D. J., Calera, M. R., Farmer, S. R. und Pilch, P. F. (1996). "Stimulation of C2C12 myoblast growth by basic fibroblast growth factor and insulin-like growth factor 1 can occur via mitogen-activated protein kinase-dependent and-independent pathways."  
*Mol Cell Biol* **16**: 5964-5973.

- Mohammadi, M. (1996). "Identification of six novel autophosphorylation sites on fibroblast growth factor receptor 1 and elucidation of their importance in receptor activation and signal transduction."  
*Mol Cell Biol* **16**: 977-989.
- Mong, F. S. (1988). "Satellite cells in the regenerated and regrafted skeletal muscles of rats."  
*Experientia* **44**: 601-603.
- Morlet, K., Grounds, M. D. und McGeachie, J. K. (1989). "Muscle precursor replication after repeated regeneration of skeletal-muscle in mice."  
*Anat Embryol* **180**: 471-476.
- Mortola, J. P. und Naso, L. (1995). "Electrophoretic analysis of contractile proteins of diaphragm in chronically hypoxic rats."  
*Am J Physiol* **269**: L371-L376.
- Murgia, M., Serrano, A. L., Calabria, E., Pallafacchina, G., Lomo, T. und Schiaffino, S. (2000). "Ras is involved in nerve-activity-dependent regulation of muscle genes."  
*Nature Cell Biol* **2**: 142-147.
- Murre, C., McCaw, P. S., Vaessin, H., Caudy, M., Jan, L. Y., Jan, Y. N., Cabrera, C. V., Buskin, J. N., Hauschka, S. D., Lassar, A. B., Weintraub, H. und Baltimore, D. (1989). "Interactions between heterologous helix-loop-helix proteins generate complexes that bind specifically to a common DNA sequence."  
*Cell* **58**: 537-544.
- Muslin, A. J., Tanner, J. W., Allen, P. M. und Shaw, A. S. (1996). "Interaction of 14-3-3 with signaling proteins is mediated by the recognition of phosphoserine."  
*Cell* **84**: 889-897.
- Nakanishi, S., Kakita, S., Takahashi, I., Kawahara, K., Tsukuda, E., Sano, T., Yamada, K., Yoshida, M., Kase, H. und Matsuda, Y. (1992). "Wortmannin, a microbial product inhibitor of myosin light chain kinase."  
*J Biol Chem* **267**(4): 2157-2163.
- Olson, E. N. (1990). "MyoD family: a paradigm for development."  
*Genes Dev* **4**: 1454-1461.
- Olson, E. N. (1992). "Proto-oncogenes in the regulatory circuit for myogenesis."  
*Cell Biology* **3**: 127-136.
- Olson, E. N., Spizz, G. und Tainsky, M. (1987). "The oncogenic forms of N-ras or H-ras prevent skeletal myoblast differentiation."  
*Mol Cell Biol* **7**: 2104-2111.
- Olson, E. N., Sternberg, E., Hu, J. S., Spizz, G. und Wilcox, C. (1986). "Regulation of myogenic differentiation by type beta transforming growth factor."  
*J Cell Biol* **103**: 1799-1805.

- Olwin, B. B. und Hauschka, S. D. (1988). "Cell surface fibroblast growth factor and epidermal growth factor receptors are permanently lost during skeletal muscle termination differentiation in culture."  
*J Cell Biology* **107**: 761-769.
- Pardee, A. B. (1989). "G1 events and regulation of cell proliferation."  
*Science* **246**: 603-608.
- Pearson, G. (2001). "Mitogen-activated protein kinase pathways: regulation and physiological functions."  
*Endocrine Reviews* **22**: 153-183.
- Pette, D. (1992). "Fiber transformation and fiber replacement in chronically stimulated muscle."  
*J Heart Lung Transplant* **11**: 299-305.
- Pette, D. und Staron, R. S. (1993). "The molecular diversity of mammalian muscle fibers."  
*NIPS* **8**: 153-156.
- Porter, A. C. und Vaillancourt, R. R. (1998). "Tyrosine kinase receptor-activated signal transduction pathway which lead to oncogenesis."  
*Oncogene* **17**: 1343-1352.
- Potten, C. S. und Loeffler, M. (1990). "Stem cells: Attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties."  
*Development* **110**(4): 1001-1020.
- Rahm, M., Jin, P., Sumegi, J. und Sejersen, T. (1990). "Elevated c-fos expression inhibits differentiation of L6- rat myoblasts."  
*J Cell Physiol* **139**: 237-244.
- Rane, S. G. (1999). "Ion channels as physiological effector for growth factor receptor and Ras/ERK signaling pathways."  
*Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* **33**: 107-127.
- Robinson, M. J. und Cobb, M. H. (1997). "Mitogen-activated protein kinase pathways."  
*Curr Opin Cell Biol* **9**: 180-186.
- Rommel, C., Clark, B. A., Zimmermann, S., Nunez, L., Rossman, R., Reid, K., Moelling, K., Yancopoulos, G. D. und Glass, D. J. (1999). "Differentiation stage specific inhibition of the raf-MEK-ERK pathway by Akt."  
*Science* **286**: 1738-1741.
- Roy, R. R., Baldwin, K. M. und Edgerton, V. R. (1991). "The plasticity of skeletal muscle effect of neuromuscular activity."  
*Exerc Sports Sci Rev* **19**: 269-312.



Roy, R. R., Monke, S. R., Allen, D. L. und Edgerton, V. R. (1999). "Modulation of myonuclear number in functionally overloaded and exercised plantaris fibers." *J Appl Physiol* **87**(2): 634-642.

Sadeh, M., Czyzewski, K. und Stern, L. Z. (1985). "Chronic myopathy induced by repeated bupivacaine injections." *J Neurol Sci* **67**: 229-38.

Salmons, S. (1992). On the reversibility of stimulation- induced muscle transformation.  
The dynamic state of muscle fibre. Berlin, W. de Gruyter: 415-428.

Salmons, S. und Vrbova, G. (1969). "Influence of activity on some contractile characteristics of mammalian fast and slow muscle." *J Physiol* **20**: 535-549.

Saltiel, A. R. und Pessin, J. E. (2002). "Insulin signaling in time and space." *Trends Cell Biol* **12**: 65-71.

Sandow, A. (1965). "Excitation-contraction coupling in skeletal muscle." *Pharmacol Rev* **17**: 265-320.

Satoh, T. und Kaziro, Y. (1992). "Ras in signal transduction." *Semin Cancer Biol* **3**(4): 169-177.

Schiaffino, S., Pierobon Bormioli, S. und Aloisi, M. (1976). "The fate of newly formed satellite cells during compensatory muscle hypertrophy." *Virchows Arch B Cell Pathol* **21**: 113-118.

Schultz, E. (1978). "Changes in the satellite cells of growing muscle following denervation." *Anat Rec* **190**: 299-311.

Schultz, E., Gibson, M. C. und Champion, T. (1978). "Satellite cells are mitotically quiescent in mature mouse muscle: An EM and radioautographic study." *J Exp Zool* **206**: 451-456.

Schultz, E. und Jaryszak, D. L. (1985). "Effects of skeletal muscle regeneration on the proliferation potential of satellite cells." *Mech Ageing Div.* **30**: 63-72.

Schwartz, M. A. und Ginsberg, M. H. (2002). "Networks and crosstalk: integrin signalling spreads." *Nature Cell Biology* **4**: E65-E68.

Seiden, D. (1976). "A quantitative analysis of muscle cell changes in compensatory hypertrophy and work-induced hypertrophy." *Am J Anat* **145**: 459-468.

- Sherwood, D. J., Dufresne, S. D., Markuns, J. F., Cheatham, B., Moller, D. E., Aronson, D. und Goodyear, L. J. (1999). "Differential regulation of MAP kinase, p70<sup>S6K</sup>, and Akt by contraction and insulin in rat skeletal muscle." *Am J Physiol* **276**(5): E870-E878.
- Shih, T. Y., Papageorge, A. G., Stokes, P. E., Weeks, M. O. und Scolnick, E. M. (1980). "Guanine nucleotide-binding and autophosphorylating activities associated with the p21src protein of Harvey murine sarcoma virus." *Nature* **287**(5784): 686-691.
- Shimizu, K., Goldfarb, M., Suard, Y., Perucho, M., Li, Y., Kamata, T., Feramisco, J., Stavnezer, E., Fogh, J. und Wigler, M. H. (1983). "Three human transforming genes are related to the viral ras oncogenes." *Proc Natl Acad Sci* **80**(8): 2112-2116.
- Snow, M. H. (1983). "A quantitative ultrastructural analysis of satellite cells in denervated fast and slow muscles of the mouse." *Anat Rec* **207**: 593-604.
- Snow, M. H. (1990). "Satellite cell response in rat soleus undergoing hypertrophy due to surgical ablation of synergists." *Anat Rec* **227**: 437-446.
- Sreter, F. A., Lopez, J. R., Alamo, L., Mabuchi, K. und Gergely, J. (1987). "Changes in intracellular ionized Ca concentration associated with muscle fiber type transformation." *Am J Physiol* **253**: C296-C300.
- Stacy, D. W., Watson, T., Kung, H.-F. und Curran, T. (1987). "Microinjection of transforming ras protein induces c-fos expression." *Mol Cell Biol* **7**: 523-527.
- Stockdale, F. E. (1992). "Myogenic cell lineages." *Develop Biol* **154**: 284-298.
- Stork, P. J. S. und Schmitt, J. M. (2002). "Crosstalk between cAMP and MAP kinase signaling in the regulation of cell proliferation." *Trends Cell Biol* **12**: 258-266.
- Sumitani, S., Goya, K., Testa, J. R., Kouhara, H. und Kasayama, S. (2002). "Akt1 and Akt2 Differently Regulate Muscle Creatine Kinase and Myogenin Gene Transkription in Insulin Induced Differentiation of C2C12 Myoblasts." *Endocrinology* **143**(3): 820-823.
- Sun, H., Charles, C. H., F., L. L. und Tonks, N. K. (1993). "MKP-1 (3CH134), an immediate gene product, is a dual specificity phosphatase that dephosphorylates MAP kinase in vivo." *Cell* **75**: 487-493.

Taparowsky, E., Shimizu, K., Goldfarb, M. und Wigler, M. (1983). "Structure and activation of the human N-ras gene."  
*Cell* **34**(2): 581-586.

Termin, A. und Pette, D. (1992). "Changes in myosin heavy-chain isoform synthesis of chronically stimulated rat fast-twitch muscle."  
*Eur J Biochem* **204**: 569-573.

Termin, A., Staron, R. S. und Pette, D. (1989). "Myosin heavy chain isoforms in histochemical defined fiber types of rat muscle."  
*Histochemistry* **92**: 453-457.

Thayer, M. J., Tapscott, S. J., Davis, R. L., Wright, W. E., Lassar, A. B. und Weintraub, H. (1990). "Positive autoregulation of the myogenic determination gene MyoD1."  
*Cell* **57**: 241-248.

Thompson, W. R., Nadal-Ginard, B. und Mahdavi, V. (1991). "A myoD1-independent muscle-specific enhancer controls the expression of the  $\beta$ -myosin heavy chain gene in skeletal and cardiac muscle cells."  
*J Biol Chem* **266**: 22678-22688.

Tortorella, L. L., Milasincic, D. J. und Pilch, P. F. (2001). "Critical proliferation-independent window for basic fibroblast growth factor repression of myogenesis via the p42/p44 MAPK signaling pathway."  
*J Biol Chem* **276**: 13709-13717.

Vivanco, I. und Sawyers, C. L. (2002). "The Phosphatidylinositol 3-Kinase-AKT Pathway in Human Cancer."  
*Nature Rev Cancer* **2**: 489-501.

Watzinger, F., Mayr, B., Haring, E. und Lion, T. (1998). "High sequence similarity within ras exons 1 and 2 in different mammalian species and phylogenetic divergence of the ras gene family."  
*Mamm Genome* **9**(3): 214-219.

Weintraub, H., Davis, R., Tapscott, S., Thayer, M., Krause, M., Benezra, R., Blackwell, T., Turner, D., Rupp, R., Hollenberg, S., Zhuang, Y. und Lassar, A. (1991a). "The myoD gene family: nodal point during specification of muscle cell lineage."  
*Science* **251**: 761-766.

Weintraub, H., Dwarki, V. J., Verma, I., Davis, R., Hollenberg, S., Snider, L., Lassar, A. und Tapscott, S. J. (1991b). "Muscle-specific transcriptional activation by MyoD."  
*Genes Dev* **5**: 1377-1386.

Weston, A. J. und Davis, R. J. (2002). "The JNK signal transduction pathway."  
*Curr Opin Genet Dev* **12**: 14-21.

- Whitmarsh, A. J. und Davis, R. J. (1998). "Structural organisation of MAP-kinase signaling modules by scaffold proteins in yeast and mammals." *Trends Biochem Sci* **23**: 481-485.
- Wright, W. E., Haddad, F., Qin, A., Bodell, P. W. und Baldwin, K. M. (1999). "In vivo regulations of  $\beta$ -MHC gene in rodent heart: role of T<sub>3</sub> and evidence for an upstream enhancer." *Am J Physiol Cell Physiol* **276**: C883-C891.
- Wu, H., Naya, F. J., McKinsey, T. A., Mercer, B., Shelton, J. M., Chin, E. R., Simard, A. R., Michel, R. N., Bassel-Duby, R., Olson, E. N. und Williams, R. S. (2000). "MEF2 responds to multiple calcium regulated signals in the control of skeletal muscle fiber type." *EMBO J* **19**(9): 1963-1973.
- Xu, Q. und Wu, Z. (2000). "The IGF-PI3K-Akt signaling pathway regulates myogenin expression in normal myogenic cells but not in Rhabdomyosarcoma derived RD cells." *J Biol Chem* **275**: 36750-36757.
- Yu, M., Blomstrand, E., Chibalin, A. V., Krook, A. und Zierath, J. R. (2001). "Marathon running increases ERK1/2 and p38 MAP kinase signalling to downstream targets in human skeletal muscle." *J Physiol* **536**: 273-282.
- Zhao, M., New, L., Kravchenko, V. V., Kato, Y., Gram, H., di Padova, F., Olson, E. N., Ulevitch, R. J. und Han, J. (1999a). "Regulation of MEF2 family of transcription factors by p38." *Mol Cell Biol* **19**: 21-30.
- Zhao, M., New, L., Kravchenko, V. V., Kato, Y., Gram, H., di Padova, F., Olson, E. N., Ulevitch, R. J. und Han, J. (1999b). "Regulation of the MEF2 family of transcription factors by p38." *Mol Cell Biol* **19**: 21-30.
- Zimmermann, S. und Moelling, K. (1999). "Phosphorylation and regulation of raf by akt (Protein kinase B)." *Science* **286**: 1741-1744.

## ***Danksagung***

Mein Dank gilt

Herrn Prof. Dr. Gerolf Gros für die Möglichkeit diese Arbeit in seiner Abteilung und unter seiner Anleitung anfertigen zu können

Herrn Priv. Doz. Dr. Heiner Wolfes für die Übernahme der Betreuung dieser Arbeit und seine anregende Hilfestellung

Herrn Dr. Hans-Peter Kubis für gute und freundschaftliche Betreuung und eine in jeder Hinsicht bereichernde Zeit

Frau Nina Hanke für etwas Weiblichkeit in unserem „Männerverein“ und für zahllose interessante Gespräche

Herrn Ernst-August Haller für gewissenhafte technische Hilfe und für unzählige anregende, aufmunternde und herausfordernde Gespräche

Herrn Klaus-Herrmann Reichmut für technische Assistenz und die musikalische Untermalung des Laboralltages

Allen anderen Mitarbeitern des Institutes für gute Zusammenarbeit und ein kollegiales Arbeitsklima

Meinen Eltern und meinen Geschwistern für ihren Glauben an mich und meine Fähigkeiten und für einen Ort zu dem ich immer nach Hause kommen kann

Anne dafür, dass sie in unerwartetem aber rechtem Moment in mein Leben getreten ist und mir vieles zurückgibt, was ich glaubte verloren zu haben

### ***Eidesstattliche Erklärung***

Hiermit versichere ich, dass ich diese Arbeit selbständig verfasst habe und dass sie nicht schon als Diplom- oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet wurde. Es wurden keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet.

Hannover, den 29.6.2004

(Michael Scholz)

## ***Lebenslauf***

Name: Michael Scholz  
Anschrift: Heidjerhof 7  
30625 Hannover

- Am 2.11.1971 als Sohn von Erwin Scholz und Dorothea Scholz, geb. Quarg in Dortmund geboren
- Herbst 1978 Einschulung in die Lessing-Grundschule in Dortmund
- Ab Herbst 1982 Besuch des Dortmunder Stadt-Gymnasiums
- Sommer 1989 Umzug nach Vlotho und Wechsel auf das Weser-Gymnasium Vlotho
- Mai 1991 Abitur am Weser-Gymnasium Vlotho
- Von Oktober 1991 bis Oktober 1992 Absolvierung des Wehrdienstes in Heide, Sonthofen und Neumünster
- Oktober 1993 Beginn mit dem Studium der Chemie an der Universität Hannover
- Zum Sommersemester 1994 Wechsel zum Studiengang Biochemie
- November 1998 Diplomprüfung im Fach Biochemie und Beginn der Diplomarbeit in der Abteilung Biophysikalische Chemie der Medizinischen Hochschule Hannover
- 3. Juni 1999 Erlangung des Hochschulabschlusses im Fach Biochemie
- Ab 1.7.1999 Promotionsstelle in der Abteilung Vegetative Physiologie der Medizinischen Hochschule Hannover

## **Publikationsliste**

### Originalpublikationen:

Meissner, J. D., Gros, G., Scheibe, R.J., **Scholz, M.**, Kubis, H.-P. (2001). „Calcineurin regulates slow myosin, but not fast myosin or metabolic enzymes, during fast-to-slow transformation in rabbit skeletal muscle cell culture.”  
*J Physiol* **533**(1): 215-226

### Abstracts:

Gros, G., Hornung, G., **Scholz, M.**, Meissner, J. D. und Kubis, H.-P. (2000). „Calcineurin mediates fast-to-slow transition on the myosin level in cultured myotubes.”  
*FASEB J* **14**(4):A315.

Meissner, J. D., Kubis, H.-P., **Scholz, M.** und Gross, G. (2000). „Calcineurin-dependent MHC I gene expression in a primary skeletal muscle culture.”  
*FASEB J* **14**(4):A318.

Kubis, H.-P., Meissner, J.-D., **Scholz, M.** und Gros, G. (2000). „Calcineurin inhibition represses the fast-to-slow transition of cultured myotubes elicited by electrostimulation and calcium ionophore treatment.”  
*Pflügers Archiv* **439**(6) *Supplement: R323*

Meissner, J. D., Kubis, H.-P., **Scholz, M.** und Gross, G. (2000). „Calcineurin dependent MHC I gene expression in a primary skeletal muscle culture.”  
*J Muscle Res Cell Motil*

Meissner, J. D., Kubis, H.-P., Scheibe, R. J., **Scholz, M.** und Gros, G. (2000). „Differential role of calcineurin in the processes of fast-to-slow transformation in primary muscle cell cultures.”  
*J Muscle Res Cell Motil*

Meissner, J. D., Kubis, H.-P., Scheibe, R. J., Hanke, N., **Scholz, M.** und Gros, G. (2001). „Role of NFATc1 during fast-to-slow transformation in a primary skeletal muscle culture.”  
*J Muscle Res Cell Motil*

**Scholz, M.**, Kubis, H.-P. und Gros, G. (2004). „Ras-dependent control of MHC expression during differentiation and maturation of skeletal muscle cells.”  
*Pflügers Archiv* **447**(Supplement 1): S21