

**Metabolische Anpassung von Skelettmuskelzellen in Kultur:
Stimuli und Signalwege, die zu
Veränderungen der metabolischen Kapazität führen**

**Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Hannover
zur Erlangung des Grades**

Doktorin der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

**Dipl.-Biochem. Nina Hanke
geboren am 12.09.1976 in Hannover**

2005

Referent: PD Dr. Heiner Wolfes

Korreferent: Prof. Dr. Gerolf Gros

Tag der Promotion: 10.06.2005

ZUSAMMENFASSUNG

Adulte Skelettmuskelzellen sind trotz ihrer terminalen Differenzierung in der Lage, ihren Fasertyp den jeweiligen physiologischen Anforderungen anzupassen. Diese Fähigkeit wird "Muskelplastizität" genannt. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den metabolischen Teil der Umwandlung von Skelettmuskelfasern vom Typ IIB / IID mit hoher anaerob-glykolytischer Stoffwechselkapazität zum Typ I Skelettmuskel mit hoher oxidativer Stoffwechselkapazität in einer Primärzellkultur von Kaninchenmyotuben zu untersuchen. Dazu wurden zunächst verschiedene Stimuli als Auslöser für eine metabolische Umwandlung der Myotuben getestet. Dabei zeigte sich, daß besonders Änderungen des Sauerstoffpartialdruckes, des Glykogengehaltes und der intrazellulären Calciumkonzentration der Myotuben Einfluß auf das metabolische Profil ausüben. Durch Elektrostimulation oder Aktivierung der AMP-aktivierten Proteinkinase (AMPK) dagegen konnte keine metabolische Anpassung induziert werden.

Im zweiten Abschnitt dieser Arbeit wurde damit begonnen, die Wirkungen dieser Stimuli auf die metabolischen Enzyme und die möglicherweise damit verbundenen Signaltransduktionswege genauer zu untersuchen. Die Absenkung des Sauerstoffpartialdruckes in den Zellkulturinkubatoren auf 3% vermindert den Gehalt an Fumarase mRNA und steigert den Gehalt an GAPDH mRNA in den Myotuben. Der Einfluß des Sauerstoffpartialdruckes könnte über den Hypoxie-induzierten Faktor-1 (HIF-1) vermittelt werden. Dieser Transkriptionsfaktor wird bei niedrigem Sauerstoffgehalt in die Zellkerne der Myotuben importiert.

Die Reduktion der intrazellulären Glykogenreserven führt zu einer Verminderung der Transkriptmenge und der Enzymaktivität von GAPDH, sowie zu einer Zunahme der PGC-1-Transkripte und einem Anstieg der Citratsynthase Enzymaktivität. Mittels *Western Blots* konnte gezeigt werden, daß die Proteinkinasen AMPK, PKB und GSK-3 bei niedrigem Glykogengehalt dephosphoryliert werden. Der Effekt der Reduktion der Glykogenreserven auf die PGC-1 mRNA und die Enzymaktivität der Citratsynthase konnte durch Inkubation der Myotuben in Medium mit dem Proteinphosphatase 1 Inhibitor Tautomycin unterdrückt werden.

Die Verwendung von Calciumionophor (A23187) zur Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration bewirkt ebenfalls eine Abnahme der GAPDH Enzymaktivität, sowie Zunahmen der PGC-1 mRNA und der Citratsynthase Enzymaktivität. Versuche

mit dem CaMKK-Inhibitor STO-609 haben gezeigt, daß die Steigerung der Transkriptmenge von PGC-1 nach Inkubation in Calciumionophor vermutlich über die Wirkung der CaMKK vermittelt wird.

Bisher wurden hauptsächlich die Zunahme der intrazellulären Calciumkonzentration und die Aktivierung der AMPK als wichtigste Mediatoren der metabolischen Anpassung von Skelettmuskelzellen beschrieben. Unsere Ergebnisse zeigen erstmals, daß auch die Abnahme der intrazellulären Glykogenreserven ein wichtiges Signal für eine metabolische Anpassung verbunden mit einer Abnahme der glykolytischen und einer Zunahme der mitochondrialen Stoffwechsellistung darstellt.

Schlagworte: AMPK, Glykogen, Calciumionophor, GAPDH, PGC-1, Citratsynthase

ABSTRACT

Terminally differentiated skeletal muscle fibers are able to change their fibre type in order to adapt to different physiological demands. This ability is called "muscle plasticity". The aim of this study was to investigate the metabolic part of the transformation from IIB / IID fibre type possessing high anaerobic and glycolytic metabolic enzyme activities to type I fibres with high levels of oxidative metabolic enzymes. The cell culture model we used to perform this study was a primary skeletal muscle cell culture from rabbit. We started by testing several different stimuli with respect to their ability to induce the metabolic transformation in our myotubes. We could demonstrate that changes of the oxygen tension, the glycogen content and the intracellular calcium concentration of the myotubes impose a high impact on the metabolic profile, whereas low frequency electric stimulation and activation of the AMP-activated protein kinase (AMPK) did not induce changes of the metabolic properties of the myotubes.

In the second part of this study, we had a closer look on the mode of action and the signalling pathways transducing these stimuli. The reduction of the oxygen pressure in our cell culture incubators to 3% led to a decrease of fumarase mRNA and an increase of GAPDH mRNA of the myotubes. The effect of the oxygen pressure is thought to be transduced via the hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1). Low oxygen tension induced the import of this transcription factor into myonuclei.

The decrease of the intracellular glycogen content led to a reduction of GAPDH mRNA and enzyme activity, as well as to increases of PGC-1 (peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1) mRNA and citrate synthase enzyme activity. Western blotting showed that the protein kinases AMPK, PKB and GSK-3 were dephosphorylated during the reduction of glycogen content. The effects of reduced intracellular glycogen stores on the mRNA-levels of PGC-1 and the enzyme activity of citrate synthase could be inhibited by incubation of the myotubes with tautomycin, an inhibitor of protein phosphatase 1.

The administration of calcium ionophore (A23187) to increase the intracellular calcium concentration led to a reduction of the GAPDH enzyme activity and increases of PGC-1 mRNA and citrate synthase enzyme activity. Inhibition of the kinase of the calcium/calmodulin-dependent protein kinase (CaMKK) by STO-609 in myotubes exposed to calcium ionophore treatment repressed the elevation of PGC-1

mRNA confirming that the calcium induced rise in PGC-1 transcription involves the action of the CaMKK.

Until now the increase of the intracellular calcium concentration and the activation of AMPK were thought to be the most important mediators of the metabolic adaptation of skeletal muscle cells. In this study we were able to demonstrate that the reduction of intracellular glycogen stores is also an important signal for the induction of metabolic adaptation as shown by reduction of glycolytic and stimulation of mitochondrial metabolic capacity.

keywords: AMPK, glycogen, calcium ionophore, GAPDH, PGC-1, citrate synthase

INHALTSVERZEICHNIS

Einleitung.....	1
Muskelfasertypen des Kaninchens	1
Muskelplastizität.....	2
Die Weiß-Rot-Transformation	2
Mögliche Signale für die metabolische Umwandlung.....	4
Mögliche Signaltransduktionswege für die metabolische Umwandlung	5
Regulation des Glykogengehaltes von Muskelzellen	7
Die Glykogensynthasekinase-3.....	9
Die Proteinkinase B	9
Die Proteinphosphatase 1	10
Die Calcium-Calmodulin abhängigen Proteinkinasen	11
Die AMP-aktivierte Proteinkinase.....	12
Der Koaktivator des peroxisom-proliferator-aktivierten Rezeptors γ	13
Der Hypoxie-induzierte Faktor-1	14
Aufgabenstellung	15
Material und Methoden	16
Primärzellkultur	16
Tiere	16
Allgemeines	16
Präparation	16
Pflege und Differenzierung der primären Muskelzellen	18
Zellernte.....	19
Semiquantitative RT-PCR	21
Präparation der Gesamt-RNA von Zellen aus der Primärzellkultur.....	21
Photometrische Bestimmung der RNA-Konzentration	21
Reverse Transkription.....	21
Multiplex-PCR.....	22
Verwendete Primer	23
Horizontale Polyacrylamidgelelektrophorese von PCR-Produkten	24
Silberfärbung von PCR-Produkten	25
Auswertung.....	26

Western Blotting	26
Proteinbestimmung nach Lowry	26
Polyacrylamidgelelektrophorese der Zellproteine	27
Halbtrockenblot mit diskontinuierlichem Puffersystem.....	29
Indian Ink Färbung.....	29
Antikörpermarkierung und ECL-Detektion der gesuchten Proteine	30
Für das <i>Western Blotting</i> verwendete Antikörper	31
Bestimmung von Enzymaktivitäten	31
Proteinbestimmung nach Oyama und Eagle	31
Enzymaktivität von GAPDH	32
Enzymaktivität von Citratsynthase.....	33
Bestimmung von Metabolitkonzentrationen.....	34
Messung des Glykogengehalts.....	34
Ermittlung der ATP-Konzentration	35
Intrazelluläre Lokalisation.....	36
Immunfluoreszenz	36
Für die Immunfluoreszenz verwendete Antikörper	37
Verwendete Computerprogramme	37
Primer3.....	37
Multalin	37
ImageMaster 1D (Version 3.1).....	38
Statistik.....	38
Ergebnisteil	39
Keine Auswirkung der Elektrostimulation auf die Stoffwechselenzyme bei 21% Sauerstoffgehalt in den Zellkulturinkubatoren.....	39
Der Sauerstoffpartialdruck beeinflusst die Transkription von GAPDH und Fumarase	40
Keine Auswirkung der Elektrostimulation auf die Stoffwechselenzyme bei 42% Sauerstoffgehalt in den Zellkulturinkubatoren.....	44
Keine Änderung der untersuchten Stoffwechselenzyme durch die Absenkung der intrazellulären ATP-Konzentration.....	48
Inkubation der Myotuben in Medium ohne Glukose führt zu einer deutlichen Änderung der untersuchten Stoffwechselfparameter.....	51

Die Abnahme der phosphorylierten Formen von PKB, GSK-3 und AMPK korreliert zeitlich mit der Abnahme des Glykogengehaltes	56
Inhibition der GSK-3 hat keinen Einfluß auf die metabolische Umwandlung der Myotuben in Medium ohne Glukose.....	57
Hemmung der PP1 verhindert den Anstieg der Citratsynthase Enzymaktivität und des PGC-1 mRNA-Gehalts der Myotuben in Medium ohne Glukose	59
Inhibition der Proteinkinase A hat keinen Einfluß auf die untersuchten Stoffwechselfparameter	62
Aktivierung der PKA hat keine Auswirkung auf die Stoffwechselfenzyme der Myotuben	62
Auch die Behandlung der Myotuben mit Calciumionophor bewirkt Änderungen bei den analysierten Stoffwechselfparametern.....	64
Die Hemmung der CaMKK vermindert den Effekt der Ionophorbehandlung auf die Transkription von PGC-1	67
Diskussion	70
Elektrostimulationsversuche bei Normoxie	70
Einfluß des Sauerstoffpartialdruckes	71
Elektrostimulationsversuche bei Hyperoxie.....	73
Aktivierung der AMPK	75
Einfluß des intrazellulären Glykogengehaltes	77
Calciumionophorversuche.....	83
Zusammenfassung	89
Ausblick.....	89
Literaturverzeichnis	91
Abkürzungsverzeichnis	100
Danksagung	103
Eidesstattliche Erklärung	104
Lebenslauf	105
Wissenschaftliche Publikationen	106

EINLEITUNG

Muskelfasertypen des Kaninchens

Adulte Skelettmuskelfasern werden in verschiedene Fasertypen eingeteilt, die sich vor allem in den Isoformen ihrer kontraktilen Proteine und in ihrem metabolischen Profil unterscheiden.

Im Skelettmuskel des Kaninchens existieren vier verschiedene adulte Fasertypen: IIB, IID, IIA und I. Die Einteilung der Fasern in diese vier Typen richtet sich nach der Isoform der schweren Ketten des Myosins (MHC), die in der jeweiligen Faser vornehmlich exprimiert wird. In einer Muskelfaser vom Typ IIB wird also hauptsächlich MHC IIB im Myosinfilament zu finden sein. Die Isoformen der schweren Ketten des Myosins unterscheiden sich unter anderem in den Reaktionsgeschwindigkeiten ihrer Myosin-ATPase. Das bedeutet, daß sich die verschiedenen Muskelfasertypen auch in ihren Kontraktionsgeschwindigkeiten unterscheiden.

Die Muskelfasern der Typen IIB und IID werden auch "schnell kontrahierende, glykolytische" Muskelfasern genannt. Sie enthalten Isoformen der schweren Ketten des Myosins (MHC IIB bzw. IID), die sich durch eine hohe Myosin-ATPase-Aktivität auszeichnen, sowie die sogenannten "schnellen" Isoformen der leichten Ketten des Myosins (MLC). Außerdem besitzen Typ IIB und IID Fasern eine hohe Kapazität für anaeroben, glykolytischen Stoffwechsel und eine niedrige Kapazität, auf oxidativem Wege Energie bereitzustellen. Für die Regulation der cytosolischen Calciumkonzentration enthalten sie z.B. die "schnelle" Isoform der Calcium-ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums (SERCA2) und das cytosolische calciumbindende Protein Parvalbumin, das nur in schnellen Muskelfasern vorkommt (Liu *et al.* 1997).

Muskelfasern vom Typ I werden auch "langsam kontrahierende" Muskelfasern genannt. Sie enthalten eine Isoform der schweren Ketten des Myosins mit geringerer Myosin-ATPase-Aktivität (MHC I), sowie die sogenannten "langsamen" Isoformen der leichten Ketten des Myosins (MLC). Durch ihren hohen Gehalt an Mitochondrien besitzen sie eine hohe oxidative Stoffwechselkapazität, während ihre Fähigkeit Energie durch anaerobe Glykolyse bereitzustellen gering ist.

Außerdem gibt es noch die sogenannten "schnellen, oxidativ-glykolytischen" Muskelfasern vom Typ IIA. Sie zeichnen sich durch eine hohe

Kontraktionsgeschwindigkeit, hohe glykolytische Kapazität, eine mittlere Laktatdehydrogenaseaktivität sowie eine hohe oxidative Stoffwechselkapazität aus (Pette und Vrbova 1992).

Muskelplastizität

Skelettmuskelzellen sind nach ihrer Differenzierung nicht mehr teilungsfähig. Da sie während der gesamten Lebensdauer eines Tieres erhalten bleiben, ist es wichtig, daß sie ihre Eigenschaften den wechselnden Anforderungen in Bezug auf Kraftentwicklung, Kontraktionsgeschwindigkeit und Ausdauer anpassen können.

Tatsächlich sind adulte Skelettmuskelzellen in der Lage, ihren Fasertyp zu ändern. Diese Fähigkeit wird als Muskelplastizität bezeichnet. Der Wechsel des Fasertyps von Typ II zu Typ I wird Weiß-Rot-Transformation (*fast-to-slow transformation*) genannt; der Wechsel von Typ I zu Typ II wird als Rot-Weiß-Transformation (*slow-to-fast transformation*) bezeichnet.

Eine Umwandlung des Fasertyps wird durch komplexe Veränderungen in der Genexpression hervorgerufen. Diese Veränderungen umfassen sämtliche fasertypspezifischen Proteinisoformen und Expressionsniveaus und werden *in vivo* durch Änderungen der Muskelaktivität, der mechanischen Belastung des Muskels oder hormonell induziert (Pette und Vrbova 1999).

Die Weiß-Rot-Transformation

Die Signaltransduktionsprozesse bei der *fast-to-slow transformation* sind noch weitgehend ungeklärt. Eine vollständige *fast-to-slow transformation* des Fasertyps bedeutet die Zunahme bzw. Abnahme einer Vielzahl von kontraktilen Proteinisoformen, Stoffwechsellzymen, Transportern und Kanälen, um vom Expressionsmuster des schnellen, glykolytischen Skelettmuskels zu dem des langsamen, oxidativen zu gelangen. Diese Änderungen scheinen jedoch nicht alle konzertiert über den gleichen Signaltransduktionsweg gesteuert zu werden.

In Bezug auf die kontraktilen Proteine ist bekannt, daß die Zunahme der MHC I-Isoform durch andauernde muskuläre Aktivität ausgelöst wird. Entscheidend für die tatsächliche Umwandlung ist dabei die Dauer, in der wiederholt Kontraktionen

stattfinden, nicht die Kontraktionsfrequenz (Kubis *et al.* 2002).

Die Steigerung der MHC I-Expression kann durch chronische Elektrostimulation induziert werden, jedoch *in vitro* auch durch die artifizielle Erhöhung der cytosolischen Calciumkonzentration mit Hilfe eines Calciumionophors (Pette und Vrbova 1992, Liu und Schneider 1998, Kubis *et al.* 1997). Wird dabei eine Calciumschwellenkonzentration überschritten, binden die Calciumionen an Calmodulin und an die regulatorische Untereinheit von Calcineurin. Die Bindung des aktivierten Calmodulins an den Calcium-Calcineurinkomplex verursacht eine Konformationsänderung, die das katalytische Zentrum von Calcineurin freilegt. In ihrem aktiven Zustand dephosphoryliert die Proteinphosphatase Calcineurin (PP2b) dann den Transkriptionsfaktor NFAT2 (*nuclear factor of activated T-cells 2*). Mit der Dephosphorylierung bildet sich ein Calcineurin-NFAT2-Komplex, der in den Zellkern transportiert wird. Innerhalb des Zellkerns wird die Dephosphorylierung von NFAT2 durch Calcineurin fortgesetzt. Im Nukleus angelangt, kann NFAT2 im Zusammenspiel mit anderen Transkriptionsfaktoren die Transkription von MHC I aktivieren. Die Dephosphorylierung von NFAT2 durch Calcineurin, die zur Freilegung des Kernlokalisierungssignals auf dem Transkriptionsfaktor führt, wird vermutlich im Zellkern durch kernständige Proteinkinasen rückgängig gemacht (Chin *et al.* 1998, Sugiura *et al.* 2001). Der durch Elektrostimulation oder Calciumionophorbehandlung induzierte Transport von NFAT2 in den Zellkern von Muskelzellen kann durch den Calcineurininhibitor "Cyclosporin A" verhindert werden (Meissner *et al.* 2001).

Die Abnahme der MHC II-Isoform bei der *fast-to-slow transformation* kann sowohl durch Elektrostimulation als auch mit Hilfe eines Calciumionophors induziert werden (Pette und Vrbova 1992, Kubis *et al.* 1997). Allerdings ist es nicht gelungen, diesen Rückgang der MHC II-Expression mit Cyclosporin A zu hemmen. Somit ist die MHC II-Abnahme zwar von Calcium abhängig, aber eine Beteiligung von Calcineurin an diesem Teil der *fast-to-slow transformation* konnte nicht bestätigt werden (Meissner *et al.* 2001).

Auch bei den metabolischen Enzymen läßt sich eine Umwandlung von hoher glykolytischer zu hoher oxidativer Stoffwechselkapazität mit Hilfe von Elektrostimulation oder Calciumionophor induzieren. *In vivo* konnte beispielsweise gezeigt werden, daß die Stimulation von schnell kontrahierendem, glykolytischem

Kaninchenmuskel (*tibialis anterior*) nach mehreren Tagen bzw. Wochen zu einer Abnahme der GAPDH Enzymaktivität und zu einer Zunahme der Citratsynthase Enzymaktivität führt (Pette und Dusterhoft 1992, Mayne *et al.* 1996). Nach der Gabe von Calciumionophor (A23187) wurde z.B. von einer Abnahme der Enzymaktivität von Laktatdehydrogenase, sowie von einer Zunahme der Citratsynthase Enzymaktivität berichtet (Lawrence und Salsgiver 1983, Kubis *et al.* 1997).

Wie bei der calciuminduzierten Abnahme der MHC II-Isoform ist es auch bei den metabolischen Enzymen bisher nicht gelungen, die Umwandlung mit Hilfe von Cyclosporin A zu unterdrücken. Somit scheint auch die Signaltransduktion des metabolischen Anteils der *fast-to-slow transformation* ohne Beteiligung der Proteinphosphatase Calcineurin abzulaufen (Meissner *et al.* 2001, Terada *et al.* 2003).

Mögliche Signale für die metabolische Umwandlung

Kontraktile Aktivität von Skelettmuskel in Form von Ausdauertraining führt zu einer Zunahme der mitochondrialen Dichte. Durch die Erhöhung der mitochondrialen Volumendichte einer Muskelfaser wird die oxidative Stoffwechselkapazität dieser Faser gesteigert. Da es während und nach Muskeltätigkeit zu einer Vielzahl an Veränderungen innerhalb der arbeitenden Muskelfaser kommt, ist es schwierig, das Signal oder die Signale zu identifizieren, die für die Mitochondriogenese verantwortlich sind. Neben der Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration kommt es z.B. auch zu einem Anstieg der AMP-Konzentration, zu einer Zunahme von glykolytischen Intermediaten, zu einer Erniedrigung des intrazellulären pH-Wertes und des Sauerstoffpartialdruckes, zu Veränderungen im Redox-Zustand der Zelle und zu einer vermehrten Bildung von freien Radikalen (Ojuka *et al.* 2003).

Da viele Effekte von kontraktile Aktivität auf die Stoffwechselkapazität auch durch eine Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration durch die Gabe von Calciumionophor (sorgt für einen Einstrom von Calciumionen aus dem extrazellulären Raum in die Muskelzellen) oder Koffein (verursacht die Freisetzung von Calciumionen aus dem sarkoplasmatischen Retikulum in das Cytosol der Muskelzellen) erzeugt werden können, scheint die Bedeutung der intrazellulären Calciumkonzentration für die Regulation der Mitochondriogenese gesichert (Lawrence und Salsgiver 1983, Kubis *et al.* 1997, Ojuka *et al.* 2003).

Trotzdem ist es denkbar, daß das Signal für die metabolische Umwandlung nicht die Erhöhung der cytosolischen Calciumkonzentration selbst ist, sondern eine Folge dieses Calciumanstiegs. Wird z.B. nach der Inkubation der Muskelzellen in Calciumionophor von den Zellen erheblich mehr Energie verbraucht als zuvor, um die cytosolische Calciumkonzentration zurück auf ihren Ruhewert zu bringen, so könnte das unmittelbare Signal für die metabolische Umwandlung der Muskelfasern aus der dabei entstehenden Änderung der AMP-Konzentration bestehen. Eine weitere Möglichkeit wäre, daß es durch den Energiebedarf nach einer starken Erhöhung der cytoplasmatischen Calciumkonzentration zu einem Abbau der Glykogenspeicher der Zellen kommt. Bei diesem Glykogenabbau könnte es zur Freisetzung glykogengebundener Enzyme kommen, die dann das Signal ihrerseits weiterleiten können.

Mögliche Signaltransduktionswege für die metabolische Umwandlung

Aus den vielen möglichen Signalen für eine Erhöhung der oxidativen Stoffwechselkapazität ergibt sich eine Vielzahl an nachfolgenden Signaltransduktionskaskaden, die bei der Regulation der Mitochondriogenese eine Rolle spielen könnten. Nimmt man beispielsweise an, daß die **Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration** ein wichtiges Signal für die metabolische Umwandlung darstellt, dann kommen außer der Proteinphosphatase Calcineurin noch andere Signaltransduktionsenzyme für die Weiterleitung des Calciumsignals in Betracht, deren Aktivität durch Calciumionen oder Calcium-Calmodulin beeinflusst wird, wie z.B. CaM-Kinasen oder die Phosphorylasekinase.

Da auch Hypoxie Auswirkungen auf die Expression von Stoffwechsellzymen hat und genau wie muskuläre Arbeit zu einem Einbau von GLUT4 in die Zellmembran führt (Holloszy und Hansen 1996), könnte auch der **Sauerstoffpartialdruck** einen entscheidenden Einfluß auf die metabolische Umwandlung haben. Bei der sauerstoffabhängigen Regulation von Genen spielt der Hypoxie-induzierte Faktor-1 (HIF-1) eine große Rolle.

Eine andere weitverbreitete Hypothese geht davon aus, daß die **Zunahme der AMP-Konzentration** und die **Abnahme der Kreatinphosphatkonzentration** in

arbeitenden Muskelfasern die Hauptstimuli für die metabolische Umwandlung darstellen. Diese Konzentrationsänderungen in den Zellen führen zu einer Aktivierung der AMP-aktivierten Proteinkinase (AMPK). Aktivierung der AMPK stimuliert die Expression mitochondrialer Enzyme (Shoubridge *et al.* 1985, Yaspelkis *et al.* 1999, Winder *et al.* 2000, Bergeron *et al.* 2001) und induziert eine vermehrte GLUT4 Expression (Ren *et al.* 1993, Ojuka *et al.* 2000, Zheng *et al.* 2001). Möglicherweise kann die Aktivierung der AMPK durch einen hohen Glykogengehalt in der Muskelzelle unterdrückt werden (Kawanaka *et al.* 2000, Wojtaszewski *et al.* 2002).

Der **Glykogengehalt** in Muskelzellen gibt Auskunft über die Energiereserven, ähnlich wie eine erhöhte AMP-Konzentration einen starken momentanen Energieverbrauch signalisiert. Der Glykogenabbau wird unter anderem durch adrenerge Stimulation und die Calciumkonzentration reguliert, die Glykogensynthese über eine Vielzahl von Proteinkinasen und die Proteinphosphatase 1. Der Glykogengehalt wird indirekt auch über die GLUT4-Regulation gesteuert, da ein vermehrter Import von Glukose in die Muskelzelle über die Bildung von Glukose-6-Phosphat zu einer allosterischen Aktivierung der Glykogensynthese führt. Folglich ist der Glykogengehalt der Zelle eine Größe, in der eine Vielzahl von Informationen aus verschiedenen Signaltransduktionswegen zusammenläuft. Die Zelle könnte die Integration dieser Informationen nutzen, indem sie die metabolische Umwandlung vom Glykogengehalt abhängig macht.

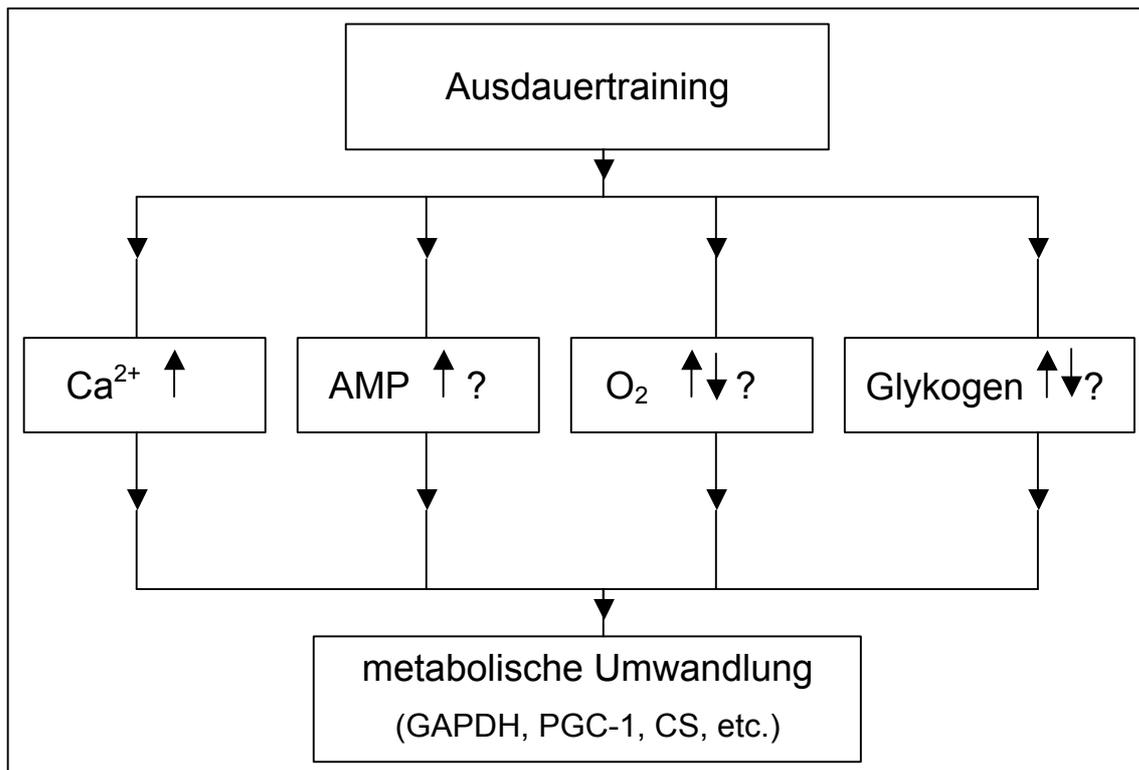


Abb.1: Mögliche Signale bei der metabolischen Umwandlung

Ausdauertraining führt über verschiedene Signale zu einer metabolischen Umwandlung von Skelettmuskelzellen. Welche Signale für eine Induktion dieser Umwandlung entscheidend sind, ist noch unbekannt. AMP = Adenosin-5'-monophosphat, CS = Citratsynthase, GAPDH = Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase, PGC-1 = Koaktivator des peroxisom-proliferator-aktivierten Rezeptors γ .

Regulation des Glykogengehaltes von Muskelzellen

Glykogen ist ein verzweigtes Polymer aus Glukoseeinheiten und dient in Muskelzellen der Energiespeicherung und der schnellen Energiebereitstellung. Bei Bedarf werden durch die Aktivität der Glykogenphosphorylase, Glukose-1-Phosphatmoleküle abgespalten, die dann verstoffwechselt werden können. Glykogenphosphorylase ist in der phosphorylierten Form aktiv, die dephosphorylierte Form im Muskel kann aber auch allosterisch durch die Bindung von AMP aktiviert werden. Glukose-6-Phosphat und ATP wirken diesem Effekt entgegen.

Die Phosphorylasekinase, die die Glykogenphosphorylase durch Phosphorylierung an Serin 14 aktiviert, wird sowohl durch Calciumionen als auch durch adrenerge Stimulation aktiviert, siehe Abb.2. Die Calciumabhängigkeit wird dabei durch Calcium-Calmodulin vermittelt; die Aktivierung durch Adrenalin verläuft über die Bildung von cAMP und die Phosphorylierung zweier regulatorischer Untereinheiten

der Phosphorylasekinase durch die Proteinkinase A. Die Dephosphorylierung und somit die Hemmung der Phosphorylasekinase, sowie der Glykogenphosphorylase, erfolgt durch die Proteinphosphatase 1 (PP1).

Die Glykogensynthese wird von der Glykogensynthase (GS), die allosterisch durch Glukose-6-Phosphat aktiviert werden kann, katalysiert. Die Glykogensynthase besitzt außerdem mehrere Phosphorylierungstellen, die von verschiedenen Kinasen modifiziert werden, welches zu einer Hemmung des Enzyms führt. Unter anderem wird die Glykogensynthase von der Phosphorylasekinase, der Proteinkinase A (PKA) und der Glykogensynthasekinase (GSK) gehemmt. Die Dephosphorylierung aller dieser Modifikationsstellen erfolgt wiederum hauptsächlich durch die Proteinphosphatase 1 (Cohen 1989, Nakielny *et al.* 1991, Nielsen und Richter 2003).

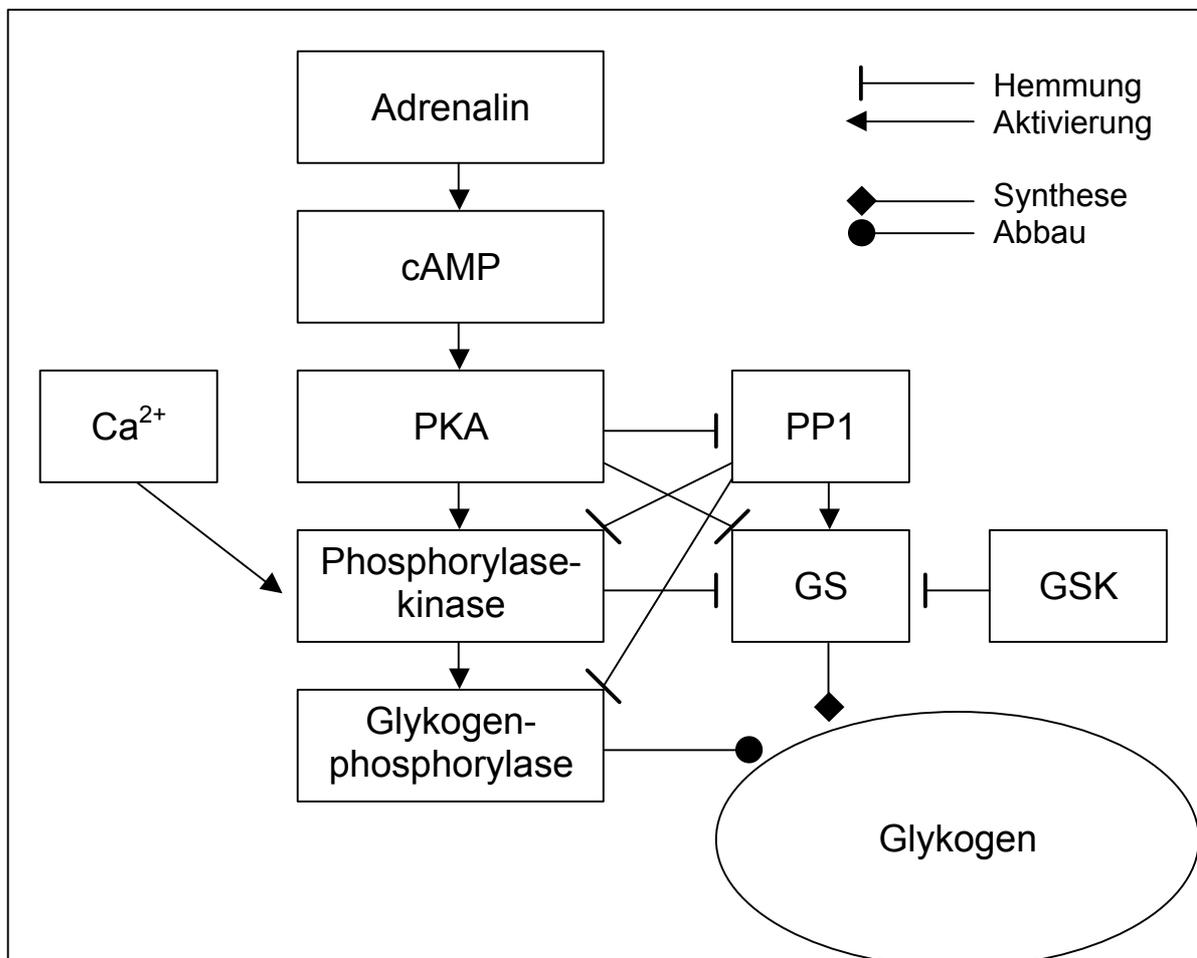


Abb.2: Regulation der Glykogensynthese und des Glykogenabbaus

cAMP = cyclisches Adenosin-5'-monophosphat, GS = Glykogensynthase, GSK = Glykogensynthasekinase, PKA = Proteinkinase A, PP1 = Proteinphosphatase 1.

Die Glykogensynthasekinase-3

Die Glykogensynthasekinase-3 (GSK-3) ist außer an der Hemmung der Glykogensynthese auch an anderen zellulären Prozessen wie z.B. Transkription, Translation oder der Regulation des Zellzyklus beteiligt.

GSK-3 ist eine ubiquitär exprimierte Serin-Threonin-Proteinkinase, die in den Isoformen GSK-3 α und GSK-3 β vorkommt. GSK-3 α ist etwas größer als GSK-3 β (51 kDa im Vergleich zu 47 kDa) und unterscheidet sich von GSK-3 β in Bezug auf Substratspezifität und Regulation. Die meisten Studien befassen sich jedoch mit der β -Isoform (Hardt und Sadoshima 2002).

Genau wie die Glykogensynthese ist die GSK-3 β in ihrer phosphorylierten Form inaktiv. Im Gegensatz zur Glykogensynthese genügt jedoch die Phosphorylierung einer einzigen Aminosäure (Ser9), um die GSK-3 β zu inhibieren. Die Inhibition von GSK-3 β erfolgt vor allem durch die Proteinkinase B (PKB), aber auch andere Kinasen wie z.B. Proteinkinase A (PKA), p70S6K (70 kDa Kinase des ribosomalen S6-Proteins) und p90rS6K (90 kDa Kinase des ribosomalen S6-Proteins) sind in der Lage, GSK-3 β zu phosphorylieren.

Aktive GSK-3 β kann neben der Glykogensynthese mehrere Transkriptionsfaktoren wie z.B. GATA4 (GATA bindendes Protein 4), CREB (*cAMP response element binding protein*), NFAT2 (*nuclear factor of activated T-cells 2*) und den, an der Translation beteiligten, eukaryotischen Initiationsfaktor 2B ϵ (eIF2B ϵ) phosphorylieren und dadurch ihre Aktivität mindern (Antos *et al.* 2002, Hardt und Sadoshima 2002).

Die Proteinkinase B

Die Proteinkinase B (PKB), auch Akt oder Rac genannt, wird durch Insulin und verschiedene Wachstumsfaktoren über einen PI3-Kinase (Phosphatidylinositol-3-Kinase) abhängigen Signalweg aktiviert. PKB ist über eine N-terminale PH-Domäne (*pleckstrin homology domain*) in der Lage an Phosphatidylinositol-3,4-Bisphosphat und Phosphatidylinositol-3,4,5-Trisphosphat (PIP3) in der Zellmembran zu binden (Franke *et al.* 2003). Dort wird die PKB durch Phosphorylierung an Thr308 und Ser473 aktiviert. Die Phosphorylierung des Thr308 wird durch die PDK1 (PI3-Kinase abhängige Kinase 1) katalysiert (Brazil *et al.* 2002), während die Dephosphorylierung von PKB durch die Proteinphosphatase 2a erfolgt (Sato *et al.* 2000).

Aktivierte PKB kann Substrate an der Zellmembran, im Cytosol oder im Zellkern

phosphorylieren, wie z.B. Glykogensynthasekinase-3, mTOR (*mammalian target of rapamycin*), Bad (*proapoptotic regulator of programmed cell death*) oder Forkhead-Transkriptionsfaktoren. Häufig (jedoch nicht bei mTOR) führt die Phosphorylierung dieser Substrate durch PKB zu deren Inaktivierung (Brazil *et al.* 2002, Sato *et al.* 2000).

Die Proteinphosphatase 1

Die Proteinphosphatase 1 ist an einer Vielzahl von Prozessen innerhalb der Zelle beteiligt, wie z.B. Mitose, Proteinsynthese oder Glykogenmetabolismus. Trotz einer sehr breiten Substratspezifität kann die Proteinphosphatase 1 durch verschiedene regulatorische Untereinheiten differenziert gesteuert werden. Diese regulatorischen Untereinheiten kontrollieren die intrazelluläre Lokalisation von PP1, erhöhen ihre Substratspezifität durch direkte Bindung der Phosphatase und ihrer Substrate und vermitteln hormonelle Signale.

Es gibt vier verschiedene glykogenbindende regulatorische Untereinheiten der PP1:

- G_M (auch R_{GL} oder PPP1R3) wird hauptsächlich in quergestreiftem Muskel exprimiert,
- G_L (auch PPP1R4) kommt überwiegend in der Leber vor,
- PTG (auch PPP1R5) und
- PPP1R6 werden in vielen verschiedenen Geweben exprimiert, unter anderem in Muskel, Leber und Fettgewebe (Newgard *et al.* 2000, Fong *et al.* 2000).

Obwohl alle diese Untereinheiten eine glykogenbindende und eine PP1-bindende Domäne aufweisen und scheinbar die gleiche Funktion erfüllen, sind die Aminosäuresequenzen der vier glykogenbindenden Untereinheiten des Menschen sehr verschieden (weniger als 50% Homologie, gleichgültig welche beiden Untereinheiten verglichen werden), während die Homologie von identischen Untereinheiten zwischen verschiedenen Spezies weit höher liegt (über 70%).

G_M besitzt ein ungefähr dreimal größeres Molekulargewicht als die anderen glykogenbindenden regulatorischen Untereinheiten der PP1 und enthält am C-Terminus eine hydrophobe Domäne, die in den anderen glykogenbindenden Untereinheiten nicht vorkommt. Diese hydrophobe Domäne vermittelt vermutlich die Bindung von G_M an das sarkoplasmatische Retikulum. Zwei weitere, von einander unabhängige Domänen ermöglichen die Bindung von PP1 und GS. Außerdem

enthält G_M zwei Serinreste (Ser46 und Ser67), die von der Proteinkinase A phosphoryliert werden können. Phosphorylierung des Ser67 verhindert die Bindung von PP1 an G_M und dadurch die Aktivierung der Glykogensynthase durch PP1 (Newgard *et al.* 2000, Liu und Brautigan 2000).

G_L besitzt als einzige der vier regulatorischen Untereinheiten eine C-terminale Domäne, die die aktive Form der Glykogenphosphorylase bindet. Diese Bindung führt zu allosterischer Inhibition des G_L -PP1-Komplexes, wenn die Glykogenphosphorylase der Leber aktiv ist.

PTG bindet außer PP1 und Glykogen auch Glykogensynthase, Glykogenphosphorylase und Phosphorylasekinase, kann jedoch nicht über PKA reguliert werden (Newgard *et al.* 2000, Fong *et al.* 2000).

Die Calcium-Calmodulin abhängigen Proteinkinasen

Eine Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration, z.B. während Muskelkontraktionen oder Behandlung der Muskeln mit Calciumionophor, wirkt sich auf eine Vielzahl verschiedener Enzyme und Signaltransduktionsketten aus. Häufig spielt das Calciumrezeptorprotein Calmodulin eine Rolle bei der calciumabhängigen Aktivierung von Signalenzymen wie z.B. bei der Proteinphosphatase Calcineurin, der Phosphorylasekinase oder den Calcium-Calmodulin abhängigen Proteinkinasen (CaMK).

Während es sich bei der CaMKII um ein multimeres Enzym handelt, sind sich die CaMKI und CaMKIV strukturell sehr ähnlich. CaMKI ist hauptsächlich im Cytosol lokalisiert und kommt im Skelettmuskel in großen Mengen vor. CaMKIV dagegen ist überwiegend kernständig und wird im Skelettmuskel nur wenig exprimiert (Soderling 1999, Wu *et al.* 2002).

CaMKI und CaMKIV werden aktiviert, indem die Bindung von Calcium-Calmodulin eine Konformationsänderung induziert, die die sterische Inhibition des katalytischen Spaltes aufhebt und die Substratbindung ermöglicht. Zusätzlich legt die Calcium-Calmodulin-Bindung einen Threoninrest frei, der dann durch die CaMK Kinase (CaMKK) phosphoryliert werden kann. Diese Phosphorylierung steigert die Aktivität von CaMKI und CaMKIV 10- bis 50-fach (Corcoran und Means 2001). Auch die CaMKK muß zuerst durch die Bindung von Calcium-Calmodulin aktiviert werden, bevor sie die CaMK phosphorylieren kann.

Welche Proteinphosphatase *in vivo* für die Dephosphorylierung der CaMK entscheidend ist, ist noch unklar. *In vitro* kann die Inaktivierung von CaMKI und CaMKIV durch PP1, PP2a, Calcineurin und die CaMK-Phosphatase katalysiert werden (Kasahara *et al.* 1999, Kitani *et al.* 1999). Da PP2a mit CaMKIV stöchiometrisch kopräzipitiert, scheint sie zumindest für die CaMKIV die wichtigste Phosphatase darzustellen (Westphal *et al.* 1998).

Hinsichtlich der Querverbindungen zwischen den CaMK-Signalwegen und anderen Signalkaskaden existieren Hinweise über Wechselwirkungen von CaMKK oder CaMK mit PKA (Hemmung der CaMKK durch PKA), PKB (Aktivierung von PKB durch CaMKK) und MAPK (indirekte Aktivierung von MAPK durch CaMKIV). Auch diese Beziehungen und ihre physiologische Bedeutung sind bisher nur unzureichend untersucht worden (Soderling 1999).

Sind die CaMKI und die CaMKIV durch die Bindung von Calcium-Calmodulin und die Phosphorylierung durch CaMKK vollständig aktiviert, können sie das Calciumsignal direkt an Transkriptionsfaktoren und Koaktivatoren übermitteln, beispielsweise durch die Phosphorylierung von CREB (*cAMP response element binding protein*), CBP (*CREB binding protein*) oder MEF2 (Corcoran und Means 2001). Aktiviertes CREB und MEF2 wiederum sind dann in der Lage die Transkription verschiedener Gene zu induzieren, wie z.B. PGC-1 (Koaktivator 1 des peroxisom-proliferator-aktivierten Rezeptors γ), GLUT4 (Glukosetransportprotein 4), Myoglobin oder Cytochrom C (Ojuka *et al.* 2002b, Handschin *et al.* 2003).

Die AMP-aktivierte Proteinkinase

Die AMP-aktivierte Proteinkinase (AMPK) ist ein Heterotrimer, bestehend aus einer α -Untereinheit, die die katalytische Domäne enthält, einer β - und einer γ -Untereinheit, die für die Substratspezifität, intrazelluläre Lokalisierung und die Stabilität des Enzyms von Bedeutung sind. Es sind zwei verschiedene Isoformen der α -Untereinheit ($\alpha 1$, $\alpha 2$), zwei der β -Untereinheit ($\beta 1$, $\beta 2$) und drei Isoformen der γ -Untereinheit ($\gamma 1$, $\gamma 2$, $\gamma 3$) bekannt. Die Zusammensetzung des Heterotrimers hängt stark von dem untersuchten Gewebetyp ab. In Skelettmuskel findet man beide α -Untereinheiten, wobei $\alpha 1$ nur im Cytosol vorkommt und $\alpha 2$ cytosolisch und nukleär lokalisiert ist (Salt *et al.* 1998, Fujii *et al.* 2004).

AMPK wird sowohl allosterisch, als auch durch Phosphorylierung und

Dephosphorylierung reguliert. Allosterische Aktivierung erfolgt durch AMP, allosterische Hemmung durch Kreatinphosphat. Außerdem kann die AMPK über eine Phosphorylierung des Thr172 ihrer α -Untereinheit durch die AMPK Kinase (AMPKK) aktiviert werden. Die AMPKK kann ebenfalls durch AMP allosterisch aktiviert werden (Hardie *et al.* 1998, Winder 2001).

Über die Substrate der AMPK ist bisher wenig bekannt. Möglicherweise werden p38 MAPK und PKC von der AMP-aktivierten Proteinkinase phosphoryliert (Ojuka 2004, Fujii *et al.* 2004). Da AMPK und CaMK verwandte Proteinkinasen sind, die zu der gleichen Unterfamilie gehören und die gleiche Aminosäurekonsensussequenz phosphorylieren, wäre eine Überschneidung bei den Substraten dieser beiden Proteinkinasen denkbar (Corcoran und Means 2001, Ojuka *et al.* 2002b).

Der Koaktivator des peroxisom-proliferator-aktivierten Rezeptors γ

Die Erhöhung der mitochondrialen Volumendichte einer Muskelfaser führt zu einer Steigerung der oxidativen Stoffwechsellkapazität. Für die Mitochondriogenese müssen kernkodierte Gene, sowie Gene von der mitochondrialen DNA exprimiert werden. PGC-1 (Koaktivator 1 des peroxisom-proliferator-aktivierten Rezeptors γ) scheint ein wichtiger regulatorischer Faktor bei der Mitochondriogenese zu sein, da er über die Koaktivierung von NRF-1 (*nuclear respiratory factor 1*) die Transkription mehrerer kernkodierter mitochondrialer Proteine aktiviert. Eines dieser Proteine ist der sogenannte mitochondriale Transkriptionsfaktor A (Tfam). Tfam ist in der Lage die Transkription der mitochondrialen DNA zu steigern, so daß durch eine vermehrte Expression von PGC-1 letztendlich sowohl kernkodierte, als auch Proteine von der mitochondrialen DNA induziert werden (Hood 2001, Wu *et al.* 2002, Adhietty *et al.* 2003).

Die Expression von PGC-1 läßt sich auf verschiedene Weise steigern; z.B. durch Muskelkontraktionen oder Behandlung der Muskeln mit Calciumionophor. Das Signal führt dann möglicherweise über CaMK und CREB, oder über Calcineurin und MEF2 oder über AMPK zu einer Aktivierung des PGC-1 Promotors (Booth *et al.* 2002, Wu *et al.* 2002, Handschin *et al.* 2003, Irrcher *et al.* 2003).

Der Hypoxie-induzierte Faktor-1

Der Hypoxie-induzierte Faktor-1 (HIF-1) ist ein Transkriptionsfaktor, der für die Anpassung von Zellen an hypoxische Bedingungen von großer Bedeutung ist. Er induziert zum Beispiel die Expression von Erythropoetin, vaskulärem endotheliale Wachstumsfaktor (VEGF) oder Laktatdehydrogenase (Ratcliffe *et al.* 1998).

HIF-1 ist ein Heterodimer bestehend aus dem cytoplasmatisch lokalisierten HIF-1 α und dem kernständigen HIF-1 β (auch "*aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator ARNT*" genannt). HIF-1 α und HIF-1 β werden konstitutiv exprimiert, die Regulation von HIF-1 erfolgt über den proteasomalen Abbau von HIF-1 α . Ist ausreichend Sauerstoff für die Zelle vorhanden, dann erfolgt eine Prolylhydroxylierung von HIF-1 α , die zu einer Ubiquitinierung durch den von-Hippel-Lindau Komplex und anschließend zu proteasomalem Abbau von HIF-1 α führt (Wang und Semenza 1995, Salceda und Caro 1997).

Unter hypoxischen Bedingungen erfolgt keine Prolylhydroxylierung, sodaß HIF-1 α nicht abgebaut wird und in den Kern transportiert werden kann. Dort dimerisiert es mit HIF-1 β zu einem Transkriptionskomplex der an sogenannte "*hypoxia response elements*" (HRE) bindet und damit die Transkription von hypoxieabhängigen Genen induziert. Für eine vollständige Aktivierung von HIF-1 bedarf es zusätzlich der Aktivierung einer C-terminalen Transaktivierungsdomäne von HIF-1 α innerhalb des Zellkerns und der Rekrutierung von transkriptionellen Koaktivatoren (Kallio *et al.* 1998).

In vielen Geweben wird HIF-1 α unter normoxischen Bedingungen abgebaut. In Skelettmuskel von Mäusen dagegen findet man auch bei Normoxie schon erhebliche Mengen von HIF-1 α (Stroka *et al.* 2001).

Aufgabenstellung

Da in zurückliegenden Arbeiten gezeigt werden konnte, daß die kontraktile Eigenschaften von Muskelzellen unabhängig von den metabolischen Eigenschaften reguliert werden können, sollte in dieser Dissertation untersucht werden, welche Stimuli und welche Signaltransduktionswege zur Veränderung der metabolischen Eigenschaften von Muskelzellen in Kultur notwendig sind.

Als Zellkulturmodell für adulten Skelettmuskel wurde die im Institut für vegetative Physiologie etablierte primäre Muskelzellkultur verwendet. Diese kultivierten Muskelzellen von neugeborenen Kaninchen differenzieren sich nach zwei Wochen in Kultur in den adulten, schnell kontrahierenden, glykolytischen Typ IIB / IID.

Um eine metabolische Anpassung in den Muskelzellen einzuleiten, sollten verschiedene Stimuli in der Zellkultur angewandt werden, die möglicherweise für eine Induktion der metabolischen Anpassung verantwortlich sein könnten. Als Stimuli sollen 1. durch Elektrostimulation ausgelöste kontraktile Aktivität, 2. die Änderung des Sauerstoffpartialdruckes, 3. die Aktivierung der AMPK durch Gabe eines Kreatinanalogs und 4. die Erniedrigung des Glykogengehaltes der Muskelzellen durch die Änderung der Glukoseverfügbarkeit im Zellkulturmedium untersucht werden.

Zur Beurteilung der metabolischen Kapazität der Muskelzellen wurden der mRNA-Gehalt und die Enzymaktivitäten metabolischer Leitenzyme analysiert. Ferner sollte mit Hilfe unterschiedlicher Hemmstoffe untersucht werden, welche Signaltransduktionswege an der Änderung der metabolischen Eigenschaften beteiligt sind.

MATERIAL UND METHODEN

PRIMÄRZELLKULTUR

Tiere

Die neugeborenen Kaninchen wurden über das zentrale Tierlabor der Medizinischen Hochschule Hannover bezogen.

Allgemeines

Die Kultivierung der primären Muskelzellen wird unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Dazu werden alle verwendeten Geräte und Lösungen, die nicht bereits steril bezogen werden, entweder hitzesterilisiert (4 Stunden, 185°C), autoklaviert (20 Minuten, 121°C, 203 kPa) oder durch einen 0,2 µm-Filter sterilfiltriert.

Alle verwendeten Zellkulturmedien und auch PBS, das während der Präparation zum Einsatz kommt, werden zusätzlich mit 100 Units Penicillin und 0,1 mg Streptomycin ("Penicillin-Streptomycin-Solution", Sigma) pro ml versetzt.

Präparation

Vorbereiten der Microcarrier: Zuerst suspendiert man 2% w/v CultiSpher-GL Microcarrier für die Zellkultur (PerCELL Biolytica AB) in PBS (PAA Laboratories GmbH) und läßt sie 60 Minuten bei Raumtemperatur quellen. Diese Suspension wird autoklaviert und anschließend einmal in PBS und zweimal in D-MEM mit 10% NCS gewaschen. Die Microcarrier werden in D-MEM mit 10% NCS aufgenommen und bei 4°C aufbewahrt (maximal 4 Wochen).

Anlegen der Primärzellkultur: Die Myoblasten für die Primärzellkultur werden aus den Hinterläufen neugeborener Kaninchen gewonnen.

Dazu dekapitiert man die maximal einen Tag alten Kaninchen (6 bis 10 Stück) und läßt sie ausbluten. Anschließend desinfiziert man die Tiere außen mit 70%igem Ethanol (Einwirkzeit 10 Minuten). Die Hinterbeine werden möglichst dicht an der Hüfte abgetrennt, die Haut wird zum Fuß hin abgezogen und mit dem Fuß entfernt.

Die gehäuteten Beine werden in kaltem PBS gesammelt. Dann beseitigt man Sehnen, Fett und Knochen. Um die Erythrozyten zu entfernen, wäscht man die Muskeln in PBS. Dann schneidet man die Kaninchenmuskeln in PBS in sehr kleine

Stücke von ca. 1 mm Kantenlänge. Der überstehende Puffer wird abgenommen, bevor die Gewebesuspension zusammen mit 50 ml warmer Trypsinlösung in einen Trypsinierkolben überführt wird. Die Inkubation erfolgt 5 Minuten bei 37°C und 300 rpm auf einem Intervallrührer (20 Sekunden in der einen Richtung, 15 Sekunden Pause, 20 Sekunden in der anderen Richtung). Anschließend ersetzt man die Trypsinlösung durch Trypsin-Collagenaselösung und inkubiert die Muskelsuspension weitere 60 Minuten bei 37°C auf dem Intervallrührer.

Nach der Inkubation resuspendiert man das trypsinierte Gewebe mit einer geweiteten Pasteurpipette. Die überstehende Trypsinlösung mit den Einzelzellen wird abpipettiert, durch ein grobmaschiges Edelstahlsieb filtriert und 1:3 mit PBS verdünnt. Anschließend zentrifugiert man die Zellen 5 Minuten bei 800 x g ab und verwirft den Überstand. Das Zellpellet wird mit einer Pasteurpipette in ca. 5 ml D-MEM mit 10% NCS resuspendiert, um die Trypsinierung zu beenden.

Das restliche Gewebe im Trypsinierkolben wird erneut mit 50 ml Trypsin-Collagenaselösung versetzt und 30 Minuten bei 37°C auf dem Intervallrührer inkubiert. Anschließend verfährt man wie nach der ersten Trypsinierung und vereinigt die in D-MEM mit 10% NCS vorliegenden Zellen.

Die vereinigten, resuspendierten Zellen werden durch ein feines Metallsieb filtriert und das Filtrat wird mit 200 ml D-MEM mit 10% NCS versetzt. Die Zellsuspension wird auf 4 Zellkulturflaschen mit je 75 cm² Bodenfläche verteilt und 50 Minuten bei 37°C inkubiert. Während dieser 50 Minuten heften sich die unerwünschten Fibroblasten größtenteils an den Boden der Zellkulturflaschen an. Nach der Inkubationszeit wird das überstehende, die Myoblasten enthaltende Medium abgenommen und die Zahl der vitalen Zellen in einer Zählkammer mit Trypan Blau bestimmt.

Anschließend sät man $7,5 \times 10^6$ Myoblasten pro 75 cm²-Zellkulturflasche zusammen mit 2 ml Microcarriersuspension aus und füllt mit D-MEM mit 10% NCS auf 15 ml Gesamtvolumen auf. Die Zellkultur wird in einem Inkubator bei 37°C, 90% relativer Luftfeuchte, 21% Sauerstoffgehalt und 8% Kohlendioxidgehalt auf einem Kreisschüttler (IKA) bei 35 rpm kultiviert.

D-MEM mit 10% NCS: 10% (v/v) NCS (GIBCO) in D-MEM mit 1 g/l D-Glukose ("Nr. 31885", GIBCO)

Trypsinlösung: 0,125% (w/v) "Trypsin 1:250" (GIBCO) in PBS pH 7,1

Trypsin-Collagenaselösung: 0,125% (w/v) "Trypsin 1:250" (GIBCO)
0,08% (w/v) Collagenase Typ 1 (Sigma)
in PBS pH 7,1

Pflege und Differenzierung der primären Muskelzellen

24 Stunden nach der Präparation werden weitere 15 ml D-MEM mit 10% NCS pro Zellkulturflasche zugegeben und die Drehzahl des Kreisschüttlers wird auf 55 rpm erhöht.

Am vierten Tag der Zellkultur wird das D-MEM mit 10% NCS entfernt und durch ein spezielles Proliferationsmedium ("Skeletal Muscle Cell Growth Medium Kit" von PromoCell) ersetzt. Am neunten Tag wird die Zellkultur auf D-MEM mit 10% Kaninchenserum umgestellt. Am elften Tag erfolgt eine Umstellung auf D-MEM mit 5% NCS.

Wird das Medium nicht durch eine dieser Umstellungen auf ein anderes Zellkulturmedium erneuert, erfolgt spätestens nach 3 Tagen ein halber Mediumwechsel.

Im Verlauf der Kultur entwickeln sich die Muskelzellen zu adulten Myotuben des Typs IId. Am 14. Tag ist die Differenzierung abgeschlossen und die Versuche mit den Myotuben (z.B. Elektrostimulation oder Behandlung mit verschiedenen Inhibitoren) können begonnen werden. Ab dem neunten Tag findet keine nennenswerte Proliferation mehr statt, sondern die Myoblasten beginnen zu fusionieren. Ist die Fusionsphase abgeschlossen (ab dem 11 Tag in Kultur) ändert sich die Zellzahl kaum und beträgt zwischen 5×10^5 und 1×10^6 Zellen pro ml.

D-MEM mit 10% NCS: 10% (v/v) NCS (GIBCO) in D-MEM mit 1 g/l D-Glukose ("Nr. 31885", GIBCO)

D-MEM mit 10% Kaninchenserum: 10% (v/v) Kaninchenserum (GIBCO) in D-MEM mit 1 g/l D-Glukose ("Nr. 31885", GIBCO)

D-MEM mit 5% NCS: 5% (v/v) NCS (GIBCO) in D-MEM mit 1 g/l D-Glukose ("Nr. 31885", GIBCO)

Zellernte

Bei der Ernte der primären Muskelzellen werden die Carrieraggregate aus jeder Zellkulturflasche für die Analytik aufgeteilt und unterschiedlich behandelt.

Ernte für die RT-PCR: Für die RT-PCR werden 10 - 20 Carrieraggregate aus der Zellkulturflasche entnommen, einmal mit 1 ml kaltem PBS (PAA Laboratories GmbH) gewaschen und mit 1 ml "RNAlater" (Ambion) bedeckt. Dann werden die Zellen bis zur RNA-Präparation bei 4°C aufbewahrt (bis zu einem Monat).

Ernte für das *Western Blotting*: Für das *Western Blotting* werden ca. 30 Carrieraggregate abgenommen. Das überschüssige Medium wird von diesen Carriern vollständig entfernt. Dann gibt man 350 µl heißen Probenpuffer (95°C) hinzu, erhitzt die Proben 3 Minuten auf 95°C und kühlt sie danach auf Eis ab. Anschließend überführt man die in Probenpuffer gekochten Zellen auf eine "QIAshredder"-Säule (QIAGEN) und zentrifugiert 10 Minuten bei 16.000 x g, um die Carrier abzutrennen. Das Eluat wird bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

Ernte für die Bestimmungen der Enzymaktivitäten und für die Messung des Glykogengehaltes: Die restlichen Carrieraggregate (ungefähr 50) werden trypsinisiert, um die Mikrocarrier zu verdauen. Dazu wäscht man die Carrieraggregate zweimal mit PBS und gibt dann je Zellkulturflasche 10 ml Trypsinlösung durch einen Sterilfilter hinzu. Die Trypsinierung erfolgt im Inkubationsschrank bei 37°C unter Schütteln. Nach 15 Minuten wird die Trypsinreaktion durch Zugabe von 1 ml Trypsininhibitorlösung beendet.

Anschließend werden die abgelösten Zellen zweimal mit kaltem PBS (0°C) gewaschen und in ca. 300 µl PBS resuspendiert. Die Suspension wird in flüssigem

Stickstoff eingefroren.

Zur Homogenisation wird die Zellsuspension während des Wiederauftauens mit PMSF-Ethanollösung versetzt (Endkonzentration PMSF 0,5 mM). Die aufgetaute Zellsuspension wird im Eisbad mit 3 x 3 Ultraschallimpulsen von je 1 Sekunde homogenisiert (20 kHz, Leistung max. 2 W). Das Homogenat wird in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C aufbewahrt.

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

Trypsinlösung: 0,125% (w/v) "Trypsin 1:250" (GIBCO)
in HEPES-Puffer pH 7,9

Trypsininhibitorlösung: 0,1375% (w/v) Trypsininhibitor aus Sojabohnen
(Invitrogen life technologies) in PBS

PMSF-Ethanollösung: 0,15 M PMSF in Ethanol

HEPES-Puffer pH 7,9:	10,0 mM	HEPES
	145,0 mM	Natriumchlorid
	2,5 mM	Kaliumchlorid
	1,8 mM	Calciumchlorid
	1,0 mM	Magnesiumsulfat

SEMIQUANTITATIVE RT-PCR

Präparation der Gesamt-RNA von Zellen aus der Primärzellkultur

Für die Präparation der Gesamt-RNA der Zellen von 10 - 20 Carrieraggregaten wird das "RNeasy Protect Mini Kit" (QIAGEN) in Kombination mit den "QIAshredder"-Säulen (QIAGEN) zur Homogenization der Zellen und dem "RNase-Free DNase Set" (QIAGEN) zum Verdau genomischer DNA verwendet. Dabei verfährt man genau nach den Angaben des Herstellers. Die isolierte RNA wird bei -80°C gelagert.

Photometrische Bestimmung der RNA-Konzentration

Aus der Absorption einer RNA-Probe bei 260 nm Wellenlänge lässt sich die RNA-Konzentration nach folgender Formel abgeschätzt: RNA-Konzentration [$\mu\text{g/ml}$] = Absorption der Probe bei 260 nm x 40 x Verdünnungsfaktor.

Reverse Transkription

Die reverse Transkription wird mit dem "Omniscript Reverse Transcriptase"-Kit (QIAGEN) durchgeführt. In einen 20 μl -Reaktionsansatz für die reverse Transkription werden 1,5 μg Gesamt-RNA eingesetzt. Die RNA wird mit RNase-freiem Wasser auf 10 μl aufgefüllt, 5 Minuten bei 65°C erhitzt, um Sekundärstrukturen aufzuschmelzen, und anschließend sofort im Eisbad abgekühlt. Dann gibt man 10 μl RT-Mastermix hinzu und inkubiert den Reaktionsansatz 60 Minuten bei 37°C.

RT-Mastermix:	3,1 μl	nukleasefreies Wasser (Ambion)
	2,0 μl	10x RT-Puffer (QIAGEN)
	3,0 μl	dNTP-Mix, 5 mM von jedem dNTP (QIAGEN)
	0,4 μl	"Random Decamer Primers" 50 μM (Ambion)
	0,5 μl	RNAse-Inhibitor 40 U/ μl (MBI Fermentas)
	1,0 μl	Omniscript Reverse Transkriptase 4 U/ μl (QIAGEN)

Die resultierende cDNA wird bei -80°C aufbewahrt.

Multiplex-PCR

Damit die PCR-Ergebnisse normiert werden können, enthält jeder PCR-Ansatz zwei Primerpaare; eines um die zu untersuchende cDNA zu amplifizieren und eines zur internen Normierung der Probe. Die Normierung erfolgt über Primer für 18S-cDNA, da der Großteil der isolierten RNA aus rRNA besteht und man deshalb davon ausgeht, daß die Menge der rRNA von Probe zu Probe ungefähr gleich bleibt. Durch den hohen Anteil von 18S-cDNA in den RT-Reaktionsansätzen ist es nötig die Amplifizierungseffizienz für die 18S-cDNA in der PCR zu reduzieren. Dazu benutzt man das "QuantumRNA 18S Internal Standards"-Kit von Ambion. Es enthält sogenannte "18S Competimer", die an ihrem 3'-Ende modifiziert wurden, um die Verlängerung durch DNA-Polymerasen zu verhindern. Auf diese Weise kann die Effizienz für die Amplifikation der 18S-cDNA so weit reduziert werden, bis die exponentielle Phase für die Amplifikation des internen 18S-Standards in dem gleichen Zyklusbereich liegt, wie die exponentielle Phase der zu untersuchenden cDNA.

Für die relative Quantifizierung der PCR-Produkte ist es wichtig, daß die Amplifizierung der PCR-Produkte in der exponentiellen Phase der PCR stattfindet. Aus diesem Grund wird für jede neue Charge Primärzellen in einem Vorversuch die exponentielle Phase für jedes Primerpaar neu ermittelt. Damit auch die 18S-cDNA exponentiell amplifiziert wird, werden in diesem Vorversuch auch die 18S Primer-Competimer-Verhältnisse neu bestimmt.

PCR-Reaktionsansatz:	33,75 µl	nukleasefreies Wasser (Ambion)
	5,0 µl	10x PCR-Puffer (QIAGEN)
	4,0 µl	Primer-Mix, je 5 µM fwd- und rev-Primer (MWG-Biotech AG)
	4,0 µl	18S Primer-Competimer-Mix 5 µM (Ambion)
	2,0 µl	RT-Reaktionsansatz
	1,0 µl	dNTP-Mix, 10 mM von jedem dNTP (MBI Fermentas)
	0,25 µl	HotStarTaq DNA Polymerase 5 U/µl (QIAGEN)

PCR-Programm für die HotStarTaq Polymerase: 95°C für 16 Minuten
 25 - 40 Zyklen bestehend aus:
 94°C für 1 Minute
 60°C für 1 Minute
 72°C für 1 Minute
 72°C für 10 Minuten
 4°C Wartestellung

Die PCR wird in einem "Mastercycler gradient" der Firma Eppendorf durchgeführt.

Verwendete Primer

Name:	Genbank- Accession:	Position PCR- Produkt:	Sequenz:
GAPDH_fwd	L23961	916 - 1127	5'-CCT GCG ACT TCA ACA GTG C-3'
GAPDH_rev			5'-GCC TCT CGT CCT CCT CTG-3'
PGC-1_fwd	AB025784	292 - 553	5'-CAA ACT TGC TAG CGG TCC TC-3'
PGC-1_rev			5'-GTG TGG TTT GCA TGG TTC TG-3'
Fumarase_fwd	NM_017005	1291 - 1493	5'-TGC TTC AGT GTC CTT CAC AG-3'
Fumarase_rev			5'-TGA GAT AGC CAA GTT CAA TAG CC-3'
MHC-I_fwd	K02444	391 - 599	5'-ACG GAA CAT CAA GGG GAA G-3'
MHC-I_rev			5'-CTT TGC CCT TCT CCA CAG G-3'
MHC-II _d _fwd	U32574	1917 - 2096	5'-TGA AGA CTC TGG CCT TCC TC-3'
MHC-II _d _rev			5'-TGA TCG ACC GTA CAA AGT GG-3'

Alle verwendeten Oligonukleotide wurden mit Hilfe der Programme Primer3 und MultAlin erstellt und von der MWG-Biotech AG bezogen.

Horizontale Polyacrylamidgelelektrophorese von PCR-Produkten

Trenngel:	6,41 ml	Bidest
	1,0 ml	Glycerin 100%
	2,8 ml	5x TBE-Puffer
	3,76 ml	Acrylamid-Bisacrylamidlösung C = 5%
	9,5 µl	TEMED
	0,06 ml	Ammoniumpersulfatlösung 10% (w/v)
Sammelgel:	6,07 ml	Bidest
	0,2 ml	Orange-G-Lösung 0,3% (w/v)
	2,0 ml	5x TBE-Puffer
	1,67 ml	Acrylamid-Bisacrylamidlösung C = 5%
	7,0 µl	TEMED
	0,06 ml	Ammoniumpersulfatlösung 10% (w/v)

Die angegebenen Mengen reichen für ein Gel von 26 cm Breite, 12,5 cm Höhe und 0,5 mm Dicke. Für die horizontale Polyacrylamidgelelektrophorese wässert man zunächst eine hydrophile Trägerfolie 10 Minuten in Bidest, auf der das Gel später aufpolymerisiert. Diese Folie wird anschließend getrocknet und mit etwas Bidest als Haftmittel auf diejenige Glasplatte der Gießkassette ohne Dichtung und Geltaschen aufgedrückt. Dann wird die Gießkassette zusammengebaut. Das Trenngel wird bis ca. 1 cm unter die Taschen für den Probenauftrag gegossen. Das Sammelgel wird sofort im Anschluß tropfenweise über das Trenngel geschichtet.

Das auspolymerisierte Gel löst man aus der Gießkassette und legt es mit der Trägerfolie nach unten auf die Kühlplatte (15°C) der Elektrophoreseapparatur (Pharmacia Biotech). Als Kühlungsvermittler dient ein dünner Film Petroleum zwischen Kühlplatte und Trägerfolie. Als Laufpuffer wird 5x TBE-Puffer auf Pappstreifen (26 cm x 3,5 cm) verwendet, die oben und unten auf das Gel gelegt werden.

Die Proben aus der PCR und der DNA-Standard werden 1:5 mit Auftragspuffer vermischt und aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgt 20 Minuten bei Maximalwerten von 200 V und 15 mA, gefolgt von 50 Minuten bei max. 375 V und 30 mA und 35 Minuten bei max. 450 V und 30 mA.

5x TBE-Puffer: 250 mM Tris
250 mM Borsäure
5 mM EDTA

Acrylamid-Bisacrylamidlösung C = 5%: 28,4% (w/v) Acrylamid
1,6% (w/v) Bisacrylamid

Auftragspuffer: 0,004% (w/v) Bromphenolblau in 5x TBE-Puffer

DNA-Standard: "Low DNA Mass Ladder" (Invitrogen life technologies). Dieser Standard enthält DNA-Fragmente von 100, 200, 400, 800, 1200 und 2000 Basenpaaren Länge in bekannter Konzentration. Aus dem Auftragsvolumen kann so die DNA-Masse in jeder Bande des Standards errechnet werden.

Silberfärbung von PCR-Produkten

Für die Silberfärbung (modifiziert nach Bassam *et al.* 1991) von DNA- und Proteinbanden in Polyacrylamidgelen fixiert man das Gel zuerst 45 Minuten lang in 10% (v/v) Essigsäure. Anschließend wird es dreimal 5 Minuten in Bidest gewaschen und 60 Minuten in Färbelösung inkubiert. Nach der Färbung spült man die Silberlösung zügig mit Bidest aus der Spritzflasche vom Gel und entwickelt die Silberfärbung unter Sichtkontrolle. Sind alle Banden ausreichend gefärbt, ersetzt man den Entwickler durch Stopplösung. Um ein Nachfärben des Gels zu verhindern, inkubiert man es über Nacht in Stopplösung. Anschließend kann es zur Archivierung 30 Minuten in 10% (w/v) Glycerinlösung imprägniert und mit einer feuchten Cellophanfolie (Amersham Biosciences) als Abdeckung getrocknet werden.

Färbelösung: 0,1% (w/v) Silbernitrat
0,1% (v/v) Formaldehydlösung (37% w/v)

Entwickler: 2,5% (w/v) Natriumcarbonat
0,1% (v/v) Formaldehydlösung (37% w/v)
0,002% (w/v) Natriumthiosulfat-5-hydrat

Stopplösung:	2,0% (w/v)	Glycin
	0,5% (w/v)	EDTA (Dinatriumsalz-dihydrat)

Auswertung

Zur Quantifizierung der Färbeintensität der Banden wird das Gel mit Hilfe der Auswertungssoftware "ImageMaster 1D" (siehe "Verwendete Computerprogramme") eingescannt und der Scan anschließend bearbeitet. Die Banden des DNA-Standards dienen bei der Quantifizierung zur Erstellung einer Eichgerade.

WESTERN BLOTTING

Proteinbestimmung nach Lowry

Vor dem *Western Blotting* wird zunächst die Proteinkonzentration der Proben bestimmt (Methode nach Lowry *et al.* 1951). Dazu füllt man 5 - 15 µl der Proben zunächst mit Bidest auf 1 ml auf. Die Zeitintervalle der folgenden Arbeitsschritte sollen für alle Proben genau eingehalten werden:

- 100 µl DOC-Lösung hinzupipettieren, mischen, 10 Minuten inkubieren,
- 100 µl TCA-Lösung zugeben, mischen,
- 10 Minuten bei 16.000 x g zentrifugieren,
- Überstände verwerfen, Reaktionsgefäße kräftig ausschütteln,
- 1 ml Waschlösung zugeben,
- 10 Minuten bei 16.000 x g zentrifugieren,
- Überstände verwerfen, Reaktionsgefäße kräftig ausschütteln,
- 500 µl Lowry-Reagenz (Sigma) auf die Pellets pipettieren, mischen, 20 Minuten inkubieren,
- 250 µl Folin-Gebrauchslösung zugeben, mischen, 60 Minuten inkubieren.

Anschließend wird die Absorption der Proben bei 750 nm gemessen.

Für die Eichkurve werden, anstelle der Proben, Verdünnungen eines Standards aus BSA (0,4 mg/ml, Sigma) verwendet. Der Proteingehalt der Eichwerte soll zwischen 0 und 50 µg liegen.

DOC-Lösung:	3,47 mM Natriumdesoxycholat
TCA-Lösung:	4,4 M Trichloressigsäure
Waschlösung:	DOC-Lösung, TCA-Lösung und Bidest im Verhältnis 1:1:12
Folin-Gebrauchslösung:	Folin & Ciocalteu`s Phenol Reagenz 2 N (Sigma) und Bidest im Verhältnis 1:6

Polyacrylamidgelelektrophorese der Zellproteine

Trenngel:	1,0 ml	Bidest
	3,75 ml	Gelpuffer pH 8,8
	1,38 ml	Glycerin 100%
	4,0 ml	Acrylamid-Bisacrylamidlösung C = 1%
	6,7 µl	TEMED
	0,04 ml	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-Bisacrylamidlösung C = 1%
	6,7 µl	TEMED
	0,04 ml	Ammoniumpersulfatlösung 10% (w/v)

Die angegebenen Mengen reichen für ein Gel von 9 cm Breite, 9 cm Höhe und 1 mm Dicke. Das Trenngel wird bis ca. 2 cm unter die Taschen für den Probenauftrag gegossen. Das Sammelgel wird sofort im Anschluß tropfenweise über das Trenngel geschichtet.

Vor dem Probenauftrag werden die Proteinkonzentrationsunterschiede der Proben mit Probenpuffer ausgeglichen und die Proben 3 Minuten auf 95°C erhitzt. Der verwendete Proteinstandard ist gebrauchsfertig und wird ohne vorheriges Erhitzen aufgetragen.

Die Elektrophorese erfolgt 60 Minuten bei Maximalwerten von 250 V und 15 mA, gefolgt von 60 Minuten bei max. 250 V und 20 mA.

Gelpuffer pH 8,8: 1,5 M Tris
0,4% (w/v) Natriumdodecylsulfat
0,001% (w/v) Natriumazid

Gelpuffer pH 6,8: 0,5 M Tris
0,4% (w/v) Natriumdodecylsulfat
0,001% (w/v) Natriumazid

Acrylamid-Bisacrylamidlösung C = 1%: 29,7% (w/v) Acrylamid
0,3% (w/v) Bisacrylamid

Elektrophoresespuffer pH 8,8: 0,025 M Tris
0,2 M Glycin
0,1% (w/v) Natriumdodecylsulfat
0,001% (w/v) Natriumazid

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

Proteinstandard: "BenchMark Protein Ladder" (Invitrogen life technologies). Dieser Standard enthält 15 Proteine mit einem Molekulargewicht von 10 bis 220 kDa.

Halbtrockenblot mit diskontinuierlichem Puffersystem

Um die Proteinbanden aus dem Polyacrylamidgel auf die Nitrozellulosemembran zu transferieren wird ein Stapel aus puffergetränkten Fließpapieren, Nitrozellulosemembranen und dem Polyacrylamidgel in einem Elektrobloßgerät aufgebaut. Die Reihenfolge der einzelnen Lagen ist:

Kathode,
3 Lagen Fließpapier mit Kathodenpuffer getränkt,
Polyacrylamidgel,
2 Nitrozellulosemembranen,
2 Lagen Fließpapier mit Anodenpuffer II getränkt,
2 Lagen Fließpapier mit Anodenpuffer I getränkt,
Anode.

Der Transfer erfolgt bei max. 12 V und 100 mA für 90 Minuten.

Kathodenpuffer:	40 mM	6-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

Indian Ink Färbung

Nach dem Transfer der Proteine vom Gel auf die Nitrozellulosemembranen werden sämtliche Proteine auf der zweiten, äußeren Membran mit Indian Ink angefärbt, um die Transfereffizienz zu überprüfen.

- 20 Minuten waschen in PBS-Tween,
- 10 Minuten inkubieren in Natronlauge 0,2 M,
- kurz waschen in PBS-Tween,
- ca. 30 Minuten färben in frisch filtrierter Indian Ink Lösung,
- kurz waschen in PBS-Tween,
- Membran an der Luft trocknen.

PBS-Tween:	167 mM	Natriumchlorid
	20,4 mM	Dinatriumhydrogenphosphat
	1,7 mM	Natriumdihydrogenphosphat
	0,025% (v/v)	Tween 20

Indian Ink Lösung:	250 ml	PBS-Tween
	2,5 ml	Essigsäure
	0,25 ml	Pelikan-Tinte "Indian Ink"

Antikörpermarkierung und ECL-Detektion der gesuchten Proteine

Ist der Transfer gelungen, erfolgt die Inkubation der ersten, inneren Nitrozellulosemembran mit primären und sekundären Antikörpern und die Detektion der sekundären Peroxidase-konjugierten Antikörper mittels ECL. Dazu werden die folgenden Schritte durchgeführt:

- 30 Minuten waschen in PBS-Tween,
- 45 Minuten blockieren in Milchpulverlösung,
- 2 Stunden inkubieren mit primärem Antikörper 1:1000 in Milchpulverlösung,
- dreimal 10 Minuten waschen in PBS-Tween,
- 1 Stunde inkubieren mit sekundärem Antikörper 1:5000 in Milchpulverlösung,
- dreimal 10 Minuten waschen in PBS-Tween.

Für die Detektion wird das "SuperSignal"-Kit von Pierce Biotechnology verwendet. Die immunologisch markierten *Western Blotting*-Membran wird in der Dunkelkammer 5 Minuten in einer 1:1-Mischung aus der SuperSignal-Luminol-Lösung und der SuperSignal-Peroxid-Lösung inkubiert. Dann wird ein Röntgenfilm aufgelegt und anschließend entwickelt.

PBS-Tween:	167 mM	Natriumchlorid
	20,4 mM	Dinatriumhydrogenphosphat
	1,7 mM	Natriumdihydrogenphosphat
	0,025% (v/v)	Tween 20

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

Für das *Western Blotting* verwendete Antikörper

- anti-Akt-Antikörper aus Kaninchen von Cell Signaling Technology: polyklonaler affinitätsaufgereinigter Antikörper, der Akt1, Akt2 und Akt3 unabhängig von ihrem Phosphorylierungsstatus erkennt.
- anti-AMPK β -Antikörper aus Kaninchen von United States Biological: polyklonaler affinitätsaufgereinigter Antikörper, der beide Isoformen (AMPK β -1 und AMPK β -2) der regulatorischen β -Untereinheit von AMPK bindet.
- anti-GSK-3 β -Antikörper aus Kaninchen von Cell Signaling Technology: polyklonaler affinitätsaufgereinigter Antikörper, der GSK-3 β unabhängig davon erkennt, ob es an Ser9 phosphoryliert ist.
- anti-Kaninchen IgG (H + L) peroxidasekonjugierter Antikörper aus Ziegen von Calbiochem: sekundärer, an Meerrettichperoxidase gekoppelter und affinitätsaufgereinigter Antikörper.
- anti-Phospho-Akt-Antikörper (Thr308) aus Kaninchen von Cell Signaling Technology: polyklonaler affinitätsaufgereinigter Antikörper, der Akt nur dann bindet, wenn es an Thr308 phosphoryliert ist.
- anti-Phospho-AMPK α -Antikörper (Thr172) aus Kaninchen von Cell Signaling Technology: polyklonaler affinitätsaufgereinigter Antikörper, der beide Isoformen der katalytischen α -Untereinheit von AMPK bindet (AMPK α -1 und AMPK α -2), wenn diese an Thr172 phosphoryliert sind. Die regulatorischen β - und γ -Untereinheiten werden nicht erkannt.
- anti-Phospho-GSK-3 β -Antikörper (Ser9) aus Kaninchen von Cell Signaling Technology: polyklonaler affinitätsaufgereinigter Antikörper, der nur an Ser9 phosphoryliertes GSK-3 β bindet. Phospho-GSK-3 α wird nicht erkannt.

BESTIMMUNG VON ENZYMAKTIVITÄTEN

Proteinbestimmung nach Oyama und Eagle

Zur Ermittlung der spezifischen Enzymaktivitäten wird als erstes die Proteinkonzentration der Proben bestimmt (Vorschrift nach Oyama und Eagle 1956). Dazu inkubiert man 50 μ l verdünntes Zellhomogenat (meist 1:20 in PBS) mit 0,25 ml Lösung C vier Stunden lang bei Raumtemperatur. Dann fügt man 1 ml Lösung C und 0,1 ml Folin-Lösung hinzu und inkubiert für weitere 30 Minuten. Anschließend wird

die Absorption der Proben bei 660 nm gemessen.

Für die Eichkurve werden, anstelle des Zellhomogenates, Verdünnungen eines Standards aus BSA in Lösung C verwendet. Der Proteingehalt der Eichwerte soll zwischen 0 und 90 µg liegen.

Lösung A:	2,0% (w/v)	Natriumcarbonat
	0,4% (w/v)	Natriumhydroxid
	0,02% (w/v)	Natriumtartrat

Lösung B: 20 mM Kupfersulfat

Lösung C: Lösung A und Lösung B im Verhältnis 51:1

Folin-Lösung: Folin-Ciocalteus Phenolreagenz (Merck)
und Bidest im Verhältnis 1:2,4

Enzymaktivität von GAPDH

Zur Bestimmung der spezifischen Enzymaktivität von GAPDH (Methode modifiziert nach Bergmeyer 1983) pipettiert man pro Messung den folgenden Testansatz:

618 µl	Triethanolamin 0,1 M pH 7,6
50 µl	3-Phospho-Glycerat 90 mM (Tricyclohexylammoniumsalz, Roche)
25,0 µl	EDTA 27 mM in 0,1 M Triethanolamin
12,5 µl	Magnesiumsulfat 0,1 M
12,5 µl	NADH 14 mM (Roche)
4,6 µl	Phosphoglyceratkinase 5600 U/ml (Sigma)
25,0 µl	ATP 36 mM (Roche)

Nach fünfminütiger Vorinkubation bei 30°C gibt man 10 µl verdünntes Zellhomogenat mit 5 mM DTT dazu (Zellhomogenat in PBS auf ca. 1 g/l Protein, dann 1:2 mit 10 mM DTT) und mißt die Extinktionänderung mit der Zeit bei 340 nm.

Die Berechnung der spezifischen Aktivität erfolgt nach: spez. Aktivität [U/g] = (Extinktionsänderung ΔE x Volumen in der Küvette [ml] x Verdünnungsfaktor für das Zellhomogenat x 1000) / (Probenvolumen [ml] x Dicke der Küvette [cm] x Zeit [min] x Proteinkonzentration [mg/ml] x 6300 [ml x mmol⁻¹ x cm⁻¹]).

Enzymaktivität von Citratsynthase

Zur Messung der spezifischen Citratsynthaseaktivität (modifiziert nach Bass *et al.* 1969) pipettiert man den folgenden Reaktionsansatz in eine Halbmikroküvette:

500 μ l	TE-Puffer pH 8,0
50 μ l	NAD ⁺ 75 mM (Roche)
50 μ l	L-Maleinsäure 90 mM
50 μ l	Malatdehydrogenase 1070 U/ml in TE-Puffer mit 50% (v/v) Glycerin (Roche)
50 μ l	verdünntes Zellhomogenat (mit PBS auf ca. 2 g/l Protein)

Nach fünfminütiger Inkubation bei 30°C gibt man 50 μ l Acetyl-CoA-Lösung 3,3 mM (Roche) dazu und mißt die Extinktionsänderung mit der Zeit bei 340 nm.

Die Berechnung der spezifischen Aktivität erfolgt nach: spez. Aktivität [U/g] = (Extinktionsänderung ΔE x Volumen in der Küvette [ml] x Verdünnungsfaktor für das Zellhomogenat x 1000) / (Probenvolumen [ml] x Dicke der Küvette [cm] x Zeit [min] x Proteinkonzentration [mg/ml] x 6300 [ml x mmol⁻¹ x cm⁻¹]).

TE-Puffer pH 8,0:	0,15 M	Tris
	3,75 mM	EDTA
	0,3% (w/v)	Triton X-100

BESTIMMUNG VON METABOLITKONZENTRATIONEN

Messung des Glykogengehalts

Zur Messung des Glykogengehalts der Proben (Methode nach Katz *et al.* 1976) wird zunächst die freie Glukose in den Zellhomogenaten zerstört. Dazu werden 80 µl unverdünntes Zellhomogenat mit 176 µl 0,4 M KOH vermischt und 15 Minuten bei 100°C inkubiert. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wird der pH-Wert der Proben mit 1 M Zitronensäure auf 4,9 eingestellt (+ ca. 33 µl).

Dann wird das Glykogen in den Proben enzymatisch in Glukose umgewandelt. Dafür inkubiert man 120 µl der glukosefreien Proben (pH 4,9) mit 120 µl Amyloglucosidase 300 U/ml (Roche) 2 Stunden lang bei 40°C. Alle 30 Minuten werden die Proben geschüttelt. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur werden die Proben durch Zugabe von Neutralisationspuffer (+ ca. 15 µl) neutralisiert (pH 6 - 7,5). Anschließend zentrifugiert man 4 Minuten bei 10.000 x g und mißt die Glukose im Überstand. Dazu inkubiert man 100 µl des Überstandes 10 Minuten mit 900 µl Meßpuffer pH 7,5 und mißt anschließend die Absorption bei 340 nm.

Da Glykogenmoleküle unterschiedlich lang sind, wird die Glykogenkonzentration von Eichwerten und Proben in mmol/l Glukose aus Glykogen ausgedrückt. Für die Eichkurve werden anstelle des Zellhomogenates Verdünnungen eines Glykogenstandards (2,5 mM Glukose aus Glykogen) eingesetzt. Die Glukosekonzentration dieser Verdünnungen soll zwischen 0 und 2,5 mM liegen. Die Normierung der Meßwerte erfolgt auf Proteingehalt der Proben in g/l.

Neutralisationspuffer:	1,4 M	KOH
	0,1 M	Triethanolamin
Meßpuffer pH 7,5:	0,33 mM	NADP ⁺ (Roche)
	3,0 mM	ATP (Roche)
	0,9 U/ml	Glukose-6-phosphat-dehydrogenase (Roche)
	0,75 U/ml	Hexokinase (Roche) in Tris-Mg-Puffer pH 7,5
Tris-Mg-Puffer pH 7,5:	0,2 M	Tris
	2,0 mM	Magnesiumchlorid

Ermittlung der ATP-Konzentration

Die ATP-Konzentration in den Zellen wird mit dem "ATP-Determination-Kit" von Molecular Probes über eine Luziferin-Luziferase-Reaktion bestimmt.

Um eine Veränderung der intrazellulären ATP-Konzentration nach der Versuchsdurchführung (z.B. Elektrostimulation) zu verhindern, werden die einzelnen Carrieraggregate sofort im Anschluß in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Anschließend werden sämtliche Proteine und somit auch alle ATP-umsetzenden Enzyme durch die Zugabe von 100 µl Perchlorsäure (1,66 M) pro Carrieraggregat ausgefällt und 3 Minuten bei 16.000 x g abzentrifugiert. Dann werden 80 µl des Überstandes durch Zugabe von 30 µl Bicine-Lösung (1 M) abgepuffert und mit Kaliumhydroxidlösung (4 M) auf einen pH-Wert von 7,6 - 8,0 gebracht. Die Pellets werden zur späteren Proteinbestimmung wieder in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Der neutralisierte Zellüberstand wird 3 Minuten bei 16.000 x g zentrifugiert. Dann werden 80 µl abgenommen und erneut 3 Minuten bei 16.000 x g zentrifugiert, um Salzreste zu entfernen. Der Überstand wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bis zur Messung auf Eis aufbewahrt.

Die Meßlösung wird nach den Angaben des Herstellers hergestellt. Sie enthält:

25,0 mM	Tricin,
5,0 mM	Magnesiumsulfat,
1,0 mM	DTT,
0,1 mM	EDTA,
0,5 mM	D-Luziferin und
1,25 µg/ml	<i>firefly</i> -Luziferase. Der pH-Wert beträgt 7,8.

100 µl dieser Meßlösung werden mit einem Luminometer (Lumat LB 9507, Berthold Technologies) zu 10 µl Probe injiziert. Dann werden nach einer Verzögerungszeit von 2 Sekunden die relativen Lichteinheiten pro Sekunde (RLU/s) gemessen.

Für die Eichkurve werden, anstelle der Proben, Verdünnungen eines Standards aus ATP (5 mM, Molecular Probes) verwendet. Die Ausgangs-ATP-Konzentration der Eichproben soll zwischen 0 und 100 µM liegen. Die Normierung der Meßwerte erfolgt auf Proteingehalt der Proben in g/l.

INTRAZELLULÄRE LOKALISATION

Immunfluoreszenz

Für die intrazelluläre Lokalisation von HIF-1 α werden die adulten Myotuben mit "Accutase" (PAA Laboratories GmbH) von den Microcarriern abgelöst und je 10⁴ Zellen pro rundes Deckgläschen von 12 mm Durchmesser (Assistent) ausgesät. Sind die Zellen adhären, können sie entsprechend des Versuchsplans behandelt und anschließend fixiert und immunfluoreszenzmarkiert werden.

Damit sich die Zellen vor der Fixierung nicht ablösen, wäscht man sie dreimal durch einen halben Mediumwechsel mit PBS (PAA Laboratories GmbH). Anschließend folgt man diesem Protokoll:

- 20 Minuten fixieren in 3% (w/v) PFA in PBS,
- dreimal waschen in PBS,
- 10 Minuten inkubieren in 50 mM Ammoniumchlorid in PBS,
- dreimal waschen in PBS,
- exakt 5 Minuten permeabilisieren in 0,1% (v/v) Triton X-100 in PBS,
- dreimal waschen in PBS,
- exakt 4 Minuten permeabilisieren in 100% Methanol, -20°C,
- dreimal waschen in PBS,
- 30 Minuten blockieren in 5% (v/v) inaktiviertem Ziegen Serum in PBS,
- 30 Minuten inkubieren in primärem Antikörper 1:300 verdünnt in PBS mit 0,2% (w/v) BSA,
- viermal waschen in 1% (w/v) BSA in PBS,
- 30 Minuten inkubieren in sekundärem Antikörper 1:1000 verdünnt in PBS mit 0,2% (w/v) BSA,
- viermal waschen in 1% BSA (w/v) in PBS,
- dreimal waschen in PBS,
- Deckgläschen kurz in Bidest tauchen.

Dann pro Deckglas einen Tropfen Einbettungsmedium auf einen Objektträger geben und das Deckglas luftblasenfrei auf den Tropfen absenken. Über Nacht fest werden lassen.

Einbettungsmedium:	6,0 g	Glycerin 100%
	2,4 g	Mowiol 40-88 (Sigma)
	18,0 ml	0,133 M Trispuffer pH 8,5
	2,5% (w/v)	DABCO

Um das Mowiol 40-88 zu lösen, werden Glycerin, Mowiol 40-88 und Trispuffer unter Rühren auf 50°C erwärmt. Ungelöstes Mowiol 40-88 wird anschließend bei ca. 4000 x g abzentrifugiert. Gebrauchsaliquots (1 ml) werden bei -20°C gelagert. Das DABCO wird dem Einbettungsmedium erst kurz vor der Benutzung zugefügt.

Für die Immunfluoreszenz verwendete Antikörper

- anti-HIF-1 α -Antikörper aus Mäusen von Abcam Limited: monoklonaler affinitätsaufgereinigter Antikörper, der HIF-1 α in verschiedenen posttranslationalen Modifikationen erkennt.
- anti-Maus IgG (H + L) Alexa Fluor 488 aus Ziegen von Molecular Probes: sekundärer fluoreszenzmarkierter Antikörper, Absorptionsmaximum bei ca. 495 nm, Fluoreszenzmaximum bei ca. 519 nm.

VERWENDETE COMPUTERPROGRAMME

Primer3

Dieses Programm sucht Primerpaare mit unterschiedlichen Eigenschaften für eine eingefügte DNA-Sequenz. Es wurde von Steve Rozen geschrieben (Rozen und Skaletsky 2000) und kann im Internet unter http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi verwendet werden.

Multalin

Dieses Programm dient dazu, verschiedene DNA-Sequenzen miteinander zu vergleichen. Es wurde von Florence Corpet entwickelt (Corpet 1988) und kann im Internet unter <http://www.toulouse.inra.fr/multalin.html> benutzt werden.

ImageMaster 1D (Version 3.1)

ImageMaster ist ein kommerzielles Auswerteprogramm von Pharmacia Biotech. Es ermöglicht das Scannen und Quantifizieren von Banden nach der Silberfärbung.

Statistik

Die Varianzanalysen wurden mit dem Programm "Prism 3.0" erstellt. Um signifikant unterschiedliche Gruppen zu identifizieren wurde bei zwei zu vergleichenden Gruppen ein zweiseitiger (two-tailed) Mann-Whitney-Test angewandt.

Sollten mehr als zwei Gruppen miteinander verglichen werden, wurde eine One-Way ANOVA ("*analysis of variance*") gefolgt von einem Newman-Keuls-Post-Test durchgeführt. Gruppen, die mit einer Wahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ zur gleichen Grundgesamtheit gehören, werden als signifikant unterschiedlich bezeichnet.

ERGEBNISTEIL

Das Ziel dieser Dissertation war es, eine metabolische Anpassung adulter Skelettmuskelzellen *in vitro* zu induzieren und anschließend die dazugehörigen Signaltransduktionswege zu untersuchen. *In vivo* erfolgt die Umwandlung von hoher glykolytischer zu hoher oxidativer Stoffwechselkapazität von Muskelfasern nach Ausdauertraining, also langanhaltendem Training bei mäßigen Belastungsstufen.

Um diese Umwandlung untersuchen zu können, mußten zuerst die Bedingungen gefunden werden, die eine solche Stoffwechselumstellung hervorrufen können. Dazu wurden verschiedene Parameter der Muskelzellkultur geändert und anschließend der mRNA-Gehalt und die Enzymaktivität ausgesuchter Stoffwechsellzyme gemessen. Insbesondere wurden die mRNA-Gehalte von GAPDH, Fumarase und PGC-1, sowie die Enzymaktivitäten von GAPDH und Citratsynthase analysiert.

Keine Auswirkung der Elektrostimulation auf die Stoffwechsellzyme bei 21% Sauerstoffgehalt in den Zellkulturinkubatoren

Veröffentlichungen anderer Gruppen haben gezeigt, daß chronische Elektrostimulation von Kaninchenmuskel *in vivo* zu einer Abnahme der spezifischen Enzymaktivität verschiedener glykolytischer Enzyme und zu einer Zunahme der spezifischen Enzymaktivität mitochondrialer Stoffwechsellzyme führt (Pette und Dusterhoft 1992, Mayne *et al.* 1996). In früheren Versuchen unserer Arbeitsgruppe konnte demonstriert werden, daß die Elektrostimulation der primären Myotuben in unserem Zellkulturmodell mit einem Reizmuster von 15 Minuten Reizung bei einer Frequenz von 1 Hz, gefolgt von 30 Minuten Pause, eine Umstellung in der Transkription kontraktile Proteine induziert. 24 Stunden Elektrostimulation unserer primären Skelettmuskelmyotuben mit dem eben genannten Reizmuster führt zu einer Zunahme der Transkription der langsamen Isoform MHC I und zu einer Abnahme der mRNA der schnellen MHC II_d Isoform (Kubis *et al.* 2002). Aus diesem Grund versuchten wir zunächst, eine metabolische Anpassung der Myotuben durch Elektrostimulation mit diesem Reizmuster auszulösen. Es konnten auf diese Weise jedoch keine Änderungen der gemessenen metabolischen Parameter induziert werden.

Der Sauerstoffpartialdruck beeinflusst die Transkription von GAPDH und Fumarase

Unsere ersten Versuche, eine metabolische Umwandlung der primären Skelettmuskelmotoneuronen durch Elektrostimulation zu induzieren waren nicht erfolgreich. Dies zeigte sich dadurch, daß keinerlei Änderungen der analysierten Stoffwechselmarker festgestellt werden konnten. Aus diesem Grund zogen wir die Möglichkeit in Betracht, daß sich in unserem Zellkultursystem während der Stimulation zelluläre Hypoxie einstellt und hierdurch die metabolischen Anpassungsvorgänge unterdrückt sein könnten. Deshalb untersuchten wir als nächstes die Wirkung unterschiedlicher Sauerstoffpartialdrücke auf die Stoffwechselkapazität der Skelettmuskelmotoneuronen. Dazu wurden die Motoneuronen bis zum 14. Tag bei 21% Sauerstoffgehalt (Normoxie) und anschließend 7 weitere Tage bei 3% (Hypoxie) oder 42% (Hyperoxie) Sauerstoffgehalt kultiviert, zunächst ohne gleichzeitige Elektrostimulation.

7-tägige Hypoxie führt zu einem Anstieg des GAPDH mRNA-Gehalts und auch zu einer Zunahme der GAPDH-Enzymaktivität, siehe Abb.3 und 4. Die untersuchte Fumarase mRNA zeigte passend dazu eine Abnahme bei 3% Sauerstoffgehalt im Vergleich zu 42%. Bei der Citratsynthese konnte jedoch keine Reduktion der Enzymaktivität durch Hypoxie erreicht werden.

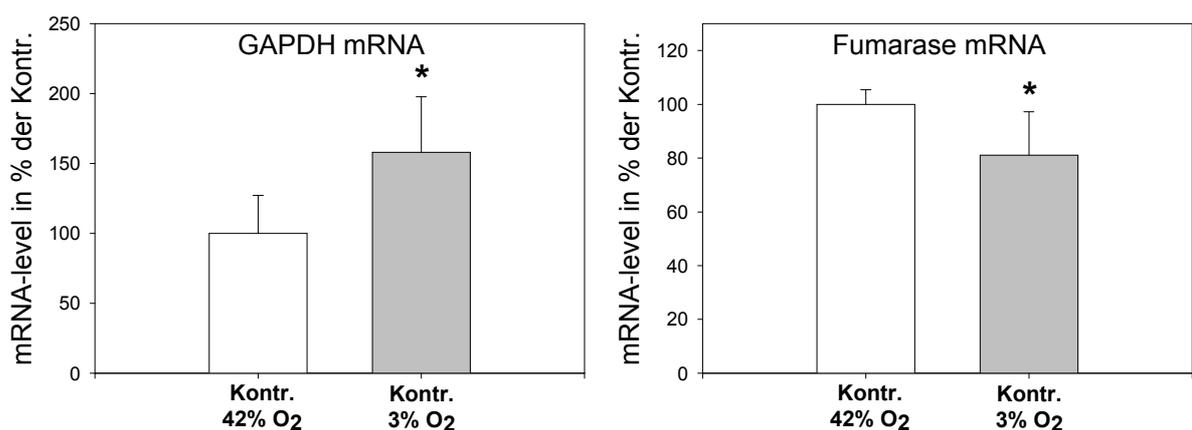


Abb.3: Änderung der GAPDH und Fumarase mRNA-Gehalte durch verschiedene Sauerstoffkonzentrationen

42% O₂ = 42% Sauerstoffgehalt des Inkubators ab dem 14. Tag in Kultur, 3% O₂ = 3% Sauerstoffgehalt des Inkubators ab dem 14. Tag in Kultur. Dargestellt sind Mittelwerte ± SD (n = 6 bzw. 5). *, signifikant unterschiedlich zur Kontrolle bei 42% O₂ mit p < 0,05.

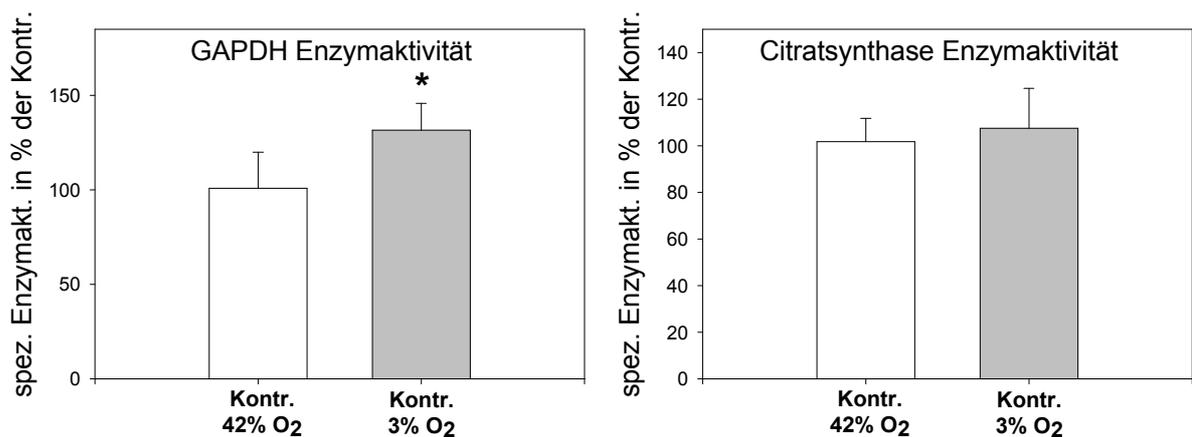


Abb.4: Änderung der GAPDH und Citratsynthase Enzymaktivitäten durch verschiedene Sauerstoffkonzentrationen

42% O₂ = 42% Sauerstoffgehalt des Inkubators ab dem 14. Tag in Kultur, 3% O₂ = 3% Sauerstoffgehalt des Inkubators ab dem 14. Tag in Kultur. Dargestellt sind Mittelwerte ± SD (n = 9). *, signifikant unterschiedlich zur Kontrolle bei 42% O₂ mit $p < 0,05$.

Da sich durch Hypoxie eine Änderung der Transkription von GAPDH und Fumarase induzieren ließ, wurde in einem weiteren Versuch zusätzlich zur Änderung des Sauerstoffpartialdruckes versucht, HIF-1 α (Hypoxie-induzierter Faktor-1 α) zu aktivieren bzw. zu hemmen. Dazu wurden die adulten Myotuben vom 15. bis zum 16. Tag in Kultur in 3% oder 42% Sauerstoffgehalt kultiviert und mit Cobalt- bzw. Cadmiumionen behandelt (je 15 μ M). Cobaltionen verhindern den proteasomalen Abbau von HIF-1 α , während Cadmiumionen den proteasomalen Abbau verstärken sollen (Yuan *et al.* 2003, Chun *et al.* 2000).

Die Auswertung dieses Versuches ergab, daß schon nach einem Tag eine Erhöhung des GAPDH mRNA-Gehalts bei 3% im Vergleich zu 42% Sauerstoffgehalt zu messen ist, siehe Abb.5. Die Zugabe von Cobaltionen bei 42% Sauerstoffgehalt erzeugt im Mittel ebenfalls einen leichten, nicht signifikanten Anstieg der GAPDH mRNA. Die größte Zunahme der GAPDH mRNA ließ sich durch die Kombination von 3% Sauerstoffgehalt und Cobalt erreichen. Cadmiumionen führten sowohl bei 42%, als auch bei 3% Sauerstoffgehalt zu einer dramatischen Abnahme des mRNA-Gehalts von GAPDH.

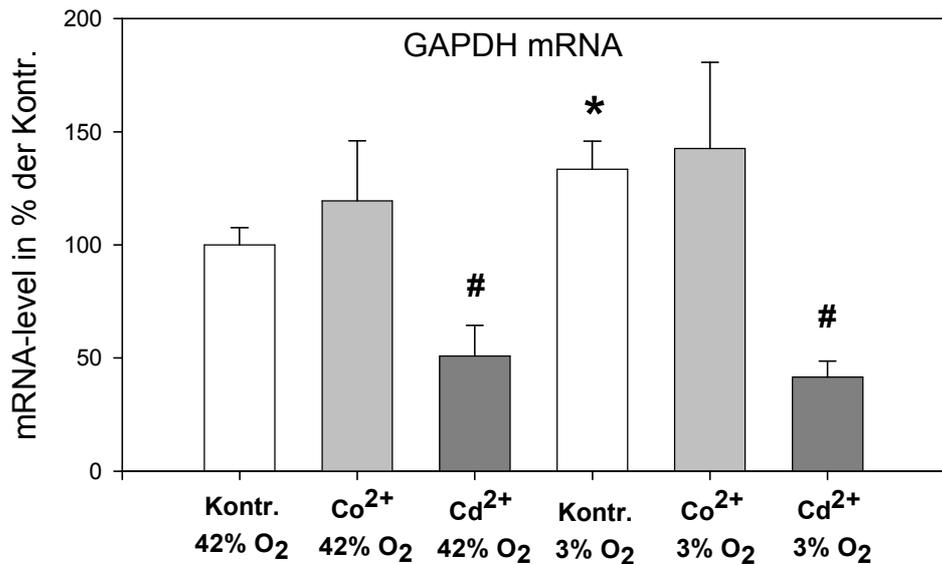


Abb.5: Beeinflussung des GAPDH mRNA-Gehalts durch Sauerstoffgehalt, Cobalt- und Cadmiumzugabe

42% O₂ = 42% Sauerstoffgehalt des Inkubators ab dem 15. Tag in Kultur, 3% O₂ = 3% Sauerstoffgehalt des Inkubators ab dem 15. Tag in Kultur, Kontr. = unbehandelte Myotuben, Co²⁺ = Myotuben 1 Tag lang mit 15 µM Cobaltchlorid inkubiert, Cd²⁺ = Myotuben 1 Tag lang mit 15 µM Cadmiumchlorid inkubiert. Dargestellt sind Mittelwerte ± SD (n = 3). *, signifikanter Unterschied zwischen den Kontrollen bei 42% und 3% O₂. #, signifikant unterschiedlich zur jeweiligen Kontrolle bei gleichem Sauerstoffpartialdruck mit p < 0,05.

Auch die Untersuchung der Fumarase mRNA zeigte, daß der Hypoxieeffekt, in diesem Fall die Abnahme des Fumarase mRNA-Gehalts, schon nach einem Tag deutlich ausgeprägt ist, siehe Abb.6. Außerdem kann auch bei der Transkription von Fumarase durch die Zugabe von Cobaltionen eine ähnliche Wirkung erzeugt werden, wie durch Hypoxie. Die Kombination von Hypoxie und Cobalt führt tendenziell zu einer noch stärkeren Reduktion der Fumarase mRNA, als Hypoxie oder Cobalt allein. Die Zugabe von Cadmiumionen bewirkte allerdings auch bei der Fumarase sowohl bei hohem, als auch bei niedrigem Sauerstoffpartialdruck, eine starke Abnahme des mRNA-Gehalts.

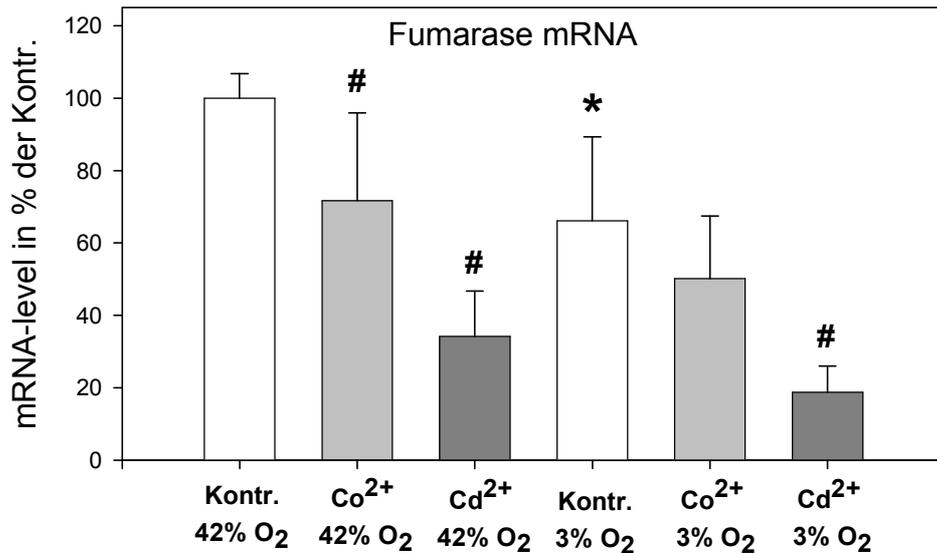


Abb.6: Beeinflussung des Fumarase mRNA-Gehalts durch Sauerstoffgehalt, Cobalt- und Cadmiumzugabe

42% O₂ = 42% Sauerstoffgehalt des Inkubators ab dem 15. Tag in Kultur, 3% O₂ = 3% Sauerstoffgehalt des Inkubators ab dem 15. Tag in Kultur, Kontr. = unbehandelte Myotuben, Co²⁺ = Myotuben 1 Tag lang mit 15 µM Cobaltchlorid inkubiert, Cd²⁺ = Myotuben 1 Tag lang mit 15 µM Cadmiumchlorid inkubiert. Dargestellt sind Mittelwerte ± SD (n = 3). *, signifikanter Unterschied zwischen den Kontrollen bei 42% und 3% O₂. #, signifikant unterschiedlich zur jeweiligen Kontrolle bei gleichem Sauerstoffpartialdruck mit p < 0,05.

Um weitere Hinweise auf die Rolle von HIF-1α im Skelettmuskel zu erhalten, wurden Immunfluoreszenzversuche mit einem Antikörper gegen HIF-1α durchgeführt.

Dazu wurden die Myotuben am 10. Tag der Kultur von den Microcarriern abgelöst und auf Deckgläschen ausgesät. Anschließend wurden sie vom 15. bis zum 16. Tag in 3% oder 42% Sauerstoffgehalt kultiviert und mit Cobalt- oder Cadmiumionen behandelt (150 bzw. 15 µM).

Die Immunfluoreszenzversuche zeigen, daß sich HIF-1α bei 42% Sauerstoffgehalt hauptsächlich im Cytosol aufhält, siehe Abb.7. Bei einer Sauerstoffkonzentration von 3% dagegen ist es ohne die Zugabe von Cobalt oder Cadmium fast ausschließlich in den Zellkernen lokalisiert. Inkubation der Myotuben in cobalthaltigem Medium führt zu einer Verstärkung der Fluoreszenz, die intrazelluläre Verteilung von HIF-1α ändert sich jedoch nicht merklich im Vergleich zu den unbehandelten Myotuben. Cadmium dagegen verhindert den Aufenthalt von HIF-1α im Zellkern; unter dem Einfluß von

15 μM Cadmiumchlorid findet man die Immunfluoreszenzfärbung sogar bei 3% Sauerstoffgehalt ausschließlich im Cytosol.

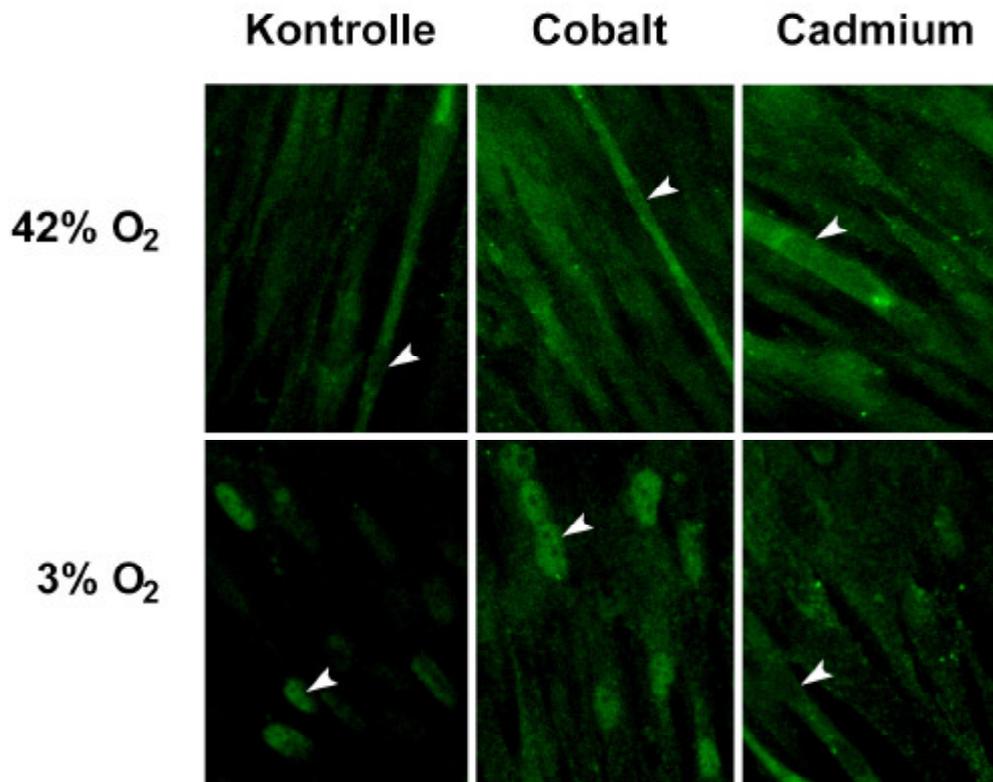


Abb.7: Änderung der intrazellulären Lokalisation von HIF-1a durch unterschiedliche Sauerstoffpartialdrücke, sowie Cobalt- und Cadmiumzugabe

42% O₂ = 42% Sauerstoffgehalt des Inkubators ab dem 15. Tag in Kultur, 3% O₂ = 3% Sauerstoffgehalt des Inkubators ab dem 15. Tag in Kultur, Kontrolle = unbehandelte Myotuben, Cobalt = Myotuben 1 Tag lang mit 150 μM Cobaltchlorid inkubiert, Cadmium = Myotuben 1 Tag lang mit 15 μM Cadmiumchlorid inkubiert. Die Pfeilspitzen markieren Zellkerne, die durchlichtmikroskopisch identifiziert wurden.

Keine Auswirkung der Elektrostimulation auf die Stoffwechsellenzyme bei 42% Sauerstoffgehalt in den Zellkulturinkubatoren

Da die Versuche mit unterschiedlichen Sauerstoffpartialdrücken gezeigt haben, daß es einen deutlichen Einfluß des Sauerstoffangebots auf die Transkription von GAPDH und Fumarase gibt, wurden alle nachfolgenden Versuche bei 42% Sauerstoffgehalt in den Zellkulturinkubatoren durchgeführt. Dies sollte eine mögliche Unterdrückung der metabolischen Umwandlung durch zelluläre Hypoxie vermeiden.

Da Ausdauertraining *in vivo* zu einer Umwandlung des Fasertyps führt, wurden die Myotuben auf den Microcarriern in speziellen Zellkulturflaschen erneut elektrisch stimuliert. Die Stimulation erfolgte mit einer Frequenz von 1 Hz in einem ständig wiederkehrenden Muster von 15 Minuten Stimulation mit anschließender 30-minütiger Pause. Die Myotuben wurden ab dem 14. Tag in Kultur entweder 3 oder 7 Tage lang bei 42% Sauerstoffgehalt elektrisch stimuliert.

Durch die Anwendung dieses Reizmusters wird eine Umwandlung der kontraktilen Proteine von Typ II (schnell kontrahierend) zu Typ I (langsam kontrahierend) erreicht (Kubis *et al.* 2002). Als Marker für einen Wechsel vom schnell kontrahierenden zum langsam kontrahierenden Fasertyp wurden der mRNA-Gehalt von MHC IId (schnelle schwere Kette des Myosins) und MHC I (langsame schwere Kette des Myosins) untersucht. Nach 7 Tagen Elektrostimulation wird eine deutliche Abnahme der MHC IId mRNA und eine starke Zunahme der MHC I mRNA sichtbar, siehe Abb.8.

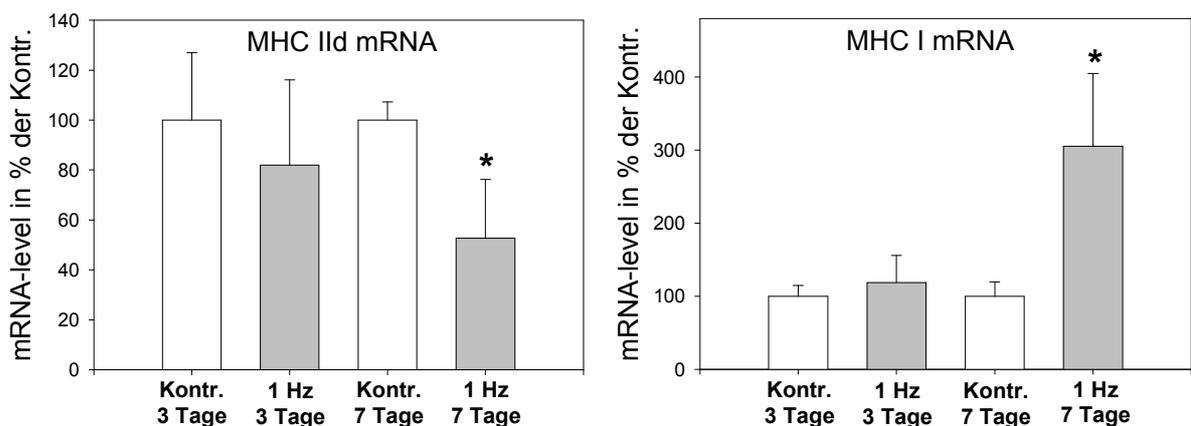


Abb.8: Änderung der MHC IId und MHC I mRNA-Gehalte durch Elektrostimulation der primären Myotuben mit einer Frequenz von 1 Hz

Kontr. = unstimulierte Myotuben, 1 Hz = elektrostimierte Myotuben, 3 Tage = 3 Tage Elektrostimulation oder Kontrollbedingungen ab dem 14. Tag in Kultur, 7 Tage = 7 Tage Elektrostimulation oder Kontrollbedingungen ab dem 14. Tag in Kultur. 42% Sauerstoffgehalt ab dem 14. Tag in Kultur. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD (n = 5 - 11). *, signifikant unterschiedlich zur jeweiligen Kontrolle mit $p < 0,05$.

Eine Änderung der Stoffwechselkapazität in Richtung oxidative Energiebereitstellung kann jedoch auch nicht durch Elektrostimulation bei 42% Sauerstoffgehalt ausgelöst werden, siehe Abb.9 und 10. Sowohl der mRNA-Gehalt, als auch die Enzymaktivität der GAPDH zeigen eher einen Trend zur Zunahme nach der Elektrostimulation,

anstelle der erwarteten Abnahme. Der mRNA-Gehalt der Fumarase ändert sich nicht signifikant und die Citratsynthase Enzymaktivität zeigt nach 7 Tagen eine Abnahme anstatt des zu erwartenden Anstiegs.

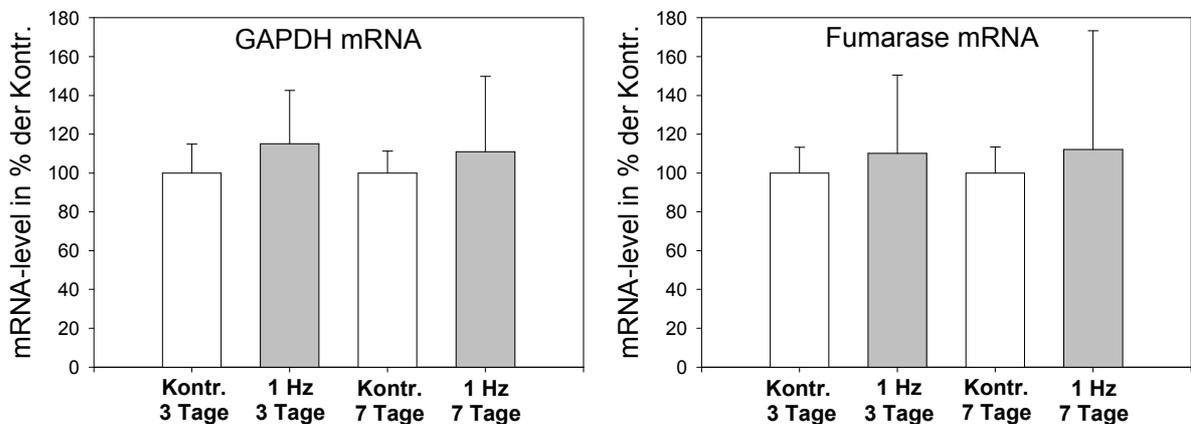


Abb.9: Änderung der GAPDH und Fumarase mRNA-Gehalte durch Elektrostimulation der primären Myotuben mit einer Frequenz von 1 Hz

Kontr. = unstimulierte Myotuben, 1 Hz = elektrostimierte Myotuben, 3 Tage = 3 Tage Elektrostimulation oder Kontrollbedingungen ab dem 14. Tag in Kultur, 7 Tage = 7 Tage Elektrostimulation oder Kontrollbedingungen ab dem 14. Tag in Kultur. 42% Sauerstoffgehalt ab dem 14. Tag in Kultur. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD (n = 5 - 11). *, signifikant unterschiedlich zur jeweiligen Kontrolle mit $p < 0,05$.

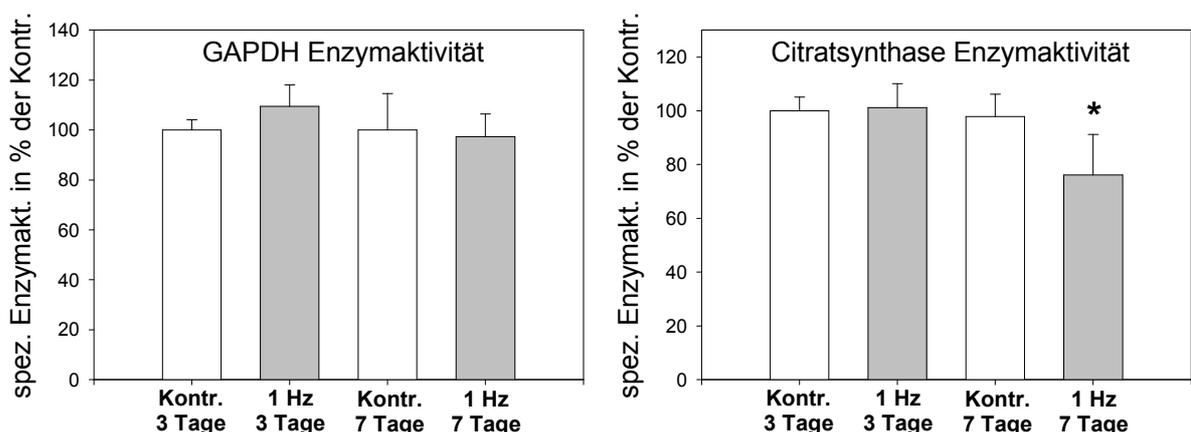


Abb.10: Änderung der GAPDH und Citratsynthase Enzymaktivitäten durch Elektrostimulation der primären Myotuben mit einer Frequenz von 1 Hz

Kontr. = unstimulierte Myotuben, 1 Hz = elektrostimierte Myotuben, 3 Tage = 3 Tage Elektrostimulation oder Kontrollbedingungen ab dem 14. Tag in Kultur, 7 Tage = 7 Tage Elektrostimulation oder Kontrollbedingungen ab dem 14. Tag in Kultur. 42% Sauerstoffgehalt ab dem 14. Tag in Kultur. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD (n = 5 - 12). *, signifikant unterschiedlich zur jeweiligen Kontrolle mit $p < 0,05$.

Auch der Glykogengehalt der Myotuben ändert sich nicht nach 3-tägiger Elektrostimulation mit einer Frequenz von 1 Hz in dem Muster von 15-minütiger Stimulation mit anschließender 30-minütiger Pause, siehe Abb.11. Der einzige untersuchte Stoffwechselmarker, der auf die elektrische Stimulation in der zu erwartenden Richtung reagiert, ist der mRNA-Gehalt von PGC-1, siehe Abb.11. Hier kommt es bereits nach 3 Tagen Reizung mit 1 Hz zu einem deutlichen Anstieg. Nach 7 Tagen Elektrostimulation ist die Zunahme der PGC-1 mRNA jedoch nicht mehr signifikant.

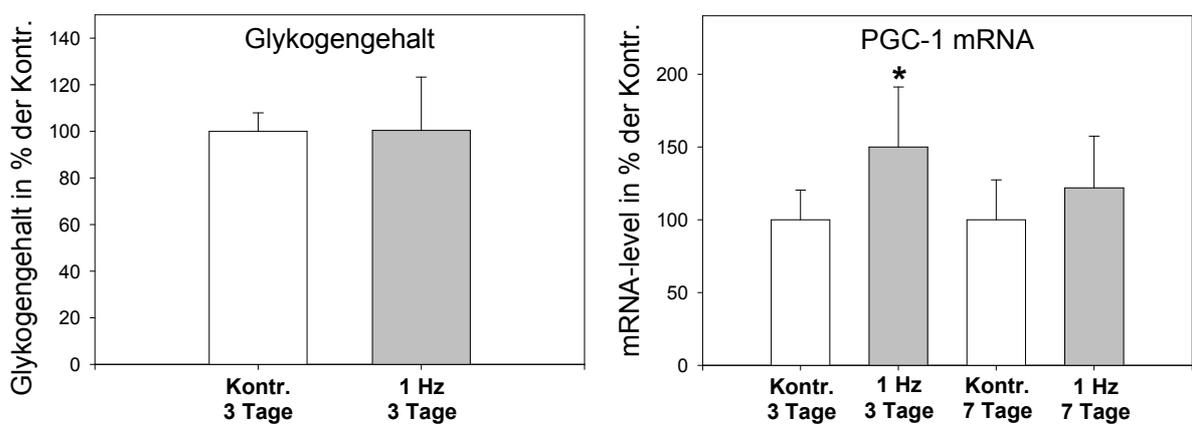


Abb.11: Änderung des Glykogengehaltes und des PGC-1 mRNA-Gehalts durch Elektrostimulation der primären Myotuben mit einer Frequenz von 1 Hz

Kontr. = unstimulierte Myotuben, 1 Hz = elektrostimierte Myotuben, 3 Tage = 3 Tage Elektrostimulation oder Kontrollbedingungen ab dem 14. Tag in Kultur, 7 Tage = 7 Tage Elektrostimulation oder Kontrollbedingungen ab dem 14. Tag in Kultur. 42% Sauerstoffgehalt ab dem 14. Tag in Kultur. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD (n = 5 - 6 bzw. 5 - 11). *, signifikant unterschiedlich zur jeweiligen Kontrolle mit $p < 0,05$.

Zusätzlich zur Stimulation mit einer Frequenz von 1 Hz wurden die Myotuben auch mit 5 Hz elektrostimuliert (15 Minuten 5 Hz gefolgt von 30 Minuten Pause). Die meisten der analysierten Parameter (Glykogengehalt, GAPDH mRNA, GAPDH Enzymaktivität, Fumarase mRNA und Citratsynthase Enzymaktivität) der Myotuben, die 3 Tage mit 5 Hz stimuliert wurden zeigten keine Unterschiede zu den Werten der Kontrollmyotuben. Der PGC-1 mRNA-Gehalt der mit 5 Hz stimulierten Myotuben lag unterhalb des Kontrollniveaus.

7 Tage Stimulation mit einer Frequenz von 5 Hz überstieg die Belastbarkeit der primären Myotuben in diesem Zellkultursystem.

Keine Änderung der untersuchten Stoffwechsellenzyme durch die Absenkung der intrazellulären ATP-Konzentration

Während kontraktile Aktivität steigert sich der ATP-Verbrauch der Skelettmuskelzellen. Durch die Aktivität der Myokinase, die die Reaktion von zwei mol ADP zu je einem mol ATP und einem mol AMP katalysiert, steigt die AMP-Konzentration innerhalb der arbeitenden Muskelzellen. Die Zunahme der Konzentration von AMP führt zur Aktivierung der Proteinkinase AMPK, die eine wichtige Rolle bei der Steigerung der Expression vieler mitochondrialer Enzyme spielen soll (Winder *et al.* 2000, Putman *et al.* 2003). In der Annahme, daß die Elektrostimulation mit dem von uns verwendeten Reizmuster vielleicht nicht intensiv genug ist, um die ATP-Konzentration in unseren Myotuben weit genug abzusenken, wurden Versuche mit β -Guanidinopropionsäure (GPA) durchgeführt. GPA ist ein Kreatinanalogen, das von der Kreatinkinase phosphoryliert wird, aber nicht zum Aufbau von ATP aus ADP dienen kann.

Zunächst wurde die ATP-Konzentration der primären Myotuben in Abhängigkeit von unterschiedlichen GPA-Konzentrationen gemessen. Dazu wurden adulte Myotuben auf Microcarriern 20 Stunden lang in Medium mit verschiedenen GPA-Konzentrationen inkubiert und anschließend die cytosolischen ATP-Konzentrationen bestimmt.

20-stündige Inkubation in 5 mM GPA erzeugt eine Verminderung der intrazellulären ATP-Konzentration um knapp 30%, siehe Abb.12. Höhere GPA-Konzentrationen senken die ATP-Konzentration in den Myotuben noch weiter ab.

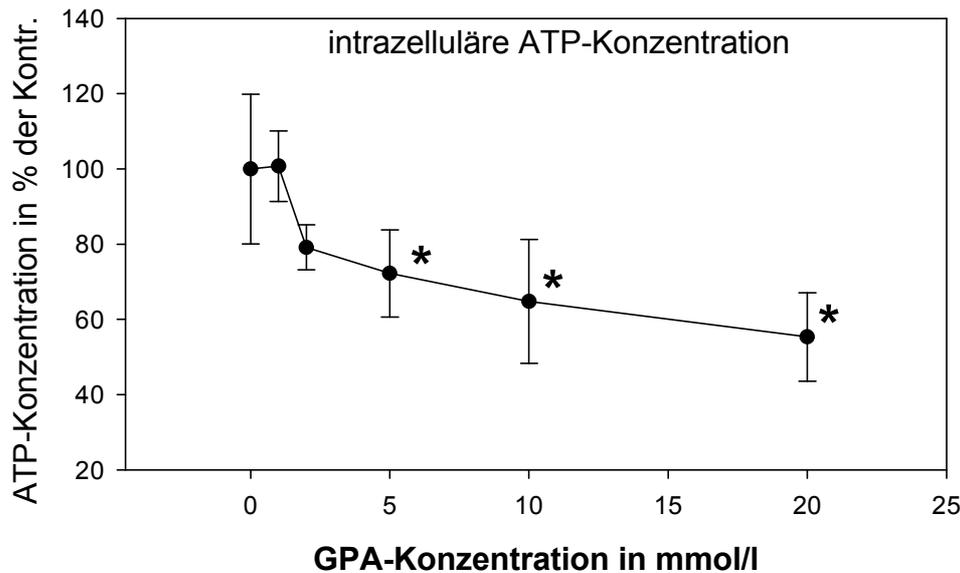


Abb.12: Dosis-Wirkungskurve von β -Guanidinopropionsäure

Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD (n = 3 - 4). *, signifikant unterschiedlich zur Kontrolle mit $p < 0,05$.

Für die Analyse von Transkription und Enzymaktivitäten der Stoffwechsellenzyme wurden adulte Myotuben vom 14. bis zum 17. Tag in Kultur mit 5 mM GPA bei 42% Sauerstoffgehalt inkubiert, um eine metabolische Umwandlung zu induzieren. Zunächst wurde die Wirkung von GPA ohne gleichzeitige Elektrostimulation untersucht. Die längere Inkubationszeit führt zu einer Absenkung der ATP-Konzentration um ca. 50% im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen.

Diese Reduktion der intrazellulären ATP-Konzentration führt jedoch nicht zu einem Anstieg der Transkription von PGC-1 oder Fumarase, sondern zu einer Abnahme der untersuchten mRNA, siehe Abb.13.

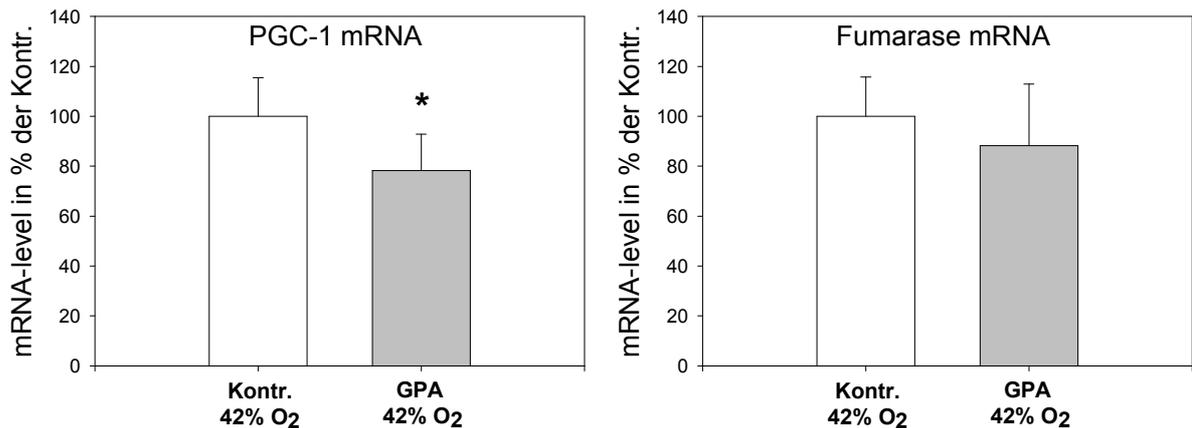


Abb.13: Änderung der PGC-1 und Fumarase mRNA-Gehalte nach 3-tägiger Inkubation in 5 mM β -Guanidinopropionsäure

Kontr. = unbehandelte Myotuben, GPA = Inkubation der Myotuben vom 14. bis zum 17. Tag in Medium mit 5 mM β -Guanidinopropionsäure, 42% O₂ = 42% Sauerstoffgehalt des Inkubators ab dem 14. Tag in Kultur. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD (n = 6). *, signifikant unterschiedlich zur Kontrolle mit p < 0,05.

Auch die gemessenen Enzymaktivitäten zeigen keinen Hinweis auf eine metabolische Umwandlung der Myotuben, siehe Abb.14. Weder die GAPDH Enzymaktivität, noch die der Citratsynthase ändern sich durch die 3-tägige Behandlung mit 5 mM GPA.

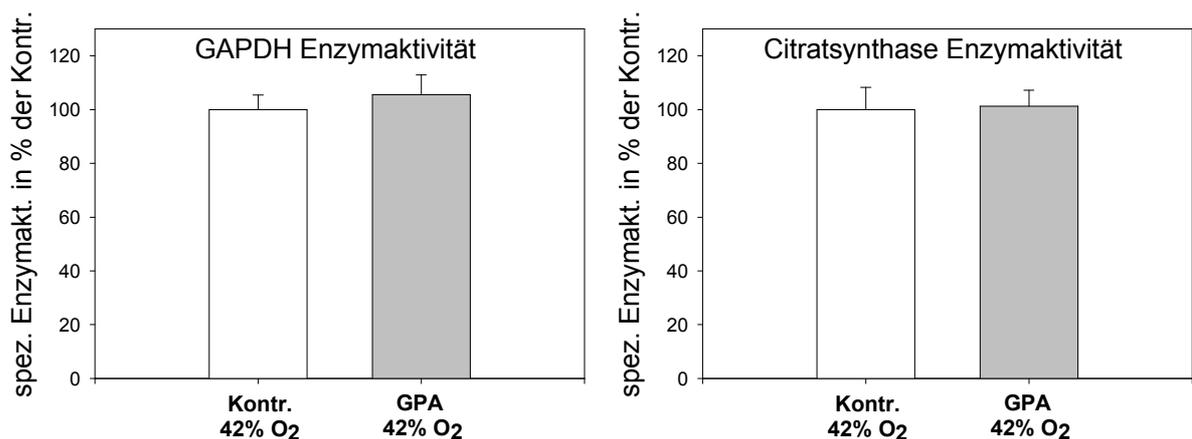


Abb.14: Änderung der GAPDH und Citratsynthase Enzymaktivitäten nach 3-tägiger Inkubation in 5 mM β -Guanidinopropionsäure

Kontr. = unbehandelte Myotuben, GPA = Inkubation der Myotuben vom 14. bis zum 17. Tag in Medium mit 5 mM β -Guanidinopropionsäure, 42% O₂ = 42% Sauerstoffgehalt des Inkubators ab dem 14. Tag in Kultur. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD (n = 6). *, signifikant unterschiedlich zur Kontrolle mit p < 0,05.

Die Kombination von 5 mM GPA mit Elektrostimulation (5 Hz für 15 Minuten gefolgt von 30 Minuten Pause über drei Tage) bewirkte ebenfalls keine Änderung der Enzymaktivitäten von GAPDH und Citratsynthase. Die Mittelwerte der mRNA-Gehalte von PGC-1 und Fumarase nahmen durch diese Behandlung noch weiter ab, als nach der Inkubation in GPA ohne Elektrostimulation.

Inkubation der Myotuben in Medium ohne Glukose führt zu einer deutlichen Änderung der untersuchten Stoffwechselfparameter

Die Tatsache, daß weder durch Elektrostimulation noch durch die Absenkung der intrazellulären ATP-Konzentration eine metabolische Umwandlung der adulten Myotuben induziert werden konnte, führte zu dem Schluß, daß die Erniedrigung der ATP-Konzentration und die daraus resultierende Aktivierung der AMPK nicht das für die Umwandlung entscheidende Signal darstellen. Ausdauertraining führt außer zu Änderungen der Konzentrationen von AMP und Kreatinphosphat auch zu einer Reduktion des intrazellulären Glykogengehaltes. Dies führte zu der Hypothese, daß es sich bei dem gesuchten Signal für die metabolische Anpassung um die Abnahme des Glykogengehaltes in den arbeitenden Muskelzellen handeln könnte. Außerdem finden sich in der Literatur Hinweise darauf, daß ein hoher intrazellulärer Glykogengehalt eine Aktivierung der AMPK verhindert (Derave *et al.* 2000, Richter *et al.* 2001). Aus diesem Grund wurden primäre Myotuben vom 14. bis zum 17. Tag in D-MEM ohne Glukose kultiviert. Diesem Medium fehlen, im Vergleich zum Kontrollmedium, 5,55 mM D-Glukose und 1 mM Natriumpyruvat. Zum Ausgleich wurde 1 mM L-Lactat zugefügt. Außerdem enthalten beide Medien die nötigen Mineralien, Aminosäuren, Vitamine und 5% NCS. Der Sauerstoffgehalt wurde für die Kontrollen und für die Myotuben in Medium ohne Glukose ab dem 14. Tag auf 42% erhöht, da ein Einfluß von Hypoxie auf die gemessenen Stoffwechselfparameter ausgeschlossen werden sollte.

Nach der 3-tägigen Inkubation in glukosefreiem Medium findet man auf der Ebene der Transkripte eine deutliche Abnahme des GAPDH mRNA-Gehalts und eine nicht signifikante Abnahme der Fumarase mRNA, siehe Abb.15.

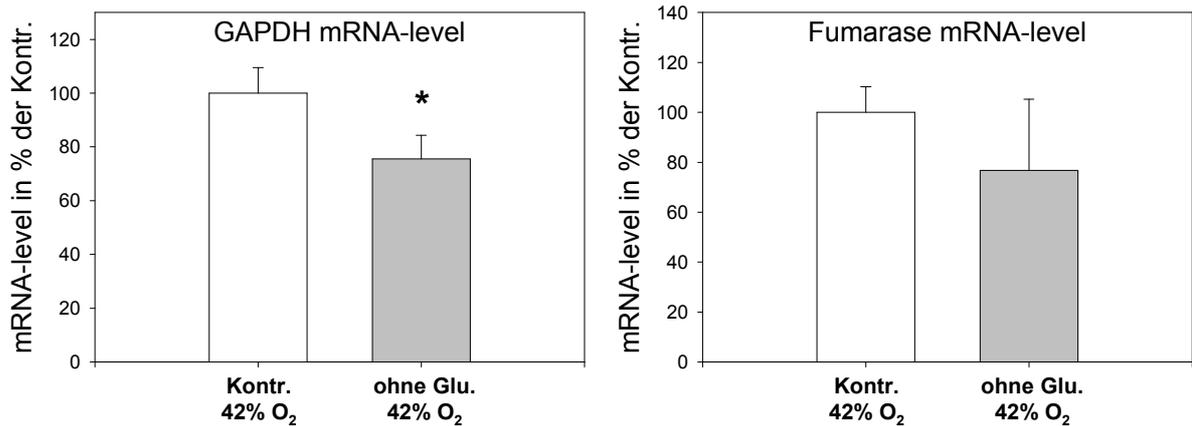


Abb.15: Änderung der GAPDH und Fumarase mRNA-Gehalte nach 3-tägiger Inkubation in glukosefreiem Medium

Kontr. = Myotuben in Medium mit 5,55 mM D-Glukose, ohne Glu. = Myotuben vom 14. bis zum 17. Tag in Medium ohne Glukose, 42% O₂ = 42% Sauerstoffgehalt des Inkubators ab dem 14. Tag in Kultur. Dargestellt sind Mittelwerte ± SD (n = 8). *, signifikant unterschiedlich zur Kontrolle mit p < 0,05.

Auch die Enzymaktivität der GAPDH ist nach 3 Tagen ohne Glukose im Medium deutlich reduziert. Die Citratsynthase Enzymaktivität dagegen zeigt einen signifikanten Anstieg, siehe Abb. 16.

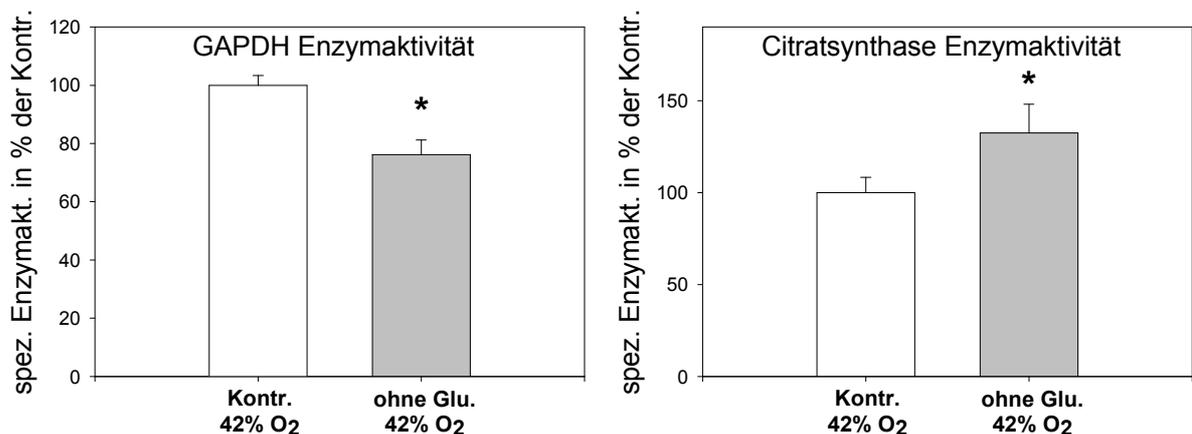


Abb.16: Änderung der GAPDH und Citratsynthase Enzymaktivitäten nach 3-tägiger Inkubation in glukosefreiem Medium

Kontr. = Myotuben in Medium mit 5,55 mM D-Glukose, ohne Glu. = Myotuben vom 14. bis zum 17. Tag in Medium ohne Glukose, 42% O₂ = 42% Sauerstoffgehalt des Inkubators ab dem 14. Tag in Kultur. Dargestellt sind Mittelwerte ± SD (n = 9). *, signifikant unterschiedlich zur Kontrolle mit p < 0,05.

Passend zu dem Anstieg der Citratsynthase Enzymaktivität findet man auch eine signifikante Zunahme des PGC-1 mRNA-Gehalts, siehe Abb.17.

Zusätzlich zu mRNA-Mengen und Enzymaktivitäten wurde auch der Glykogengehalt der Myotuben bestimmt, um die Auswirkung des glukosefreien Mediums auf die Glykogenvorräte sichtbar zu machen. 3 Tage Medium ohne Glukose bewirkt eine Abnahme des Glykogengehaltes in den Myotuben um knapp 40%, siehe Abb.17.

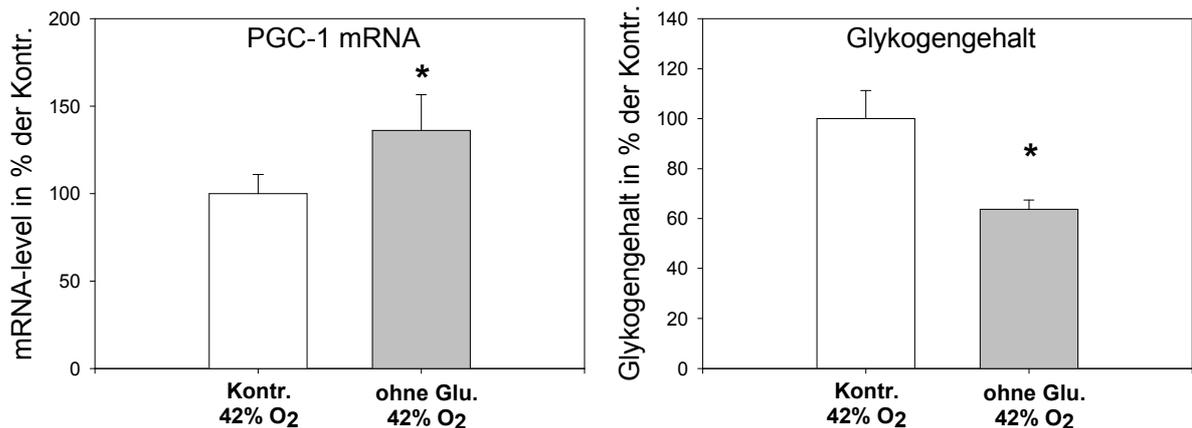


Abb.17: Änderung des PGC-1 mRNA-Gehalts und des Glykogengehaltes der Myotuben nach 3-tägiger Inkubation in glukosefreiem Medium

Kontr. = Myotuben in Medium mit 5,55 mM D-Glukose, ohne Glu. = Myotuben vom 14. bis zum 17. Tag in Medium ohne Glukose, 42% O₂ = 42% Sauerstoffgehalt des Inkubators ab dem 14. Tag in Kultur. Dargestellt sind Mittelwerte ± SD (n = 8 bzw. 9). *, signifikant unterschiedlich zur Kontrolle mit p < 0,05.

Trägt man die Werte der gemessenen Enzymaktivitäten von GAPDH und Citratsynthase gegen den Glykogengehalt der jeweiligen Probe auf, finden sich deutliche, nicht lineare Zusammenhänge, siehe Abb.18 und 19.

Den Wertepaaren aus Glykogengehalt und GAPDH Enzymaktivität bzw. Glykogengehalt und Citratsynthase Enzymaktivität wurden exponentielle Kurven angepaßt, da sich die Kurven jeweils einem Grenzwert annähern. Man kann erkennen, daß eine Absenkung des Glykogengehaltes der Zellen unter einen bestimmten Schwellenwert zu einer Abnahme der GAPDH Enzymaktivität und zu einer Zunahme der Citratsynthase Enzymaktivität führt. Eine Erhöhung des Glykogengehaltes vom Kontrollwert ruft dagegen kaum Änderungen der Enzymaktivitäten hervor.

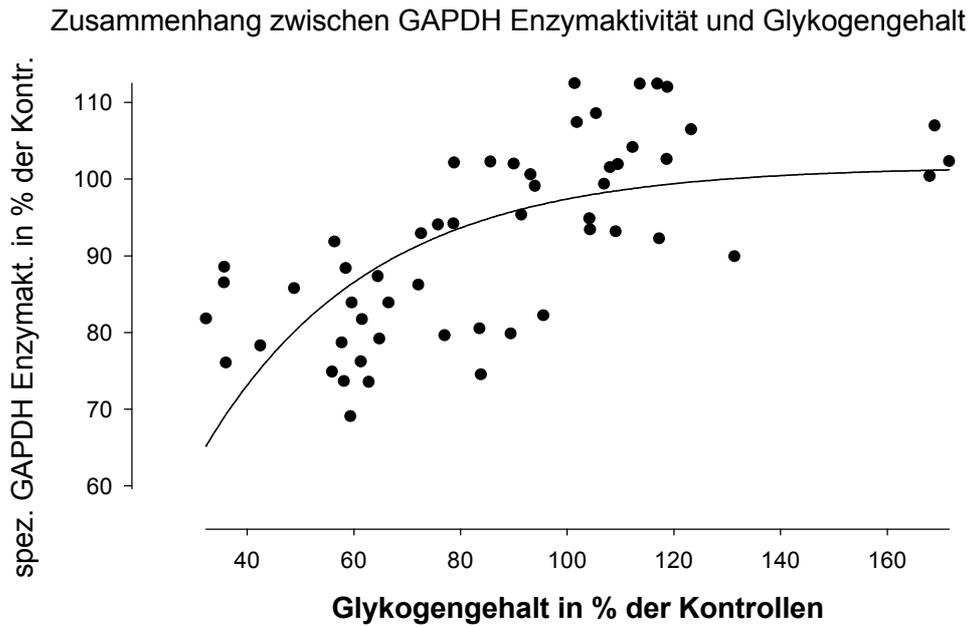


Abb.18: Zusammenhang zwischen GAPDH Enzymaktivität und Glykogengehalt

Dargestellt sind Wertepaare aus unterschiedlichen Versuchen, alle Myotuben waren 17 Tage in Kultur. (n = 54), R = 0,59.

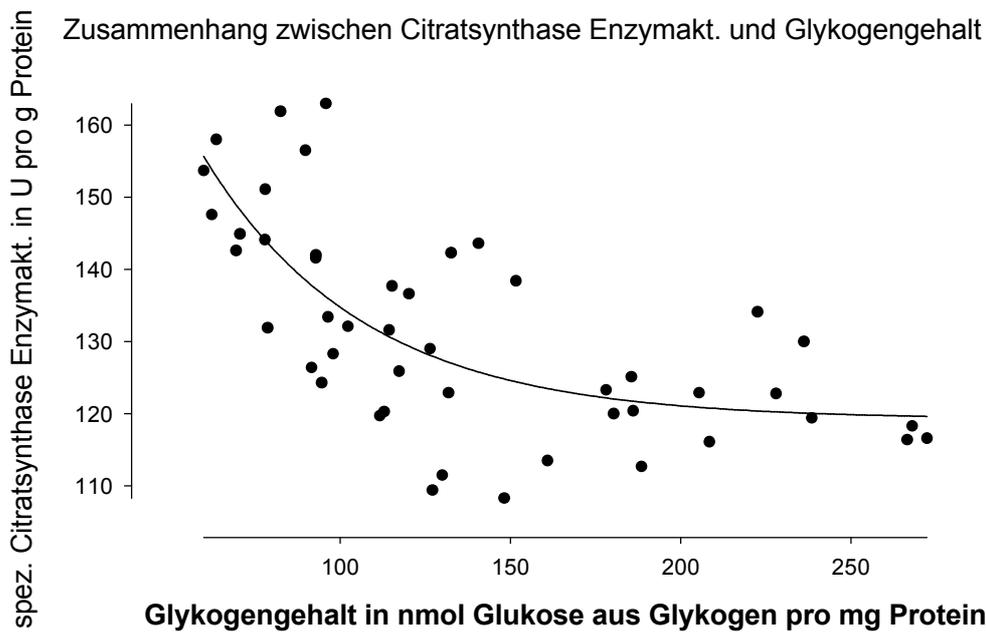


Abb.19: Zusammenhang zwischen Citratsynthase Enzymaktivität und Glykogengehalt

Dargestellt sind Wertepaare aus unterschiedlichen Versuchen, alle Myotuben waren 17 Tage in Kultur. (n = 47), R = 0,71.

Um weitere Hinweise auf die Signaltransduktion der metabolischen Anpassung in den Muskelzellen während der Inkubation in Medium ohne Glukose zu erhalten, wurden *Western Blots* mit primären Antikörpern gegen die phosphorylierten Formen von Proteinkinase B (PKB bzw. Akt), Glykogensynthasekinase-3 (GSK-3) und AMP-aktivierter Proteinkinase (AMPK) durchgeführt. Auf diesen *Western Blots* ist eine deutliche Abnahme der aktivierten, phosphorylierten Form der PKB, eine deutliche Abnahme der inaktiven, phosphorylierten GSK-3 sowie eine Abnahme der aktivierten, phosphorylierten AMPK zu sehen, siehe Abb.20.

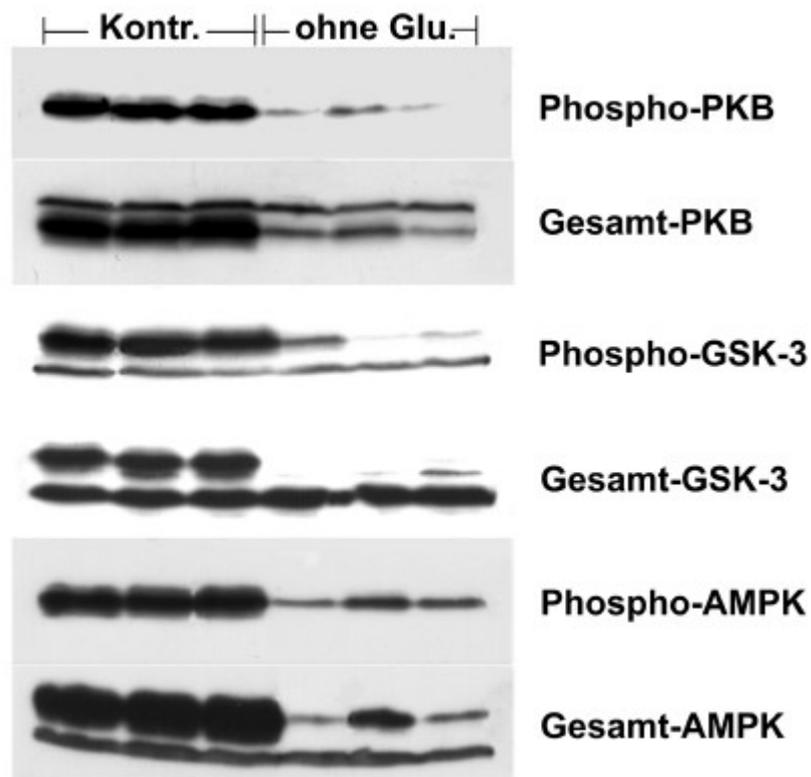


Abb.20: *Western Blots* mit Antikörpern gegen die phosphorylierten Formen von PKB, GSK-3 und AMPK nach 3-tägiger Inkubation der Myotuben in Medium mit und ohne Glukose

Kontr. = Myotuben in Medium mit 5,55 mM D-Glukose, ohne Glu. = Myotuben vom 14. bis zum 17. Tag in Medium ohne Glukose.

Die Abnahme der phosphorylierten Formen von PKB, GSK-3 und AMPK korreliert zeitlich mit der Abnahme des Glykogengehaltes

Da die Abnahme des Glykogenvorrates in den Myotuben durch die Inkubation in Medium ohne Glukose erzeugt wurde, stellt sich die Frage, ob der extrazelluläre Mangel an Glukose oder die Abnahme des Glykogengehaltes in den Zellen für die Effekte des glukosefreien Mediums entscheidend ist. Um diese Frage zu untersuchen, wurden am 14. Tag in Kultur Proben für *Western Blots* direkt nach der Umstellung des Mediums von glukosehaltigem auf glukosefreies Medium entnommen.

Die *Western Blots* mit diesen Proben zeigen, daß die Abnahme der phosphorylierten Formen von PKB, GSK-3 und AMPK nicht sofort nach der Umstellung auf glukosefreies Medium erfolgt, sondern daß nach den ersten 30 Minuten in Medium ohne Glukose der Phosphorylierungsgrad der drei analysierten Proteinkinasen in den Myotuben noch relativ hoch ist. Die *Western Blots* mit primärem Antikörper gegen GSK-3 sind in Abb.21 dargestellt.

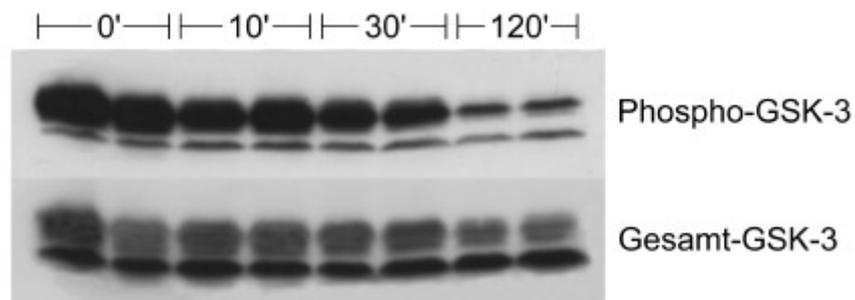


Abb.21: Zeitliche Abnahme der phosphorylierten Form von GSK-3 nach der Umstellung von glukosehaltigem auf glukosefreies Medium

0' = 0 Minuten, 10' = 10 Minuten, 30' = 30 Minuten, 120' = 120 Minuten nach der Umstellung von glukosehaltigem auf glukosefreies Medium.

Außerdem wurden am 17. Tag in Kultur Proben für *Western Blots* direkt nach einer erneuten Umstellung des Mediums von glukosefreiem auf glukosehaltiges Medium entnommen. Die *Western Blots* von diesen Proben zeigen, daß das Vorhandensein von Glukose nach 3-tägiger Inkubation der Myotuben in Medium ohne Glukose nicht dazu führt, daß die phosphorylierten Formen von PKB, GSK-3 (siehe Abb.22) und AMPK wieder zunehmen, obwohl extrazellulär wieder ausreichend Glukose zur

Verfügung steht.

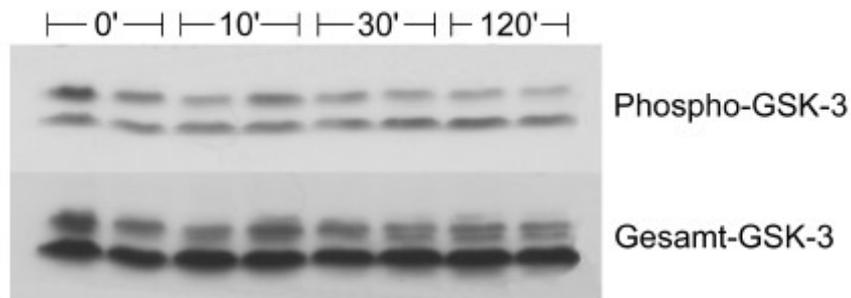


Abb.22: Zeitliche Entwicklung der phosphorylierten Form von GSK-3 nach der Umstellung von glukosefreiem auf glukosehaltiges Medium

0' = 0 Minuten, 10' = 10 Minuten, 30' = 30 Minuten, 120' = 120 Minuten nach der Umstellung von glukosefreiem auf glukosehaltiges Medium.

Inhibition der GSK-3 hat keinen Einfluß auf die metabolische Umwandlung der Myotuben in Medium ohne Glukose

Aufgrund des Befundes aus den *Western Blots*, daß nach Inkubation in Medium ohne Glukose die inaktive, phosphorylierte Form von GSK-3 abnimmt und die aktive, unphosphorylierte Form zunimmt, wurden Versuchsreihen durchgeführt, in denen die GSK-3 mit Lithiumionen oder mit dem spezifischen Hemmstoff SB-216763 (Sigma) gehemmt wurde. Dazu wurden die Myotuben vom 14. bis zum 17. Tag bei 42% Sauerstoffgehalt in Medium mit oder ohne Glukose kultiviert. Zusätzlich wurden für diese letzten 3 Tage entweder 10 mM Lithiumchlorid oder 1 μ M SB-216763 (IC_{50} = 34 nM, Cross *et al.* 2001) zugegeben.

Bei der Auswertung dieser Versuche konnte kein Unterschied zwischen der Wirkung von 10 mM Lithiumchlorid und der Wirkung von 1 μ M SB-216763 gefunden werden. Die Hemmung der GSK-3 hatte keinen Einfluß auf die Enzymaktivitäten von GAPDH und Citratsynthase, weder in Medium mit Glukose, noch in Medium ohne Glukose, siehe Abb.23. Der Effekt des glukosefreien Mediums auf die Stoffwechsellenzyme der Myotuben konnte also mit Lithium bzw. SB-216763 nicht unterdrückt werden.

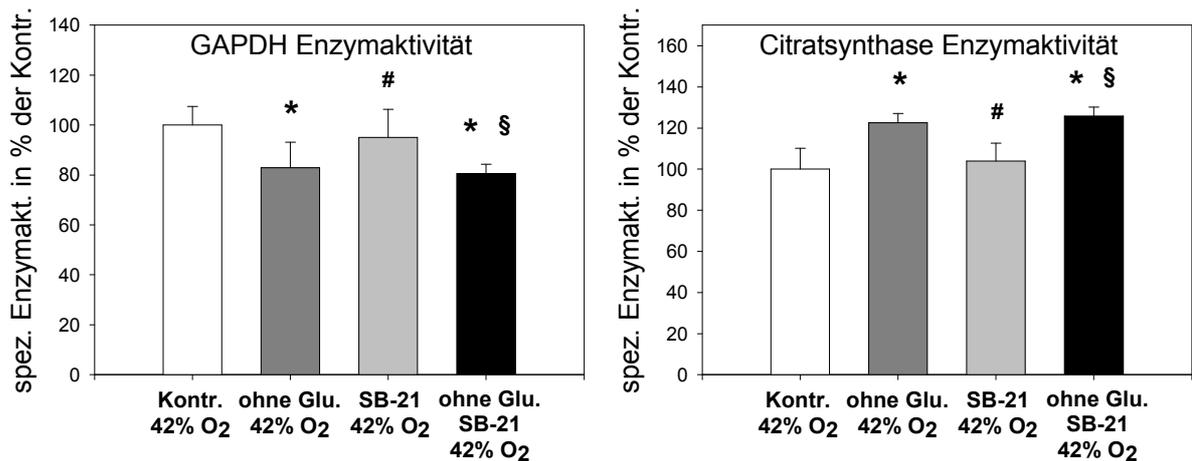


Abb.23: Änderung der GAPDH und Citratsynthase Enzymaktivitäten nach 3-tägiger Inkubation in glukosefreiem Medium mit und ohne 1 μ M SB-216763

Kontr. = Myotuben in Medium mit 5,55 mM D-Glukose, ohne Glu. = Myotuben vom 14. bis zum 17. Tag in Medium ohne Glukose, SB-21 = 1 μ M SB-216763 vom 14. bis zum 17. Tag, 42% O₂ = 42% Sauerstoffgehalt des Inkubators ab dem 14. Tag in Kultur. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD (n = 6). *, signifikant unterschiedlich zur Kontrolle. #, signifikant unterschiedlich zu den Myotuben in Medium ohne Glukose. §, signifikant unterschiedlich zu den Myotuben in Medium mit Glukose und SB-216763, p < 0,05.

Auch der GAPDH mRNA-Gehalt konnte weder mit Lithium, noch mit SB-216763 beeinflusst werden. Der Glykogengehalt der Myotuben ist in glukosehaltigem Medium bei Hemmung der GSK-3 und damit einhergehender Aktivierung der Glykogensynthase angestiegen, siehe Abb.24.

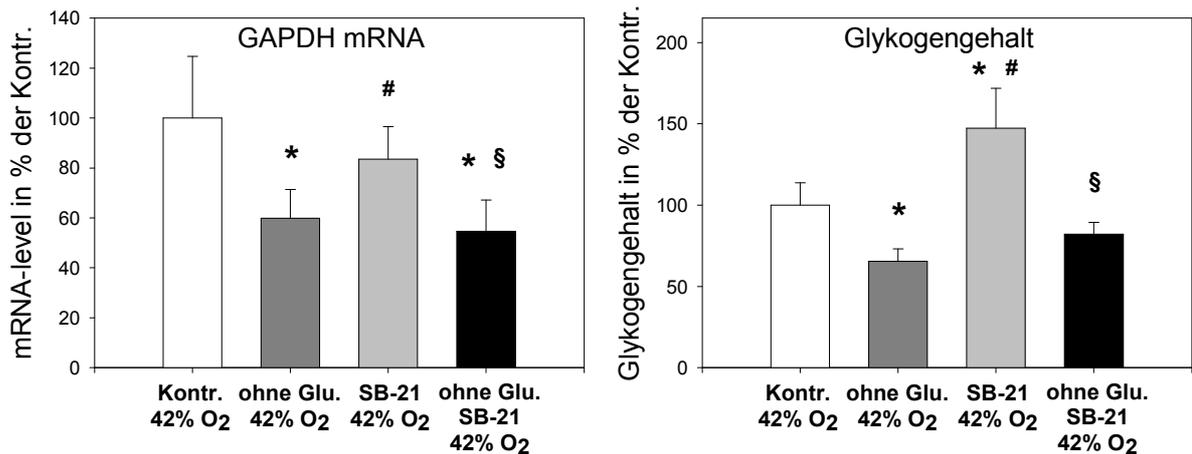


Abb.24: Änderung des GAPDH mRNA-Gehalts und des Glykogengehalts der Myotuben nach 3-tägiger Inkubation in glukosefreiem Medium mit und ohne 1 μ M SB-216763

Kontr. = Myotuben in Medium mit 5,55 mM D-Glukose, ohne Glu. = Myotuben vom 14. bis zum 17. Tag in Medium ohne Glukose, SB-21 = 1 μ M SB-216763 vom 14. bis zum 17. Tag, 42% O₂ = 42% Sauerstoffgehalt des Inkubators ab dem 14. Tag in Kultur. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD (n = 6 bzw. 4 - 6). *, signifikant unterschiedlich zur Kontrolle. #, signifikant unterschiedlich zu den Myotuben in Medium ohne Glukose. §, signifikant unterschiedlich zu den Myotuben in Medium mit Glukose und SB-216763, p < 0,05.

Hemmung der PP1 verhindert den Anstieg der Citratsynthase Enzymaktivität und des PGC-1 mRNA-Gehalts der Myotuben in Medium ohne Glukose

Die in den Abb.18 und 19 gezeigte Abhängigkeit der GAPDH und Citratsynthase Enzymaktivitäten vom Glykogengehalt führte zu der Hypothese, daß die Proteinphosphatase 1 (PP1), die bei hohem Glykogengehalt mit den Glykogenpartikeln assoziiert ist, an der metabolischen Umwandlung der Skelettmuskelmyotuben beteiligt ist. Aus diesem Grund wurden Myotuben vom 14. bis zum 17. Tag in Medium mit 4 nM Tautomycin (Alexis) inkubiert. Tautomycin hemmt in niedrigen Konzentrationen spezifisch die Proteinphosphatase 1 (IC₅₀ = 1 nM, Connor *et al.* 1999). Der Sauerstoffgehalt wurde für alle Myotuben ab dem 14. Tag auf 42% erhöht.

Nach der 3-tägigen Inkubation in Tautomycin zeigen die Myotuben keine Veränderungen bei den GAPDH Enzymaktivitäten, siehe Abb.25. Die Citratsynthase Enzymaktivitäten der Myotuben in Medium mit Glukose können mit Tautomycin ebenfalls nicht beeinflusst werden, siehe Abb.25. Der Anstieg der Citratsynthase

Enzymaktivität in Medium ohne Glukose dagegen kann durch die Zugabe von Tautomycin unterdrückt werden.

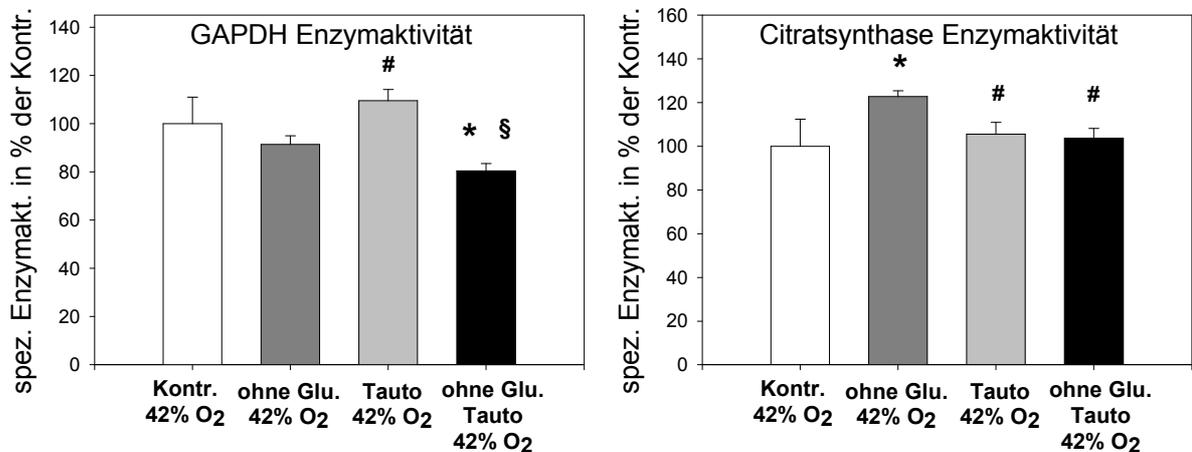


Abb.25: Änderung der GAPDH und Citratsynthase Enzymaktivitäten nach 3-tägiger Inkubation in glukosefreiem Medium mit und ohne 4 nM Tautomycin

Kontr. = Myotuben in Medium mit 5,55 mM D-Glukose, ohne Glu. = Myotuben vom 14. bis zum 17. Tag in Medium ohne Glukose, Tauto = 4 nM Tautomycin vom 14. bis zum 17. Tag, 42% O₂ = 42% Sauerstoffgehalt des Inkubators ab dem 14. Tag in Kultur. Dargestellt sind Mittelwerte ± SD (n = 3). *, signifikant unterschiedlich zur Kontrolle. #, signifikant unterschiedlich zu den Myotuben in Medium ohne Glukose. §, signifikant unterschiedlich zu den Myotuben in Medium mit Glukose und Tautomycin, p < 0,05.

Ähnlich wie bei den Citratsynthase Enzymaktivitäten kann bei der PGC-1 mRNA der Effekt des glukosefreien Mediums durch die Zugabe von Tautomycin verhindert werden, siehe Abb.26. Der Glykogengehalt der Myotuben ändert sich durch die Behandlung mit Tautomycin nicht, siehe Abb.26.

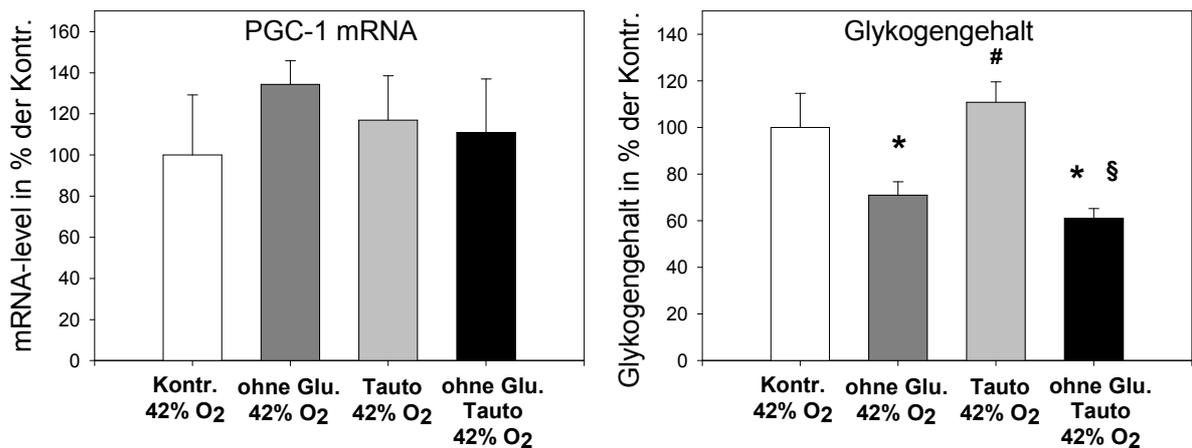


Abb.26: Änderung des PGC-1 mRNA-Gehalts und des Glykogengehalts nach 3-tägiger Inkubation in glukosefreiem Medium mit und ohne 4 nM Tautomycin

Kontr. = Myotuben in Medium mit 5,55 mM D-Glukose, ohne Glu. = Myotuben vom 14. bis zum 17. Tag in Medium ohne Glukose, Tauto = 4 nM Tautomycin vom 14. bis zum 17. Tag, 42% O₂ = 42% Sauerstoffgehalt des Inkubators ab dem 14. Tag in Kultur. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD (n = 3). *, signifikant unterschiedlich zur Kontrolle. #, signifikant unterschiedlich zu den Myotuben in Medium ohne Glukose. §, signifikant unterschiedlich zu den Myotuben in Medium mit Glukose und Tautomycin, p < 0,05.

Die niedrige Anzahl der Proben (n = 3) für die Mittelwerte in den Abb.25 und 26 kommt durch eine schlechte Reproduzierbarkeit der Ergebnisse mit Tautomycin zustande. Aus diesem Grund wurden hier nur die Ergebnisse von einem Versuch dargestellt. Bei den zwei Wiederholungen dieses Versuches gelang es einmal, den Effekt des glukosefreien Mediums auf den PGC-1 mRNA-Gehalt durch die Inkubation der Myotuben in Tautomycin zu unterdrücken. Die in Abb.25 dargestellten Ergebnisse für die Citratsynthase Enzymaktivität konnten in keiner der beiden Wiederholungen des Versuches reproduziert werden. Die Erhöhung der Tautomycinkonzentration auf 40 nM führte zu unspezifischen Effekten und morphologischen Veränderungen der Myotuben.

Inhibition der Proteinkinase A hat keinen Einfluß auf die untersuchten Stoffwechselfparameter

Aufgrund der in der Literatur postulierten Rolle der Proteinkinase A (PKA) als Gegenspieler zur Proteinphosphatase 1 wurden Versuche mit dem PKA-Inhibitor H-89 (Sigma) durchgeführt. Die Myotuben wurden vom 14. bis zum 17. Tag in Kultur mit Konzentrationen von 0,25 bis 1,0 μM H-89 ($\text{IC}_{50} = 48 \text{ nM}$, Chijiwa *et al.* 1990) inkubiert. Keine dieser Konzentrationen zeigte eine Wirkung auf die gemessenen Stoffwechselmarker, weder in Medium mit Glukose, noch in glukosefreiem Medium.

Aktivierung der PKA hat keine Auswirkung auf die Stoffwechsellenzyme der Myotuben

Da adrenerge Stimulation durch die Aktivierung der Proteinkinase A über die Phosphorylase zum Abbau von Glykogen führt, wurde untersucht, ob eine Aktivierung der PKA mit Isoproterenol (Sigma) die gleiche Wirkung auf die Stoffwechsellenzyme zeigt, wie die Inkubation in Medium ohne Glukose, und ob sich die Effekte von Isoproterenol und glukosefreiem Medium addieren. Isoproterenol ist ein β -adrenerger Agonist, der die cytosolische Konzentration von cyclischem AMP erhöht. Dazu wurden die Myotuben vom 14. bis zum 17. Tag in Kultur mit 15 μM Isoproterenol behandelt (Liu und Brautigan 2000). Der Sauerstoffgehalt wurde für alle Myotuben ab dem 14. Tag auf 42% erhöht.

Die Aktivierung der Proteinkinase A durch Isoproterenol in Medium mit Glukose zeigte keine Wirkung auf die Enzymaktivität von GAPDH und Citratsynthase, siehe Abb.27.

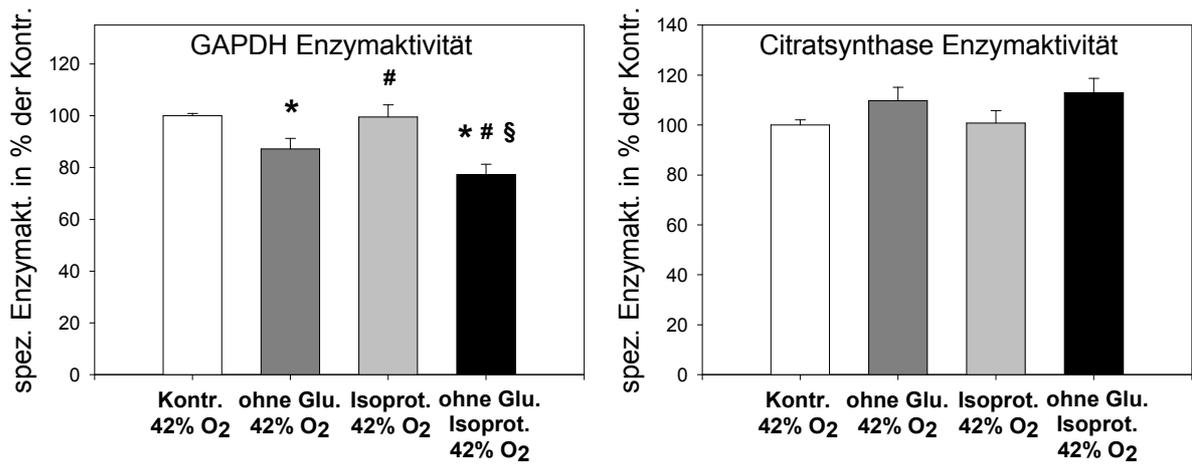


Abb.27: Änderung der GAPDH und Citratsynthase Enzymaktivitäten nach 3-tägiger Inkubation in glukosefreiem Medium mit und ohne 15 µM Isoproterenol

Kontr. = Myotuben in Medium mit 5,55 mM D-Glukose, ohne Glu. = Myotuben vom 14. bis zum 17. Tag in Medium ohne Glukose, Isoprot. = 15 µM Isoproterenol vom 14. bis zum 17. Tag, 42% O₂ = 42% Sauerstoffgehalt des Inkubators ab dem 14. Tag in Kultur. Dargestellt sind Mittelwerte ± SD (n = 3). *, signifikant unterschiedlich zur Kontrolle. #, signifikant unterschiedlich zu den Myotuben in Medium ohne Glukose. §, signifikant unterschiedlich zu den Myotuben in Medium mit Glukose und Isoproterenol, p < 0,05.

Die Analyse der PGC-1 mRNA ergab keinen signifikanten Anstieg des Mittelwertes nach der Inkubation in Medium mit Glukose und Isoproterenol, siehe Abb.28. Der Glykogengehalt der Myotuben in Medium mit Glukose konnte durch die Behandlung mit Isoproterenol verringert werden, jedoch nicht so stark wie durch die Inkubation in glukosefreiem Medium.

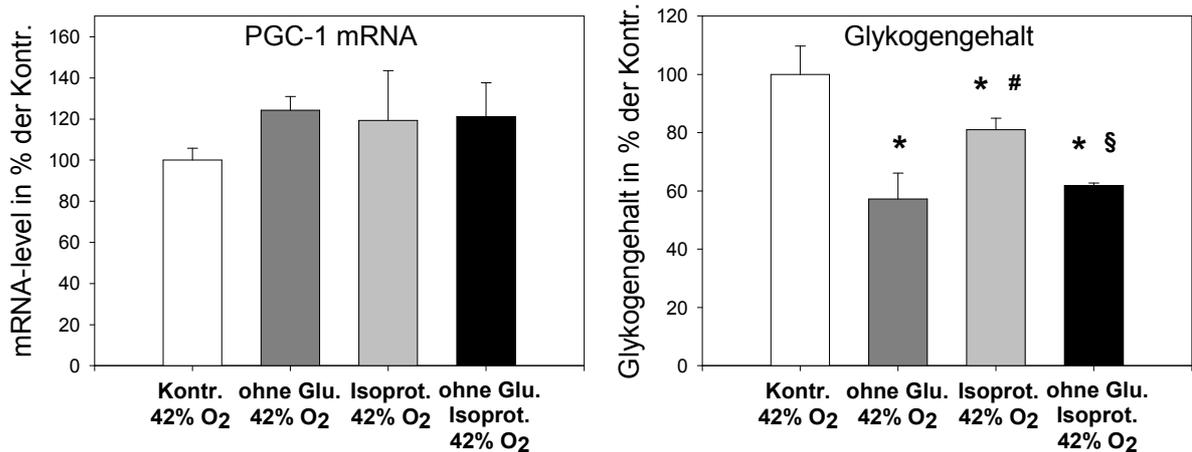


Abb.28: Änderung des PGC-1 mRNA-Gehalts und des Glykogengehalts nach 3-tägiger Inkubation in glukosefreiem Medium mit und ohne 15 μ M Isoproterenol

Kontr. = Myotuben in Medium mit 5,55 mM D-Glukose, ohne Glu. = Myotuben vom 14. bis zum 17. Tag in Medium ohne Glukose, Isoprot. = 15 μ M Isoproterenol vom 14. bis zum 17. Tag, 42% O₂ = 42% Sauerstoffgehalt des Inkubators ab dem 14. Tag in Kultur. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD (n = 3). *, signifikant unterschiedlich zur Kontrolle. #, signifikant unterschiedlich zu den Myotuben in Medium ohne Glukose. §, signifikant unterschiedlich zu den Myotuben in Medium mit Glukose und Isoproterenol, p < 0,05.

Auch die Behandlung der Myotuben mit Calciumionophor bewirkt Änderungen bei den analysierten Stoffwechselfparametern

Ähnlich wie Elektrostimulation führt auch die Behandlung der Myotuben mit Calciumionophor zu einer Umwandlung der kontraktilen Proteine, von schnell kontrahierenden Typ II zu langsam kontrahierenden Typ I Isoformen (Kubis *et al.* 1997). Allerdings kann im Gegensatz zur Elektrostimulation durch Calciumionophorbehandlung auch eine Änderung der metabolischen Kapazität induziert werden. Für die Versuche mit Calciumionophor wurden die Myotuben vom 14. bis zum 17. Tag in 0,4 μ M A23187 (Sigma) inkubiert. Der Sauerstoffgehalt im Inkubator wurde für alle Myotuben ab dem 14. Tag auf 42% erhöht.

Die durch das Calciumionophor hervorgerufene starke Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration bewirkt eine Reduktion der GAPDH Enzymaktivität, ähnlich wie nach der Inkubation in Medium ohne Glukose. Die Citratsynthase Enzymaktivität ließ sich durch die Zugabe von Calciumionophor sogar deutlich stärker induzieren, als durch die Inkubation in Medium ohne Glukose, siehe Abb.29.

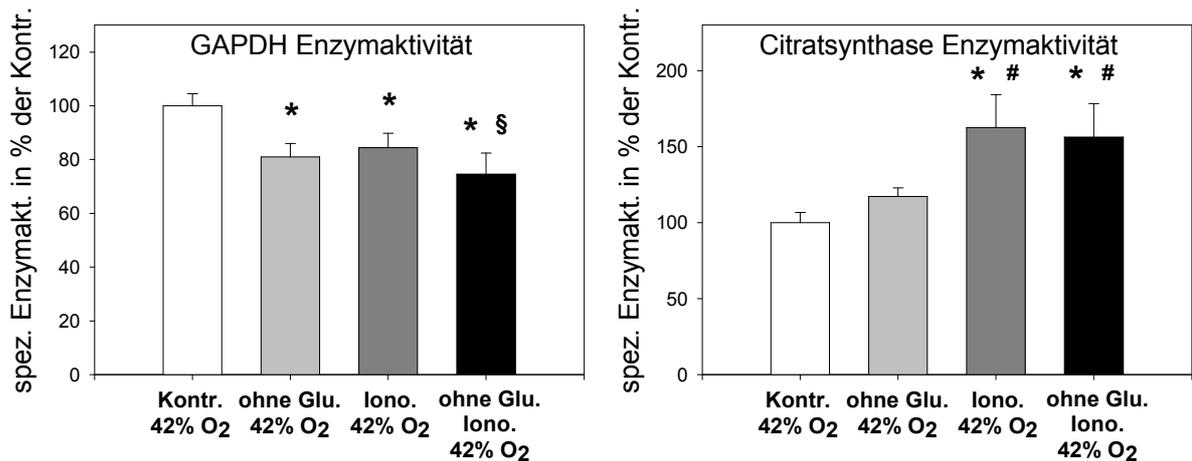


Abb.29: Änderung der GAPDH und Citratsynthase Enzymaktivitäten nach 3-tägiger Behandlung mit Calciumionophor

Kontr. = Myotuben in Medium mit 5,55 mM D-Glukose, ohne Glu. = Myotuben vom 14. bis zum 17. Tag in Medium ohne Glukose, Iono. = Behandlung der Myotuben mit 0,4 μ M A23187 vom 14. bis zum 17. Tag, 42% O₂ = 42% Sauerstoffgehalt des Inkubators ab dem 14. Tag in Kultur. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD (n = 6 bzw. 5 - 6). *, signifikant unterschiedlich zur Kontrolle. #, signifikant unterschiedlich zu den Myotuben in Medium ohne Glukose. §, signifikant unterschiedlich zu den Myotuben in Medium mit Glukose und Calciumionophor, p < 0,05.

Auch bei den Transkripten von PGC-1 findet man eine weitaus größere Zunahme nach Behandlung der Myotuben mit Calciumionophor, als nach 3-tägigem Glukoseentzug. Der Glykogengehalt der ionophorbehandelten Zellen war deutlich niedriger als der Glykogengehalt der Kontrollmyotuben. Der Abfall des intrazellulären Glykogens durch Inkubation mit Calciumionophor war jedoch tendenziell nicht so stark wie nach der 3-tägigen Inkubation in Medium ohne Glukose, siehe Abb.30.

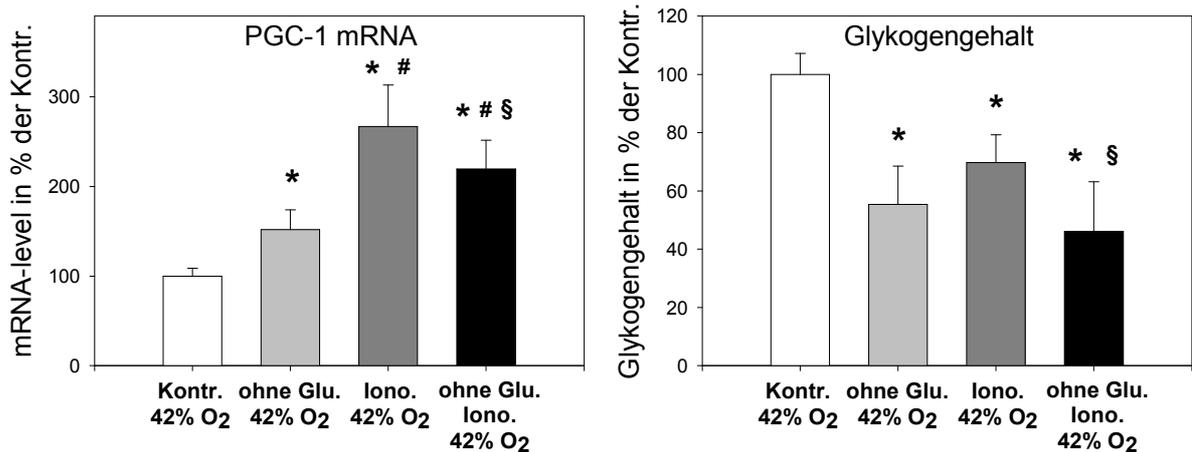


Abb.30: Änderung des PGC-1 mRNA-Gehalts und des Glykogengehalts der Myotuben nach 3-tägiger Behandlung mit Calciumionophor

Kontr. = Myotuben in Medium mit 5,55 mM D-Glukose, ohne Glu. = Myotuben vom 14. bis zum 17. Tag in Medium ohne Glukose, Iono. = Behandlung der Myotuben mit 0,4 μ M A23187 vom 14. bis zum 17. Tag, 42% O₂ = 42% Sauerstoffgehalt des Inkubators ab dem 14. Tag in Kultur. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD (n = 3 - 6 bzw. 6). *, signifikant unterschiedlich zur Kontrolle. #, signifikant unterschiedlich zu den Myotuben in Medium ohne Glukose. §, signifikant unterschiedlich zu den Myotuben in Medium mit Glukose und Calciumionophor, p < 0,05.

Wie bei den Versuchen mit glukosefreiem Medium wurden *Western Blots* angefertigt, um die Auswirkungen der Ionophorbehandlung auf die Signaltransduktion der metabolischen Anpassung der Myotuben näher zu untersuchen. Dabei wurden wiederum primäre Antikörper gegen die phosphorylierten Formen von PKB, GSK-3 und AMPK verwendet. Überraschenderweise führt die Inkubation der Zellen in Calciumionophor trotz der starken Effekte auf die gemessenen metabolischen Parameter zu keinerlei Änderungen in der Phosphorylierung der drei untersuchten Proteinkinasen, siehe Abb.31. Diese Ergebnisse stehen im Kontrast zu den *Western Blots* von den Myotuben, die in Medium ohne Glukose inkubiert wurden, siehe Abb.20.

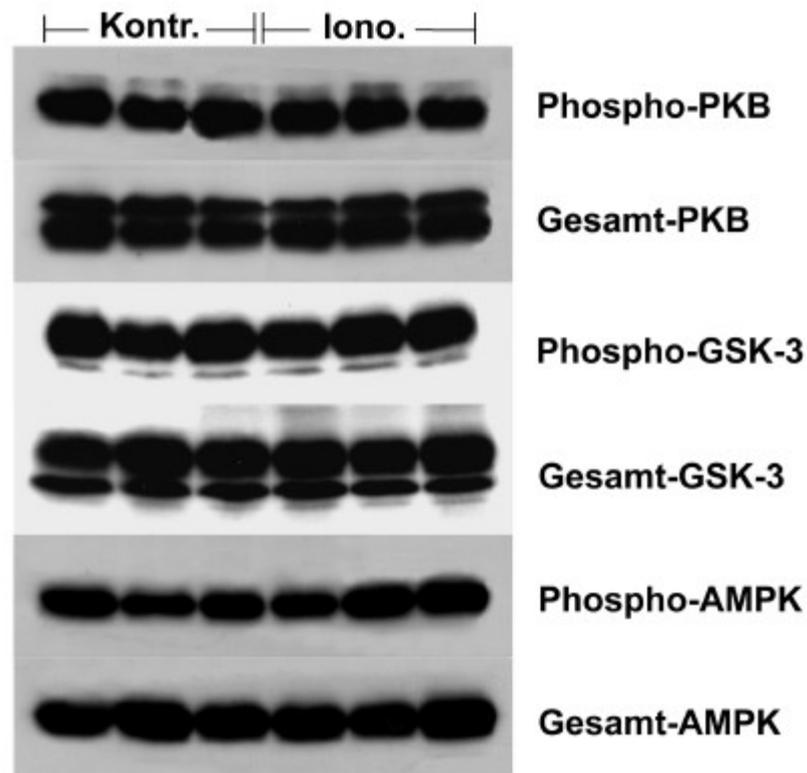


Abb.31: Western Blots mit Antikörpern gegen die phosphorylierten Formen von PKB, GSK-3 und AMPK nach 3-tägiger Behandlung der Myotuben mit Calciumionophor

Kontr. = Myotuben in Medium mit 5,55 mM D-Glukose, Iono. = Behandlung der Myotuben in Medium mit 5,55 mM D-Glukose mit 0,4 μ M A23187 vom 14. bis zum 17. Tag.

Die Hemmung der CaMKK vermindert den Effekt der Ionophorbehandlung auf die Transkription von PGC-1

Die Inkubation der Myotuben in Calciumionophor beeinflusst die Enzymaktivitäten von GAPDH und Citratsynthase, sowie den PGC-1 mRNA-Gehalt und den Glykogengehalt der Zellen, siehe Abb.29 und 30. Geht man davon aus, dass die Ionophorbehandlung über die Erhöhung der intrazellulären Calciumionenkonzentration wirkt, könnte die Inhibition der CaMKK den Ionophoreffekt hemmen. Aus diesem Grund wurden Myotuben vom 14. bis zum 17. Tag bei 42% Sauerstoffgehalt in Medium mit 0,4 μ M A23187 inkubiert. Zur Hemmung der CaMKK wurden 2,67 μ M STO-609 (Calbiochem) verwendet (IC_{50} = 200 nM für CaMKK α und IC_{50} = 40 nM für CaMKK β , Tokumitsu *et al.* 2002, Tokumitsu *et al.* 2003).

Bei den untersuchten Enzymaktivitäten von GAPDH und Citratsynthase zeigt die Inkubation in STO-609 keinerlei Wirkung. Dies gilt sowohl für die Myotuben, die in ionophorhaltigem Medium kultiviert wurden, als auch für die Myotuben in Medium ohne Ionophor, siehe Abb.32.

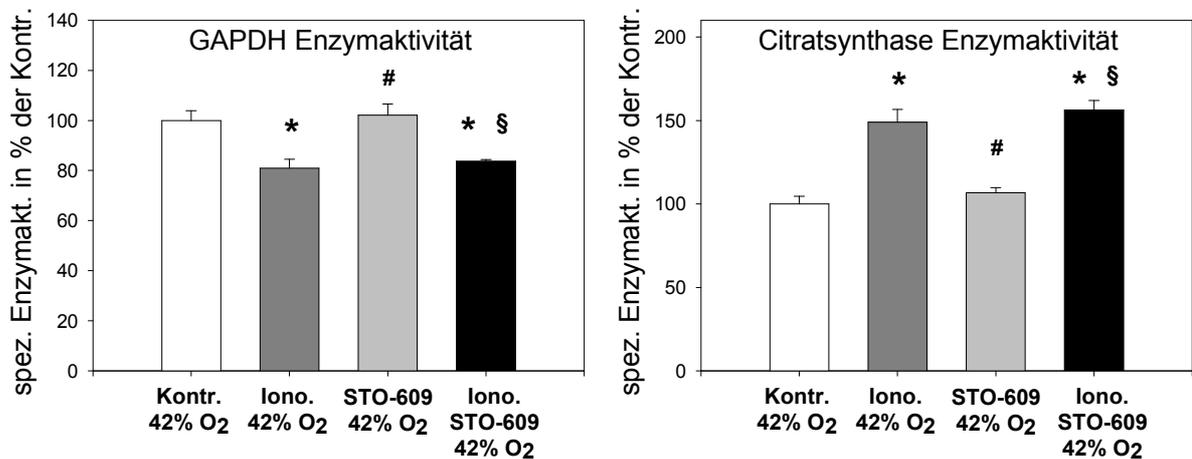


Abb.32: Änderung der GAPDH und Citratsynthase Enzymaktivitäten nach 3-tägiger Inkubation in Medium mit Calciumionophor und 2,67 μ M STO-609

Kontr. = Myotuben in Medium mit 5,55 mM D-Glukose, Iono. = 0,4 μ M A23187 vom 14. bis zum 17. Tag, STO-609 = 2,67 μ M STO-609 vom 14. bis zum 17. Tag, 42% O₂ = 42% Sauerstoffgehalt des Inkubators ab dem 14. Tag in Kultur. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD (n = 3). *, signifikant unterschiedlich zur Kontrolle. #, signifikant unterschiedlich zu den Myotuben in Medium mit Calciumionophor. §, signifikant unterschiedlich zu den Myotuben in Medium mit STO-609, p < 0,05.

Die starke Zunahme der Transkripte von PGC-1 nach Inkubation der Myotuben in Calciumionophor konnte durch den CaMKK-Inhibitor zumindest teilweise unterdrückt werden, siehe Abb.33. STO-609 in Medium ohne Calciumionophor zeigt keine Auswirkungen auf den PGC-1 mRNA-Gehalt. Bei den Glykogenwerten konnte der Ionophoreffekt durch die Inkubation in STO-609 nicht verhindert werden, siehe Abb.33.

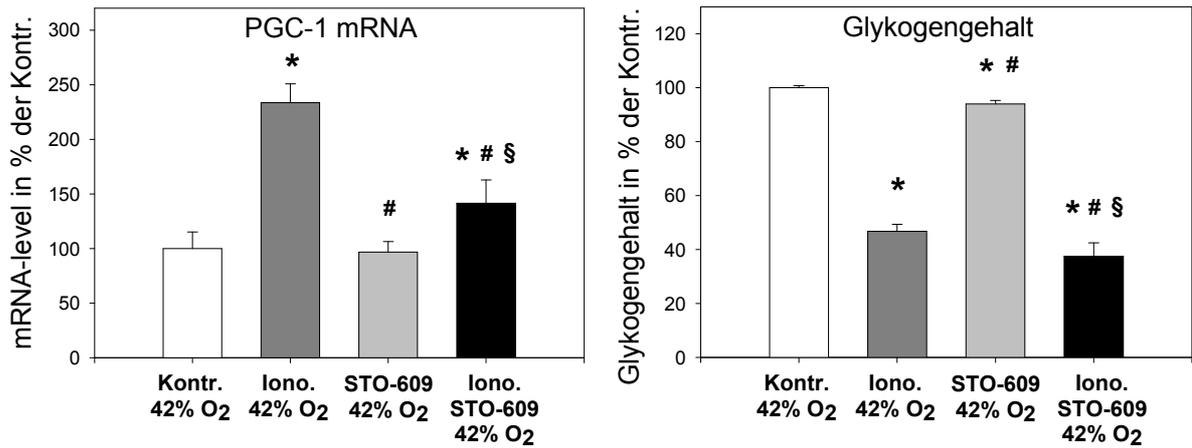


Abb.33: Änderung des PGC-1 mRNA-Gehalts und des Glykogengehalts nach 3-tägiger Inkubation in Medium mit Calciumionophor und 2,67 μ M STO-609

Kontr. = Myotuben in Medium mit 5,55 mM D-Glukose, Iono. = 0,4 μ M A23187 vom 14. bis zum 17. Tag, STO-609 = 2,67 μ M STO-609 vom 14. bis zum 17. Tag, 42% O₂ = 42% Sauerstoffgehalt des Inkubators ab dem 14. Tag in Kultur. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD (n = 3). *, signifikant unterschiedlich zur Kontrolle. #, signifikant unterschiedlich zu den Myotuben in Medium mit Calciumionophor. §, signifikant unterschiedlich zu den Myotuben in Medium mit STO-609, p < 0,05.

DISKUSSION

Die Fasertyptransformation adulter Skelettmuskelfasern vom schnell kontrahierenden, glykolytischen Typ IIB / IID zum langsam kontrahierenden, oxidativen Typ I (auch als *fast-to-slow transformation* bezeichnet) ist ein komplexer Vorgang. Es ist anzunehmen, daß die *fast-to-slow transformation* kein einheitlich gesteuerter Prozeß ist, bei dem die Änderung der Expressionsraten vieler Gene durch ein einziges Signal, wie zum Beispiel der Erhöhung der cytoplasmatischen Ruhecalciumkonzentration, gesteuert wird. In der Literatur wird mehr und mehr die Ansicht vertreten, daß verschiedene Signale an der Transformation beteiligt sind, die zudem, je nach der Art der Beanspruchung einer Muskelfaser, unterschiedlich gewichtet sein können (Spangenburg und Booth 2003, Putman *et al.* 2003). Sind mehrere Signale für die Induktion einer vollständigen *fast-to-slow transformation* notwendig, so ist es nicht verwunderlich, wenn sich bei der experimentellen Anwendung einzelner Stimuli nur einige Parameter der untersuchten Muskelfasern ändern und keine umfassende Transformation auf allen Ebenen (kontraktile Proteine, metabolische Enzyme, Ionenkanäle etc.) erzeugt werden kann.

Das Hauptaugenmerk dieser Dissertation lag auf der metabolischen Umwandlung von Skelettmuskelfasern. Zur Steigerung der oxidativen Stoffwechselkapazität einer Muskelfaser muß die mitochondriale Volumendichte der Faser erhöht werden. Als Signalwege, die zu einer Förderung der Mitochondriogenese führen, wurden bisher besonders die Erhöhung der cytosolischen Calciumionenkonzentration und die Aktivierung der AMPK durch Absenkung der Konzentration der energiereichen Phosphatverbindungen untersucht. Es wäre jedoch nicht verwunderlich, wenn für eine Zunahme der Expression aller oxidativen Stoffwechsellzyme weitere Stimuli notwendig sind (Booth *et al.* 2002, Ojuka *et al.* 2002a).

Elektrostimulationsversuche bei Normoxie

Chronische Elektrostimulation *in vivo* führt im Kaninchenmuskel zu einer Abnahme der glykolytischen Stoffwechselkapazität in Form einer Abnahme der spezifischen Enzymaktivitäten verschiedener Enzyme der anaeroben Glykolyse (z.B. GAPDH), und zu einer Zunahme der oxidativen Stoffwechselkapazität in Form einer Zunahme

der spezifischen Enzymaktivitäten verschiedener mitochondrialer Enzyme (z.B. Citratsynthase). Diese Anpassungen werden *in vivo* nach ungefähr 7 Tagen sichtbar (Pette und Dusterhoft 1992, Mayne *et al.* 1996). Aufgrund dieser Daten versuchten wir zunächst, die metabolische Umwandlung der primären Skelettmuskelmyotuben in Kultur durch chronische Elektrostimulation zu induzieren.

Das von uns verwendete zyklische Stimulationsmuster von 15 Minuten 1 Hz mit anschließender 30-minütiger Pause führt in unserem System zu einer Umwandlung bei den kontraktilen Proteinen der primären Myotuben. Diese Umwandlung äußert sich unter anderem in einer Steigerung der Transkription der langsamen MHC Isoform I und in einer Abnahme der Transkripte der schnellen Isoform MHC II_d (siehe auch Abb.8). Es ist jedoch nicht gelungen, mittels Elektrostimulation mit diesem Reizmuster eine Änderung bei den metabolischen Enzymen zu induzieren.

Die Tatsache, daß sich auch nach 7-tägiger Elektrostimulation keine Veränderung bei den analysierten Stoffwechsellenzymen feststellen ließ, führte zu der Hypothese, daß die metabolische Umwandlung der Myotuben in unserem System während der Elektrostimulation eventuell durch andere Faktoren unterdrückt wird. Da bekannt ist, daß Hypoxie Einfluß auf die Transkription von GAPDH nimmt (z.B. Wood *et al.* 1998) und andererseits beim Menschen zu einer Abnahme der mitochondrialen Volumendichte führen kann (Hoppeler *et al.* 2003), haben wir als nächstes den Einfluß des Sauerstoffpartialdruckes auf die metabolischen Parameter in unserem Zellkultursystem untersucht.

Einfluß des Sauerstoffpartialdruckes

Da die Elektrostimulation bei 21% Sauerstoffgehalt im Inkubator in Bezug auf die metabolische Umwandlung der Myotuben nicht erfolgreich war und in der Literatur ein Einfluß von Hypoxie auf verschiedene metabolische Enzyme beschrieben ist (Iyer *et al.* 1998, Hoppeler *et al.* 2003), haben wir als nächstes die Wirkung unterschiedlicher Sauerstoffpartialdrücke (3% O₂, 21% O₂ und 42% O₂) auf die Stoffwechsellparameter untersucht.

Anders als bei den Elektrostimulationsversuchen ändert sich bei Hypoxie die

Transkription von GAPDH und Fumarase. Die spezifische Enzymaktivität von GAPDH ist unter Hypoxie erhöht. Obwohl der Fumarase mRNA-Gehalt bei 3% O₂ niedriger liegt, als bei 42% O₂, konnten bei der Citratsynthase Enzymaktivität und bei den PGC-1 Transkription keine Änderung festgestellt werden. Inzwischen wurde eine große Anzahl von Genen gefunden, deren Expression durch Hypoxie induziert werden kann. Diese Induktion kann direkt durch die Bindung von HIF-1 (Hypoxie-induzierter Faktor-1) an *hypoxia response elements* (HRE) oder indirekt beispielsweise durch die Interaktion von HIF-1 mit anderen Transkriptionfaktoren erfolgen (Semenza 1999).

Eine Zunahme der Transkription von GAPDH unter hypoxischen Bedingungen wurde bereits von mehreren Arbeitsgruppen beschrieben (Iyer *et al.* 1998, Wood *et al.* 1998, Graven *et al.* 1999). Über die Abhängigkeit der Expression von Fumarase vom Sauerstoffpartialdruck liegt keine Literatur vor. Allerdings ist bekannt, daß die mitochondriale Volumendichte in Muskelfasern beim Menschen abnimmt, wenn er sich über längere Zeit in einer ausgeprägt sauerstoffarmen Umgebung aufhält (Hoppeler *et al.* 2003).

Aktivierung und Hemmung von HIF-1

Um den Einfluß von HIF-1 auf die Transkription von GAPDH und Fumarase näher zu untersuchen, wurden Versuche mit Cobalt- und Cadmiumionen durchgeführt. Cobaltionen verhindern den proteasomalen Abbau von HIF-1 α , indem sie die Bindung von prolylhydroxiliertem HIF-1 α an den von-Hippel-Lindau Komplex inhibieren. Zudem sollen Cobaltionen die transaktivierende Funktion von HIF-1 α steigern (Wang *et al.* 1995, Jiang *et al.* 1997, Yuan *et al.* 2003). Cadmiumionen dagegen sollen den proteasomalen Abbau von HIF-1 α sogar bei niedrigem Sauerstoffpartialdruck verstärken (Chun *et al.* 2000).

Wie zu erwarten hat die Inkubation der Myotuben in cobalthaltigem Medium ähnliche Auswirkungen auf die GAPDH und Fumarase Transkription wie die Kultivierung unter hypoxischen Bedingungen. Die Immunfluoreszenzaufnahmen zeigen, daß Cobaltionen den Gehalt der Myotuben an HIF-1 α erhöhen, die intrazelluläre Lokalisation aber nicht sichtbar beeinflussen. Diese Ergebnisse unterstützen die Befunde, daß Cobaltionen den Abbau von HIF-1 α hemmen. Es scheint jedoch in Skelettmuskelzellen einen hypoxieabhängigen Kernimport von HIF-1 zu geben (siehe Abb.7), der durch die Behandlung mit Cobaltionen nicht beeinträchtigt wird, da die

Erhöhung des cytosolischen HIF-1 α Proteingehaltes allein nicht ausreicht, um die Fluoreszenz in den Zellkernen bei 42% O₂ merklich zu verstärken.

Die Inkubation der primären Myotuben in cadmiumhaltigem Medium führte sowohl bei den Transkripten der GAPDH als auch bei den Transkripten der Fumarase zu einer deutlichen Abnahme. Die Immunfluoreszenzaufnahmen zeigen, daß durch Cadmiumionen der Kernimport von HIF-1 α bei 3% O₂ verhindert wird. Ein verstärkter Abbau von HIF-1 α in cadmiumhaltigem Medium, wie in der Literatur beschrieben (Chun *et al.* 2000), konnte nicht beobachtet werden. Da sowohl die Transkription von GAPDH, als auch die der Fumarase, nach der Inkubation der Myotuben in cadmiumhaltigem Medium deutlich abnimmt, könnte dies darauf hinweisen, daß Cadmiumionen auch den Kernimport anderer Transkriptionsfaktoren behindern, oder die Transkription mehrerer unterschiedlich regulierter Gene auf andere Weise vermindern.

Die Resultate der Versuche nach Inkubation der Myotuben in cobalthaltigem Medium unterstützen die Hypothese, daß HIF-1 die Erhöhung der Transkription von GAPDH und die Verminderung der Transkription des Fumarasegens bei niedrigem Sauerstoffpartialdruck vermittelt. Um eine fundierte Aussage über die Regulation des Gens für Fumarase durch HIF-1 treffen zu können, müßten jedoch Reporterassays durchgeführt werden.

Die Versuche mit unterschiedlichen Sauerstoffpartialdrücken haben die Bedeutung des Sauerstoffangebots für die Expression der GAPDH und die Transkription der Fumarase bestätigt. Aus diesem Grund wurde in den folgenden Versuchen die Hypothese untersucht, daß die Elektrostimulation der primären Myotuben nur bei ausreichendem Sauerstoffangebot zu einer Zunahme der mitochondrialen Stoffwechsellzyme führen kann.

Elektrostimulationsversuche bei Hyperoxie

Die Versuche mit unterschiedlichen Sauerstoffpartialdrücken haben gezeigt, daß das Sauerstoffangebot einen starken Einfluß auf die Transkription von GAPDH und Fumarase nimmt. Dies führte zu der Hypothese, daß die metabolische Umwandlung der Myotuben während der Elektrostimulationsversuche unter normoxischen Bedingungen durch einen Mangel an Sauerstoff verhindert wurde. Aus diesem Grund

wurde bei alle nachfolgenden Versuchen der Sauerstoffgehalt in den Zellkulturinkubatoren ab dem 14. Tag auf 42% verdoppelt.

Auch durch die Erhöhung des Sauerstoffgehaltes auf 42% während der Elektrostimulation mit dem Stimulationsmuster von 15 Minuten 1 Hz mit anschließender 30-minütiger Pause, ist es nicht gelungen, eine Änderung bei den metabolischen Enzymen zu induzieren. Einzig bei den PGC-1 Transkripten konnte eine signifikante Zunahme erzeugt werden.

Die Abhängigkeit der PGC-1 Expression von muskulärer Arbeit und Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration durch Koffein oder Calciumionophor ist allgemein anerkannt (z.B. Wu *et al.* 2002, Handschin *et al.* 2003, Ojuka *et al.* 2003). Der von uns gemessene schnelle und signifikante Anstieg der PGC-1 mRNA nach 3 Tagen Elektrostimulation zeigt, daß zumindestens die Transkription eines sehr frühen und wichtigen Koaktivators für die Mitochondriogenese durch die Elektrostimulation der primären Myotuben induziert werden kann.

Da auch die Elektrostimulation bei 42% O₂ mit einer Frequenz von 1 Hz keine Wirkung auf die metabolischen Enzyme zeigte, wurden Experimente mit einem Reizmuster von 15 Minuten Stimulation mit 5 Hz, gefolgt von 30 Minuten Pause durchgeführt. Wie bei den Elektrostimulationsversuchen mit einer Frequenz von 1 Hz konnte auch bei den Experimenten mit 5 Hz bei 42% O₂ keine metabolische Umwandlung der Muskelfasern induziert werden.

Kontraktile Aktivität führt zu einer Vielzahl von Veränderungen innerhalb der Skelettmuskelzellen. Neben den Calciumtransienten, die im Zuge der elektromechanischen Kopplung auftreten, kommt es z.B. zu Änderungen der Konzentrationen von AMP und Kreatinphosphat, des intrazellulären pH-Wertes und der Konzentrationen vieler Stoffwechselintermediate (Ojuka *et al.* 2003). Welches dieser Signale für die metabolische Umwandlung der Skelettmuskelzellen entscheidend ist, ist noch nicht endgültig gezeigt worden. Viele Arbeitsgruppen gehen davon aus, daß es sich bei den Signalen für die metabolische Anpassung in erster Linie um die Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration und die Aktivierung der AMPK handelt (Booth *et al.* 2002, Ojuka *et al.* 2002a).

Es ist denkbar, daß die Elektrostimulation in dem von uns verwendeten Zellkultursystem nicht intensiv genug ist, um die erforderlichen Schwellenwerte bei

den intrazellulären Erhöhungen der Calciumkonzentration bzw. der Zunahme der AMP-Konzentration zu erreichen. Aus diesem Grund wurden Versuche mit dem Kreatinanalogen β -Guanidinopropionsäure (GPA) durchgeführt, das zu einer Absenkung der intrazellulären ATP-Konzentration führt. Durch die Aktivität der Myokinase kann auf diese Weise die AMPK in den Myotuben aktiviert werden. Die Bedeutung der AMPK bei der Steigerung der Expression verschiedener mitochondrialer Enzyme ist in der Literatur ausführlich beschrieben (z.B. Winder *et al.* 2000, Putman *et al.* 2003).

Aktivierung der AMPK

Die AMPK soll an der Steigerung der Expression einer Vielzahl mitochondrialer Enzyme beteiligt sein (z.B. Winder *et al.* 2000, Putman *et al.* 2003). Sie wird durch einen gesteigerten ATP-Verbrauch und der damit einhergehenden Zunahme der intrazellulären AMP-Konzentration aktiviert. In der Annahme, daß die Elektrostimulation der Myotuben in unserem Zellkultursystem nicht intensiv genug ist, um durch die Zunahme der intrazellulären AMP-Konzentration die AMPK zu aktivieren, haben wir Versuche mit dem Kreatinanalogen β -Guanidinopropionsäure (GPA) durchgeführt. GPA wird von der Kreatinkinase phosphoryliert, kann anschließend aber nicht zum Aufbau von ATP aus ADP verwendet werden. Dadurch führt die Behandlung der Myotuben mit GPA dazu, daß die intrazelluläre ATP-Konzentration absinkt. Durch die Aktivität der Myokinase kommt es in der Folge zu einem Anstieg der AMP-Konzentration in den Myotuben und zu einer Aktivierung der AMPK.

Trotz der ausführlich beschriebenen Rolle der AMPK bei Steigerung der Expression der mitochondrialen Enzyme, ist es uns nicht gelungen eine metabolische Umwandlung der primären Myotuben durch die Absenkung der intrazellulären ATP-Konzentration zu induzieren. Für die Versuchsreihe zur Aktivierung der AMPK wurden die Myotuben drei Tage lang in Medium mit 5 mM β -Guanidinopropionsäure inkubiert, wodurch die intrazelluläre ATP-Konzentration um ca. 50% abgesenkt wurde. Mit dieser Behandlung konnte keine Veränderung bei den Enzymaktivitäten von GAPDH und Citratsynthase induziert werden. Der Fumarase mRNA-Gehalt änderte sich ebenfalls nicht und die Transkription von PGC-1 nahm ab. Auch die

Kombination von 5 mM GPA mit 3-tägiger Elektrostimulation in dem Reizmuster 5 Hz für 15 Minuten gefolgt von 30-minütiger Pause bewirkte keinerlei Steigerung der Transkription von PGC-1 oder Fumarase und auch keine Veränderung der Citratsynthase und GAPDH Enzymaktivitäten.

In Versuchen anderer Arbeitsgruppen führte die Gabe von GPA intraperitoneal oder im Futter ebenfalls zu einer Reduktion der ATP-Konzentration von ungefähr 50%. Außerdem wurde durch GPA die intrazelluläre Kreatinphosphatkonzentration gesenkt, die AMPK aktiviert und die spezifische Enzymaktivität von Citratsynthase gesteigert (Ren *et al.* 1993, Yaspelkis *et al.* 1999, Bergeron *et al.* 2001, Zhong *et al.* 2002). Allerdings ist ein direkter Vergleich zwischen diesen Tierversuchen und unseren Zellkulturexperimenten nur unter Vorbehalt möglich und die *in vivo* Versuchszeiten von 6 - 8 Wochen unterscheiden sich erheblich von unserer dreitägigen Versuchsdauer *in vitro*.

Zumindest in Bezug auf die Steigerung des Glukosetransportes während muskulärer Arbeit ist die Bedeutung der AMPK allerdings umstritten (Derave *et al.* 2000). In gentechnisch veränderten Mäusen, die dominant negative AMPK in ihren Muskeln überexprimieren, lag die Induktion des Glukosetransportes durch Elektrostimulation nur um 30% niedriger als in Wildtypmäusen (Mu *et al.* 2001). An Muskelbiopsien vom Menschen konnte gezeigt werden, daß eine Aktivierung der AMPK nur bei intensivem Training (75% von V_{O_2max}) stattfindet. Fahrradergometertraining von niedriger Intensität (50% von V_{O_2max}) führte nicht zu einer Aktivierung der AMPK beim Menschen (Wojtaszewski *et al.* 2000). Diese Ergebnisse führten zu der Hypothese, daß bei muskulärer Arbeit von niedriger Intensität die Anpassung der Muskelfasern in Bezug auf Glukosetransport und Gehalt der Zelle an Mitochondrien hauptsächlich über die Erhöhung der cytosolischen Calciumkonzentration als Stimulus abläuft. Nur bei muskulärer Arbeit von hoher Intensität, die zu einem Abfall der intrazellulären ATP-Konzentration führt, kommt das Signal für die Anpassung über beide Signalwege: den calciumabhängigen und den AMPK-vermittelten Signalweg. Auf diese Weise wäre eine differenziertere Steuerung der Anpassungsvorgänge bei unterschiedlicher Beanspruchung der Muskelfasern möglich (Ojuka 2004, Fujii *et al.* 2004, Richter *et al.* 2004).

Ein anderer Grund für das Ausbleiben der metabolischen Anpassung unserer primären Myotuben nach Inkubation in GPA-haltigem Medium könnte die Inhibition

der AMPK-Aktivierung durch einen hohen Glykogengehalt in den Zellen sein. Sowohl in Ruhe als auch während muskulärer Aktivität scheint die Aktivität der AMPK in Muskelfasern mit hohem Glykogengehalt niedriger zu liegen als in Muskelfasern mit niedrigem Glykogengehalt. (Derave *et al.* 2000, Wojtaszewski *et al.* 2002, Wojtaszewski *et al.* 2003). Beim Menschen konnte sogar nach 60-minütigem Training bei 70% von V_{O_2max} in der Gruppe mit erhöhtem Glykogengehalt keine Aktivierung der AMPK festgestellt werden (Richter *et al.* 2001). Diese *in vivo* Daten von humanen Muskelbiopsien können natürlich nur bedingt mit den *in vitro* Ergebnissen aus der primären Zellkultur verglichen werden.

Einfluß des intrazellulären Glykogengehaltes

Die vorangehenden Versuche haben gezeigt, daß weder Elektrostimulation mit 5 Hz, noch die Verminderung der ATP-Konzentration, noch die Verbindung dieser beiden Reize, eine metabolische Umwandlung unserer primären Myotuben induzieren konnte. Zwar ist es gelungen, einen Einfluß des Sauerstoffpartialdruckes auf die Expression der GAPDH und die Transkription der Fumarase nachzuweisen, aber durch die Erhöhung des Sauerstoffgehaltes in den Inkubatoren auf 42% O_2 während der Elektrostimulation konnte eine Hemmung der metabolischen Umwandlung durch ein zu niedriges Sauerstoffangebot während der Elektrostimulation ausgeschlossen werden. Da in der Literatur die hemmende Wirkung eines hohen intrazellulären Glykogengehaltes auf die Aktivierung der AMPK beschrieben ist (Richter *et al.* 2001, Derave *et al.* 2000, Wojtaszewski *et al.* 2002, Wojtaszewski *et al.* 2003), wurde in den nachfolgenden Versuchen der Einfluß des intrazellulären Glykogengehaltes auf die metabolischen Enzyme untersucht.

Die Absenkung des intrazellulären Glykogengehaltes durch Inkubation unserer primären Skelettmuskelmyotuben in glukosefreiem Medium führt zu signifikanten Abnahmen des GAPDH mRNA-Gehalts und der spezifischen GAPDH Enzymaktivität der Myotuben. Die Transkription von PGC-1 und die spezifische Citratsynthase Enzymaktivität dagegen steigen signifikant an. Diese Änderungen zeigen, daß die Inkubation der Myotuben in glukosefreiem Medium zu einer Reduktion der glykolytischen Stoffwechselkapazität führt, da GAPDH eines der Schlüsselenzyme des glykolytischen Stoffwechselweges darstellt. Zusätzlich gibt es Hinweise auf die

Erhöhung der oxidativen Stoffwechselkapazität in Form einer Zunahme der Enzymaktivität von Citratsynthase und der vermehrten Transkription eines der wichtigsten Faktoren bei der Induktion mitochondrialer Gene (PGC-1). Über den Einfluß des Glykogengehaltes von Muskelzellen auf die Expression von Stoffwechsellenzymen sind bisher sehr wenig Daten veröffentlicht worden. Eine Arbeitsgruppe aus Dänemark hat gezeigt, daß ein niedriger Glykogengehalt beim Menschen zu einer verstärkten Transkription der Hexokinase 2, der Pyruvatdehydrogenasekinase 4 und der Lipoproteinlipase führt (Pilegaard *et al.* 2002).

Ob es sich bei dem Auslöser für die Änderung der Stoffwechsellparameter um den extrazellulären Glukosemangel, oder um die Reduktion des intrazellulären Glukosegehaltes handelt, ist nicht sicher. Allerdings korrelieren die spezifischen Enzymaktivitäten von GAPDH und Citratsynthase mit dem Glykogengehalt (siehe Abb.18 und 19). Die Daten aus den *Western Blots* zeigen ebenfalls, daß die durch Inkubation in glukosefreiem Medium induzierte Abnahme der phosphorylierten Formen von PKB, GSK-3 und AMPK nicht sofort nach der Umstellung auf Medium ohne Glukose erfolgt, sondern erst dann, wenn auch der Glykogengehalt absinkt (siehe Abb.21 und 22).

In Bezug auf die Aktivitäten bestimmter Proteinkinasen kann man an den *Western Blots* in Abb.20 erkennen, daß die Inkubation in Medium ohne Glukose zu einer Inaktivierung von AMPK und PKB führt, da die aktivierten, phosphorylierten Formen von AMPK und PKB unter diesen Bedingungen abnehmen. Dies legt die Schlußfolgerung nahe, daß die durch glukosefreies Medium induzierte metabolische Anpassung nicht von der AMPK vermittelt wird. GSK-3 dagegen wird durch die Abnahme des intrazellulären Glykogenreserven aktiviert, da bei dieser Kinase die dephosphorylierte Form des Enzyms aktiv ist.

Hypothese über den Zusammenhang von Glykogengehalt und Aktivität der untersuchten Signaltransduktionskinasen

Geht man davon aus, daß es sich bei dem Signal für die metabolische Umwandlung der Skelettmuskelzellen um die Abnahme des intrazellulären Glykogengehaltes unter einen bestimmten Schwellenwert handelt, da eine geringe Abnahme der

Glykogenreserven noch nicht zu einer Änderung der Enzymaktivitäten von GAPDH und Citratsynthase führt (siehe Abb.18 und 19), dann muß es einen Sensor in den Zellen geben, der in der Lage ist, diese Abnahme des Glykogengehaltes unter einen bestimmten Wert zu registrieren. Da die Proteinphosphatase 1 über die glykogenbindende regulatorische Untereinheit des Muskels G_M an das Glykogen gebunden wird, wäre es denkbar, daß sie nach starkem Glykogenabbau frei wird. Cytosolische PP1 unterliegt der Regulation durch Inhibitorproteine und regulatorische Untereinheiten, im Muskel z.B. durch das Inhibitorprotein 2. Im Komplex mit Inhibitorprotein 2 wird die PP1 gehemmt, jedoch nur, solange das Inhibitorprotein 2 unphosphoryliert vorliegt. Phosphorylierung dieses Inhibitors durch GSK-3 oder Caseinkinase 2 aktiviert die an Inhibitorprotein 2 gebundene PP1. Andere Untereinheiten katalysieren den Kernimport von PP1 oder regulieren die Aktivität der PP1 in den Mitochondrien (Agarwal-Mawal und Paudel 2001, Sakashita *et al.* 2003, Watanabe *et al.* 2001, Bricchese *et al.* 2004). Nachdem sich die PP1 vom Glykogen gelöst hat liegt sie also nicht zwangsläufig in gehemmtem Zustand vor, sondern könnte andere Substrate im Cytosol oder sogar im Zellkern erreichen und dephosphorylieren, wie z.B. AMPK oder PKB.

Welche Proteinphosphatasen die Dephosphorylierung von AMPK, PKB und GSK-3 katalysieren, ist nicht genau bekannt. AMPK soll vor allem durch PP2c und PP2a dephosphoryliert werden (Davies *et al.* 1995), während PKB hauptsächlich von PP2a inaktiviert wird (Sato *et al.* 2000). Die für GSK-3 zuständige Proteinphosphatase ist noch nicht identifiziert, eventuell wird GSK-3 vornehmlich über die Proteinexpression reguliert, da es im unphosphorylierten Zustand aktiv ist und erst durch die Phosphorylierung inaktiviert wird (Hardt und Sadoshima 2002). Geht man nun davon aus, daß sich die Substratspezifitäten der Proteinphosphatasen PP1 und PP2a überlappen, und daß die PP1 bei einem Abfall des Glykogengehaltes unter den postulierten Schwellenwert stark aktiviert wird, ist es möglich, daß sie unter diesen Umständen auch AMPK und PKB dephosphorylieren kann.

Diese Daten, zusammen mit der Tatsache, daß es ein lange bekanntes, negatives *feedback* zwischen dem Glykogengehalt und der Glykogensynthase Enzymaktivität gibt, das dazu führt, daß die Glykogensynthase bei niedrigem Glykogengehalt aktiviert und bei hohem Glykogengehalt inaktiviert wird (Nielsen und Richter 2003), führten zu der Hypothese, die in Abb.34 dargestellt ist.

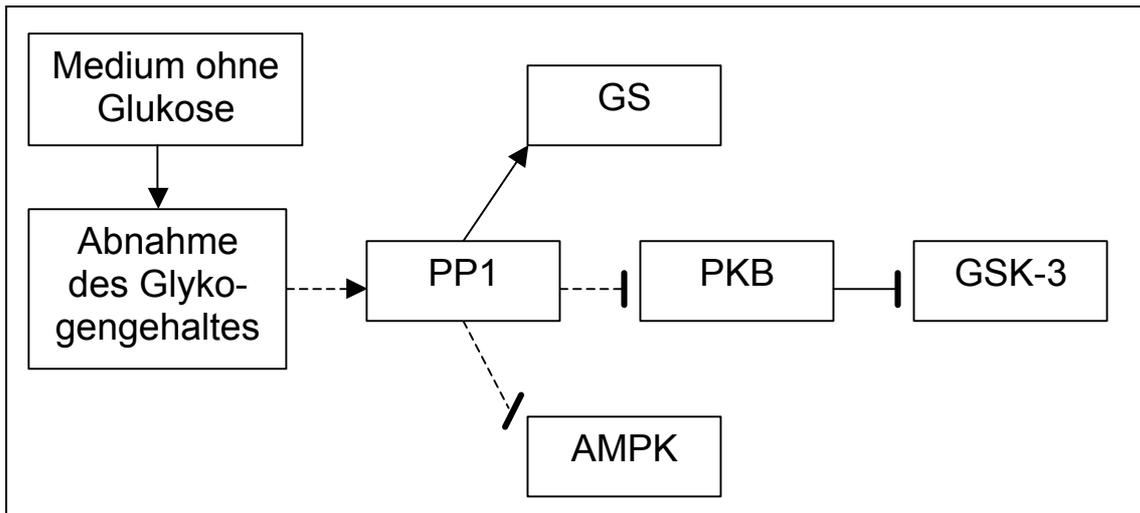


Abb.34: Hypothese: Zusammenhang zwischen Glykogengehalt und den Enzymaktivitäten von PP1, Glykogensynthase, AMPK, PKB und GSK-3

AMPK = Adenosin-5'-monophosphat-aktivierte Proteinkinase, GS = Glykogensynthase, GSK-3 = Glykogensynthasekinase-3, PKB = Proteinkinase B, PP1 = Proteinphosphatase 1.

Eine direkte Dephosphorylierung von GSK-3 durch PP1 ist unwahrscheinlich, da PP1 dann sowohl die Glykogensynthase, als auch die GSK-3 aktivieren würde. Andererseits hat sich die Bedeutung der GSK-3 für die Phosphorylierung der Glykogensynthase stark relativiert, seitdem bekannt ist, daß die Glykogensynthase von mindestens fünf Proteinkinasen an verschiedenen Stellen phosphoryliert wird, und daß die Phosphorylierung der GS durch die GSK-3 erst durch eine vorangehende Phosphorylierung des Ser 666 (Glykogensynthase des Kaninchens) durch die Caseinkinase 2 ermöglicht wird. Es gibt jedoch immer mehr Veröffentlichungen, die der GSK-3 eine Rolle bei der Phosphorylierung verschiedener Transkriptionsfaktoren zuschreiben. Aus diesen Gründen enthält das Schema in Abb.34 keine Verbindung zwischen GSK-3 und der Glykogensynthase.

Inhibition der GSK-3

Die Versuchsreihen mit zwei verschiedenen GSK-3-Hemmstoffen zeigen, daß die metabolischen Veränderungen, die durch die Inkubation in glukosefreiem Medium induziert werden, nicht mittels Inhibition der GSK-3 unterdrückt werden können (siehe Abb.23 und 24). Obwohl die GSK-3 also durch die Inkubation der Myotuben in Medium ohne Glukose aktiviert (dephosphoryliert) wird (*Western Blot*, Abb.20), ist ihre Beteiligung für die Änderung der analysierten Stoffwechselfparameter anscheinend nicht von Bedeutung.

Hemmung der PP1

Die Inhibition der Proteinphosphatase 1 dagegen verhinderte die Anstiege der spezifischen Citratsynthase Enzymaktivität und der Transkription von PGC-1, die durch Inkubation der Myotuben in Medium ohne Glukose induziert wurden. Dieser Befund führte zu der Annahme, daß das Signal für diese Änderungen von der PP1 weitergeleitet wird, und nicht von GSK-3 (siehe oben), AMPK (inaktiv) oder PKB (inaktiv). Der Glykogengehalt der Myotuben änderte sich durch die Tautomycinbehandlung nicht. Dieses Indiz deutet darauf hin, daß die Änderungen des Glykogengehaltes in der untersuchten Signaltransduktionskaskade vor den Änderungen der PP1-Aktivität stattfindet.

Obwohl die spezifische GAPDH Enzymaktivität mit dem Glykogengehalt der Zellen korreliert, konnte sie durch die Inkubation in Tautomycin nicht beeinflusst werden. Die Reduktion der GAPDH Transkription und der GAPDH Enzymaktivität wird also nicht durch die PP1 vermittelt. Das auslösende Signal für die Verminderung der GAPDH Expression könnte z.B. aus einer Änderung des Glykogengehaltes, der extrazellulären Glukosekonzentration oder der intrazellulären Konzentration von Glukose-6-Phosphat bestehen. Ergänzt man die in Abb.34 dargestellte Hypothese um die untersuchten Stoffwechselfparameter, ergeben sich die in Abb.35 gezeigten Zusammenhänge.

Glykogenreserven in den Myotuben wird der nötige Schwellenwert für die Änderung der Stoffwechselfparameter vielleicht nicht erreicht. Außerdem könnte die gleichzeitige Hemmung der PP1 durch die PKA dem Effekt von Isoproterenol auf die Glykogenreserven und damit auf die PP1 und die Transkription von PGC-1 bzw. die Enzymaktivität von Citratsynthase entgegenwirken. Diese zwei Wirkungsweisen der PKA sind nicht zu trennen und könnten in unserem Versuch dazu geführt haben, daß sich die unterschiedlichen Effekte von Isoproterenol gegenseitig aufheben.

Calciumionophorversuche

In der Literatur werden als Auslöser für eine veränderte Expression metabolischer Enzyme vor allem die Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration und die Aktivierung der AMPK durch Erhöhung der AMP-Konzentration genannt (Booth *et al.* 2002, Ojuka *et al.* 2002a). Auch wenn man davon ausgeht, daß die AMPK eventuell doch keine Rolle bei der Steigerung der metabolischen Stoffwechselkapazität spielt, so hätten zumindest die intrazellulären Calciumtransienten, die bei der elektromechanischen Kopplung während der Elektrostimulation der Myotuben entstehen, eine Änderung der gemessenen Enzymaktivitäten bewirken sollen. Auch in Bezug auf die intrazelluläre Erhöhung der Calciumkonzentration ist es jedoch denkbar, daß die kontraktile Aktivität in dem von uns verwendeten Zellkultursystem nicht intensiv genug ist, um eine metabolische Anpassung zu induzieren. Es stellt sich an dieser Stelle die Frage, wie der Schwellenwert der intrazellulären Calciumkonzentration definiert ist, der für die metabolische Transformation der Myotuben überschritten werden muß. Da die während der elektromechanischen Kopplung auftretenden Calciumtransienten kurzzeitig zu äußerst starken Erhöhungen der Calciumionenkonzentration im Myoplasma führen, handelt es sich bei diesem Schwellenwert eher nicht um eine Calciumkonzentration, die einmal überschritten werden muß, da diese Voraussetzung dann bei jeder Kontraktion der Muskelfaser erfüllt wäre. Wahrscheinlich besteht dieser Schwellenwert für die metabolische Anpassungsvorgänge eher aus einem Integral der Calciumkonzentration über die Zeit. So wäre es zu erklären, wenn sich der erforderliche Calciumschwellenwert für die metabolische Umwandlung leichter durch die Inkubation der Myotuben in Calciumionophor erreichen ließe, als durch Elektrostimulation von Muskelzellen *in vitro*. Aus diesem Grund wurden zusätzlich zu den Elektrostimulationsversuchen

auch Versuche mit dem Calciumionophor A23187 durchgeführt.

Im Gegensatz zu den Elektrostimulationsversuchen konnten durch die Inkubation der Myotuben in Medium mit Calciumionophor deutliche Änderungen bei den untersuchten Stoffwechselfparametern induziert werden. Der Vergleich mit den Werten der Myotuben aus Medium ohne Glukose zeigt, daß die Behandlung der Myotuben mit Calciumionophor, in Bezug auf den Glykogengehalt und die GAPDH Enzymaktivität eine ähnlich starke Wirkung hat, wie das glukosefreie Medium (siehe Abb.29 und 30). Außerdem kann der Ionophoreffekt auf diese beiden Parameter durch die Kombination von Calciumionophor mit glukosefreiem Medium noch gesteigert werden. Die Transkription von PGC-1 und die Enzymaktivität der Citratsynthase dagegen lassen sich durch die Anwendung von Calciumionophor viel stärker induzieren, als mit glukosefreiem Medium; in diesen beiden Fällen ist keine weitere Verstärkung des Ionophoreffektes durch die Kombination der beiden Stimuli zu erreichen. Die Induktion der Expression von PGC-1 durch Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration wurde in der Literatur bereits von mehreren Gruppen beschrieben (Irrcher *et al.* 2003, Ojuka *et al.* 2003). Auch über die Zunahme der Citratsynthase Enzymaktivität nach Inkubation von Muskelzellen in Calciumionophor wurde bereits berichtet (Kubis *et al.* 1997).

Phosphorylierungsstatus von PKB, GSK-3 und AMPK nach Inkubation in Calciumionophor

Die *Western Blots* in Abb.31 zeigen, daß die Inkubation der Myotuben in Calciumionophor keinerlei Änderungen des Phosphorylierungsstatus von PKB, GSK-3 und AMPK hervorruft. Somit läßt sich keine Änderung der Aktivität dieser drei Proteinkinasen nach Behandlung der Myotuben mit Calciumionophor feststellen. Diese Ergebnisse unterscheiden sich deutlich von den *Western Blots* der Myotuben aus Medium ohne Glukose (Abb.20).

Geht man davon aus, daß es bei den Myotuben in glukosefreiem Medium zu einer starken Aktivierung der PP1 kommt, die dann direkt oder indirekt zu einer Dephosphorylierung der drei untersuchten Proteinkinasen führt (Hypothese in Abb.35), so scheint die PP1 durch die Inkubation der Myotuben in Calciumionophor nicht aktiviert zu werden. Folglich können die durch Calciumionophor induzierten Anstiege der Transkription von PGC-1 und der Enzymaktivität von Citratsynthase

nicht von der PP1 vermittelt werden. Es müßte also zwei Wege geben, um die Transkription von PGC-1 und die Enzymaktivität der Citratsynthase zu steigern: einen calciumabhängigen Weg und einen, der vom intrazellulären Glykogengehalt abhängt.

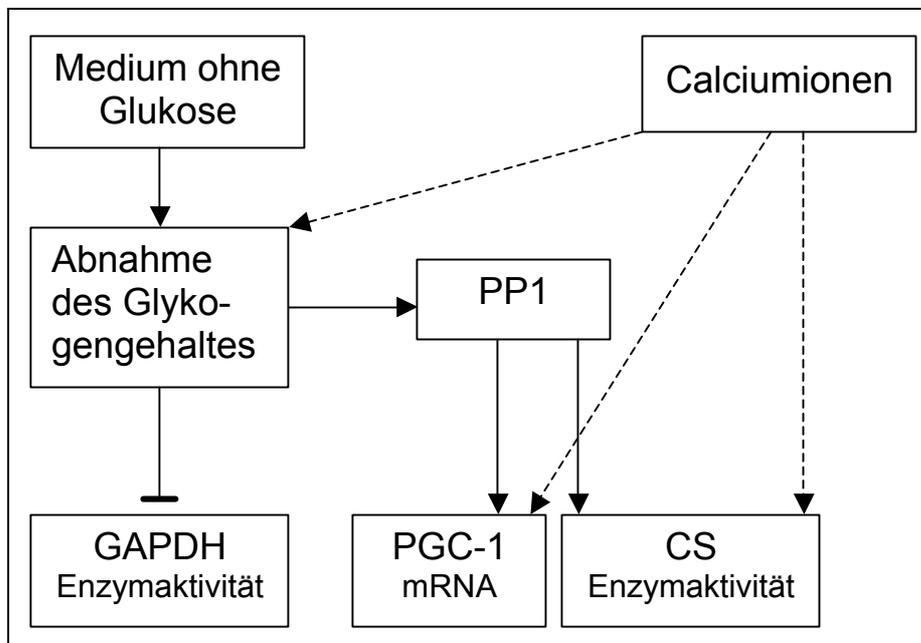


Abb.36: Zwei Wege führen zur Zunahme der PGC-1 mRNA und der Citratsynthase Enzymaktivität

CS = Citratsynthase, GAPDH = Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase, PGC-1 = Koaktivator des peroxisom-proliferator-aktivierten Rezeptors γ , PP1 = Proteinphosphatase 1.

Die in Abb.30 sichtbare Abnahme der Glykogenreserven nach Inkubation der Myotuben in Medium mit Calciumionophor, läßt sich zum einen durch die Aktivierung der Phosphorylasekinase über die erhöhte Calciumkonzentration erklären, da die Phosphorylasekinase sowohl durch Calcium-Calmodulin als auch durch die PKA aktiviert wird. Zum anderen ist es möglich, daß während der Inkubation in Calciumionophor ein erhöhter Energieverbrauch der Myotuben entsteht, da die Zellen die eingeströmten Calciumionen wieder aktiv aus dem Cytosol heraustransportieren müssen. Dieser energieaufwendige Prozeß könnte dann zu einer Reduktion der Glykogenreserven führen. Die moderate Reduktion der Glykogenreserven in den Myotuben nach Anwendung von Calciumionophor muß nicht zwangsläufig zu einer Aktivierung der PP1 führen, wenn der Schwellenwert für die Freisetzung der PP1 nicht erreicht wird. Diese Reduktion des intrazellulären

Glykogengehaltes könnte wiederum der Grund für die Abnahme der GAPDH Enzymaktivität nach der Behandlung der Myotuben mit Calciumionophor sein.

Die starken Anstiege der Transkription von PGC-1 und der Enzymaktivität der Citratsynthase (Abb.29 und 30) lassen sich jedoch durch den relativ geringen Glykogenabbau nach Behandlung der Myotuben in Calciumionophor (Abb.30) allein nicht erklären, denn der Glykogengehalt ist nach der Anwendung von Calciumionophor nicht stärker reduziert, als nach der Inkubation in Medium ohne Glukose. Der PGC-1 mRNA-Gehalt und die Enzymaktivität der Citratsynthase dagegen steigen dagegen nach der Ionophorbehandlung sehr viel stärker an, als nach der Inkubation in glukosefreiem Medium (Abb.29 und 30). Auch dieser Befund weist darauf hin, daß es zwei verschiedene Wege gibt, die die Transkription von PGC-1 und die Citratsynthase Enzymaktivität steigern, und daß die Erhöhung der Calciumkonzentration ein eigenständiges, nicht über den Glykogengehalt vermitteltes Signal für die metabolische Umwandlung darstellt.

Hemmung der CaMKK

Die Versuche zur Inhibition der CaMKK zeigen, daß nur der Ionophoreffekt auf die Transkription von PGC-1 durch den CaMKK-Hemmstoff STO-609 teilweise unterdrückt werden kann (siehe Abb.32 und 33). Die durch Inkubation der Myotuben in Calciumionophor induzierten Änderungen der Enzymaktivitäten von GAPDH und Citratsynthase lassen sich durch STO-609 nicht beeinflussen. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß Calciumionophor über die Aktivierung von CaMKK und CaMK womöglich über die Phosphorylierung von CREB (*cAMP response element binding protein*) die Transkription von PGC-1 fördert. Daß die Wirkung des Calciumionophors auf die PGC-1 Transkripte durch STO-609 nicht vollständig unterdrückt werden kann, läßt sich dadurch erklären, daß die CaMK bei erhöhten Calciumkonzentrationen auch ohne die Phosphorylierung durch die CaMKK teilweise aktiviert wird.

Geht man davon aus, daß die Abnahme der GAPDH Enzymaktivität nach der Behandlung der Myotuben mit Calciumionophor durch die Abnahme des Glykogengehaltes ausgelöst wird, dann ist keine Hemmung dieses Effektes durch die Inkubation der Myotuben in CaMKK-Inhibitor zu erwarten. Eine weitere Möglichkeit die relativ zügige Abnahme der GAPDH Enzymaktivität bei Behandlung der Myotuben mit Calciumionophor zu erklären, wäre ein calciumioneninduzierter Abbau von cytoplasmatischen Proteinen. Die Transformation einer Skelettmuskelfaser

beinhaltet den Austausch aller fasertypspezifischen Proteinisoformen und wird von einem kontrollierten Abbau bestimmter cytosolischer Proteine begleitet (Ordway *et al.* 2000). In der Literatur gibt es Hinweise auf die Aktivierung des calciumabhängigen μ -Calpains, einer cytosolischen Cysteinprotease, durch chronische Elektrostimulation von Kaninchen- und Rattenmuskel. Die Aktivität des μ -Calpains wird in diesen Untersuchungen durch die Elektrostimulation von *extensor digitorum longus*-Muskel in intakten Muskelfasern gesteigert, während die nekrotischen Muskelfasern eine erhöhte Aktivität von m-Calpain aufweisen (Sultan *et al.* 2001). Dieser regulierte proteasomale Abbau soll den Umbau der myofibrillären kontraktilen Proteine bei der *fast-to-slow* Umwandlung fördern und betrifft wahrscheinlich auch andere cytosolische Proteine, wie z.B. GAPDH.

Die calciumbedingte Steigerung der Enzymaktivität der Citratsynthase scheint ohne die Beteiligung der CaMKK abzulaufen, denn sie konnte durch die Anwendung von STO-609 nicht inhibiert werden. Auch die Hemmung der Proteinphosphatase Calcineurin (PP2b) durch Cyclosporin A kann den Anstieg der Citratsynthase Enzymaktivität nach Inkubation von Myotuben in Calciumionophor nicht verhindern (Meissner *et al.* 2001). Über welchen anderen Signaltransduktionsweg die Erhöhung der intrazellulären Calciumionenkonzentration zu der beobachteten Zunahme der Citratsynthase Enzymaktivität führen könnte ist noch unklar.

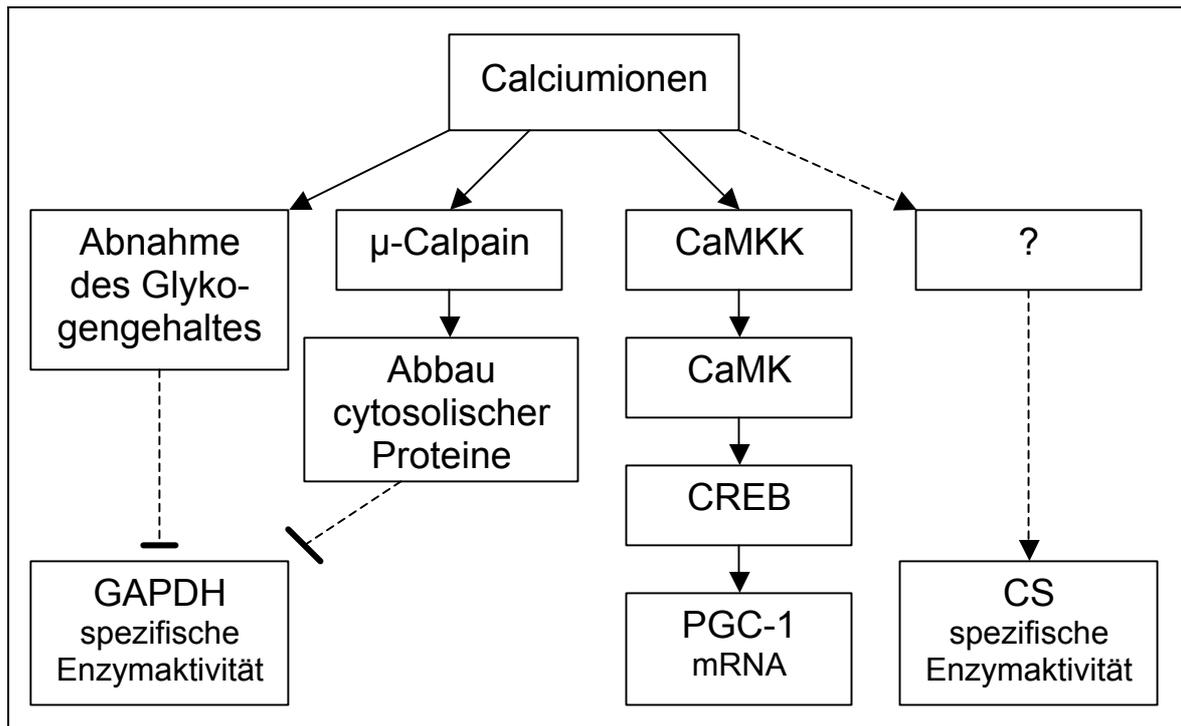


Abb.37: Mögliche Wirkungsweisen des Calciumionophors auf die Enzymaktivitäten von GAPDH und Citratsynthase und auf die PGC-1 Transkription

CaMK = Calcium-Calmodulin abhängige Proteinkinase, CaMKK = CaMK Kinase, CREB = *cyclic adenosine-5'-monophosphate response element binding protein*, CS = Citratsynthase, GAPDH = Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase, PGC-1 = Koaktivator des peroxisom-proliferator-aktivierten Rezeptors γ .

Zusammenfassung

In dieser Dissertation sind die Einflüsse verschiedener Stimuli auf metabolische Parameter von primären Skelettmuskelmyotuben untersucht worden. Dabei konnte eine Wirkung des Sauerstoffpartialdrucks auf die GAPDH und Fumarase Transkription gefunden werden. Inkubation der Myotuben in Calciumionophor dagegen beeinflusst die Enzymaktivitäten von GAPDH und Citratsynthase, sowie den PGC-1 mRNA-Gehalt. Außerdem konnte erstmals gezeigt werden, daß die Abnahme der intrazellulären Glykogenreserven ein wichtiges Signal für die metabolische Anpassung darstellt und zu Veränderungen bei den mRNA-Gehalten von GAPDH und PGC-1, sowie bei den Enzymaktivitäten von GAPDH und Citratsynthase führt. Auch der Phosphorylierungsgrad von AMPK, PKB und GSK-3 ändert sich bei einer Reduktion des intrazellulären Glykogengehalts.

Die Untersuchung von Signaltransduktionswegen, die an diesen metabolischen Anpassungsvorgängen beteiligt sein könnten, ist diffizil, da Signale innerhalb der Zellen nicht linear weitergeben werden, sondern sich vielmehr in komplexen Signalnetzwerken verbreiten. Die Zusammenhänge zwischen Ursache und Wirkung innerhalb eines Signaltransduktionsvorgangs sind dadurch schwer zu erkennen und noch schwieriger zu manipulieren.

Ausblick

Die in dieser Dissertation dargestellten Hinweise auf die Zusammenhänge zwischen dem Glykogengehalt und der metabolischen Umwandlung von Skelettmuskelfasern bedürfen noch weiterer ausgiebiger Untersuchungen. Beispielsweise ist es uns bisher noch nicht gelungen, den Glykogenabbau während der Inkubation in glukosefreiem Medium oder in Medium mit Calciumionophor zu hemmen, und so wertvolle Hinweise auf die Zusammenhänge zwischen Glykogengehalt, Phosphorylierungsstatus der untersuchten Proteinkinasen und der Transkription von PGC-1 zu gewinnen. Auch die Art und Weise der Aktivierung der PP1 durch die Reduktion der Glykogenreserven unter einen bestimmten Schwellenwert und die Rolle der glykogenbindenden Einheit G_M bei dieser Aktivierung sind noch unklar. Weiterhin sollten mögliche Wechselwirkungen zwischen PP1 und anderen regulatorischen Untereinheiten und Inhibitorproteinen (z.B. Inhibitorprotein 2) untersucht werden, ebenso wie die Verbindung zwischen der PP1 und der

Transkription von PGC-1 bzw. der Enzymaktivität der Citratsynthase.

Es ist jedoch gewiß, daß eine Reduktion des Glykogengehaltes einer Skelettmuskelfaser um ca. 50% *in vivo* leicht zu erreichen ist. Beim Menschen z.B. führen 30 Minuten Fahrradergometertraining bei 62% von V_{O_2max} zu einer Entleerung der Glykogenspeicher um ca. 34%, während 60 Minuten des gleichen Trainings eine Reduktion des intrazellulären Glykogens um ca. 73% bewirken (Green *et al.* 1995). Eine dauerhafte Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration in Bereiche, die der Inkubation von Myotuben in calciumionophorhaltigem Medium entsprechen, sind dagegen *in vivo* nicht realisierbar (ungefähr 150 nM nach 4-stündiger Inkubation in 0,1 μ M A23187, siehe Kubis *et al.* 2003). In zukünftigen Experimenten sollten die Ergebnisse dieser Arbeit über die metabolische Umwandlung nach Reduktion des Glykogengehaltes durch *in vivo* Studien bestätigt und ergänzt werden, indem man den intrazellulären Glykogengehalt in Tier oder Mensch durch bestimmte Trainingsprogramme absenkt und die Wirkung auf die metabolischen Parameter untersucht.

Ein Problem bei der Elektrostimulation der Myotuben in unserem Zellkultursystem könnte die Verwendung des zyklischen Reizmusters aus 15 Minuten Stimulation gefolgt von 30 Minuten Pause sein. Die Anwendung dieses Reizmusters mit einer Stimulationsfrequenz von 1 oder 5 Hz bewirkt bei den Myotuben in unserem System, die während der Reizpausen geerntet wurden, keinerlei Änderung des Glykogengehaltes (siehe Abb.11). Das während der kontraktiven Aktivität der Muskelzellen verbrauchte Glykogen wird also in den Reizpausen sofort wieder aufgefüllt. Die Umstellung auf ein Elektrostimulationsmuster mit länger andauernden Reizphasen, z.B. 4 Stunden Reizung mit anschließender 8-stündiger Pause, könnte zu einer stärkeren und auch längerandauernden Abnahme der Glykogenreserven und dadurch vielleicht eher zu einer metabolischen Umwandlung der primären Skelettmuskelmyotuben durch Elektrostimulation führen.

LITERATURVERZEICHNIS

Adhihetty P.J., Irrcher I., Joseph A.M., Ljubicic V. und Hood D.A. (2003). "Plasticity of skeletal muscle mitochondria in response to contractile activity." *Experimental Physiology* 88(1): 99-107.

Agarwal-Mawal A. und Paudel H.K. (2001). "Neuronal Cdc2-like protein kinase (Cdk5/p25) is associated with protein phosphatase 1 and phosphorylates inhibitor-2." *Journal of Biological Chemistry* 276(26): 23712-23718.

Antos C.L., McKinsey T.A., Frey N., Kutschke W., McAnally J., Shelton J.M., Richardson J.A., Hill J.A. und Olson E.N. (2002). "Activated glycogen synthase-3 beta suppresses cardiac hypertrophy in vivo." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99(2): 907-912.

Bass A., Brdiczka D., Eyer P., Hofer S. und Pette D. (1969). "Metabolic Differentiation of Distinct Muscle Types at Level of Enzymatic Organization." *European Journal of Biochemistry* 10(2): 198-206.

Bassam B.J., Caetanoanollés G. und Gresshoff P.M. (1991). "Fast and Sensitive Silver Staining of DNA in Polyacrylamide Gels." *Analytical Biochemistry* 196(1): 80-83.

Bergeron R., Ren J.M., Cadman K.S., Moore I.K., Perret P., Pypaert M., Young L.H., Semenkovich C.F. und Shulman G.I. (2001). "Chronic activation of AMP kinase results in NRF-1 activation and mitochondrial biogenesis." *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 281(6): E1340-E1346.

Bergmeyer H.U. (1983). "Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase." *Methods of Enzymatic Analysis, Verlag Chemie GmbH, Weinheim* 2: 211-213.

Booth F.W., Chakravarthy M.V. und Spangenburg E.E. (2002). "Exercise and gene expression: physiological regulation of the human genome through physical activity." *Journal of Physiology-London* 543(2): 399-411.

Brazil D.P., Park J. und Hemmings B.A. (2002). "PKB binding proteins: Getting in on the akt." *Cell* 111(3): 293-303.

Brichese L., Cazettes G. und Valette A. (2004). "JNK is associated with Bcl-2 and PP1 in mitochondria: paclitaxel induces its activation and its association with the phosphorylated form of Bcl-2." *Cell Cycle* 3(10): 1312-1319.

Chijiwa T., Mishima A., Hagiwara M., Sano M., Hayashi K., Inoue T., Naito K., Toshioka T. und Hidaka H. (1990). "Inhibition of Forskolin-Induced Neurite Outgrowth and Protein-Phosphorylation by A Newly Synthesized Selective Inhibitor of Cyclic Amp-Dependent Protein-Kinase, N-[2-(P-Bromocinnamylamino)Ethyl]-5-Isoquinolinesulfonamide (H-89), of Pc12D Pheochromocytoma Cells." *Journal of Biological Chemistry* 265(9): 5267-5272.

Chin E.R., Olson E.N., Richardson J.A., Yano Q., Humphries C., Shelton J.M., Wu H., Zhu W.G., Bassel-Duby R. und Williams R.S. (1998). "A calcineurin-dependent transcriptional pathway controls skeletal muscle fiber type." *Genes & Development* 12(16): 2499-2509.

Chun Y.S., Choi E., Kim G.T., Choi H., Kim C.H., Lee M.J., Kim M.S. und Park J.W. (2000). "Cadmium blocks hypoxia-inducible factor (HIF)-1-mediated response to hypoxia by stimulating the proteasome-dependent degradation of HIF-1alpha." *European Journal of Biochemistry* 267(13): 4198-4204.

Cohen P. (1989). "The Structure and Regulation of Protein Phosphatases." *Annual Review of Biochemistry* 58: 453-508.

Connor J.H., Kleeman T., Barik S., Honkanen R.E. und Shenolikar S. (1999). "Importance of the beta 12-beta 13 loop in protein phosphatase-1 catalytic subunit for inhibition by toxins and mammalian protein inhibitors." *Journal of Biological Chemistry* 274(32): 22366-22372.

Corcoran E.E. und Means A.R. (2001). "Defining Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase cascades in transcriptional regulation." *Journal of Biological Chemistry* 276(5): 2975-2978.

Corpet F. (1988). "Multiple Sequence Alignment with Hierarchical-Clustering." *Nucleic Acids Research* 16(22): 10881-10890.

Cross D.A.E., Culbert A.A., Chalmers K.A., Facci L., Skaper S.D. und Reith A.D. (2001). "Selective small-molecule inhibitors of glycogen synthase kinase-3 activity protect primary neurones from death." *Journal of Neurochemistry* 77(1): 94-102.

Davies S.P., Helps N.R., Cohen P.T. und Hardie D.G. (1995). "5'-AMP inhibits dephosphorylation, as well as promoting phosphorylation, of the AMP-activated protein kinase. Studies using bacterially expressed human protein phosphatase-2C alpha and native bovine protein phosphatase-2AC." *Federation of European Biochemical Societies Letters* 377(3): 421-425.

Derave W., Ai H., Ihlemann J., Witters L.A., Kristiansen S., Richter E.A. und Ploug T. (2000). "Dissociation of AMP-activated protein kinase activation and glucose transport in contracting slow-twitch muscle." *Diabetes* 49(8): 1281-1287.

Fong N.M., Jensen T.C., Shah A.S., Parekh N.N., Saltiel A.R. und Brady M.J. (2000). "Identification of binding sites on protein targeting to glycogen for enzymes of glycogen metabolism." *Journal of Biological Chemistry* 275(45): 35034-35039.

Franke T.F., Hornik C.P., Segev L., Shostak G.A. und Sugimoto C. (2003). "PI3K/Akt and apoptosis: size matters." *Oncogene* 22(56): 8983-8998.

Fujii N., Aschenbach W.G., Musi N., Hirshman M.F. und Goodyear L.J. (2004). "Regulation of glucose transport by the AMP-activated protein kinase." *Proceedings of the Nutrition Society* 63(2): 205-210.

Graven K.K., Yu Q., Pan D., Roncarati J.S. und Farber H.W. (1999). "Identification of an oxygen responsive enhancer element in the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene." *Biochimica et Biophysica Acta* 1447(2-3): 208-218.

Green H.J., Jones S., Ball-Burnett M., Farrance B. und Ranney D. (1995). "Adaptations in muscle metabolism to prolonged voluntary exercise and training." *Journal of Applied Physiology* 78(1): 138-145.

Handschin C., Rhee J., Lin J.D., Tarr P.T. und Spiegelman B.M. (2003). "An autoregulatory loop controls peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 alpha expression in muscle." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(12): 7111-7116.

Hardie D.G., Carling D. und Carlson M. (1998). "The AMP-activated/SNF1 protein kinase subfamily: Metabolic sensors of the eukaryotic cell?" *Annual Review of Biochemistry* 67: 821-855.

Hardt S.E. und Sadoshima J. (2002). "Glycogen synthase kinase-3 beta - A novel regulator of cardiac hypertrophy and development." *Circulation Research* 90(10): 1055-1063.

Holloszy J.O. und Hansen P.A. (1996). "Regulation of glucose transport into skeletal muscle." *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology* 128: 99-193.

Hood D.A. (2001). "Plasticity in skeletal, cardiac, and smooth muscle - Invited review: Contractile activity-induced mitochondrial biogenesis in skeletal muscle." *Journal of Applied Physiology* 90(3): 1137-1157.

Hoppeler H., Vogt M., Weibel E.R. und Fluck M. (2003). "Response of skeletal muscle mitochondria to hypoxia." *Experimental Physiology* 88(1): 109-119.

Irrcher I., Adhietty P.J., Sheehan T., Joseph A.M. und Hood D.A. (2003). "PPAR gamma coactivator-1 alpha expression during thyroid hormone- and contractile activity-induced mitochondrial adaptations." *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 284(6): C1669-C1677.

Iyer N.V., Kotch L.E., Agani F., Leung S.W., Laughner E., Wenger R.H., Gassmann M., Gearhart J.D., Lawler A.M., Yu A.Y. und Semenza G.L. (1998). "Cellular and developmental control of O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 alpha." *Genes & Development* 12(2): 149-162.

Jiang B.H., Zheng J.Z., Leung S.W., Roe R. und Semenza G.L. (1997). "Transactivation and inhibitory domains of hypoxia-inducible factor 1alpha. Modulation of transcriptional activity by oxygen tension." *Journal of Biological Chemistry* 272(31): 19253-19260.

Kallio P.J., Okamoto K., O'Brien S., Carrero P., Makino Y., Tanaka H. und Poellinger L. (1998). "Signal transduction in hypoxic cells: inducible nuclear translocation and recruitment of the CBP/p300 coactivator by the hypoxia-inducible factor-1 alpha." *The European Molecular Biology Organization Journal* 17(22): 6573-6586.

Kasahara J., Fukunaga K. und Miyamoto E. (1999). "Differential effects of a calcineurin inhibitor on glutamate-induced phosphorylation of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinases in cultured rat hippocampal neurons." *Journal of Biological Chemistry* 274(13): 9061-9067.

Katz J., Golden S. und Wals P.A. (1976). "Stimulation of Hepatic Glycogen-Synthesis by Amino-Acids." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 73(10): 3433-3437.

Kawanaka K., Nolte L.A., Han D.H., Hansen P.A. und Holloszy J.O. (2000). "Mechanisms underlying impaired GLUT-4 translocation in glycogen-supercompensated muscles of exercised rats." *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 279(6): E1311-E1318.

Kitani T., Ishida A., Okuno S., Takeuchi M., Kameshita I. und Fujisawa H. (1999). "Molecular cloning of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase phosphatase." *Journal of Biochemistry* 125(6): 1022-1028.

Kubis H.P., Haller E.A., Wetzel P. und Gros G. (1997). "Adult fast myosin pattern and Ca²⁺-induced slow myosin pattern in primary skeletal muscle culture." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94(8): 4205-4210.

Kubis H.P., Scheibe R.J., Meissner J.D., Hornung G. und Gros G. (2002). "Fast-to-slow transformation and nuclear import/export kinetics of the transcription factor NFATc1 during electrostimulation of rabbit muscle cells in culture." *Journal of Physiology* 541(Pt 3): 835-847.

Kubis H.P., Hanke N., Scheibe R.J., Meissner J.D. und Gros G. (2003). "Ca²⁺ transients activate calcineurin/NFATc1 and initiate fast-to-slow transformation in a primary skeletal muscle culture." *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 285(1): C56-C63.

Lawrence J.C. und Salsgiver W.J. (1983). "Levels of Enzymes of Energy-Metabolism Are Controlled by Activity of Cultured Rat Myotubes." *American Journal of Physiology* 244(5): C348-C355.

Liu J. und Brautigan D.L. (2000). "Glycogen synthase association with the striated muscle glycogen-targeting subunit of protein phosphatase-1 - Synthase activation involves scaffolding regulated by beta-adrenergic signaling." *Journal of Biological Chemistry* 275(34): 26074-26081.

Liu Y.W., Carroll S.L., Klein M.G. und Schneider M.F. (1997). "Calcium transients and calcium homeostasis in adult mouse fast-twitch skeletal muscle fibers in culture." *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 41(6): C1919-C1927.

Liu Y.W. und Schneider M.F. (1998). "Fibre type-specific gene expression activated by chronic electrical stimulation of adult mouse skeletal muscle fibres in culture." *Journal of Physiology-London* 512(2): 337-344.

Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. und Randall R.J. (1951). "Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent." *Journal of Biological Chemistry* 193(1): 265-275.

Mayne C.N., Sutherland H., Jarvis J.C., Gilroy S.J., Craven A.J. und Salmons S. (1996). "Induction of a fast-oxidative phenotype by chronic muscle stimulation: Histochemical and metabolic studies." *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 39(1): C313-C320.

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." *Journal of Physiology* 533(Pt 1): 215-226.

Mu J., Brozinick J.T., Jr., Valladares O., Bucan M. und Birnbaum M.J. (2001). "A role for AMP-activated protein kinase in contraction- and hypoxia-regulated glucose transport in skeletal muscle." *Molecular Cell* 7(5): 1085-1094.

Nakielny S., Campbell D.G. und Cohen P. (1991). "The Molecular Mechanism by Which Adrenaline Inhibits Glycogen-Synthesis." *European Journal of Biochemistry* 199(3): 713-722.

Newgard C.B., Brady M.J., O'Doherty R.M. und Saltiel A.R. (2000). "Organizing glucose disposal - Emerging roles of the glycogen targeting subunits of protein phosphatase-1." *Diabetes* 49(12): 1967-1977.

Nielsen J.N. und Richter E.A. (2003). "Regulation of glycogen synthase in skeletal muscle during exercise." *Acta Physiologica Scandinavica* 178(4): 309-319.

Ojuka E.O., Nolte L.A. und Holloszy J.O. (2000). "Increased expression of GLUT-4 and hexokinase in rat epitrochlearis muscles exposed to AICAR in vitro." *Journal of Applied Physiology* 88(3): 1072-1075.

Ojuka E.O., Jones T.E., Han D.H., Chen M., Wamhoff B.R., Sturek M. und Holloszy J.O. (2002a). "Intermittent increases in cytosolic Ca²⁺ stimulate mitochondrial biogenesis in muscle cells." *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 283(5): E1040-E1045.

Ojuka E.O., Jones T.E., Nolte L.A., Chen M., Wamhoff B.R., Sturek M. und Holloszy J.O. (2002b). "Regulation of GLUT4 biogenesis in muscle: evidence for involvement of AMPK and Ca²⁺." *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 282(5): E1008-E1013.

Ojuka E.O., Jones T.E., Han D.H., Chen M. und Holloszy J.O. (2003). "Raising Ca²⁺ in L6 myotubes mimics effects of exercise on mitochondrial biogenesis in muscle." *The Federation of American Societies for Experimental Biology Journal* 17(6): 675-681.

Ojuka E.O. (2004). "Role of calcium and AMP kinase in the regulation of mitochondrial biogenesis and GLUT4 levels in muscle." *Proceedings of the Nutrition Society* 63(2): 275-278.

- Ordway G.A., Neuffer P.D., Chin E.R. und DeMartino G.N. (2000). "Chronic contractile activity upregulates the proteasome system in rabbit skeletal muscle." *Journal of Applied Physiology* 88(3): 1134-1141.
- Oyama V.I. und Eagle H. (1956). "Measurement of Cell Growth in Tissue Culture with A Phenol Reagent (Folin-Ciocalteu)." *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 91(2): 305-307.
- Pette D. und Vrbova G. (1992). "Adaptation of mammalian skeletal muscle fibers to chronic electrical stimulation." *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology* 120: 115-202.
- Pette D. und Dusterhoft S. (1992). "Altered Gene-Expression in Fast-Twitch Muscle Induced by Chronic Low-Frequency Stimulation." *American Journal of Physiology* 262(3): R333-R338.
- Pette D. und Vrbova G. (1999). "What does chronic electrical stimulation teach us about muscle plasticity?" *Muscle & Nerve* 22(6): 666-677.
- Pilegaard H., Keller C., Steensberg A., Helge J.W., Pedersen B.K., Saltin B. und Neuffer P.D. (2002). "Influence of pre-exercise muscle glycogen content on exercise-induced transcriptional regulation of metabolic genes." *Journal of Physiology* 541(Pt 1): 261-271.
- Putman C.T., Kiricsi M., Pearcey J., MacLean I.M., Bamford J.A., Murdoch G.K., Dixon W.T. und Pette D. (2003). "AMPK activation increases uncoupling protein-3 expression and mitochondrial enzyme activities in rat muscle without fibre type transitions." *Journal of Physiology* 551(Pt 1): 169-178.
- Ratcliffe P.J., O'Rourke J.F., Maxwell P.H. und Pugh C.W. (1998). "Oxygen sensing, hypoxia-inducible factor-1 and the regulation of mammalian gene expression." *Journal of Experimental Biology* 201(8): 1153-1162.
- Ren J.M., Semenkovich C.F. und Holloszy J.O. (1993). "Adaptation of Muscle to Creatine Depletion - Effect on Glut-4 Glucose Transporter Expression." *American Journal of Physiology* 264(1): C146-C150.
- Richter E.A., MacDonald C., Kiens B., Hardie G. und Wojtaszewski J.F.P. (2001). "Dissociation of 5'AMP-activated protein kinase activity and glucose clearance in human skeletal muscle during exercise." *Diabetes* 50: A62.
- Richter E.A., Nielsen J.N., Jorgensen S.B., Frosig C., Birk J.B. und Wojtaszewski J.F. (2004). "Exercise signalling to glucose transport in skeletal muscle." *Proceedings of the Nutrition Society* 63(2): 211-216.
- Rozen S. und Skaletsky H. (2000). "Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers." *Methods in Molecular Biology* 132: 365-386.
- Sakashita G., Shima H., Komatsu M., Urano T., Kikuchi A. und Kikuchi K. (2003). "Regulation of type 1 protein phosphatase/inhibitor-2 complex by glycogen synthase kinase-3beta in intact cells." *Journal of Biochemistry (Tokyo)* 133(2): 165-171.

Salceda S. und Caro J. (1997). "Hypoxia-inducible factor 1 alpha (HIF-1 alpha) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions - Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes." *Journal of Biological Chemistry* 272(36): 22642-22647.

Salt I., Celler J.W., Hawley S.A., Prescott A., Woods A., Carling D. und Hardie D.G. (1998). "AMP-activated protein kinase: greater AMP dependence, and preferential nuclear localization, of complexes containing the alpha 2 isoform." *Biochemical Journal* 334: 177-187.

Sato S., Fujita N. und Tsuruo T. (2000). "Modulation of Akt kinase activity by binding to Hsp90." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(20): 10832-10837.

Semenza G.L. (1999). "Regulation of mammalian O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1." *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 15: 551-578.

Shoubridge E.A., Challiss R.A.J., Hayes D.J. und Radda G.K. (1985). "Biochemical Adaptation in the Skeletal-Muscle of Rats Depleted of Creatine with the Substrate-Analog Beta-Guanidinopropionic Acid." *Biochemical Journal* 232(1): 125-131.

Soderling T.R. (1999). "The Ca²⁺-calmodulin-dependent protein kinase cascade." *Trends in Biochemical Sciences* 24(6): 232-236.

Spangenburg E.E. und Booth F.W. (2003). "Molecular regulation of individual skeletal muscle fibre types." *Acta Physiologica Scandinavica* 178(4): 413-424.

Stroka D.M., Burkhardt T., Desbaillets I., Wenger R.H., Neil D.A.H., Bauer C., Gassmann M. und Candinas D. (2001). "HIF-1 is expressed in normoxic tissue and displays an organ-specific regulation under systemic hypoxia." *The Federation of American Societies for Experimental Biology Journal* 15(13): 2445-2453.

Sugiura R., Sio S.O., Shuntoh H. und Kuno T. (2001). "Molecular genetic analysis of the calcineurin signaling pathways." *Cellular and Molecular Life Sciences* 58(2): 278-288.

Sultan K.R., Dittrich B.T., Leisner E., Paul N. und Pette D. (2001). "Fiber type-specific expression of major proteolytic systems in fast- to slow-transforming rabbit muscle." *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 280(2): C239-C247.

Terada S., Nakagawa H., Nakamura Y. und Muraoka I. (2003). "Calcineurin is not involved in some mitochondrial enzyme adaptations to endurance exercise training in rat skeletal muscle." *European Journal of Applied Physiology* 90(1-2): 210-217.

Tokumitsu H., Inuzuka H., Ishikawa Y., Ikeda M., Saji I. und Kobayashi R. (2002). "STO-609, a specific inhibitor of the Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase." *Journal of Biological Chemistry* 277(18): 15813-15818.

Tokumitsu H., Inuzuka H., Ishikawa Y., Ikeda M., Saji I. und Kobayashi R. (2003). "STO-609, a specific inhibitor of the Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase. (vol 277, pg 15813, 2002)." *Journal of Biological Chemistry* 278(6): 4368.

- Wang G.L. und Semenza G.L. (1995). "Purification and Characterization of Hypoxia-Inducible Factor-1." *Journal of Biological Chemistry* 270(3): 1230-1237.
- Wang G.L., Jiang B.H., Rue E.A. und Semenza G.L. (1995). "Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92(12): 5510-5514.
- Watanabe T., Huang H.B., Horiuchi A., Cruze Silva E.F., Hsieh-Wilson L., Allen P.B., Shenolikar S., Greengard P. und Nairn A.C. (2001). "Protein phosphatase 1 regulation by inhibitors and targeting subunits." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98(6): 3080-3085.
- Westphal R.S., Anderson K.A., Means A.R. und Wadzinski B.E. (1998). "A signaling complex of Ca²⁺-calmodulin-dependent protein kinase IV and protein phosphatase 2A." *Science* 280(5367): 1258-1261.
- Winder W.W., Holmes B.F., Rubink D.S., Jensen E.B., Chen M. und Holloszy J.O. (2000). "Activation of AMP-activated protein kinase increases mitochondrial enzymes in skeletal muscle." *Journal of Applied Physiology* 88(6): 2219-2226.
- Winder W.W. (2001). "Energy-sensing and signaling by AMP-activated protein kinase in skeletal muscle." *Journal of Applied Physiology* 91(3): 1017-1028.
- Wojtaszewski J.F., Nielsen P., Hansen B.F., Richter E.A. und Kiens B. (2000). "Isoform-specific and exercise intensity-dependent activation of 5'-AMP-activated protein kinase in human skeletal muscle." *Journal of Physiology* 528(Pt 1): 221-226.
- Wojtaszewski J.F., MacDonald C., Nielsen J.N., Hellsten Y., Hardie D.G., Kemp B.E., Kiens B. und Richter E.A. (2003). "Regulation of 5'AMP-activated protein kinase activity and substrate utilization in exercising human skeletal muscle." *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 284(4): E813-E822.
- Wojtaszewski J.F.P., Jorgensen S.B., Hellsten Y., Hardie D.G. und Richter E.A. (2002). "Glycogen-dependent effects of 5-aminoimidazole-4-carboxamide (AICA)-riboside on AMP-activated protein kinase and glycogen synthase activities in rat skeletal muscle." *Diabetes* 51(2): 284-292.
- Wood S.M., Wiesener M.S., Yeates K.M., Okada N., Pugh C.W., Maxwell P.H. und Ratcliffe P.J. (1998). "Selection and analysis of a mutant cell line defective in the hypoxia-inducible factor-1 alpha-subunit (HIF-1alpha). Characterization of hif-1alpha-dependent and -independent hypoxia-inducible gene expression." *Journal of Biological Chemistry* 273(14): 8360-8368.
- Wu H., Kanatous S.B., Thurmond F.A., Gallardo T., Isotani E., Bassel-Duby R. und Williams R.S. (2002). "Regulation of mitochondrial biogenesis in skeletal muscle by CaMK." *Science* 296(5566): 349-352.
- Yaspelkis B.B., Castle A.L., Ding Z. und Ivy J.L. (1999). "Attenuating the decline in ATP arrests the exercise training-induced increases in muscle GLUT4 protein and citrate synthase activity." *Acta Physiologica Scandinavica* 165(1): 71-79.

Yuan Y., Hilliard G., Ferguson T. und Millhorn D.E. (2003). "Cobalt inhibits the interaction between hypoxia-inducible factor-alpha and von Hippel-Lindau protein by direct binding to hypoxia-inducible factor-alpha." *Journal of Biological Chemistry* 278(18): 15911-15916.

Zheng D.H., MacLean P.S., Pohnert S.C., Knight J.B., Olson A.L., Winder W.W. und Dohm G.L. (2001). "Regulation of muscle GLUT-4 transcription by AMP-activated protein kinase." *Journal of Applied Physiology* 91(3): 1073-1083.

Zong H., Ren J.M., Young L.H., Pypaert M., Mu J., Birnbaum M.J. und Shulman G.I. (2002). "AMP kinase is required for mitochondrial biogenesis in skeletal muscle in response to chronic energy deprivation." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99(25): 15983-15987.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
Acetyl-CoA	Acetyl-Coenzym A
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
AMP	Adenosin-5'-monophosphat
AMPK	AMP-aktivierte Proteinkinase
AMPKK	AMPK Kinase
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
Bad	<i>proapoptotic regulator of programmed cell death</i>
Bidest	zweifach destilliertes Wasser
BSA	Rinderserumalbumin
CaMK	Calcium-Calmodulin abhängige Proteinkinase
CaMKK	CaMK Kinase
cAMP	zyklisches AMP
CBP	CREB bindendes Protein
cDNA	komplementäre DNA, aus RNA erzeugt
CREB	<i>cAMP response element binding protein</i>
CS	Citratsynthase
C-Terminus	Carboxylende eines Proteins
DABCO	1,4-Diazabicyclo(2.2.2)octan
D-MEM	Dulbeccos Modifiziertes Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotid
DOC	Desoxycholat
DTT	1,4-Dithiothreitol
ECL	verstärkte Chemolumineszenz
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eIF2B ϵ	eukaryotischer Initiationsfaktor 2B ϵ
ER	endoplasmatisches Retikulum
fwd	vorwärts
g	Erdbeschleunigung
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase
GATA4	GATA bindendes Protein 4
G _L	glykogenbindende Untereinheit von PP1 der Leber
GLUT4	Glukosetransportprotein 4
G _M	glykogenbindende Untereinheit von PP1 des Muskels

GPA	β -Guanidinopropionsäure
GS	Glykogensynthase
GSK-3	Glykogensynthasekinase-3
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
HIF-1	Hypoxie-induzierter Faktor-1
HRE	<i>hypoxia response element</i>
H + L	schwere und leichte Ketten des Antikörpers
IgG	Immunglobulin G
kDa	Kilodalton
KOH	Kaliumhydroxid
MAPK	mitogen-aktivierte Proteinkinase
MEF2	<i>myocyte enhancer faktor 2</i>
Mg	Magnesium
MHC	schwere Kette des Myosins
MLC	leichte Kette des Myosins
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i>
NAD ⁺	Nicotinamid-adenin-dinucleotid (oxidiert)
NADP ⁺	oxidiertes Nicotinamidadenindinucleotidphosphat
NADH	reduziertes Nicotinamidadenindinucleotid
NCS	Serum vom neugeborenen Kalb
NFAT2	<i>nuclear factor of activated T-cells 2</i>
NRF-1	<i>nuclear respiratory factor 1</i>
N-Terminus	Aminoende eines Proteins
p38	ein Mitglied der MAPK-Familie
p70S6K	70 kDa Kinase des ribosomalen S6-Proteins
p90rS6K	90 kDa Kinase des ribosomalen S6-Proteins
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDK1	PI3-Kinase abhängige Kinase 1
PFA	Paraformaldehyd
PGC-1	Koaktivator des peroxisom-proliferator-aktivierten Rezeptors γ
PH-Domäne	<i>pleckstrin homology domain</i>
PI3-Kinase	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5-Trisphosphat
PKA	Proteinkinase A
PKB	Proteinkinase B (auch Akt oder Rac)

PKC	Proteinkinase C
PMSF	Phenylmethylsulfonsäure
PP1	Proteinphosphatase 1
PP2a	Proteinphosphatase 2a
PP2b	Proteinphosphatase 2b (Calcineurin)
PP2c	Proteinphosphatase 2c
PPP1R6	glykogenbindende Untereinheit der PP1
PTG	glykogenbindende Untereinheit der PP1
rev	rückwärts
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
rRNA	ribosomale RNA
RT	reverse Transkription
S	Svedberg, 1 S = 10 ⁻¹³ Sekunden
SD	Standardabweichung
SERCA2	SR/ER-Ca ²⁺ -ATPase
SR	sarkoplasmatisches Retikulum
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tfam	mitochondrialer Transkriptionsfaktor A
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Triton X-100	4-(1,1,3,3-Tetramethylbutyl)phenylpolyethylenglycol
VEGF	vaskulärer, endothelialer Wachstumsfaktor
V _{O2} max	maximal erreichbarer Wert der Sauerstoffaufnahme (l/min)
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen

Die Abkürzung der Nukleotidbasen und der Aminosäuren entspricht den international üblichen Ein- bzw. Dreibuchstaben-Codes.

DANKSAGUNG

Ich danke ganz herzlich

Piet, meinem Master,

Ernesto, meinem Elite-TA,

Klaus-Herrmann, für die schönen Blots,

Michael, Susanne, Hannelore, Norbert, Uwe, Volker, Ulli, Barb, Simon

und meinen Eltern, die meine naturwissenschaftlichen Interessen

immer gefördert haben.

Außerdem danke ich ganz besonders

Prof. Dr. Gerolf Gros und PD Dr. Heiner Wolfes

für Betreuung, Unterstützung und die Übernahme des Referats dieser Arbeit,

und natürlich Manolo für alles.

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

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

Hannover, den 10.04.2005

(Nina Hanke)

LEBENS LAUF

Name: Nina Hanke
Adresse: Hagenstr. 2, 30161 Hannover
Telefon: 05 11 - 388 03 88
Geburtsdatum: 12.09.1976
Geburtsort: Hannover
Familienstand: Ledig
Staatsangehörigkeit: Deutsch

Schulbildung:

1983 - 1987 Grundschule Mengendamm, Hannover
1987 - 1989 Orientierungsstufe Röntgenstraße, Hannover
1989 - 1996 Richarda-Huch-Schule, Hannover
Abschluß mit der allg. Hochschulreife

Studium:

1996 - 2001 Studium der Biochemie an der
Universität Hannover

April 2001 - Diplomarbeit im Institut für Vegetative Physiologie der
Oktober 2001 Medizinischen Hochschule Hannover

seit Dezember 2001 Wissenschaftliche Mitarbeiterin im Institut für
Vegetative Physiologie der Medizinischen Hochschule
Hannover

WISSENSCHAFTLICHE PUBLIKATIONEN

Originalpublikationen

- 2005 H.P. Kubis, **N. Hanke**, O. Hüsing, M. Berthold, C. Siebrands und G. Gros.
"Protein phosphatase-dependent modulation of IGF-1 transcription, Akt phosphorylation and myosin transcription under passive mechanical stress or electrostimulation in skeletal muscle cells in culture."
submitted
- 2005 H.P. Kubis, **N. Hanke**, R.J. Scheibe und G. Gros.
"Accumulation and nuclear import of HIF1 alpha during high and low oxygen pressure in skeletal muscle cells in primary culture."
submitted
- 2003 H.P. Kubis, **N. Hanke**, R.J. Scheibe, J.D. Meissner und G. Gros.
"Ca²⁺-transients activate calcineurin/NFATc1 and initiate fast-to-slow transformation in a primary skeletal muscle culture."
American Journal of Physiology 285: C56-C63

Abstracts

- 2005 H.P. Kubis, **N. Hanke**, O. Hüsing, M. Berthold und G. Gros.
"Mechanical stress modulates IGF-1/Akt signalling and fast myosin transcription via protein phosphatase 2a in skeletal muscle cells in culture."
Pflügers Archiv 449 Supplement 1
- 2004 H.P. Kubis, **N. Hanke**, C. Siebrands und G. Gros.
"MGF/IGF-1 is transcriptionally regulated by passive mechanical forces and controls fast myosin expression."
Pflügers Archiv 447 Supplement 1
- 2003 H.P. Kubis, C. Siebrands, **N. Hanke** und G. Gros.
"Effects of contractile activity and passive mechanical forces on MGF transcription and AKT phosphorylation in cultured myocytes."
Proceedings of The Nutrition Society
- 2003 H.P. Kubis, **N. Hanke**, R.J. Scheibe, J.D. Meissner und G. Gros.
"Calcineurin-NFATc1 signal transduction during fast-to-slow transformation is triggered by calcium transients in electrostimulated myocytes."
The FASEB Journal 17(4): A436
- 2002 G.Gros, **N. Hanke**, R.J. Scheibe, J.D. Meissner und H.P. Kubis.
"Ca²⁺-transients activate calcineurin/NFATc1 and initiate fast-to-slow transformation."
Physiologist
- 2002 J.D. Meissner, **N. Hanke**, H.P. Kubis, R.J. Scheibe und G. Gros.
"Ca²⁺-transients trigger calcineurin/NFATc1-mediated fast-to-slow transformation in a primary skeletal muscle culture."
Journal of Muscle Research and Cell Motility
- 2002 H.P. Kubis, **N. Hanke**, R.J. Scheibe, J.D. Meissner und G. Gros.
"Calcineurin-NFATc1 signal transduction during fast-to-slow transformation is triggered by calcium transients in electrostimulated myocytes."
Pflügers Archiv 443 Supplement
- 2001 J.D. Meissner, H.P. Kubis, R.J. Scheibe, **N. Hanke**, M. Scholz und G. Gros.
"Role of NFATc1 during fast-to-slow transformation in a primary skeletal muscle cell culture."
Journal of Muscle Research and Cell Motility