

**Evaluation der Mechanismen zur  
Entstehung einer  
glukokortikoidinduzierten Muskelatrophie  
in primären humanen Myoblasten**

Dissertation zur Erlangung des Grades  
Doktor der Naturwissenschaften

im Promotionsfach Biologie

am Fachbereich Biologie  
der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz

Eva Katharina Langendorf,  
geboren am  
in

Mainz, Mai 2019

Dekan:

1. Berichterstatterin:

2. Berichterstatterin:

Datum der mündlichen Prüfung: 15.08.2019

# Zusammenfassung

Das Rückenleiden wird in der westlichen Gesellschaft immer präsenter. Betroffene leiden unter Kreuzschmerzen deren Ursache meist eine Muskelatrophie, die zu Funktionsstörungen bis hin zu Rückenverletzungen führen kann, hat. Sie kann als Folge von Krankheiten, durch genetische Faktoren oder durch Glukokortikoide u. w. induziert werden. Dadurch können Störungen des IGF-1/PI3K/Akt/mTOR Signalweges, der einerseits die Proteinsynthese andererseits auch die Proteindegradierung der Skelettmuskulatur induziert, auftreten. Atrophische Bedingungen, ausgelöst z.B. von Glukokortikoiden, können die Proteolyse durch Aktivierung muskelspezifischer Ubiquitin-Ligasen erhöhen. Dabei wird z.B. das Muskelprotein Myosin durch MuRF-1 mit Ubiquitin markiert und durch das Proteasom degradiert. Dieser Prozess begünstigt die Einlagerung intramuskulärer Fettdepots im Gewebe. Die Translation von Proteinen, wie z.B. MuRF-1, kann durch microRNAs (kleine nicht-kodierende RNA-Moleküle (17-22 nt)) inhibiert werden. Sie regulieren die Genexpression posttranskriptionell durch Bindung an die 3'UTR, einer komplementären mRNA. In dieser Studie sollen Mechanismen und Transduktionswege, die zur Atrophie führen können, näher analysiert werden, um damit neue Therapieformen und Präventionsmaßnahmen für muskuloskeletale Erkrankungen zu entwickeln. Glukokortikoide werden in vitro zur Atrophieinduktion eingesetzt, bislang jedoch nicht bei primären humanen Zellen. Daher beschäftigt sich diese Studie mit der Auswirkung des Glukokortikoids Dexamethason auf humane Myoblasten und auch dem Einfluss der miR-23a – eine microRNA, der eine wichtige Rolle im Muskelstoffwechsel zugeschrieben wird. Die Zellen wurden zu Myotuben differenziert, mit 1, 10 und 100  $\mu\text{M}$  Dexamethason über verschiedene Zeiträume inkubiert und die Gen- sowie die Proteinexpression analysiert. Neben muskelspezifischen Genen wurden Transkriptionsfaktoren des Signalweges sowie die Ubiquitin-Ligasen MuRF-1 und MAFbx analysiert. Durch Dexamethason wurden letztere signifikant hochreguliert, zeigten dabei aber keinen Effekt auf die Muskelgene, deren Expression durch Dexamethason verstärkt wurde. Ein eindeutiger Zusammenhang zwischen Signalweg und der dexamethasoninduzierten Atrophie konnte nicht festgestellt werden. Die Proteinexpression zeigt auch keine eindeutige Myosindegradierung. MuRF-1 wurde zwar stärker exprimiert als in der Kontrolle, jedoch wurde MuRF-1 auch von der Kontrolle exprimiert. Die mRNA Expression von MuRF-1 und MAFbx konnte auch in miR-23a transduzierten Myotuben nicht gehemmt werden, jedoch entstand dadurch eine verzögerte Myotubenbildung und Proteinexpression von Myosin. Auch das Protein MuRF-1 wurde hier nicht gehemmt und so kein Effekt von Dexamethason auf humane miR-23a transduzierte Myotuben festgestellt. Mit einer Kokultur aus Myoblasten und Endothelzellen (HUVECs) sollte die Interaktion beider Zellarten analysiert werden. So konnte die Expression von CD31 und vWF und dadurch der Angiogenese von HUVECs außerhalb einer 3D-Gel Matrix erreicht werden. Dexamethason reprimiert in diesem Ansatz die mRNA Expression von KDR und vWF, jedoch nicht von CD31, in HUVECs. MuRF-1 konnte durch die Kokultur nicht inhibiert werden, jedoch zeigte sich, dass Dexamethason in der

Kokultur nur auf die Myoblasten wirkt. Weitere Analysen sind jedoch für validere Aussagen dieser Ergebnisse notwendig. In dieser Studie konnte, durch Dexamethason, die Hochregulierung der atrophieassoziierten Gene Foxo, MuRF-1 und MAFbx in humanen Myotuben gezeigt werden, allerdings ohne dabei Einfluss auf MyoD, MyoG noch Myosin zu nehmen. Dexamethason bewirkte eine verstärkte Genexpression der myogenen Marker anstatt sie zu reprimieren. Aber nur durch längere Inkubationszeiten konnte eine leichte Myosindegredierung sowie die Expression von MuRF-1 festgestellt werden. Die Überexpression der miR-23a konnte MuRF-1 und MAFbx nicht hemmen, aber eine verzögerte Myotubenbildung sowie eine verzögerte Myosinexpression in diesen Zellen bewirken. Schlussfolgernd lässt sich sagen, dass Dexamethason einen anderen Effekt auf primäre humane Myoblasten als auf die murine C2C12 Myoblastenzelllinie hat.

## Abstract

Chronic back diseases are becoming more and more present in Western society. Patients suffer from non-specific cross pain (lumbalgia). This is usually due to muscle atrophy, which can lead to dysfunction up to back injuries. Muscle atrophy can be induced after denervation, malnutrition, natural aging processes, as a result of disease, as well as genetic factors or by glucocorticoids. As a result, breakdown of the IGF-1/PI3K/Akt/mTOR pathway can occur, which on the one hand induces protein synthesis and on the other hand induces the protein degradation of the skeletal muscle. Atrophic conditions triggered by glucocorticoids can increase proteolysis by activating muscle-specific ubiquitin ligases. For example, myosin is marked with ubiquitin by MuRF-1 and degraded by the proteasome, thus favoring the storage of intramuscular fat deposits in the tissue.

MuRF-1 translation can be inhibited by microRNAs (small non-coding RNA molecules (17-22 nt)). They regulate gene expression post-transcriptionally by binding to the 3'UTR of a complementary mRNA. In this study, mechanisms and transduction pathways that can lead to atrophy are to be analysed in more detail to develop new therapies and preventive measures for musculoskeletal diseases. Glucocorticoids are already used *in vitro* to induce atrophic conditions, but until now no studies in human primary cells exist. Therefore, this study deals with the effect of the glucocorticoid dexamethasone on human myoblasts and the influence of miR-23a. After confirmation of the safety of dexamethasone, cells were differentiated into myotubes and incubated with 1, 10 and 100  $\mu$ M dexamethasone over different periods and gene and protein expression were analysed. In addition to muscle-specific genes, transcription factors of the pathway as well as the ubiquitin ligases MuRF-1 and MAFbx were analysed. Dexamethasone significantly upregulated both ligases, however, without effecting muscle gene expression. Their expression was enhanced by dexamethasone. A clear link between the pathway and dexamethasone-induced atrophy could not be established. Protein expression also showed no clear myosin degradation. MuRF-1 was expressed more than in control, but MuRF-1 was also expressed by untreated cells. The mRNA expression of MuRF-1 and MAFbx could not be inhibited in miR-23a overexpressed myotubes. However, the overexpression delayed the formation of myotubes, which is also reflected in the protein expression of myosin. The MuRF-1 protein expression was not inhibited here either. Therefore, no clear effect of dexamethasone on human myotubes could be shown in this study. No inhibitory effects on MuRF-1 could be detected by miR-23a. However, a reduction in myosin protein expression could be shown by the overexpression of this microRNA and an effect on myotube formation, independent of dexamethasone.

Another part of this study was the establishment of a coculture of myoblasts and endothelial cells (HUVECs). This coculture should show how these two cell types interact. The interaction resulted in a higher gene expression of CD31 and vWF and thus induced the angiogenesis of HUVECs outside a 3D-gel-matrix. Dexamethasone repressed mRNA expression of KDR and vWF but CD31 was unaffected in HUVECs. This effect could be reversed in coculture. MuRF-1 could be repressed in coculture, when the medium was supplemented with growth

factors. However, in coculture dexamethasone affected the myoblasts more due to the expression of the muscle-specific MuRF-1, which is not expressed by HUVECs. However, the results must be confirmed in further experiments.

In this study, the use of dexamethasone showed a high regulation of mRNA expression of Foxo, MuRF-1 and MAFbx in human myotubes. Their upregulated expression did not affect MyoD, MyoG and Myosin. Dexamethasone caused increased gene expression of myogenic muscle markers rather than repressing them. The overexpression of the miR-23a could not inhibit MuRF-1 and MAFbx. Protein expression also showed no myosin degradation in myotubes incubated with dexamethasone. However, prolonged incubation periods have shown mild myosin degradation as well as expression of MuRF-1. MuRF-1 expression could not be inhibited in miR-23a transduced myotubes. However, delayed myotube formation as well as delayed myosin expression was shown in these cells. In conclusion, dexamethasone has a different effect on primary human myoblasts than on the murine C2C12 myoblast cell line.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abstract</b> .....	<b>III</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>X</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>XII</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 <i>Die Muskelatrophie</i> .....	1
1.1.1 Entstehung Muskelatrophie .....	1
1.2 <i>Glukokortikoide</i> .....	2
1.3 <i>Muskelatrophie und Signaltransduktionskaskaden</i> .....	3
1.3.1 Atrogene.....	3
1.3.2 Der IGF-1/PI3K/Akt/mTOR Signalweg.....	3
1.3.3 Target-Substrate von MAFbx und MuRF-1.....	5
1.3.4 Das Ubiquitin-Proteasom-System .....	6
1.4 <i>MicroRNAs – Ein Überblick</i> .....	7
1.4.1 MicroRNAs und ihre Entdeckung .....	7
1.4.2 Entwicklung der miRNAs .....	7
1.4.3 MicroRNAs in der Skelettmuskulatur .....	8
1.4.4 MicroRNAs in der Myogenese.....	8
1.5 <i>Die Angiogenese – Ein kleiner Einschub</i> .....	9
<b>2 Ziel dieser Studie</b> .....	<b>11</b>
<b>3 Material und Methode</b> .....	<b>13</b>
3.1 <i>Zellkultur</i> .....	13
3.1.1 Allgemeine Zellkultur Bedingungen .....	13
3.1.2 Zellen und Medien .....	13
3.1.3 Isolierung primärer humaner Myoblasten.....	14
3.1.4 Zellpassagierung .....	15
3.1.5 Kryokonservierung und Reaktivierung .....	15
3.1.6 Zellzahldefinition .....	15
3.1.7 Viabilitätstest.....	15
3.1.8 Durchflusszytometrie.....	16
3.1.9 Immunfluoreszenz.....	17
3.1.10 Mikroskopie.....	17
3.1.11 Induktion atrophischer Bedingungen in vitro.....	18
3.2 <i>Bakterienkultur</i> .....	19
3.2.1 Bakterienstamm.....	19
3.2.2 Bakterienmedium .....	19
3.2.3 Agarplatten.....	19
3.2.4 Vektoren.....	19
3.2.5 Transformation.....	19
3.2.6 Bakterienanzucht.....	20

3.2.7	Kryokonservierung.....	20
3.2.8	Plasmid-Isolierung.....	20
3.2.9	Transfektion von Plasmid-DNA in humane Zellen.....	20
3.3	<i>Virusherstellung</i> .....	21
3.3.1	Herstellung von Viruspartikeln.....	21
3.3.2	Transduktion.....	21
3.3.3	Transduktionseffizienz.....	21
3.3.4	Selektion und Kultivierung einer stabilen Zelllinie.....	21
3.4	<i>Etablierung einer Kokultur aus HUVECs und Myoblasten</i> .....	22
3.4.1	Kultivierung, Differenzierung und Induktion der Angiogenese oder Myogenese	22
3.5	<i>Isolierung von microRNA – quantitative Real-Time Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)</i>	24
3.5.1	Reverse Transkription und cDNA-Synthese von microRNAs.....	24
3.5.2	qPCR von microRNAs.....	24
3.6	<i>RNA Isolierung</i> .....	25
3.6.1	Reverse Transkription und cDNA-Synthese.....	25
3.6.2	Quantitative Real-Time Polymerase-Kettenreaktion (qPCR).....	25
3.7	<i>Proteinexpression - Western Blot</i> .....	27
3.7.1	Probenvorbereitung.....	27
3.7.2	Protein-Assay.....	27
3.7.3	Gelelektrophorese.....	27
3.7.4	Proteintransfer.....	28
3.8	<i>Statistische Auswertung</i> .....	28
<b>4</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion</b> .....	<b>29</b>
4.1	<i>Analyse der primären humanen Myoblasten</i> .....	29
4.1.1	Genexpression.....	29
4.1.2	Durchflusszytometrische Charakterisierung von Oberflächenproteinen.....	30
4.1.3	Charakterisierung der Proteinexpression.....	37
4.1.4	Zusammenfassung.....	40
4.2	<i>MicroRNA - Vektortransfer</i> .....	41
4.2.1	Bestimmung der Selektionskonzentration.....	41
4.2.2	Transfektionseffizienz nach Elektroporation und Transfektion.....	42
4.2.3	Transduktionseffizienz nach viraler Transduktion.....	43
4.2.4	qPCR des eGFP-hsa-miR-23a Vektors in Myoblasten.....	44
4.2.5	Myoblastenviabilität nach der Inkubation mit Dexamethason.....	45
4.3	<i>Genexpressionsanalyse der dexamethasoninduzierten Atrophie in vitro</i> .....	47
4.3.1	Dexamethason induziert die Expression der E3-Ligasen MuRF-1 und MAFbx.....	47
4.3.2	Unterschiedliche Effekte von Dexamethason auf Myotuben und Myoblasten.....	52
4.3.3	Ausbleibende Reprimierung der E3-Ligasen mRNA durch miR-23a.....	54
4.4	<i>Proteinexpressionsanalyse in humanen Myotuben</i> .....	60
4.4.1	Western Blot.....	60
4.4.2	Analyse der Myotuben Bildung in miR-23a überexprimierten Myoblasten.....	66
4.4.3	Abschließende Diskussion und Zusammenfassung.....	67



4.5	<i>Die Angiogenese in der Kokultur</i> .....	68
4.5.2	Allgemeine Genexpression in Mono- und Kokulturen nach Behandlung mit Dexamethason .....	76
<b>5</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>79</b>
<b>6</b>	<b>Anhang</b> .....	<b>94</b>

# Abkürzungsverzeichnis

<b>Amp</b>	Ampicillin
<b>APC</b>	Allophycocyanin
<b>APS</b>	Ammoniumpersulfat
<b>Aqua dest.</b>	Destilliertes Wasser
<b>bFGF</b>	basic-Fibroblast-Growth Factor
<b>bp</b>	Basenpaare
<b>BSA</b>	Rinderserumalbumin
<b>cDNA</b>	complementary DNA
<b>Dex</b>	Dexamethason
<b>DMEM</b>	Dulbecco's modified eagle medium
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid
<b>DNA</b>	Deoxyribonucleic acid
<b>dNTP</b>	Desoxyribonukleosidtriphosphatgemisch, dCTP/dATP/dGTP/dTTP
<b>DTT</b>	Dithiothreitol
<b>E. coli</b>	Escherichia coli
<b>EBM</b>	Endothelial Cell Basal Medium
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraessigsäure
<b>ELISA</b>	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
<b>EtOH</b>	Ethanol
<b>FCS/FKS</b>	Fetal calf serum/Fötales Kälberserum
<b>FITC</b>	Fluoresceinisothiocyanate
<b>Foxo</b>	Forkhead Transcription Factor
<b>GAPDH</b>	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
<b>GFP</b>	Green Fluorescent Protein
<b>GOI</b>	Gene of Interest
<b>GSK3<math>\beta</math></b>	Glykogen Synthase Kinase 3 $\beta$
<b>HDAC-4</b>	Histon-Deacetylase-4
<b>HEK 293T</b>	Human Embryonic Kidney
<b>HS</b>	Horse Serum/Pferdeserum
<b>HUVEC</b>	Human Umbilical Vein Endothelial Cell
<b>IgG</b>	Immunglobulin G
<b>IU</b>	Enzymaktivitätseinheit
<b>kB</b>	Kilobasenpaare
<b>KDR</b>	Kinase Insert Domain Receptor
<b>LB-Medium</b>	Luria Bertani-Medium
<b>MAFbx</b>	Muscle Atrophy F-box
<b>MCAM</b>	Melanoma-associated Cellular Adhesion Molecule
<b>MEF-2</b>	Myocyte Enhancer Factor-2
<b>MeOH</b>	Methanol
<b>MRF</b>	Myogenic Regulatory Factor
<b>mTOR</b>	mammalian Target Of Rapamycin
<b>MuRF-1</b>	Muscle-specific-Ringfinger Protein 1
<b>Myf5</b>	Myogenic Factor 5
<b>MyHC</b>	Myosin Heavy Chain
<b>MyoD</b>	Myoblast Determination
<b>MyoG</b>	Myogenin
<b>NCAM</b>	Neural Cell Adhesion Molecule

<b>OD</b>	optische Dichte
<b>PAGE</b>	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
<b>Pax7</b>	Paired-Box-Protein 7
<b>PBS</b>	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
<b>PDK1</b>	Phosphoinositid-abhängige Kinase 1
<b>PECAM-1</b>	Platelet/Endothelial Cell Adhesion Molecule 1
<b>Pen.Strep.</b>	Penicillin Streptomycin
<b>PFA</b>	Paraformaldehyd
<b>PIP3</b>	Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphat
<b>Ponceau S</b>	3-Hydroxy-4-(2-sulfo-4-[4-sulfophenylazo]phenylazo)-2,7-naphthalenedisulfonic acid sodium salt
<b>Primer</b>	Startermolekül der DNA-Synthese
<b>qPCR</b>	(quantitative) Real-Time Polymerase Chain Reaction
<b>revTra</b>	reverse Transkription
<b>RNA</b>	Ribonucleic Acid
<b>RNase</b>	Ribonuklease
<b>rpm</b>	revolutions per minute
<b>RT</b>	Raumtemperatur
<b>SDS</b>	Sodium Dodecyle Sulfate/Natriumdodecylsulfat
<b>SRF</b>	Serum Response Factor
<b>β-ME</b>	β-Mercaptoethanol
<b>TAE</b>	Tris-Acetat-EDTA
<b>TBS</b>	Trisgepufferte Kochsalzlösung
<b>TBST</b>	Trisgepufferte Kochsalzlösung mit 0,1% Tween 20
<b>TEMED</b>	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
<b>Tris</b>	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
<b>ÜN</b>	Über Nacht
<b>VE-Cadherin</b>	Vascular Endothelial Cadherin
<b>VEGF</b>	Vascular Endothelial Growth Factor
<b>vWF</b>	von-Willebrand-Faktor

# Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Faktoren zur Entstehung einer Muskelatrophie. ....	1
Abb. 2: Signaltransduktionsweg der Muskelatrophie.....	4
Abb. 3: Myofibrillen Degradierung durch MuRF. ....	5
Abb. 4: Ubiquitin-Proteasom-System.....	6
Abb. 5: Überblick des 1. experimentellen Teils der Studie. ....	11
Abb. 6: Überblick des 2. experimentellen Teils der Studie. ....	12
Abb. 7: Überblick des 3. experimentellen Teils der Studie. ....	12
Abb. 8: Phasenkontrast Mikroskopie der verwendeten Zelltypen. ....	13
Abb. 9: Schema der Myoblasten Isolierung. ....	14
Abb. 10: Phasenkontrast Mikroskopie der isolierten primären, humanen Myoblasten. ....	15
Abb. 11: Ablauf der Zellvorbereitung und Antikörperkopplung für die Durchflusszytometrie. ....	16
Abb. 12: Schematischer Ablauf der Immunfluoreszenz.....	17
Abb. 13: Induktion atrophischer Bedingungen in vitro. ....	18
Abb. 14: Vektorkarte des lentiviralen Expressionsplasmids. ....	19
Abb. 15: Überblick zur Kultivierung und Induktion der Angiogenese in der Kokultur. ....	22
Abb. 16: Genexpression von Myf5, MyoD, MyoG und Myosin in primären humanen Myoblasten. ....	29
Abb. 17: Detektion der Oberflächenantikörper CD133, CD31, CD45, CD16. ....	31
Abb. 18: Detektion der Oberflächenantikörper CD11b, CD105, CD146, CD144. ....	33
Abb. 19: Detektion der Oberflächenantikörper CD3, CD19, CD14 und CD34. ....	35
Abb. 20: Immunfluoreszenz primärer Myoblasten.....	37
Abb. 21: Immunfluoreszenz primärer Myotuben. ....	38
Abb. 22: Immunfluoreszenz der murinen Zelllinie C2C12. ....	39
Abb. 23: Zellviabilität der Myoblasten mit dem Selektionsantibiotikum Puromycin. .....	41
Abb. 24: Transfektionseffizienz der Elektroporation nach 48 Std. ....	42
Abb. 25: Transduktionseffizienz der humanen Myoblasten.....	43
Abb. 26: Fluoreszenzmikroskopie der verschiedenen Transfermethoden des lentiviralen GFP-miR-23a Vektors bei Myoblasten. ....	43
Abb. 27: Quantitative Genexpression des eGFP-hsa-miR-23a Vektors. ....	44
Abb. 28: DNA-Screening zur Detektion der Vektorexpression in humanen Myoblasten. ....	44
Abb. 29: AlamarBlue® Assay der Myoblasten nach der Inkubation mit Dexamethason. ....	45
Abb. 30: AlamarBlue® Assay differenzierender Myoblasten während der Inkubation mit Dexamethason.....	46
Abb. 31: Relative Expression von MuRF-1, MAFbx, Foxo, mTOR, MyoD, MyoG und MyHC in Myotuben. ....	48
Abb. 32: Relative Expression von MuRF-1, MAFbx, Foxo, mTOR, Myf5 und MyoD in humanen Myoblasten.....	52

Abb. 33: Relative Expression von MuRF-1, MAFbx, Foxo, mTOR, MyoD, MyoG und MyHC, in miR-23a transduzierten humanen Myotuben. ....	55
Abb. 34: Proteinexpression von Myosin, DDB-1, CUL4A, DDB-2 und MuRF-1 in humanen Myotuben. ....	60
Abb. 35: Proteinexpression von Myosin, DDB-1, CUL4A, DDB-2 und MuRF-1 in Myotuben. ....	61
Abb. 36: Proteinexpression von Myosin, DDB-1, CUL4A, DDB-2 und MuRF-1 in miR-23a überexprimierten Myotuben. ....	64
Abb. 37: Proteinexpression von Myosin, DDB-1, CUL4A, DDB-2 und MuRF-1 in miR-23a transduzierten Myotuben. ....	65
Abb. 38: Myotuben Bildung in Myoblasten und miR-23a transduzierten Myoblasten. ....	66
Abb. 39: Mono- und Kokultur nach 5 Tagen Kultivierung in unterschiedlichen Medien. ....	68
Abb. 40: Normalisierte Genexpression der Mono- und Kokulturen nach 5 Tagen. ....	69
Abb. 41: Immunfluoreszenz Kokultur 5 Tage in Differenzierungsmedium. ....	71
Abb. 42: Immunfluoreszenz Kokultur 5 Tage in EBM-2/Differenzierungsmedium (1:1, (v/v)). ....	72
Abb. 43: VEGF Konzentration der Mono- und Kokulturen in Differenzierungsmedium. ....	74
Abb. 44: Genexpression von CD31, KDR, MAFbx, MURF und vWF in HUVECs und beiden Kokulturen nach Dexamethason Inkubation. ....	76
Abb. 45: pRSV-Rev Verpackungsplasmid. ....	94
Abb. 46: pMDLg/pRRE Verpackungsplasmid. ....	95
Abb. 47: pCMV-VSV-G Hüllplasmid. ....	96

# Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Oberflächenantikörper Expression [%] von Passage 0 bis 4. ....	32
Tabelle 2: Oberflächenantikörper Expression [%] von Passage 0 bis 4. ....	34
Tabelle 3: Oberflächenantikörper Expression [%] von Passage 0 bis 4. ....	36
Tabelle 4: Transfektionseffizienz. ....	42
Tabelle 5: $\Delta$ Ct-Werte von Mono- und Kokultur. ....	70
Tabelle 6: Verwendete Zellen. ....	96
Tabelle 7: Wachstumsmedien. ....	96
Tabelle 8: Differenzierungsmedien. ....	97
Tabelle 9: Transfektionsmedien. ....	97
Tabelle 10: Transduktionsmedien. ....	97
Tabelle 11: Kokultur Medien. ....	97
Tabelle 12: Messsysteme, verwendetes Laborequipment. ....	97
Tabelle 13: Software. ....	99
Tabelle 14: Verbrauchsmaterialien, Einmalartikel. ....	99
Tabelle 15: Feste/flüssige Chemikalien/Lösungen. ....	100
Tabelle 16: Komplettsysteme & Kits. ....	102
Tabelle 17: Molekulargewichtsmarker & Längenstandards. ....	102
Tabelle 18: Verwendete Vektoren. ....	103
Tabelle 19: QuantiTect® Primer/Qiagen. ....	103
Tabelle 20: Primer Sequenzen/Eurofins Genomics. ....	103
Tabelle 21: Antikörper. ....	104
Tabelle 22: Antikörper Durchflusszytometrie. ....	105

# 1 Einleitung

## 1.1 Die Muskelatrophie

Das Rückenleiden wird vor allem in der westlichen Gesellschaft immer präsenter. Betroffen ist meist die Lendenwirbelsäule und Patienten leiden häufig unter unspezifischen Kreuzschmerzen (Lumbalgie). Daraus können körperliche Einschränkungen sowie Funktionsstörungen und Verletzungen des Rückens resultieren<sup>1-3</sup>. Neben stumpfen Traumata zählt insbesondere die Muskelatrophie zu häufigen Ursachen der Lumbalgie.

Die Muskelatrophie – eine Verringerung der Muskelmasse - wird durch den Zellschwund definiert, der sich in einer Reduktion der Zellgröße, sowie Gewebe- oder Organverkleinerung zeigt<sup>4,5</sup>. Damit verbunden ist häufig eine Minderung der Muskelfunktion. Die Atrophie entsteht durch den Abbau von Zellorganellen, des Zytoplasmas und Proteinen<sup>5</sup>.

Meist ist die Rumpfmuskulatur von einer Atrophie betroffen<sup>6,7</sup>. Die klinischen Begleiterscheinungen können, neben dem Verlust an Lebensqualität, ausgelöst durch Muskelschwäche und der Unfähigkeit, alltägliche Bewegungen auszuführen, eine gestörte Wundheilung sowie eine beeinträchtigte Lungenfunktion sein<sup>8</sup>.

### 1.1.1 Entstehung Muskelatrophie

Die unterschiedlichsten Faktoren können eine Muskelatrophie begünstigen oder entstehen lassen. In Abb. 1 sind einige Auslöser der Muskelatrophie grafisch dargestellt.

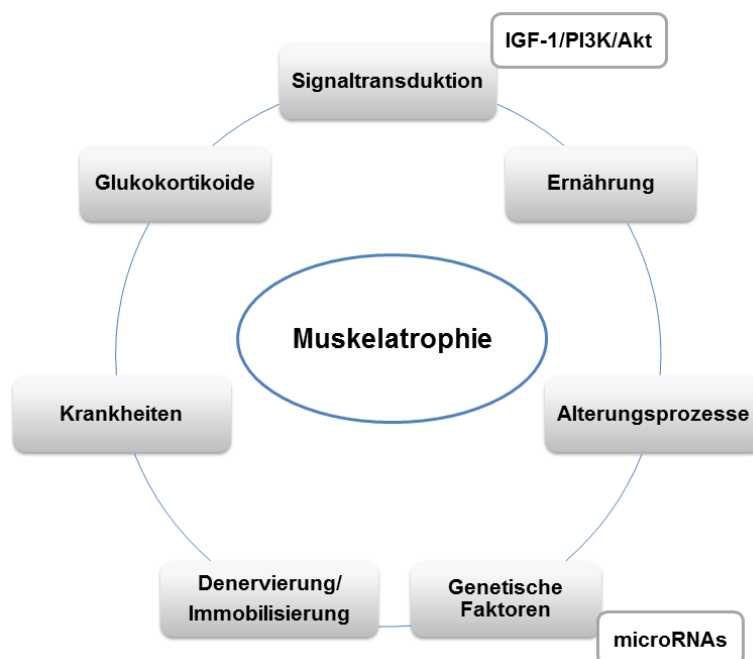


Abb. 1: Faktoren zur Entstehung einer Muskelatrophie.

Eine Muskelatrophie kann nach einer Denervierung, einer Immobilisierung, bei Mangelernährung, durch natürliche Alterungsprozesse, als Folge von Krankheiten, physiologischer Inaktivität oder durch genetische Faktoren auftreten<sup>4</sup>.

## 1 Einleitung

### 1.1.1.1 Veränderungen der Muskulatur

Die Zell- und Proteinsynthese der Skelettmuskulatur wird durch verschiedene Signaltransduktionswege reguliert<sup>5</sup>.

Sie ist von der Balance zwischen ana- und katabolischen Stoffwechselreaktionen abhängig, die ein konstantes Niveau an essentiellen Proteinen und Nährstoffen garantiert. Durch ein Ungleichgewicht (atrophische Bedingungen) können sowohl eine Reduktion der Proteinsynthese als auch eine Erhöhung der Proteolyse verursacht werden<sup>9</sup>.

Ein solches Ungleichgewicht kann durch molekulare Auslöser, die zu einer Störung bestimmter Signaltransduktionskaskaden führen, eingeleitet werden<sup>10</sup>.

Eine geringere Proteinsynthese führt zur rapiden Degradierung von kontraktile Muskelfasern<sup>10</sup>. Kontraktile und sarkomerbildende Proteine sind neben Aktin und Myosin die strukturellen Proteine Titin und Nebulin sowie das Intermediärfilament Desmin<sup>11</sup>. Sarkomerbildende Proteine werden im Fall der verringerten Proteinsynthese weniger häufig oder überhaupt nicht mehr synthetisiert. Die Proteolyse von myofibrillären Proteinen ist somit höher als ihre Syntheserate<sup>10</sup>. Das Sarkomer bildet die funktionelle Einheit des Muskels<sup>12</sup>. Seine Struktur kann nicht mehr aufrechterhalten werden, was den Abbau von Muskelmasse zur Folge hat. Letzteres führt zunächst zur Muskelschwäche und über den Kraftverlust bis hin zur Unbeweglichkeit<sup>13</sup>.

Die Kombination der beschriebenen Prozesse erhöht den oxidativen Stress im Gewebe und begünstigt die Einlagerung intramuskulärer Fettdepots<sup>14-21</sup>. Diese Fettansammlung kann aufgrund von Zelltransformationen, etwa von Fibroblasten oder Prä-Adipozyten durch den Einfluss von bspw. Glukokortikoiden, entstehen. Auch kann eine erhöhte Sezernierung inflammationsfördernder Zytokine, Wachstumsfaktoren oder Prostaglandine die Vermehrung von adipösem Gewebe stimulieren<sup>22</sup>.

## 1.2 Glukokortikoide

Glukokortikoide werden als entzündungshemmende und immunsuppressive Medikamente eingesetzt<sup>23</sup>. In höheren Dosierungen sowie bei längeren Einnahmephasen können sie ein „Steroides Muskelleiden“ induzieren, das zur Atrophiebildung führen kann<sup>24</sup>. Die Glukokortikoidwirkung auf Gewebe und den Zellmetabolismus sind vielfältig. Allgemein wird angenommen, dass sie die Skelettmuskelatrophie durch Erhöhung der Proteolyse und Reduzierung der Proteinsynthese induzieren<sup>8,25-30</sup>.

Die Proteolyse betrifft vor allem die Muskelfaserproteine<sup>31,32</sup>. Sie kann durch Stimulierung bestimmter Signaltransduktionskaskaden aktiviert werden<sup>24</sup>. Bestimmte Transkriptionsfaktoren können eine Signalkaskade auslösen, die muskelspezifische Ubiquitin-Ligasen (MAFbx und MuRF-1) aktivieren. Sie stimulieren die Proteolyse und den Ubiquitin-Proteasom-Signalweg (UPS)<sup>33-37</sup>. Die Behandlung mit Glukokortikoiden, z.B. mit dem synthetisch hergestellten Dexamethason, führt zur Expression dieser Ligasen und als Folge zu Muskelschwund, was sowohl in vitro als in vivo nachgewiesen werden konnte<sup>31-35</sup>. Dieser induzierte Muskelschwund konnte durch einen Glukokortikoid-Rezeptor-Antagonisten „RU-486“ in einigen Fällen gemildert werden<sup>35,36</sup>.



## 1.3 Muskelatrophie und Signaltransduktionskaskaden

### 1.3.1 Atrogene

Die muskelspezifischen Ubiquitin-Ligasen MAFbx/Atrogin-1 (Muscle Atrophy F-box/Muscle-specific Ubiquitin E3-ligases Atrophy gene-1) und MuRF1 (Muscle RING-finger protein-1) sind Atrogene (atrophieinduzierende Gene), das heißt sie sind am beschleunigten Abbau von kontraktilen Proteinen beteiligt<sup>44</sup>.

Diese E3-Ligasen verfügen über mehrere Bindungsstellen: eine für ihre Substrate (wie Myosin oder MyoG), eine für die E2-Ligasen und eine für andere Ubiquitin-Moleküle. Die Fähigkeit zur Substraterkennung ist abhängig von der Aminosäuresequenz und spezifischer struktureller Bindungsdomänen<sup>45</sup>.

MuRF-1 besteht aus 353 Aminosäuren und verfügt neben einer RING Domäne (spezifisch für E3-Ligase Aktivität) über eine Zink-Finger Domäne (B-Box)<sup>37</sup>.

MAFbx besteht aus 355 Aminosäuren und besitzt eine F-box Domäne (spezifisch für E3s)<sup>37</sup>. F-box besitzende E3-Ligasen binden erst an ihr Substrat nachdem es posttranslational, etwa durch Phosphorylierung, modifiziert wurde<sup>38</sup>.

### 1.3.2 Der IGF-1/PI3K/Akt/mTOR Signalweg

Die Transduktionskaskade IGF-1/PI3K/Akt/mTOR (Insulin-like Growth Factor 1/Phosphoinositid 3-Kinase/Akt/mammalian Target of Rapamycin) induziert das Muskelwachstum durch Stimulierung der Proteinsynthese<sup>39</sup>. Sowohl Hypertrophie als auch Atrophie werden über diesen Signalweg gesteuert<sup>5,40</sup>.

Neben der Kontrolle der Mitose von Muskelzellen stimuliert der Signalweg in der G0-Phase die Proteinsynthese und inhibiert die Degradierung<sup>41</sup>.

Krankheiten können zu Veränderungen der Proteinsynthese und gleichzeitig zur Aktivierung der Proteolyse führen.

#### 1.3.2.1 Die Kaskade – eine kurze Beschreibung

IGF-1 bindet an seinen Rezeptor und aktiviert durch Phosphorylierung PI3K. An dieses Phosphatidylinositol (3,4,5)-Trisphosphat (PIP3) können zwei weitere Kinasen, die phosphoinositid-abhängige Kinase 1 (PDK1) und Akt binden. Die Aktivierung von Akt erfolgt wiederum durch Phosphorylierung durch die PDK1. Diese Schritte finden an der inneren Oberfläche der Plasmamembran statt. Phosphoryliertes Akt inhibiert ebenfalls durch Phosphorylierung den Transkriptionsfaktor Foxo und reprimiert dadurch die Proteindegradierung.

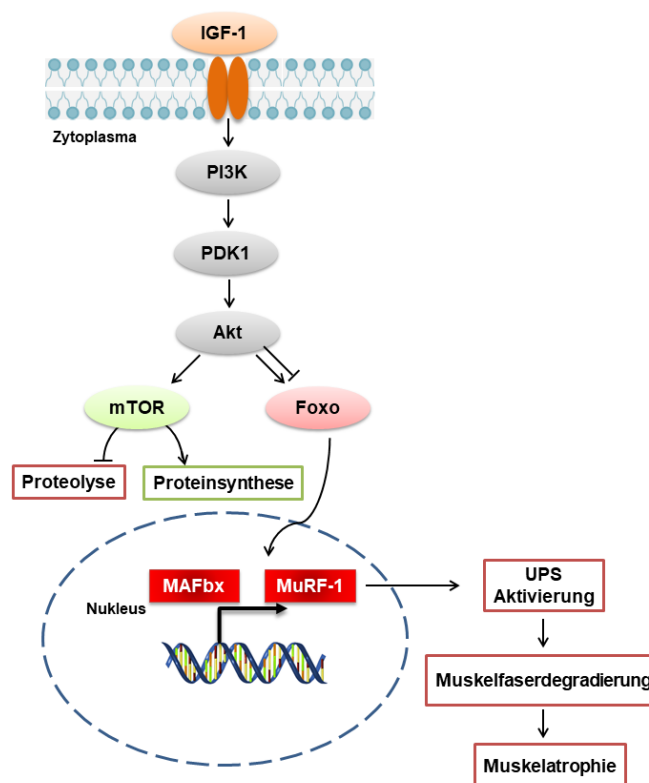
Die Proteinsynthese wird durch mTOR und die Glykogen Synthase Kinase 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ) stimuliert werden<sup>42</sup>. Der Effekt von Akt auf mTOR ist indirekt: Akt inhibiert und aktiviert verschiedene Protein- und Enzymkomplexe (die Komplexe werden in dieser Arbeit nicht weiter beschrieben), die ihrerseits mTOR aktivieren. Er bildet weitere Protein-Komplexe, die zur Proteinsynthese sowie zur Inhibierung der Proteolyse, benötigt werden<sup>43,44</sup>.

Der Transkriptionsfaktor Akt reguliert über Wachstumsfaktoren sowohl das Zellwachstum als auch das Zellüberleben<sup>45,46</sup>. Er hemmt die Proteindegradierung im Skelettmuskel durch Phosphorylierung und Inaktivierung von Foxo<sup>47</sup>. Dadurch verbleibt Foxo im Zytoplasma und wird inhibiert<sup>30</sup>.

## 1 Einleitung

mTOR kann über Wachstumsfaktoren und Nährstoffe die Proteinsynthese, Zellfunktionen und das Zellwachstum kontrollieren<sup>30,56</sup>. Wird er blockiert, kann eine Hypertrophie gemildert und die Phosphorylierung weiterer Transkriptionsfaktoren gedämpft werden<sup>38,57</sup>. Ebenso wird durch seine Funktion die Proteinanhäufung gefördert und Foxo<sup>48</sup>, der die Expression von Atrogenen kontrolliert, unterdrückt<sup>41,48</sup>.

Daneben reguliert er Gene des Zellzyklus, der Apoptose und des Metabolismus<sup>49</sup>. Foxo wird bei allen Atrophietypen aktiviert und induziert Komponenten des UPS<sup>34,50,51</sup>. Dephosphoryliertes Foxo wird in den Nukleus verlagert und dort induziert er die Expression seiner Target-Gene<sup>30</sup> (Abb. 2). So können MuRF-1 und MAFbx hochreguliert werden. Andererseits kann durch seine Inhibierung (Phosphorylierung durch Akt) die Expression beider Atrogene inhibiert werden<sup>47</sup>.



**Abb. 2: Signaltransduktionsweg der Muskelatrophie.**

Modifiziert nach Cohen et al., 2015<sup>52</sup>. IGF-1 bindet an seinen Rezeptor, aktiviert die PI3K und diese die PDK1. Durch die Aktivierung von Akt wird auch mTOR aktiviert, der die Proteinsynthese stimuliert und die Proteolyse inhibiert. Durch katabolische Stimuli wird die Expression von Foxo (Forkhead box protein O) ausgelöst. Seine Expression erfolgt einerseits durch extrazelluläre Stimuli oder durch eine Verminderung des PI3K/Akt/mTOR Signalwegs. Seine Reduktion z.B. durch Glukokortikoide resultiert in der mTOR-Inhibierung und der Foxo-Aktivierung. Er aktiviert MAFbx und MuRF-1 und beide wiederum den UPS, der schließlich zur Muskelfaserdegradierung und letztendlich zur Atrophie führt. Die Verringerung der PI3K/Akt Signaltransduktion, die bei katabolischen Krankheiten auftritt, resultiert in einer Verringerung der Proteinsynthese, erhöhter Proteolyse und einer Muskelfaseratrophie.

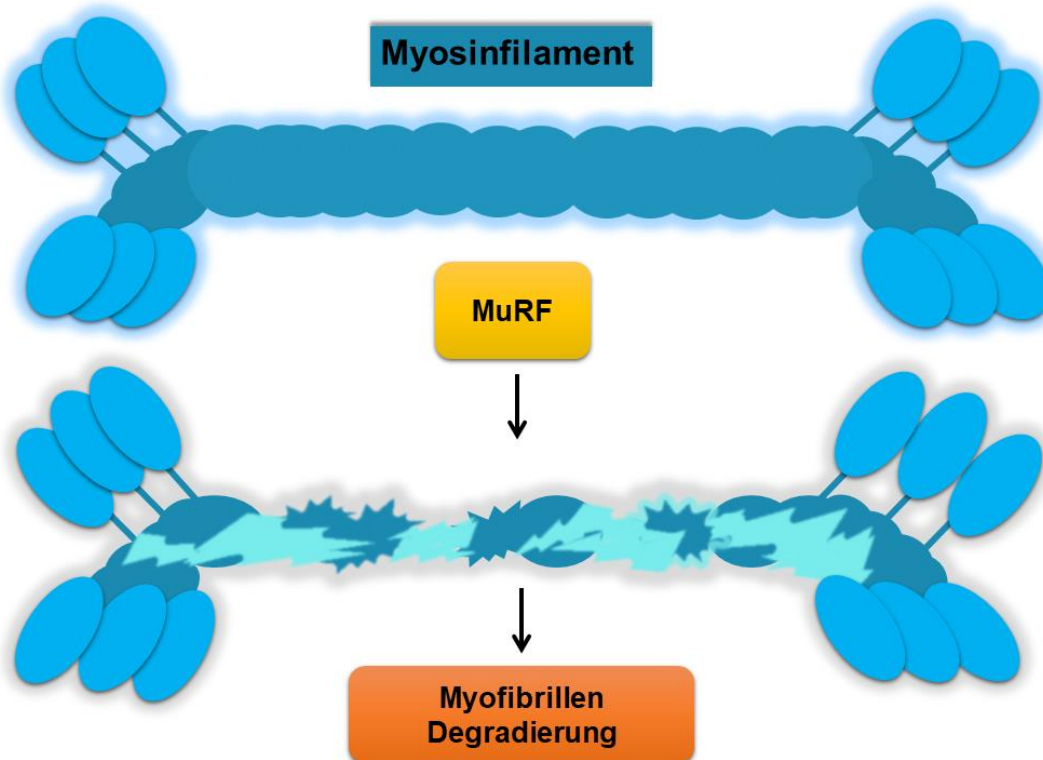
Zu Beginn der Degradierung werden regulatorische Proteine ubiquitiniert, die das Myosinfilament stabilisieren sowie andere Muskelproteine stabilisieren. Dafür sind die beiden Ubiquitin-Ligasen MuRF-1 und MAFbx verantwortlich. Die Degradierung selbst erfolgt durch das 26S Proteasom<sup>13,39,62</sup>. Der hypertrophieinduzierende PI3K/Akt Signalweg kann wiederum atrophieinduzierende Effekte, z.B. von Dexamethason, über Akt und der Inhibierung Foxos, blockieren<sup>34,52</sup>.

### 1.3.3 Target-Substrate von MAFbx und MuRF-1

Die regulatorischen Proteine zur Muskelproteinsynthese sowie der Regeneration zählen zu den Substraten von MAFbx. MuRF-1 zielt eher auf kontraktile und strukturelle Muskelproteine (wie Myosin)<sup>37,53</sup>. Substrate von MAFbx sind die myogenen Differenzierungsmarker MyoD1 und MyoG. Beide werden in der Skelettmuskulatur ubiquitiniert und degradiert<sup>43,65,66</sup>. Im Nukleus kann eine Interaktion zwischen MAFbx und MyoD stattfinden. Durch eine Überexpression von MAFbx wird MyoD polyubiquitiniert, degradiert und so die Myoblasten Differenzierung inhibiert<sup>67</sup>. Ähnlich verhält sich die Bindung zwischen MAFbx und MyoG. MyoG wird ebenfalls polyubiquitiniert und degradiert.

Dies kann z.B. nach einer dexamethasoninduzierten Myotuben Atrophie auftreten<sup>68</sup>.

Die kontraktile und strukturelle Proteine wie Titin, Troponin1, Myosin, Myosin bindendes Protein C sowie mehrere Proteine der Glykolyse und des Glykogenmetabolismus sind Substrate von MuRF-1<sup>13,32,37,53-55</sup>. Im Gegensatz zu MAFbx interagiert MuRF-1 vorzugsweise nur mit diesen strukturellen Proteinen. MuRF-1 bindet und degradiert das Protein Myosin nach der Behandlung der Muskulatur mit Dexamethason<sup>45,69</sup> (Abb. 3).



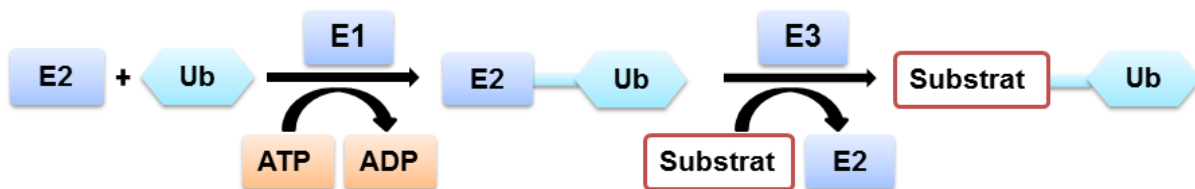
**Abb. 3: Myofibrillen Degradierung durch MuRF.**

Modifiziert nach Cohen et al., 2015<sup>44</sup>. Die Degradierung von Myosinfilamenten wird durch MuRF-1 katalysiert. Nach der Degradierung der stabilisierenden Proteine wird Myosin selbst degradiert.

### 1.3.4 Das Ubiquitin-Proteasom-System

Das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) ist in biologische Prozesse, wie der Zellzyklusregulierung, bei Entzündungsreaktionen oder der Proteolyse involviert<sup>56</sup>. Durch Übertragung von Ubiquitin auf ein Protein wird dieses Protein vom Proteasom erkannt und abgebaut. Proteine, die durch das 26S Proteasom degradiert werden sollen, werden kovalent mit einem 8,5 kDa großen Ubiquitin-Molekül markiert<sup>56</sup>.

Den Transport übernehmen entweder muskel- oder substratspezifische Ubiquitin-Ligasen<sup>48</sup>. Die E1-Ligase (Ubiquitin aktivierendes Enzym) aktiviert Ubiquitin über eine Thiolester-Bindung zwischen Ubiquitin und der E1-Ligase, in Abhängigkeit von ATP. Das aktivierte Ubiquitin wird anschließend auf die E2-Ligase (Ubiquitin konjugierendes Enzym), ebenfalls durch eine Thiolester-Bindung, übertragen. Die E2 interagiert mit der E3-Ubiquitin-Ligase, die das Substrat erkennt. Zuletzt wird Ubiquitin durch eine kovalente Isopeptid-Bindung zwischen Ubiquitin und dem Protein übertragen<sup>57</sup>. Nach der Ubiquitin Übertragung auf die E3-Ligase wird das zu ubiquitinisierende Protein durch die E3-Ligase an das Proteasom gebunden<sup>73</sup>. Die Proteolyse wird von dem ATP-abhängigen 26S Proteasom durchgeführt (Abb. 4).



**Abb. 4: Ubiquitin-Proteasom-System.**

Die Abbildung wurde nach Voutsadakis et al.<sup>58</sup> modifiziert. E1: Ubiquitin aktivierendes Enzym, überträgt Ubiquitin unter ATP Verbrauch auf E2. E2: Ubiquitin konjugierendes Enzym, überträgt Ub auf die E3. E3: Ubiquitin-Ligase überträgt Ub auf das Protein und bindet das Protein ans Proteasom. Ub: Ubiquitin.

Die Cullin-RING-Ubiquitin-Ligasen (CRLs) kontrollieren die Ubiquitinisierung einiger Substrate. Humane Zellen verfügen über mehrere Cullin-Ligasen, die als Gerüstproteine dienen<sup>59</sup>. Im Gegensatz zu anderen RING-E3-Ligasen, bindet Cullin seine Substrate nicht direkt, sondern benötigt einen Komplex aus Linker-Proteinen. Dieser Komplex besteht aus dem Gerüst CUL4A, einem RING-Protein, und einem Adapter, dem DNA Damage Binding protein 1 (DDB-1)<sup>60</sup>.

DDB-2 ist ein Substrat Rezeptor der CUL4-DDB-1-Ligase und trägt zur Ubiquitinisierung bei<sup>61-63</sup>. Außerdem ist DDB-2 selbst ein Target der CUL4-DDB-1-Ligase zur Ubiquitinisierung und Degradierung<sup>64</sup>. DDB-2 und DDB-1 verbinden sich mit CUL4 und bilden einen E3-Ubiquitin-Ligase Komplex. DDB-1 dient als Linker-Protein während DDB-2 an DDB-1 bindet und als Substrat Rezeptor Molekül fungiert. So können Proteine ubiquitiniert und degradiert werden<sup>79-81</sup>.

Die CRL-Aktivität wird durch posttranslationale Neddylierung mittels eines ubiquitin-ähnlichem Protein (Nedd8) reguliert und modifiziert<sup>59,65,66</sup>. Bei der Neddylierung wird Nedd8 auf Substrate übertragen. Diese Modifikation zählt zu den wichtigsten biochemischen Prozessen zur Regulierung der Proteinfunktion<sup>67</sup>.

Cullin-Proteine werden bevorzugt neddyliert und dadurch die Cullin-RING-Ligase aktiviert<sup>68</sup>. Die Expression durch Nedd8 modifiziertes Cullin, das durch die Neddylierung etwa 80 kDa groß ist, erhöht sich zu Beginn der Differenzierung und verringert sich im Verlauf auf das Anfangsniveau des Proliferationsstadiums.

## 1 Einleitung

Durch Inhibierung von Nedd8 wird die Myotuben Bildung in murinen Myoblasten verhindert. Daher könnte die Cullin-E3-Ligase Aktivität für jeden Schritt der Muskeldifferenzierung in vitro wichtig sein<sup>86</sup>. Durch Inhibierung der Cullin-RING-Ligase wird die Differenzierung in C2C12 Myoblasten inhibiert.

### 1.4 MicroRNAs – Ein Überblick

MicroRNAs (miRNAs) sind kleine nicht-kodierende RNA-Moleküle (17-22 nt)<sup>69</sup>, die die Genexpression sowohl transkriptionell, posttranskriptionell als auch posttranslational regulieren<sup>70-78</sup>. Durch sequenzspezifische Bindung an die 3'untranslated Region (3'UTR), einer komplementären mRNA, können sie die Genexpression beeinflussen<sup>97</sup>. Entweder kann die Translation inhibiert oder die mRNA selbst degradiert werden<sup>76,79</sup>. MicroRNAs können an mehrere mRNAs binden und unterschiedliche miRNAs an die selbe mRNA<sup>73</sup>. Sie haben gleichzeitig mehrere Zielgene und jedes kann durch mehrere miRNAs reguliert werden<sup>74</sup>. Ihre Hochregulierung kann durch zellulären Stress entstehen<sup>46</sup>. Da das humane Genom mehr als tausend miRNAs kodiert, wird geschätzt, dass sie mehr als 30% der mRNA Transkripte regulieren<sup>80</sup>.

#### 1.4.1 MicroRNAs und ihre Entdeckung

MicroRNAs wurden in der Nematode *Caenorhabditis elegans* entdeckt. Hier kodiert das Gen *lin-4* nicht für ein Protein, sondern für zwei kleine RNA-Moleküle (21-61 nt). Diese 20 Nukleotid lange RNA ist die reife microRNA. Die kleinere RNA, *lin-4* reguliert das Gen *lin-14*. Durch Basenpaarung bindet sie komplementär an die 3'-UTR der *lin-14*-mRNA und verringert so die Translation der mRNA. Die längere Sequenz formiert sich zu einer Stem-loop (Haarnadel) Struktur und dient als Vorlage für die kürzere RNA<sup>72</sup>. Die Bindung zwischen den komplementären Regionen verringert die Expression Proteins *Lin-14* ohne eine signifikante Veränderung der mRNA zu verursachen. Daraus entstand ein Model zur komplementären Basenpaarung zwischen zwei kleinen RNAs an der 3'UTR der *Lin-14* mRNA. So wurde die translationale Reprimierung der *Lin-14* entdeckt<sup>72,81</sup>.

Das microRNA Register („miRbase“) ist eine Online-Plattform und dient als Quelle für potentielle miRNA-Sequenzen. Hier lassen sich neben Erläuterungen und Nomenklaturen auch Informationen über mögliche Targets finden<sup>82,83</sup>. Auch von den haarnadelförmigen Vorläufer miRNAs existieren bereits über 30.424 miRNAs<sup>84</sup>.

#### 1.4.2 Entwicklung der miRNAs

MicroRNAs werden durch die RNA-Polymerase II transkribiert. Sie können aus einzelnen miRNA Genen oder von Intron Protein kodierenden Genen synthetisiert werden<sup>85</sup>. Anfangs sind miRNAs mehrere Basen lang (pri-miRNA), erst im Nukleus erfolgt ihre Transkription durch die Ribonuklease (RNase) III Endonuklease Drosha in eine haarnadelförmige Vorläufer-miRNA (pre-miRNA, 70–100 nt)<sup>69,86</sup>. Exportin-5 (XPO5) transportiert sie ins Zytoplasma<sup>87</sup>, wo die RNase III Endonuklease, Dicer1, die pre-miRNA in eine doppelsträngige ~22 nt kurze miRNA schneidet<sup>86</sup>. Diese miRNA wird anschließend in einen Multikomponenten Proteinkomplex, RNA-Induced Silencing Complex (RISC), eingebaut<sup>86,88,89</sup>. Hier wird ein Strang zur reifen miRNA, während der andere degradiert wird<sup>86</sup>.

### 1.4.3 MicroRNAs in der Skelettmuskulatur

MyomiRs sind microRNAs, die ausschließlich in der Herz- und Skelettmuskulatur exprimiert werden. Neben der Myogenese regulieren sie das Muskelwachstum, tragen allerdings auch zur Entstehung einer Atrophie bei<sup>90–94</sup>. Sie besitzen bei molekularen Prozessen im Muskelgewebe wichtige Funktionen. Veränderungen ihrer Expression können einerseits zur Regeneration andererseits aber auch zur Degeneration führen.

Entwickelt sich eine Muskelatrophie, spielen sowohl das Ubiquitin-Proteasom als auch der Foxo Signalweg eine wichtige Rolle. Die Ubiquitin-Protein-Ligase Aktivität wird durch microRNAs moduliert. Eine Studie in Mäusen zeigte, dass die miR-23a die Translation der Ubiquitin-Ligasen MAFbx und MuRF1 hemmt. Foxo ist ebenfalls ein Zielgen dieser miRNA. Durch Reprimierung der miR-23a wird die Foxo Expression erhöht, was wiederum zur Atrophie führt. Die Überexpression der miR-23a führt zu einer verminderten Atrophie<sup>95</sup>. Daher könnten MyomiRs besonders wichtig für die Entwicklung neuer Therapien zur Behandlung von Muskelerkrankungen sein.

### 1.4.4 MicroRNAs in der Myogenese

Die Entwicklung der Skelettmuskulatur ist ein koordinierter Entwicklungsprozess<sup>96</sup>. Nach der Proliferation von Satellitenzellen und Myoblasten, die durch den basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) begünstigt wird, erfolgt die Differenzierung und die Zellfusion zu multinukleären Myotuben<sup>97</sup>. Die Regulierung erfolgt durch sogenannte Myogenic Regulatory Factors (MRFs) und dem Myocyte Enhancer Factor-2 (MEF-2), die eine muskelspezifische Gentranskription ermöglichen<sup>97,98</sup>. MicroRNAs regulieren diese Schritte sowie die Balance zwischen Proliferation und Differenzierung<sup>93,99–101</sup>.

Während der Proliferation und der Differenzierung steigt oder sinkt die Expression von drei miRNAs: miR-1, -206 und -133a/b<sup>101,102</sup>. Sie kontrollieren die Satellitenzell- und Myoblastenproliferation ebenso wie die Differenzierung<sup>103–107</sup>. Diese miRNAs werden wiederum durch die Serum Response Factor (SRF), MyoD und MEF-2 kontrolliert. Die miR-206 wird nur in der Skelettmuskulatur exprimiert und ihre Induktion erfolgt durch MyoD und MyoG<sup>108</sup>.

MiR-1 und miR-133 sind bei der Proliferation und der Differenzierung involviert. Durch Reprimierung der SFRs verstärkt miR-133 die Proliferation während miR-1 die Histon-Deacetylase-4 (HDAC-4), einen Inhibitor der Muskeldifferenzierung, inhibiert. Dadurch wird die Proliferation gehemmt und die Differenzierung eingeleitet<sup>103</sup>. Letztere wird auch durch die miR-206, mittels Reprimierung der Proliferation von Myozytenvorläufern, begünstigt<sup>101,106–109</sup>. In kultivierten, humanen Myoblasten werden bis zu 20 weitere miRNAs hoch- oder herunterreguliert<sup>110</sup>. Die Myogenese erfolgt in mehreren Schritten. Von der myogenen Determinierung von Vorläuferzellen, der Myoblasten Proliferation, über die Expression muskelspezifischer Gene, der Fusion zu multinukleären Myotuben, letztendlich über die Entwicklung von Myotuben zu kontraktile Muskelfasern<sup>111–114</sup>. Die Komplexität dieses Prozesses steht unter der Kontrolle myogener Regulatoren; sie koordinieren die Myogenese. Diese MRFs gehören zu den Muscle-basic-Helix–Loop–Helix (bHLH) Transkriptionsfaktoren. Dazu zählen Myf5, MyoD, MRF4 und MyoG. Myf5 und MyoD regulieren die Proliferation und das Überleben von Myoblasten. MyoG und MRF-4 (Myogenic Regulatory Factor-4) sind essentiell für die Regulation der späteren Differenzierung<sup>111,115,116</sup>. Nach Beginn der Differenzierung aktivieren und initiieren diese Transkriptionsfaktoren die Expression von Muskelgenen in Abhängigkeit von MEF2. Diese Transkriptionsfaktoren binden an bestimmte Regionen der Muskelgene<sup>117</sup>.

## 1 Einleitung

Die Skelettmuskelfaser besteht aus verschiedenen Myosin Isoformen der schweren Kette (Myosin Heavy Chain - MyHC). Jede Isoform wird von einem individuellen Gen kodiert<sup>118</sup>. Die Muskelfasern sind aus verschiedenen MyHC-Isoformen zusammengesetzt. Bei der Muskelentwicklung und der Differenzierung ist die Expression dieser Gene am stärksten reguliert<sup>119,120</sup>.

Durch Bindung an die 3'UTR der Myh1, -2 und -4 mRNAs kann die miR-23a ihre Expression reprimieren. Dadurch kann die Myogenese z. B. in murinen Myoblasten inhibiert werden. Sie reguliert die Differenzierung durch Inhibierung der MyHC-Isoform Expression<sup>121</sup>.

In Säugetieren wird die miR-23a in unterschiedlichen Geweben wie Fett-, Herz- oder Skelettmuskel exprimiert<sup>95,122-125</sup>. Unter anderem reguliert sie auch die Herzmuskel Hypertrophie, indem sie die Translation der anti-hypertrophen E3-Ligase MuRF-1 inhibiert. Diese Inhibierung erfolgt posttranslational<sup>122</sup>.

Myh1, Myh2 und My4 sind weitere Zielgene der miR-23a. Zu Beginn der Differenzierung wird die miR-23a Expression verringert (von Tag 0 bis Tag 3). Dadurch kann mehr Myosin Protein exprimiert werden. Nach 5 Tagen Differenzierung sinkt die Myosin Expression und die miR-23a Expression beginnt wieder zu steigen. Dadurch wird die Translation von Myosin gestoppt<sup>121</sup>.

Einige Studien zeigten bereits die regulatorischen Funktionen von microRNAs bei der Proteinexpression in pathologischen Stadien, unter anderem bei der Muskelatrophie<sup>95,126,127</sup>.

Die miR-23a kann die Expression von MAFbx und MuRF-1 im Skelettmuskel durch Inhibierung der Translation ihrer mRNA verringern<sup>113</sup>. Die gleiche Studie zeigte durch eine miR-23a Überexpression eine Resistenz der Muskeln vor einer Atrophie sowohl in vitro als auch in vivo. Im Gegensatz hierzu kann diese microRNA auch die Myogenese durch Reprimierung struktureller Muskelgene inhibieren<sup>121</sup>.

## 1.5 Die Angiogenese – Ein kleiner Einschub

Die Angiogenese ist ein Prozess zur Bildung neuer Blutgefäße und damit Voraussetzung für intaktes Gewebe und Geweberegeneration. Die Regulierung übernehmen Wachstumsfaktoren, Chemokine, endothelzell-spezifische Rezeptoren und Adhäsionsmoleküle. Erfolgt dieser Prozess unkoordiniert können Tumore und Metastasen entstehen, deren Entwicklung angiogeneseabhängig ist<sup>128</sup>.

Die Vaskularisierung, die gerade bei der Wundheilung eine wichtige Rolle spielt, wird durch Wachstumsfaktoren wie dem FGF-2 (fibroblast-growth-factor-2)<sup>129</sup> und dem VEGF (Vascular-Endothelial-Growth-Factor) reguliert<sup>130</sup>. VEGF stimuliert sowohl die Proliferation als auch die Migration von Endothelzellen<sup>131</sup>. Außerdem können Endothelzellen durch den VEGF röhrenförmige Strukturen, sogenannte Tubes, ausbilden<sup>132</sup>. Seine Expression und die seines Rezeptors ist nicht ausschließlich auf Endothelzellen beschränkt, sondern erfolgt auch durch Osteoblasten<sup>133</sup> und regenerierende Myotuben<sup>134</sup>.

Glukokortikoide können die Angiogenese inhibieren<sup>135</sup>. Allerdings können endogene Glukokortikoide auch zur Regulierung der neuen Gefäßbildung beitragen<sup>136,137</sup>. Glukokortikoide inhibieren die Bildung der Röhrenstruktur in Endothelzellen (HUVECs) indem sie die Bildung von Zell-Zell Kontakten vermindern. Diese Inhibierung konnte durch den Glukokortikoid-Rezeptor Antagonisten RU38486 verbessert werden.

Bei Krebszellen verursacht Dexamethason die VEGF Reprimierung. Weiterhin wird VEGF nach der Induktion einer Ischämie von Skelettmuskel Myozyten und Endothelzellen produziert und spielt dabei eine wichtige Rolle bei der Angiogenese<sup>138,139</sup>.

## 1 Einleitung

Durch VEGF kann die Zellmigration von Myoblasten verstärkt werden und dann ebenso die Apoptose im Skelettmuskel (in vivo) inhibieren. Dadurch zeigt sich, dass VEGF auch Myoblasten modulieren kann. Weiterhin kann VEGF auch zur Rekrutierung von Vorläuferzellen im regenerierenden Muskel beitragen. Dies könnte ein Hinweis auf einen gemeinsamen Prozess mit identischem Auslöser zur Regeneration und zur Angiogenese sein<sup>140</sup>.

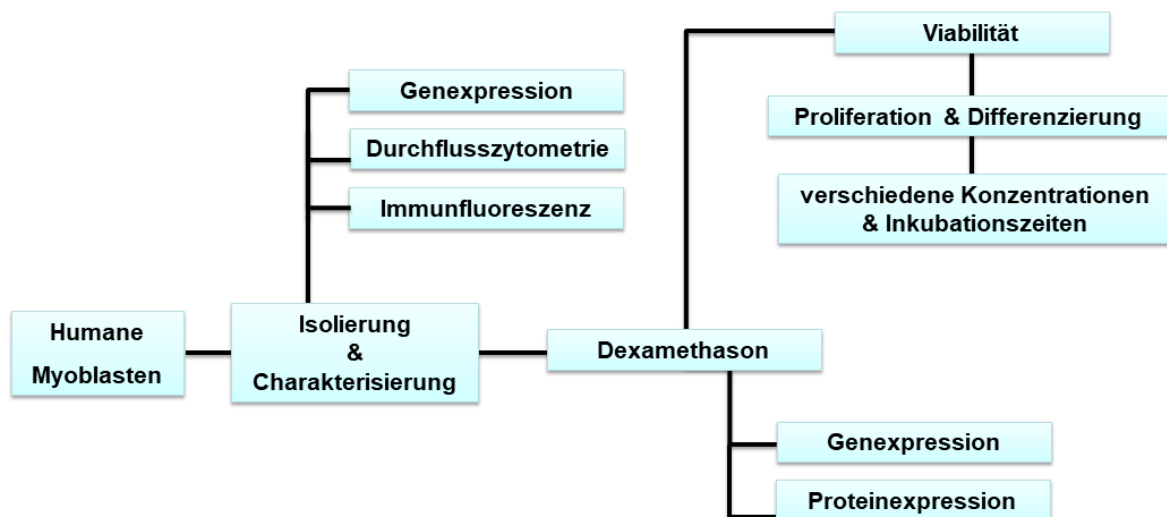
In vitro wurde im Modell des dystrophischen Muskel gezeigt, dass MDSCs (Myeloid-derived-suppressor cells), die mit VEGF stimuliert wurden, das angiogene Protein vWF exprimieren<sup>141</sup>.



## 2 Ziel dieser Studie

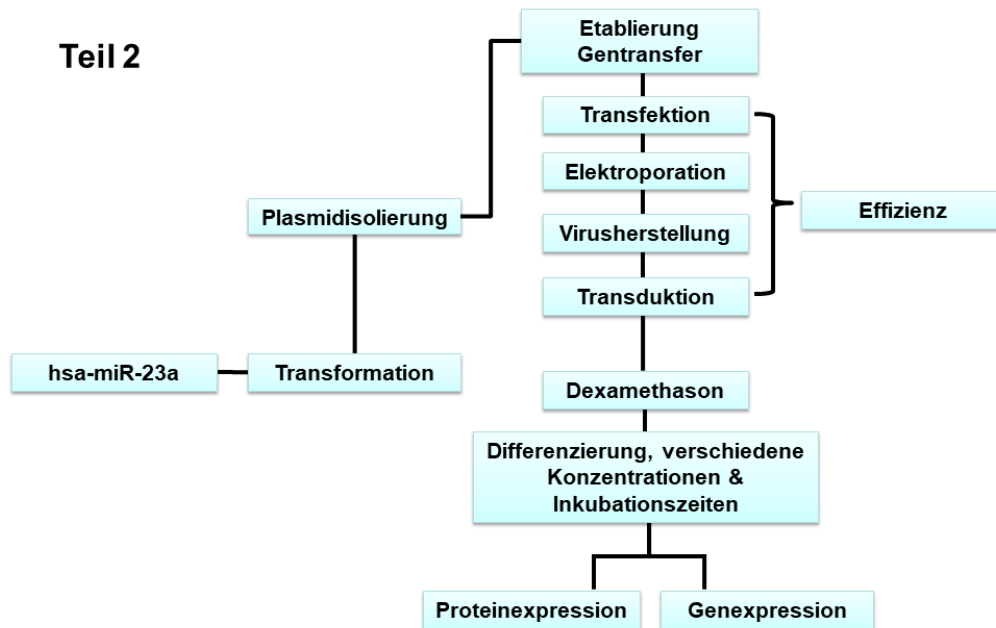
In dieser Studie sollen Mechanismen und Transduktionswege, die zur Atrophie führen können, näher analysiert werden um damit neue Therapieformen und Präventionsmaßnahmen für muskuloskelettale Erkrankungen zu entwickeln. Deshalb wird in dieser Studie der Einfluss des Glukokortikoids Dexamethason auf primäre humane Myotuben in Verbindung mit einer Signaltransduktionskaskade zur Entstehung der Muskelatrophie analysiert werden. Aus diesem Ansatz sollen zukünftig neue Therapien für Muskelerkrankungen entwickelt werden. Die Analyse von atrophieassoziierten Transkriptionsfaktoren erfolgt durch die Gen- und Proteinexpression. Im Weiteren soll der Einfluss einer Überexpression der miR-23a zur Inhibierung von Atrophie-auslösenden Genen und einer damit verbundenen Inhibierung der Myosin Degradierung in dieser Studie eingehend analysiert werden. Ebenfalls soll eine Kokultur aus Myoblasten und Endothelzellen etabliert werden und der Einfluss von Dexamethason auf die Expression von angio- und myogenen Markern bestimmt werden. Die Studie ist drei experimentelle Abschnitte unterteilt, die in den nachfolgenden Abbildungen grafisch dargestellt sind.

### Teil 1



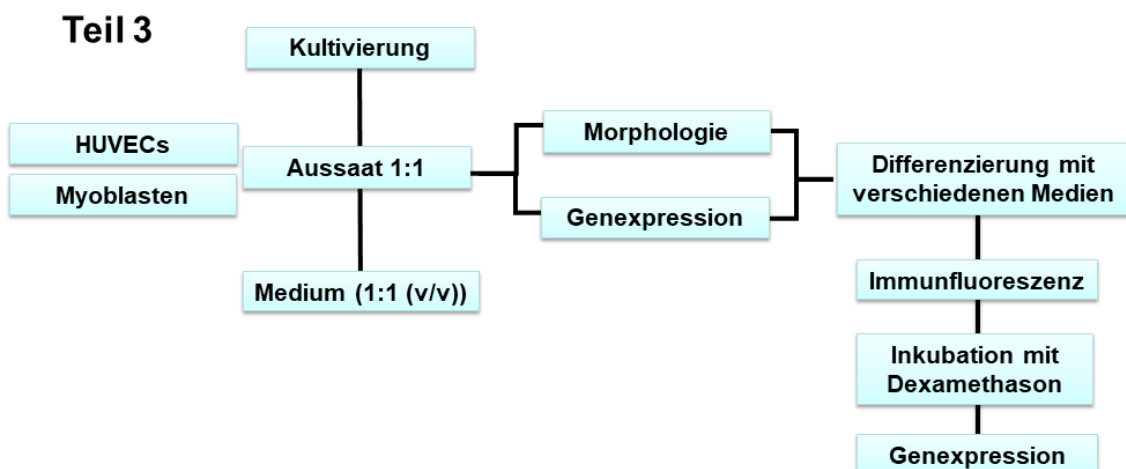
**Abb. 5: Überblick des 1. experimentellen Teils der Studie.**

Im ersten Teil der Studie (Abb. 5) werden humane primäre Myoblasten nach der Isolierung charakterisiert. Danach werden sie mit unterschiedlichen Konzentrationen Dexamethason zur Induktion der Atrophie zu unterschiedlichen Zeiten inkubiert und ihre Viabilität überprüft. Schließlich wird die Genexpression (qPCR) und die Proteinexpression (Western Blot) von Atrogenen sowie muskelspezifischer Marker analysiert.



**Abb. 6: Überblick des 2. experimentellen Teils der Studie.**

Im zweiten Teil (Abb. 6) wird zuerst der miR-23a Plasmid vermehrt und isoliert. Anschließend wird der geeignetste Gentransfer ermittelt. Danach erfolgt die Transduktion des Plasmids in die primären Myoblasten und die Differenzierung mit anschließender Atrophieinduktion (Dexamethason). Die Analysiert erfolgt wie in Teil 1.



**Abb. 7: Überblick des 3. experimentellen Teils der Studie.**

Im letzten Teil (Abb. 7) wird eine Kokultur aus primären Myoblasten und Endothelzellen etabliert und analysiert. Anschließend werden die Zellen ebenfalls mit Dexamethason inkubiert und die Genexpression analysiert.

Anhand der qPCR wird die Genexpression von Transkriptionsfaktoren des Signalwegs, der Ubiquitin-Ligasen sowie der myogenen Differenzierungsmarker und einer microRNA quantitativ verifiziert. Durch den Western Blot soll die Expression von MuRF-1 und Myosin qualitativ überprüft werden um so Rückschlüsse auf die Proteinexpression und somit die Translation zu ziehen.

## 3 Material und Methode

Alle verwendeten Geräte, Verbrauchsmaterialien, Chemikalien und Lösungen, Antikörper, Enzyme, Primer-Sequenzen, Zellkultur Medien, Software sowie Komplettsysteme und Kits sind im Anhang aufgelistet.

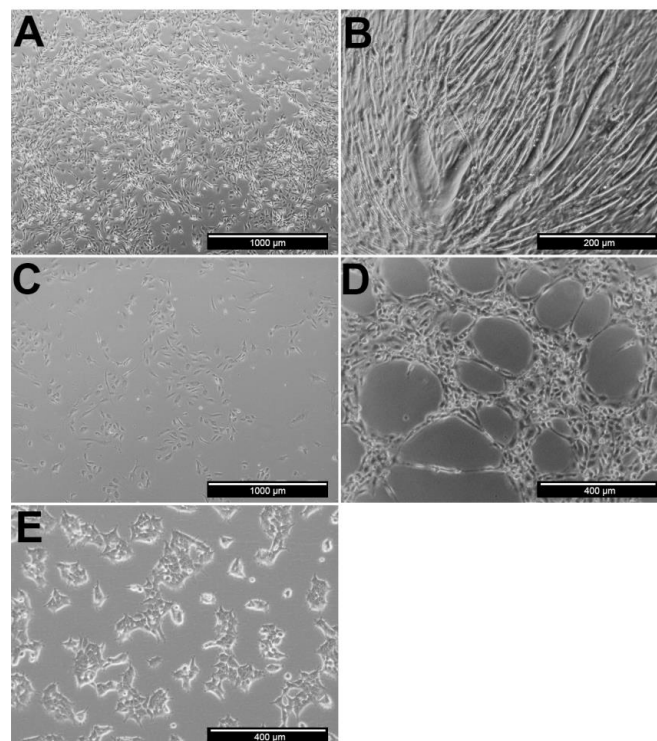
### 3.1 Zellkultur

#### 3.1.1 Allgemeine Zellkultur Bedingungen

Die Versuche wurden unter einer Sicherheitswerkbank durchgeführt. Zur Kontaminationsvermeidung wurden alle Lösungen und Materialien entweder vom Hersteller steril geliefert (Zellkulturmedien, Einmalplastikartikel), hitzesterilisiert, steril gefiltert oder autoklaviert. Die Kulturmedien wurden auf 37°C vorgewärmt, Puffer und Enzyme jedoch bei Raumtemperatur verwendet.

#### 3.1.2 Zellen und Medien

Für die Versuche wurden primäre humane Myoblasten, humane, aus Nabelschnur stammende Endothelzellen (Human Umbilical Vein Endothelial Cells; HUVECs), die murine C2C12 Myoblasten Zelllinie, HEK 293T (Human Embryogenic Kidney) Zellen und die Hela Zelllinie verwendet (Tabelle 6). Die jeweiligen Medien und Supplemente befinden sich im Anhang (Tabelle 7). Die Zellkultivierung erfolgte bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank. Ein Medienwechsel erfolgte alle zwei Tage.



**Abb. 8: Phasenkontrast Mikroskopie der verwendeten Zelltypen.**

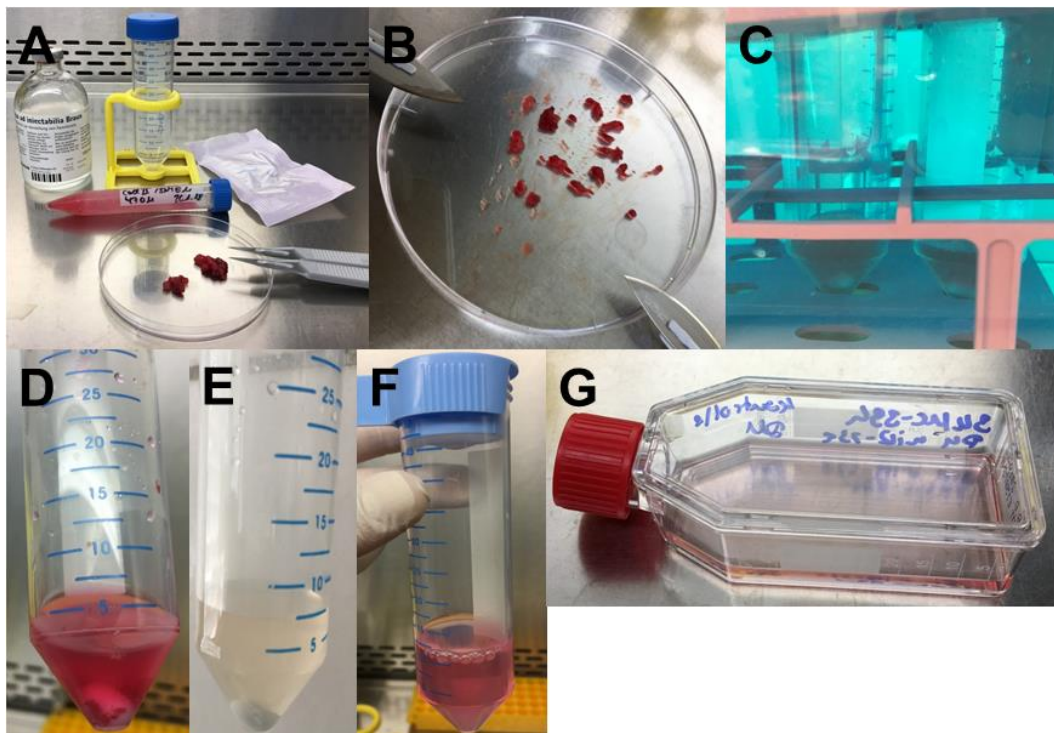
A: proliferierende C2C12, B: C2C12 Myotuben nach 5 Tagen Differenzierung, C: proliferierende HUVEC, D: Röhrenbildung (Tube-Formation) der HUVECs in einer 3D Gel-Matrix. E: HEK 293T Zellen zur Herstellung lentiviraler Viruspartikel.

### 3.1.3 Isolierung primärer humaner Myoblasten

Die Isolierung erfolgte nach einem etablierten und modifizierten Verfahren unter sterilen Bedingungen<sup>142</sup>. Das Skelettmuskelgewebe stammte aus der Lendenwirbelsäule und fiel als Überschussmaterial im Rahmen von Wirbelsäulenoperationen an. Für die Verwendung des Gewebes lag stets eine Einverständniserklärung seitens des Patienten vor. Die Verwendung des Materials ist in einer Übereinkunft der Ethikkommission der Landesärztekammer Rheinland-Pfalz mit der Uniklinik geregelt<sup>143</sup>.

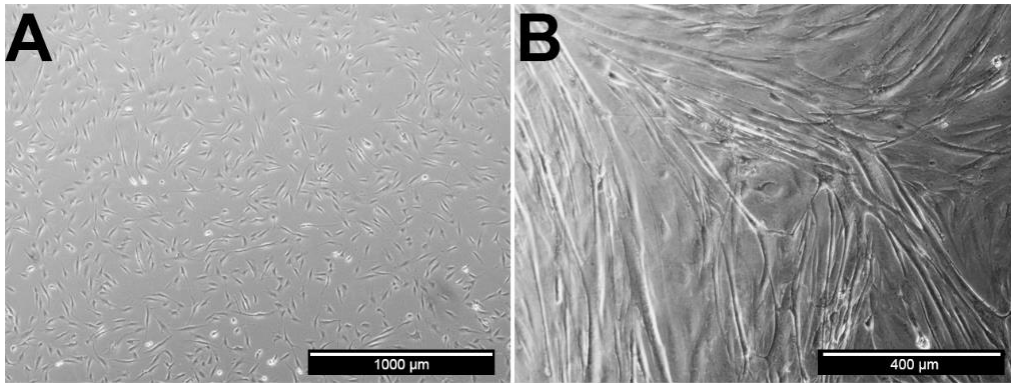
Die Zellkultivierung erfolgte immer in kollagenbeschichteten Kulturgefäßen (Kollagen Typ I/PBS (1:100), 45 min Inkubation).

Nach der Entfernung von Perimysium, Zelldebris sowie unspezifischem Gewebe wurde die Muskelprobe in 1 mm<sup>2</sup> Fragmente zerkleinert. Nach dem Spülen des Gewebes wurde bei 37°C mit Kollagenase (Typ 2, 470 U/ml in DMEM/F-12) für eine Stunde unter Rühren im Wasserbad inkubiert (Abb. 9 B, C, D). Nach dem Zentrifugieren (7 min, 1600 rpm) wurde der Überstand verworfen und die Probe mit Trypsin/EDTA (0,25%/0,02%, 20 min) wie zuvor inkubiert (E). Die Trypsinierung wurde durch Zugabe von Medium beendet, die Zellsuspension durch ein 70 µm Zellsieb gefiltert (F) und zentrifugiert (1400 rpm, 5 min). Nach der Resuspension wurden die Zellen in Zellkulturgefäßen für zwei Stunden im Brutschrank bei 37°C inkubiert (G). Innerhalb der zwei Stunden sollten sich Fibroblasten auf der unbeschichteten Oberfläche absetzen. Dadurch wurde versucht eine möglichst fibroblastenfreie Primärkultur zu erhalten. Zum Schluss wurde der Überstand in kollagenbeschichtete Kulturgefäße überführt und von neuem inkubiert.



**Abb. 9: Schema der Myoblasten Isolierung.**

A: Equipment zur Zellisolierung B: Gewebefragmente C: Gewebeverdau durch Kollagenase im Wasserbad, D: Nach Kollagenaseverdau, E: Trypsiniertes Gewebe, F: Filtrierung der Zellen, G: Zellaussaat & Kultivierung.



**Abb. 10: Phasenkontrast Mikroskopie der isolierten primären, humanen Myoblasten.**

A: Proliferierende Myoblasten 5 Tage nach Isolierung, B: ausdifferenzierte Myotuben nach 5 Tagen.

Zur Differenzierung wurden die Myoblasten mit PBS gewaschen und über einen Zeitraum von 5 Tagen mit Differenzierungsmedium (Tabelle 8) inkubiert. Anschließend konnte Myotubenbildung lichtmikroskopisch detektiert werden.

#### 3.1.4 Zellpassagierung

Bei der Zelldichte von 75% wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und für 5 min mit Accutase inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden in Medium aufgenommen und bei 1400 rpm für 5 min abzentrifugiert. Das Pellet wurde in Medium resuspendiert, die Zellsuspension in kollagenbeschichtete Zellkulturgefäße ausgesät und bei 37°C inkubiert; Nach 24 Std. erfolgte ein Medienwechsel.

#### 3.1.5 Kryokonservierung und Reaktivierung

Die Zellen wurden wie in 3.1.4 beschrieben abgelöst, pelletiert, in 10% DMSO/FCS resuspendiert und in Kryoröhrchen überführt. Nach 24 Std. bei -80°C wurden die Zellen bei -196°C eingefroren.

Zur Reaktivierung wurden die aufgetauten Zellen in Medium resuspendiert und für 5 min bei 1400 rpm zentrifugiert, anschließend in kollagenbeschichtete Zellkulturflaschen ausgesät und bei 37°C im Brutschrank kultiviert.

#### 3.1.6 Zellzahldefinition

Die Zellsuspension wurde mit Trypanblau (0,4%, 1:2) gemischt und in eine Zellzählkammer pipettiert. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte im LUNA™ Automated Cell Counter. Die definierte Zellzahl, je nach Experiment, konnte anschließend in die vorgesehenen Zellkulturgefäße pipettiert werden.

#### 3.1.7 Viabilitätstest

Die Zellviabilität wurde mit dem alamarBlue® Reagenz (1:10/Medium) über einen definierten Zeitraum bestimmt. Nach der Zellaussaat und der Kultivierung in 24-Loch Platten wurden sie mit je 500 µl des Reagens für 4 Std. inkubiert. Anschließend wurden je 100 µl im Triplikat auf eine 96-Loch Platte pipettiert und die Fluoreszenzintensität (Extinktion 525 nm; Emission 580-649 nm) mit dem GloMax® Multidetektion System gemessen. Die Zellen wurden mit frischem Medium versorgt und wieder inkubiert.

### 3 Material und Methode

#### 3.1.7.1 Puromycin

Die Myoblasten ( $1,0 \times 10^4$  Zellen) wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen des Selektionsantibiotikums Puromycin inkubiert. Die Viabilitätsmessung erfolgte nach jeweils 0, 24, 48, und 72 Std. Als Kontrolle wurden die Zellen ohne Puromycin inkubiert.

#### 3.1.7.2 Dexamethason

Die Zellen wurden 5 Tage differenziert und anschließend mit Dexamethason (1, 10 und 100  $\mu\text{M}$ ) inkubiert. Die Messung erfolgte jeweils nach 0, 24, 48 und 72 Std. nach Zugabe. Zusätzlich wurden die Zellen für eine Dauer von 8 Tagen differenziert und Dexamethason bei Beginn der Differenzierung zugegeben. Zur Kontrolle wurden die Zellen ohne Dexamethason inkubiert.

#### 3.1.8 Durchflusszytometrie

Für die Bestimmung von Oberflächenproteinen wurden die Myoblasten ( $3 \times 10^5$  Zellen) gewaschen (PBS, 0,5% FCS, 0,1M EDTA, pH 7,3) mit Antikörpern inkubiert (dunkel) und zur Messung in PBS aufgenommen (Abb. 11). Die Messung erfolgte im Triplikat bei 488 nm (FITC) und 640 nm (APC). Die Zellen wurden von Passage 0 bis 4 charakterisiert.

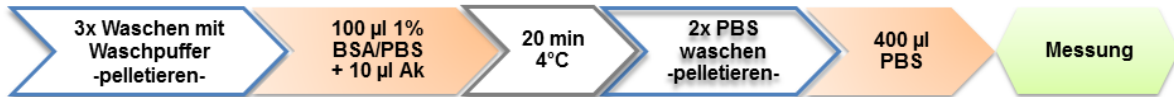


Abb. 11: Ablauf der Zellvorbereitung und Antikörperkopplung für die Durchflusszytometrie.

### 3.1.9 Immunfluoreszenz

Für den Nachweis intrazellulärer oder membranständiger Proteine wurden die Zellen in 24- oder 6-Loch Platten ausgesät und kultiviert. Zur Differenzierung wurden die Zellen für 5 Tage mit Differenzierungsmedium inkubiert. Der schematische Ablauf ist in Abb. 12 aufgeführt.

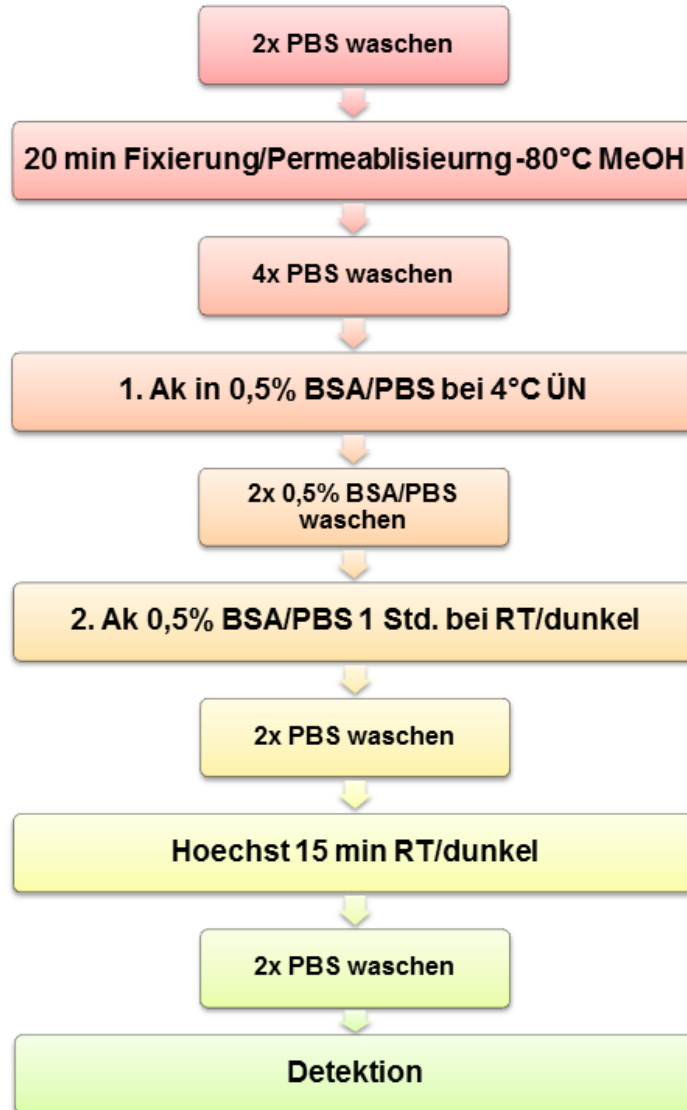


Abb. 12: Schematischer Ablauf der Immunfluoreszenz.

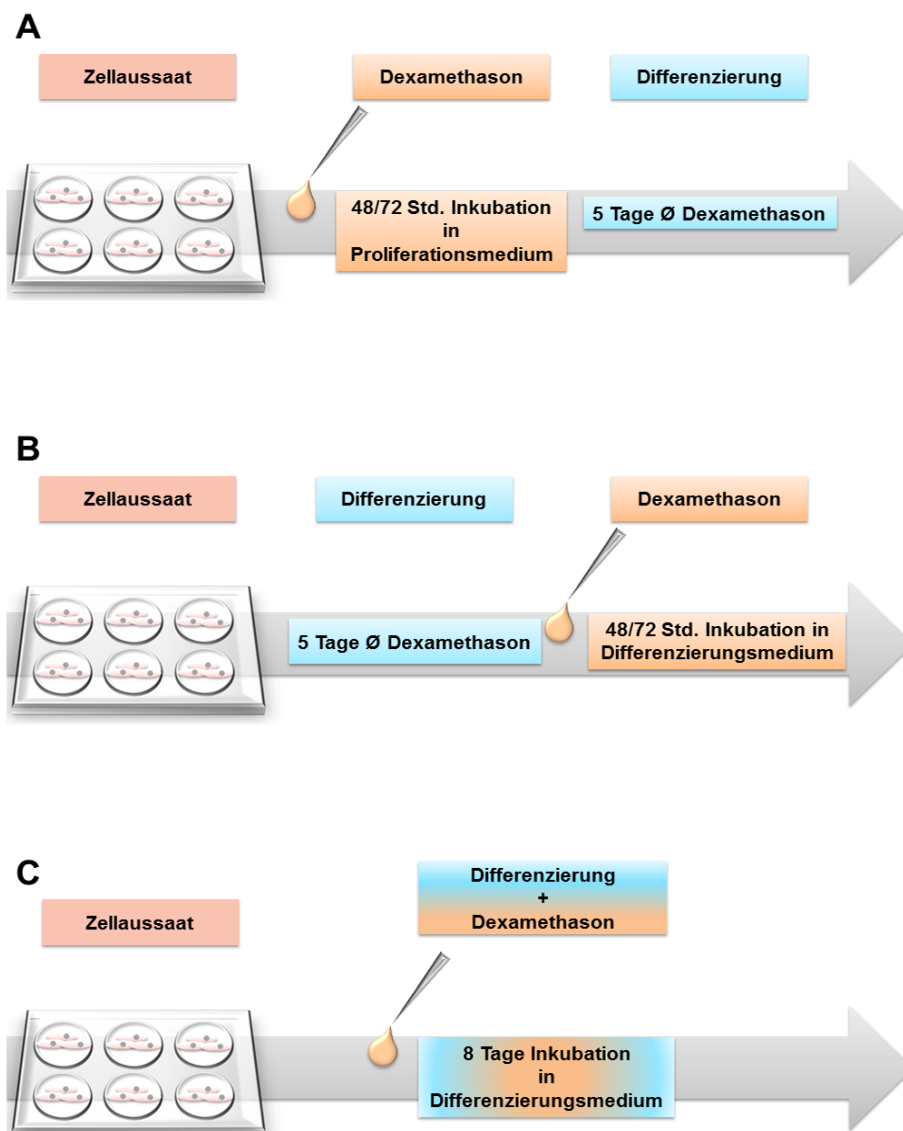
### 3.1.10 Mikroskopie

Die Zellen wurden lichtmikroskopisch kontrolliert. Die Fluoreszenzmikroskopie wurde zur Detektion der Transfektion, Transduktion sowie der Immunfluoreszenz angewendet. Gefärbte Zellen wurden im blauen, grünen oder roten Kanal separat oder kombiniert, durch Überlagerung der einzelnen Kanäle, detektiert.

### 3.1.11 Induktion atrophischer Bedingungen in vitro

Atrophische Bedingungen wurden in vitro mit dem synthetischen Glukokortikoid Dexamethason (1, 10 und 100  $\mu\text{M}$ ) induziert. Die Dexamethason Stocklösung (25 mM/Aqua dest.) wurde steril filtriert und bei 4°C gelagert.

Dafür wurden  $5,0\text{-}8,0 \times 10^4$  Zellen in 6-Loch Platten ausgesät und kultiviert. Abb. 13 veranschaulicht die verschiedenen Versuchsansätze. Jeder Versuch wurde mit Zellen von drei verschiedenen Muskelgeweben durchgeführt.



**Abb. 13: Induktion atrophischer Bedingungen in vitro.**

A: Nach der Aussaat wurden die Zellen für 48 und 72 Std. mit Dexamethason in PM kultiviert und ohne Dexamethason differenziert. B: Die Zellen wurden zuerst differenziert und anschließend für 48 und 72 Std. mit Dexamethason/DM inkubiert. C: Die Inkubation mit Dexamethason erfolgte über den gesamten Zeitraum der Differenzierung.



## 3.2 Bakterienkultur

### 3.2.1 Bakterienstamm

Die Vermehrung von Plasmid-DNA erfolgte durch den kompetenten *Escherichia coli* Stamm DH5 $\alpha$ .

#### 3.2.1.1 Genotyp

fhuA2  $\Delta$ (argF-lacZ) U169 phoA glnV44  $\Phi$ 80 $\Delta$  (lacZ)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17

### 3.2.2 Bakterienmedium

#### LB-Medium

10 g Bacto Tryptone

5 g Hefeextrakt

10 g NaCl

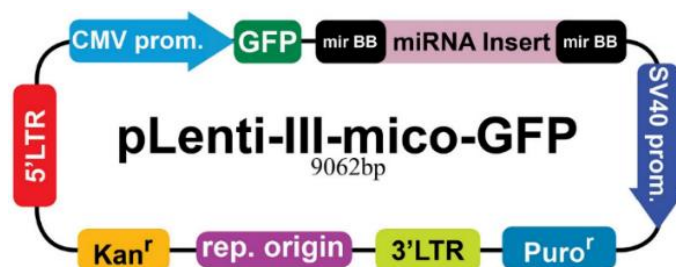
Ad 1000 ml mit Aqua dest., pH 7,5.

### 3.2.3 Agarplatten

Zu 500 ml des LB-Mediums wurden 7,5 g Agar-Agar hinzugefügt und autoklaviert.

Die Platten wurden steril und mit einer Endkonzentration von 100  $\mu$ g/ml Kanamycin oder Ampicillin gegossen.

### 3.2.4 Vektoren



**Abb. 14: Vektorkarte des lentiviralen Expressionsplasmids.**

Die miR-23a (21 bp) Sequenz wurde hinter das GFP-Reporter Konstrukt subkloniert. Die Kanamycinresistenz dient zur bakteriellen, die Puromycinresistenz zur eukaryotischen Selektion.

### 3.2.5 Transformation

Die Transformation in *E. coli* diente zur Vermehrung von Plasmid-DNA und erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Die kompetenten Bakterien wurden auf Eis angetaut und mit 1  $\mu$ l Plasmid-DNA für 30 min auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte bei 42°C für 30 sek.. Nach Zugabe von SOC-Medium wurde für 60 min bei 37°C und 250 rpm inkubiert. Zum Schluss wurden 30  $\mu$ l der Ansätze auf Agarplatten ausplattiert und bei 37°C über Nacht inkubiert. Als Positivkontrolle wurde pUC19 und Aqua dest. als Negativkontrolle eingesetzt.

### 3.2.6 Bakterienanzucht

Zur Gewinnung kleiner Mengen an DNA wurden einzelne Kolonien der ausplattierten Bakterien gepickt, in 5 ml LB-Medium mit entsprechendem Selektionsantibiotikum angeimpft und bei 37°C, 250 rpm für maximal 16 Std. inkubiert. Zur Gewinnung einer größeren Menge an DNA wurden 2 ml LB-Medium für eine Vorkultur angeimpft und inkubiert. Anschließend wurden 100 ml LB-Medium mit 50-100 µl der Vorkultur angeimpft und erneut inkubiert.

Die Zelldichte der Flüssigkulturen wurde photometrisch bei einer optischen Dichte von 600 ( $OD_{600}$ ) bestimmt, wobei:  $OD_{600} = 8 \times 10^8$  Zellen/ml.

### 3.2.7 Kryokonservierung

Die Bakterienkulturen wurden im Verhältnis 1:2 mit 87% Glycerin gemischt und bei -80°C eingelagert. Zur Reaktivierung wurden sie auf Eis angetaut, auf Agar-Platten ausplattiert und bei 37°C über Nacht inkubiert. Die Einzelkolonien wurden gepickt und in LB-Medium mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum angeimpft.

### 3.2.8 Plasmid-Isolierung

Die Plasmid-Isolierung (EndoFree® Plasmid Maxi Kit) erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers. Nach der Pelletlyse mit RNase-haltigem Puffer wurde das Lysat filtriert und mehrmals gewaschen. Nach Bindung an eine Membran und weiteren Waschschritten, erfolgte die DNA-Eluierung und die Präzipitation durch Isopropanol. Das Präzipitat wurde für 24 Std. bei -80°C eingefroren. Nach der Zentrifugation und dem Waschen mit 70% EtOH wurde das DNA-Pellet luftgetrocknet und zum Schluss mit RNase-freiem Wasser resuspendiert.

Sowohl die Reinheit als auch der Gehalt an Gesamt-DNA wurden photometrisch bei einer Wellenlänge von 260/280 nm bestimmt. Die Lagerung des Plasmids erfolgte bei 4°C.

### 3.2.9 Transfektion von Plasmid-DNA in humane Zellen

#### 3.2.9.1 Kationische polymerbasierte Transfektion

Die Transfektion erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers. Die Zellen wurden in 6-Loch Platten ausgesät und kultiviert. 2 µg DNA wurden in 200 µl jetPRIME® Puffer gelöst, 2 µl jetPRIME® Reagens hinzu pipettiert und für 10 min (RT) inkubiert. Nach dem Waschen der Zellen mit PBS wurde der Transfektionsmix hinzugegeben und für 4 Std. bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde frisches Medium hinzugegeben und für weitere 48 Std. bei 37 °C inkubiert.

#### 3.2.9.2 Elektroporation

Nach dem Ablösen und Zählen wurden je  $3 \times 10^5$  Zellen pelletiert, abzentrifugiert, mit PBS gewaschen und in je 10 µl des Elektroporationspuffers R resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen mit 2 µg Plasmid-DNA elektroporiert und für 48 Std. bei 37°C inkubiert.

#### 3.2.9.3 Transfektionseffizienz

Nach 48 Std. wurden die Zellen abgelöst, mit PBS gewaschen und in Messröhrchen überführt. Die Transfektionseffizienz wurde durchflusszytometrisch bestimmt.

## 3.3 Virusherstellung

### 3.3.1 Herstellung von Viruspartikeln

Zur Herstellung lentiviraler Partikel wurden die HEK 293T Zellen mit der 3. Generation der Hüllproteine und der microRNA transfiziert. Die Vektorkarten der Plasmide zur Virusherstellung befinden sich im Anhang.

<u>µg</u>	<u>Vektor</u>
1,6	RRE
0,6	REV
1,0	VSVG
2,0	GFP-hsa-miR-23a

Die Vektoren wurden mit 200 µl jetPRIME® Puffer gemischt, 10 µl jetPRIME® Reagent hinzu pipettiert und für 10 min RT inkubiert. Der Transfektionskomplex wurde tropfenweise zu den Zellen pipettiert und für 4 Std. inkubiert. Nach einem Mediumwechsel wurde für weitere 48 Std. inkubiert und nochmals 2 ml frisches Medium zugegeben. Nach 72 Std. wurde der Überstand für 15 min mit 3000 rpm bei 4°C zentrifugiert und bei 4°C gelagert.

### 3.3.2 Transduktion

Die Zellen ( $1,5 \times 10^4$ ) wurden in 24-Loch Platten ausgesät und für 24 Std. inkubiert. Für eine effizientere Transduktion wurde das Medium mit 5 µg/ml Protaminsulfat versetzt. Die Viruspartikel wurden auf die Zellen pipettiert und über Nacht inkubiert. Nach dem Wechsel des Mediums wurden die Zellen für weitere 48 Std. inkubiert. Als Kontrollvektor diente der SEW-eGFP Vektor.

### 3.3.3 Transduktionseffizienz

Die Transduktionseffizienz wurde nach dem Erreichen einer 80%-igen Konfluenz durchgeführt. Die Zellen wurden abgelöst, mit PBS gewaschen und nach dem Pelletieren in Messröhrchen überführt und die Effizienz durchflusszytometrisch analysiert. Als Kontrolle dienten untransduzierte Zellen.

### 3.3.4 Selektion und Kultivierung einer stabilen Zelllinie

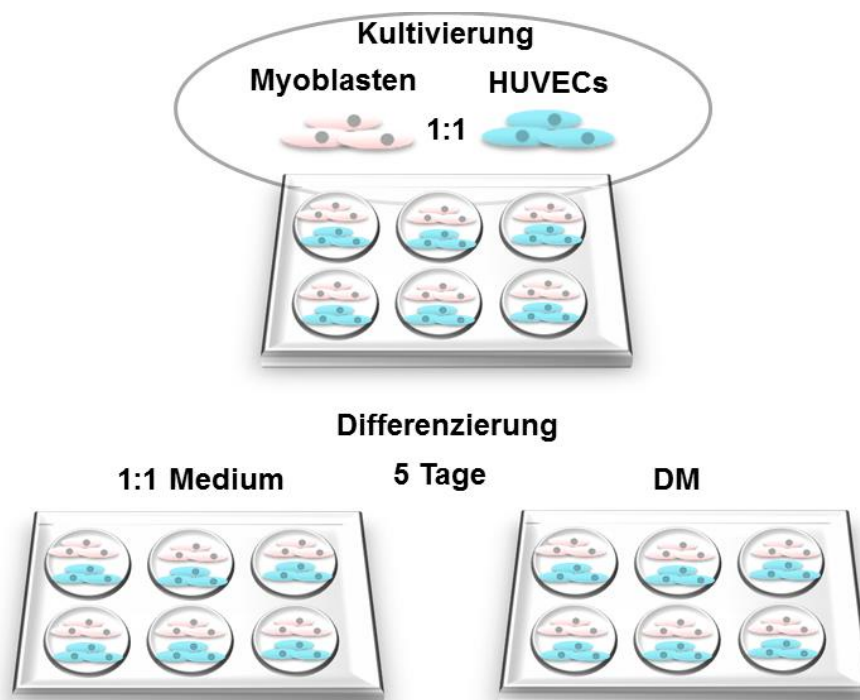
Für die Selektion wurden die Zellen 2x mit PBS gewaschen und mit der entsprechenden Konzentration des Selektionsantibiotikums im Medium für insgesamt 72 Std. inkubiert.

### 3.4 Etablierung einer Kokultur aus HUVECs und Myoblasten

Die Kokultur wurde zur Beurteilung des Zusammenspiels beider Zellarten getestet. Beide Zellarten benötigen unterschiedliche Medienkompositionen sowohl zur Proliferation als auch zur Differenzierung. Myoblasten differenzieren durch Serumsentzug und fusionieren zu Myotuben. HUVECs dagegen bilden erst in einer 3D-Gel Matrix ihre röhrenförmige Struktur aus. Die Evaluierung dieser Kokultur wurde dem Protokoll von Ertan et al.,<sup>144</sup> nachempfunden und angepasst. Weiterhin sollte die Angiogenese unter atrophischen Bedingungen in der Kokultur evaluiert werden.

#### 3.4.1 Kultivierung, Differenzierung und Induktion der Angiogenese oder Myogenese

Myoblasten und HUVECs wurden 1:1 in kollagenbeschichteten Kulturgefäßen ausgesät und bei 37°C inkubiert. Das Medium bestand aus beiden Proliferationsmedien (EBM-2 + EGM-2 Bullet Kit/DMEM-F12, 2,5 ng/ml bFGF, 10% FCS: 1:1 (v/v)). Die Zellen wurden sowohl mikroskopisch als auch auf ihre Genexpression hin untersucht. In Abb. 15 wird die Kultivierung und die Differenzierung grafisch dargestellt.



**Abb. 15: Überblick zur Kultivierung und Induktion der Angiogenese in der Kokultur.**

Nach der Kultivierung wurden die Zellen für 5 Tage mit unterschiedlichen Medienkompositionen (Tabelle 11 im Anhang) zur Differenzierung kultiviert. Die Zellen wurden lichtmikroskopisch beurteilt und die Proteinexpression durch die Färbung mit spezifischen Antikörpern überprüft.

#### **3.4.1.1 Bestimmung der VEGF-Konzentration**

Zur quantitativen Bestimmung der VEGF-Abgabe, durch die Myoblasten, wurde ein VEGF-ELISA nach Herstellerangaben durchgeführt. Nach der Plattenbeschichtung (100 µl verdünnter Antikörper) und der Inkubation über Nacht (RT) erfolgte ein dreimaliges Waschen mit Waschpuffer. Nach dem Blocken für 1 Std. wurde erneut drei Mal gewaschen.

Je 100 µl Probe oder Standard Reagens wurden aufgetragen und für 2 Std. inkubiert. Danach wurde erneut drei Mal gewaschen und anschließend mit dem zweiten Antikörper für 2 Std. inkubiert. Nach erneutem Waschen, einer 20-minütigen Inkubation mit Streptavidin-HRP und des Reaktionsabbruchs erfolgte die Absorptionsmessung bei 450 nm.

## 3.5 Isolierung von microRNA – quantitative Real-Time Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)

Die Isolierung wurde mit dem AllPrep® DNA/RNA/miRNA Universal Kit von Qiagen durchgeführt und erfolgte nach Empfehlung des Herstellers. Nach dem Ablösen wurde das Zellpellet lysiert und die Zellbestandteile durch zentrifugieren entfernt. Nach einer weiteren Behandlung mit Proteinase K wurde ein zusätzlicher DNase-Verdau durchgeführt. Nach mehrmaligem Waschen wurde die RNA inklusive der miRNAs von der Membran mit RNase-freiem Wasser eluiert. Reinheit sowie RNA Konzentration wurden photometrisch bestimmt.

### 3.5.1 Reverse Transkription und cDNA-Synthese von microRNAs

Die Reverse Transkription erfolgte mit dem miScript II RT Kit nach Angaben des Herstellers.

Mix:

4,0	µl	5x miScript HiSpec Buffer
2,0	µl	10x miScript Nucleics Mix
2,0	µl	miScript Reverse Transcriptase Mix
x	µl	RNA (1 µg)

---

Ad 15 µl mit RNase-freiem Wasser

Der Komponenten Mix wurde für 60 min bei 37°C inkubiert und anschließend die Reverse Transkriptase bei 95°C für 5 min inaktiviert.

### 3.5.2 qPCR von microRNAs

Der Nachweis von microRNAs wurde mit dem miScript SYBR® Green PCR Kit und dem miScript Primer Assay von Qiagen durchgeführt. Die cDNA wurde zuvor 1:5 mit RNase freiem Wasser verdünnt.

Komponenten Mix:

12,5	µl	2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix
2,5	µl	10x miScript Universal Primer
2,5	µl	10x miScript Primer Assay
5,0	µl	cDNA

---

Ad 25 µl mit RNase freiem Wasser

Die qPCR durchlief folgende Zyklen:

	50°C	2 min	
	95°C	15 min	Aktivierung
40 Zyklen	94°C	15 sek.	Denaturierung
	55°C	30 sek.	Primer-Anlagerung
	70°C	30 sek.	Extension

Die Ergebnisse wurden mit der  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  Methode nach Livak<sup>145</sup> oder der  $\Delta C_t$ -Methode ausgewertet.

## 3.6 RNA Isolierung

Die Extraktion und Aufreinigung von RNA wurde mit dem PeqGold micro sowie dem Total RNA Kit nach Herstellerangaben durchgeführt.

Nach der Zellyse und Binden der RNA auf die Säulen wurde zur Kontaminationsvermeidung ein zusätzlicher DNase-Verdau vorgenommen und die RNA nach mehrmaligem Waschen mit 30 bis 50 µl RNase-freiem Wasser von der Säule eluiert.

Die Konzentration sowie die Reinheit der RNA wurden photometrisch gemessen. Die Qualität der RNA wurde per Gelelektrophorese visualisiert. Dafür wurden 200 ng RNA mit Ladepuffer vermischt, bei 65°C für 5 min denaturiert und anschließend auf ein 1,5% Gel aufgetragen. Nach einer Stunde und einer konstanten Spannung von 150 V wurden die 28S und die 18S rRNA Banden unter UV-Licht detektiert.

### 3.6.1 Reverse Transkription und cDNA-Synthese

Für die cDNA Synthese wurde 2 µg RNA eingesetzt und wie folgt verfahren:

x	µl	RNA
2,0	µl	Random Primer
2,0	µl	dNTP Mix
<hr/>		
Ad 15 µl mit RNase freiem Wasser		

Danach wurde bei 65°C für 5 min und anschließend bei 25°C für 5 min im Thermocycler inkubiert.

Für die revTra wurden folgende Komponenten hinzu pipettiert:

2,0	µl	M-MuLV RT
2,0	µl	10x M-MuLV Puffer
1,0	µl	RNase-freies Wasser

Nach 60 min bei 42°C wurde das Enzym bei 65°C für 20 min inaktiviert. Die cDNA wurde anschließend 1:10 mit RNase-freiem Wasser verdünnt.

### 3.6.2 Quantitative Real-Time Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)

Von der verdünnten cDNA wurden je 5 µl/Probe, im Triplikat, auf eine 96-Loch Platte pipettiert und je 15 µl des Primer-Mixes hinzu pipettiert.

Primer Mix:

10	µl	PowerUp™ SYBR® Green Master Mix
0,1	µl	Forward Primer
0,1	µl	Reverse Primer
4,8	µl	RNase-freies Wasser

Die Primerkonzentration betrug 500 ng. Die Amplifizierung wurde wie folgt durchgeführt:

	50°C	2 min	
	95°C	2 min	Aktivierung
40 Zyklen	95°C	15 sek.	Denaturierung
	60°C	15 sek.	Primeranlagerung
	72°C	60 sek.	Extension

### 3 Material und Methode

Die Ergebnisse wurden mit der  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  Methode nach Livak<sup>163</sup> ausgewertet.

Ein Dissoziationsschritt wurde am Ende zur Überprüfung von Primer-Dimeren hinzugefügt.

#### **3.6.2.1 DNA Screening**

Zur Detektion von eGFP und der miR-23a wurden die Proben nach der Amplifizierung mit dem QIAxcel Advanced Kit analysiert und nach den Angaben des Herstellers verfahren. So konnte die Amplikongröße zusätzlich überprüft werden.



## 3.7 Proteinexpression - Western Blot

### 3.7.1 Probenvorbereitung

Nach dem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit RIPA Puffer (inkl. Protease/Phosphatase Inhibitor) abgenommen, für 30 min bei 13.300 rpm und 4°C zentrifugiert, der Überstand abgenommen und bei -20°C gelagert.

### 3.7.2 Protein-Assay

Die Quantifizierung der Proteinkonzentration wurde mit dem DC™ Protein Assay Kit durchgeführt. Die Detektion erfolgte photometrisch und im Triplikat. Als Proteinstandard wurde BSA (0-3,0 mg) eingesetzt.

5 µl	Standard/Probe
25 µl	Reagent S : Reagent A (1:50)
200 µl	Reagent B

### 3.7.3 Gelelektrophorese

Trenngel-Puffer, pH 8,8	Sammelgel-Puffer, pH 6,8
18,17 g Tris	6,05 g Tris
4,00 ml 10% SDS (0,4 g)	4,00 ml 10% SDS (0,4 g)
Ad 100 ml Aqua dest.	

10x SDS Laufpuffer	5x Probenpuffer
30 g Tris	12,5 ml Glycerol
144 g Glycin	3,125 ml β-ME
10 g SDS	7,5 ml 300 mM Tris-HCL, (pH 6,8)
Ad 1000 ml Aqua dest.	Ad 25 ml Aqua dest.

12% Trenngel	10% Trenngel	8% Trenngel
3,34 ml Aqua dest.	4,00 ml Aqua dest.	4,73 ml Aqua dest.
4,00 ml Acrylamid	3,25 ml Acrylamid	2,70 ml Acrylamid
150 µl 10% APS		
5 µl TEMED		
2,5 ml Trenngel-Puffer		

Sammelgel
2,55 ml Aqua dest.
1,25 ml Acrylamid
1,25 ml Sammelgel-Puffer
72 µl 10% APS
5 µl TEMED

Die Proben wurden mit Probenpuffer gemischt, bei 95°C für 3 min denaturiert und anschließend bei 0,04 Ampere aufgetrennt. Als Positivkontrolle wurden Hela Zellen und als Negativkontrolle HEK 293T Zellen verwendet.

### 3.7.4 Proteintransfer

#### Transferpuffer

25,0 ml 25 mM Tris-HCL

14,4 g Glycin

20% Methanol

Ad 1000 ml Aqua dest.

<b>Ponceau S</b>	<b>Coomassie</b>	<b>Entfärberlösung</b>
0,5 g Ponceau S	227 ml Isopropanol	20 % Methanol
25,0 ml Essigsäure	46 ml Essigsäure	7 % Essigsäure
	1,25 g Coomassie® Brillantblau	
Ad 500 ml Aqua dest.		

<b>10xTBS</b>	<b>1xTBST<sub>20</sub></b>
24,2 g Tris	200 ml 10x TBS
80,0 g NaCl	2 ml Tween <sub>20</sub>
Ad 1000 ml Aqua dest., pH 7,6	Ad 2000 ml Aqua dest.

#### 5% Blockierungspuffer

5 g Milchpulver

Ad 100 ml 1xTBS

Nach der Elektrophorese wurde das Gel in die Blotkammer gestellt und für 2 Std., bei 4°C und 400 mA geblottet. Der Transfer wurde mit einer Coomassie und einer Ponceau S Färbung vollzogen.

Danach wurde die Membran für 1 Std. in 5% Blockierungspuffer geblockt und danach die Membran bei 4°C über Nacht mit dem ersten Antikörper in 2,5% Blockierungspuffer/TBS inkubiert. Vor der Inkubation des Zweitantikörpers wurde die Membran zweimal über je 5 min in TBST gewaschen und anschließend für 1 Std. RT im Dunkeln mit dem Zweitantikörper (2,5% Blockierungspuffer/TBST) inkubiert. Nach erneutem Waschen in TBST wurde die Membran detektiert.

### 3.8 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit SPSS. Die Daten wurden anhand des Shapiro-Wilk-Tests auf Normalverteilung überprüft. Normalverteilte Daten wurden mit einer einfaktoriellem ANOVA und dem Games-Howell oder Tukey Post-Hoc Test analysiert. Nicht-normalverteilte Daten wurden mit dem Kruskal-Wallis Test und einem paarweisen Vergleich durch den Mann-Whitney-U Test ausgewertet. Ein p-Wert <0,05 wurde als statistisch signifikant angenommen (\*p<0,05). Die p-Werte wurden entsprechend der Bonferoni-Holm Korrektur angepasst.

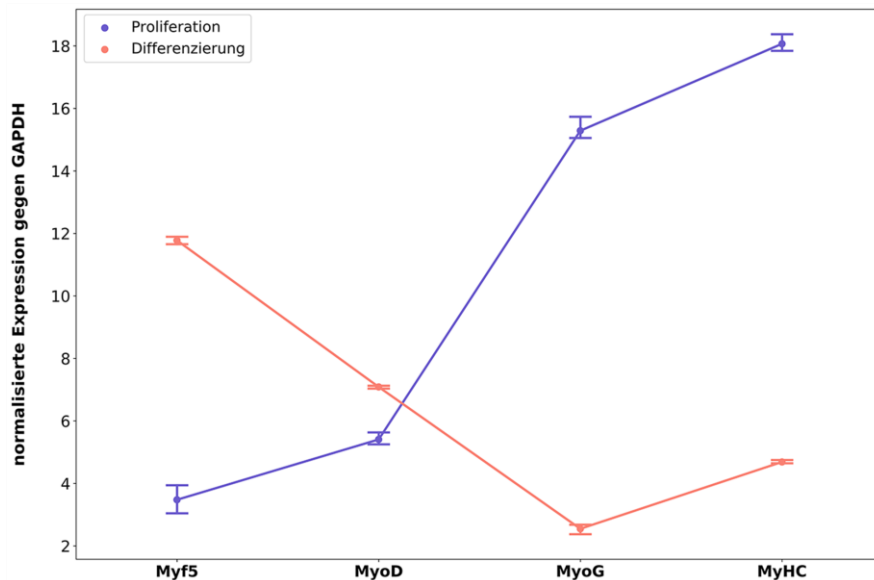
## 4 Ergebnisse und Diskussion

### 4.1 Analyse der primären humanen Myoblasten

Zur Verifizierung des myogenen Phäno- und Genotyps wurden die isolierten Myoblasten mittels quantitativer Real-Time-PCR, Durchflusszytometrie und Immunfluoreszenz analysiert.

#### 4.1.1 Genexpression

Die Genexpression wurde zum Zwecke der Quantifizierung der Expression myogener Proliferations- und Differenzierungsmarker durchgeführt. Die Auswertung erfolgte nach der  $\Delta\text{Ct}$ -Methode ( $\text{Ct}_{\text{GOI}} - \text{Ct}_{\text{GAPDH}}$ ), die in der nachfolgenden Abb. 16 dargestellt ist. Die Zellen wurden kultiviert und im Proliferationsstadium abgelöst. Für die Differenzierungsmarker wurden die Zellen 5 Tage lang mit Differenzierungsmedium kultiviert.



**Abb. 16: Genexpression von Myf5, MyoD, MyoG und Myosin in primären humanen Myoblasten.** Normalisierte Genexpression von Myf5 und MyoD (lila), MyoG und Myosin (orange). Die Ergebnisse sind als Liniendiagramm unter Angabe der Standardabweichung, in Form von Fehlerbalken, dargestellt (n=6).

Durch die Auswertungsmethode weisen geringe Werte eine höhere und hohe Werte eine geringe Expression auf.

Im proliferierenden Stadium werden die Myoblastenmarker Myf5 und MyoD im Vergleich zu GAPDH stärker exprimiert. Im Gegensatz dazu werden MyoG und Myosin geringer exprimiert. Im Myotuben Stadium werden Myf5 und MyoD weniger, die Myotubenmarker MyoG und Myosin stärker exprimiert.

Die Genexpression zeigt eindeutig, dass es sich bei den isolierten Zellen um Myoblasten handelt. Myf5 und MyoD werden von proliferierenden Myoblasten exprimiert (Abb. 16, lila) und gehören den frühen Myogenic Regulatory Factors (MRFs) an, während MyoG zu den Differenzierungsmarkern gehört<sup>164</sup>. Die Expression von Myosin im ausdifferenzierten Zustand (Abb. 16, orange) weist eindeutig auf Myotuben hin, denn Myosin wird ausschließlich von Myotuben exprimiert<sup>165</sup>.

### **4.1.2 Durchflusszytometrische Charakterisierung von Oberflächenproteinen**

Die Myoblasten wurden in den einzelnen Passagen (0-4) charakterisiert. Da es sich bei diesen Zellen um primäre Zellen handelt, werden sie nach Passage 4 nicht mehr verwendet. Ab dieser Passage können sich primäre Zellen sowohl phäno- als auch genotypisch verändern. Als Kontrolle wurden IgG APC und IgG FITC gekoppelte Zellen, die zur Korrektur der Messwerte und zum Ausschluss ungefärbter und toter Zellen dienen, verwendet. Die Messung erfolgte im Triplikat.

Da die Myoblasten aus Gewebe isoliert wurden, sollte die durchflusszytometrische Analyse zur allgemeinen Überprüfung verschiedenster Zellpopulationen sein. Daher wurde in jeder Passage die Expression der nachfolgenden Oberflächenantikörper überprüft.

CD133 wurde zur Detektion somatischer Stammzellen, die in unterschiedlichen Geweben vorkommen, verwendet<sup>146</sup>.

CD34 ist ein Marker für sowohl hämatopoetische Stamm- als auch Vorläuferzellen. Er dient zusätzlich zur Detektion von vaskulären Endothelvorläuferzellen, Fibroblasten, multipotenten mesenchymalen Zellen und epithelialen Vorläuferzellen<sup>147</sup>.

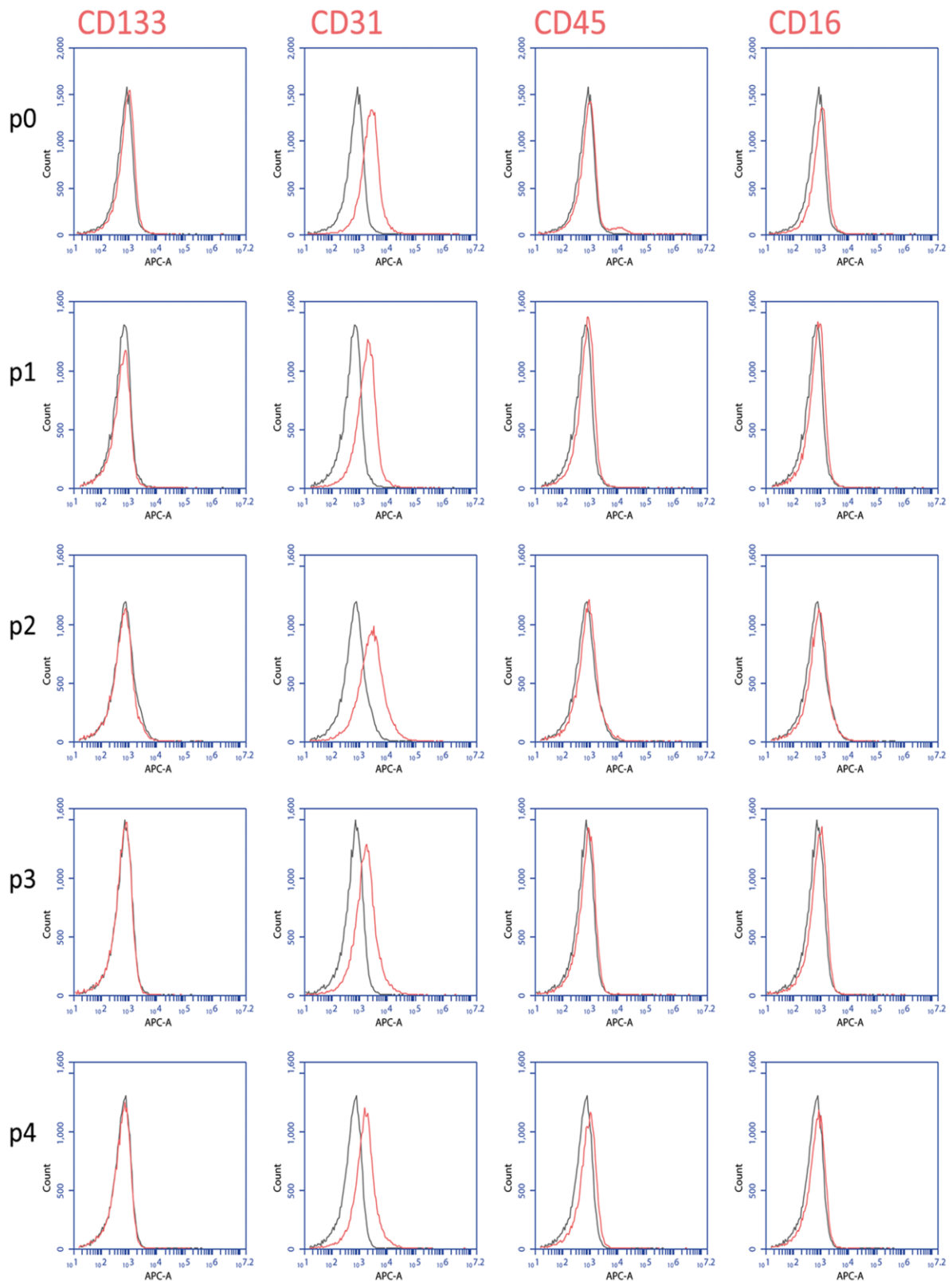
Mit CD31, CD144 und CD146 sollten Endothelzellen identifiziert werden<sup>148</sup>.

CD105 ist neben CD73 und CD90 ein Marker für mesenchymale Stammzellen<sup>149</sup>.

CD14 sowie CD11b sind Monozyten und Makrophagen Marker und sind besonders in mesenchymalen Stammzellkulturen zu finden. CD19 hingegen dient als Marker für B-Zellen<sup>149</sup>.

CD16 wird von Makrophagen, Mastzellen und natürlichen Killer-Zellen exprimiert<sup>150</sup>. CD45 exprimieren alle hämatopoetischen Zellen ausgenommen Erythrozyten<sup>151</sup> und CD3 ist ein T-Zell Marker<sup>148</sup>.

## 4 Ergebnisse und Diskussion



**Abb. 17: Detektion der Oberflächenantikörper CD133, CD31, CD45, CD16.**

IgG-APC Isotyp (schwarz) und APC gekoppelte Antikörper (rot). Die Zellzahl ist in Abhängigkeit zur Fluoreszenzintensität aufgetragen.

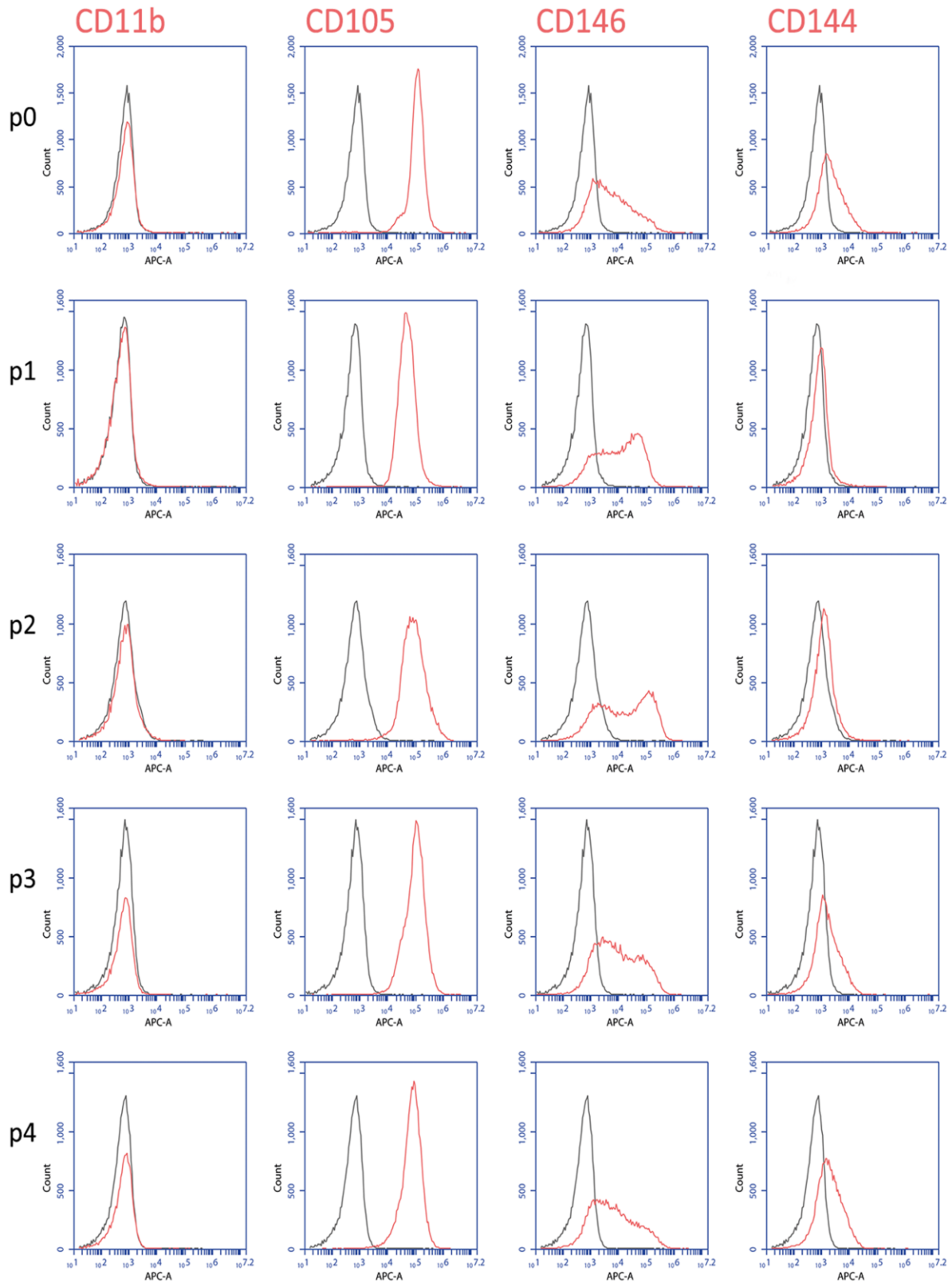
#### 4 Ergebnisse und Diskussion

**Tabelle 1: Oberflächenantikörper Expression [%] von Passage 0 bis 4.**

<b>Antikörper</b>	<b>p0</b>	<b>p1</b>	<b>p2</b>	<b>p3</b>	<b>p4</b>
<b>CD133</b>	0,2	0,4	0,0	0,0	0,0
<b>CD31</b>	46,3	27,5	27,3	20,0	13,7
<b>CD45</b>	6,5	4,1	0,1	0,4	0,1
<b>CD16</b>	0,4	0,3	0,5	0,1	1,4

In den Passagen 0-4 wird CD31 in Passage 0 am höchsten mit etwa 46,3% exprimiert. Ab Passage 1-4 sinkt die Expression von 27,5% auf ca. 13,7% ab. CD133 und CD16 werden kaum exprimiert und die Expression von CD45 sinkt von 4,5% in Passage 0 auf 0,1% in Passage 4.

## 4 Ergebnisse und Diskussion



**Abb. 18: Detektion der Oberflächenantikörper CD11b, CD105, CD146, CD144.**

IgG-APC Isotyp (schwarz) und APC gekoppelte Antikörper (rot). Die Zellzahl ist in Abhängigkeit zur Fluoreszenzintensität aufgetragen.

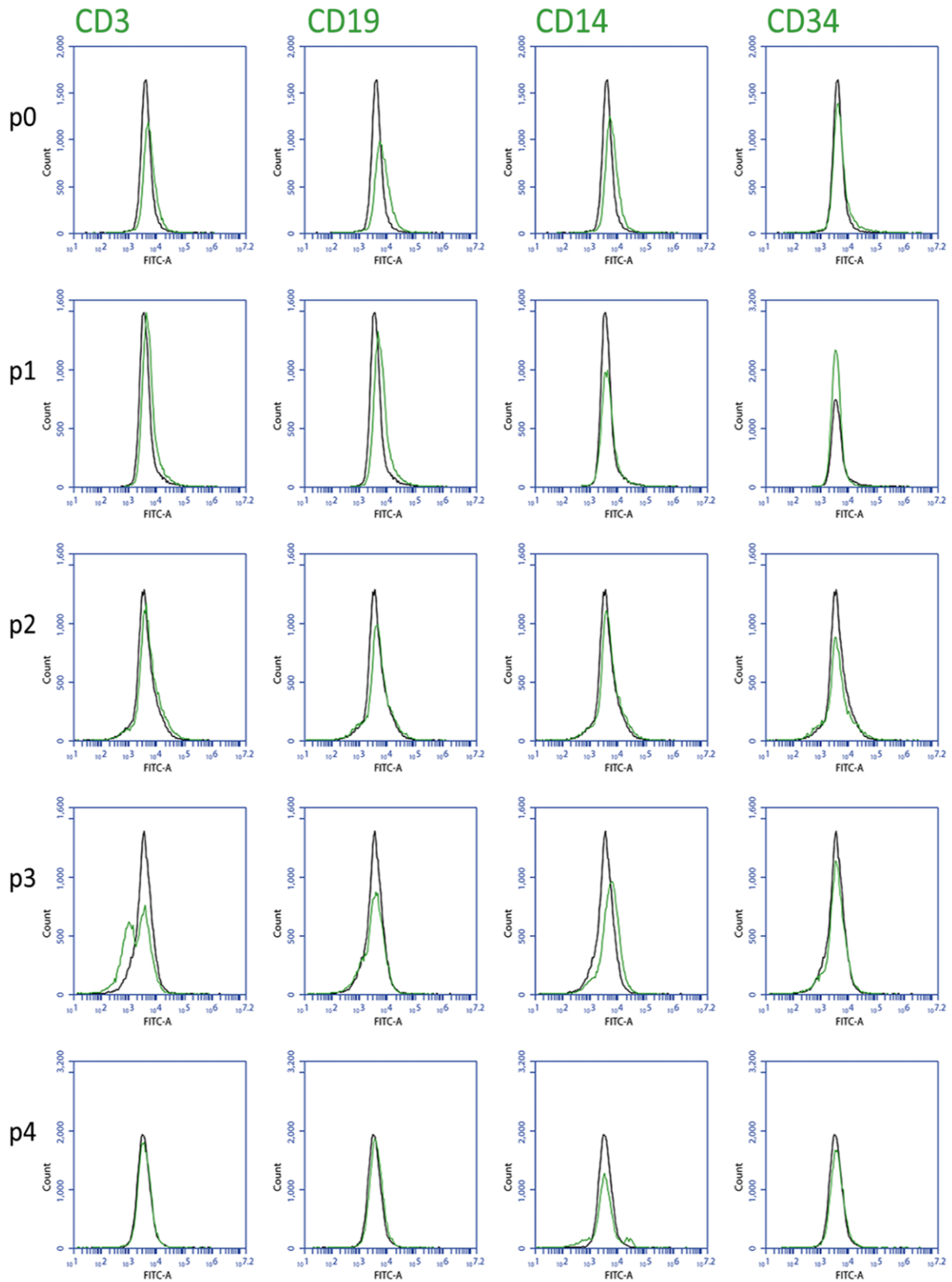
**Tabelle 2: Oberflächenantikörper Expression [%] von Passage 0 bis 4.**

<b>Antikörper</b>	<b>p0</b>	<b>p1</b>	<b>p2</b>	<b>p3</b>	<b>p4</b>
<b>CD11b</b>	0,3	0,5	0,0	0,2	0,0
<b>CD105</b>	99,2	99,5	94,8	92,3	90,0
<b>CD146</b>	52,2	52,7	47,8	48,2	45,6
<b>CD144</b>	27,7	2,6	4,6	16,9	20,7

Die Expression von CD105 liegt in p0 bei 99,2% und in p1 bei 99,5%. In p2 verringert sich die Expression auf 94,8%, fällt in p3 auf 92,3% und in p4 weiter auf 90% ab. Die Expression von CD146 liegt in p0 und p1 bei ca. 52%, in p2 und p3 bei ca. 48% und in p4 bei 45,6%. Weiterhin lässt sich bei CD146 kein klarer Peak erkennen. CD144 wird in p0 mit 27,7% am höchsten exprimiert, fällt in p2 auf 4,6% ab und steigt in p3 zunächst auf 16,9% an und schließlich in p4 weiter auf 20,7% an. CD11b wird nicht exprimiert.



## 4 Ergebnisse und Diskussion



**Abb. 19: Detektion der Oberflächenantikörper CD3, CD19, CD14 und CD34.**

IgG-APC Isotyp (schwarz), FITC (grün) gekoppelte Antikörper. Die Zellzahl ist in Abhängigkeit zur Fluoreszenzintensität aufgetragen.

**Tabelle 3: Oberflächenantikörper Expression [%] von Passage 0 bis 4.**

Antikörper	p0	p1	p2	p3	p4
CD3	1,8	2	0,6	0,4	0,1
CD19	3,6	2,8	0,3	0,4	0,2
CD14	2,2	2,4	0,5	1,1	1,1
CD34	4,1	1,6	0,6	0,7	0,2

In den Passagen 0 und 1 wird CD3 (1,8%/2%), CD19 (3,6%/2,8%), CD14 (2,2%/2,4%) und CD34 (4,1%/1,6%) exprimiert. In allen anderen Passagen zeigt sich fast keine Expression.

Im Skelettmuskelgewebe wurden bereits unterschiedliche Populationen an Vorläuferzellen nachgewiesen. Jede dieser Vorläuferzellen exprimiert eine bestimmte Kombination von Zelloberflächenantigenen. Darunter befinden sich neben mesenchymalen Stammzellen (MSC) auch myogene Endothelzellen (MEC: CD34<sup>+</sup>/56<sup>+</sup>/144<sup>+</sup>/45<sup>-</sup>) und Perizyten (PC: CD 146<sup>+</sup>/34<sup>-</sup>/45<sup>-</sup>/56<sup>+</sup>)<sup>152</sup>.

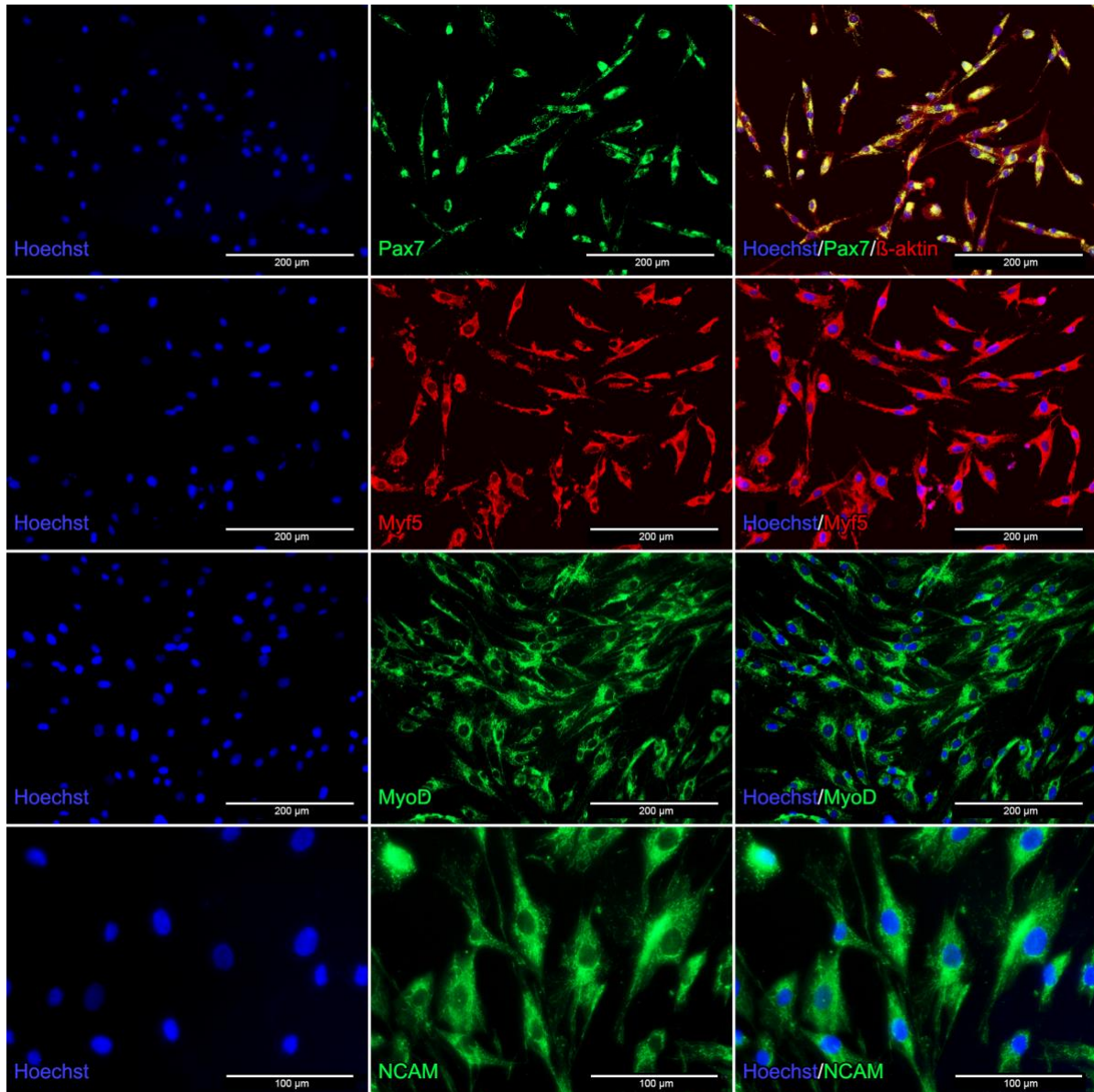
Die isolierten Zellen exprimieren den mesenchymalen Stammzellmarker CD105 (99,5%), den Endothelzell-, follikulären dendritischen Zellmarker CD146 (52,7%) und den Stammzell-, und Endothelzellmarker CD144 (27,2%), siehe Abb. 18. Für andere Zellarten wie Makrophagen sind diese Zellen negativ.

Die Expression von CD146 könnte darauf hinweisen, dass ein Teil der Zellpopulation myogene Vorläuferzellen enthält. Weiterhin wird CD146 auch von proliferierenden Myoblasten exprimiert<sup>153</sup>. Perizyten sind, wie die isolierten Zellen CD146<sup>+</sup>/CD34<sup>-</sup><sup>154</sup> (Abb. 19), daher verfügen die isolierten Myoblasten über einen perizytischen Charakter. Da die Analyse keinen eindeutigen Peak der CD146 Expression zeigte, könnte eine Population von perizytenähnlichen Zellen in der Myoblasten Population enthalten sein. Der hohe Anteil von CD105 positiven Zellen (Abb. 18) und die negative Expression von CD45 (Abb. 17), CD34, CD14 (Abb. 19) oder CD11b (Abb. 18) weist eindeutig auf einen mesenchymalen Stammzellcharakter hin<sup>149</sup>. Die CD144<sup>+</sup> (27,7%) und CD31<sup>+</sup> (46,3%) Zellen könnten auf einen geringen Anteil von myogenen Endothelzellen hinweisen<sup>154</sup>.

Die durchflusszytometrische Analyse weist eher auf eine Stamm- sowie eine Endothelzellpopulation als auf eine Myoblastenpopulation hin. Daher wurde in einem nächsten Schritt die Expression von Myoblasten und Myotuben spezifischen Proteinen analysiert.

### 4.1.3 Charakterisierung der Proteinexpression

Die isolierten Zellen wurden zum qualitativen Nachweis ihres Phänotyps und zur weiteren Charakterisierung mit myogenen Antikörpern gefärbt. Die Immunfluoreszenz wurde sowohl im proliferierenden (Abb. 20) als auch im ausdifferenzierten Myotubenstadium und zur Visualisierung von Intermediärfilamenten (Abb. 21) angewendet. Zum Vergleich wurde die murine C2C12 Myoblasten Zelllinie (Abb. 22) herangezogen.

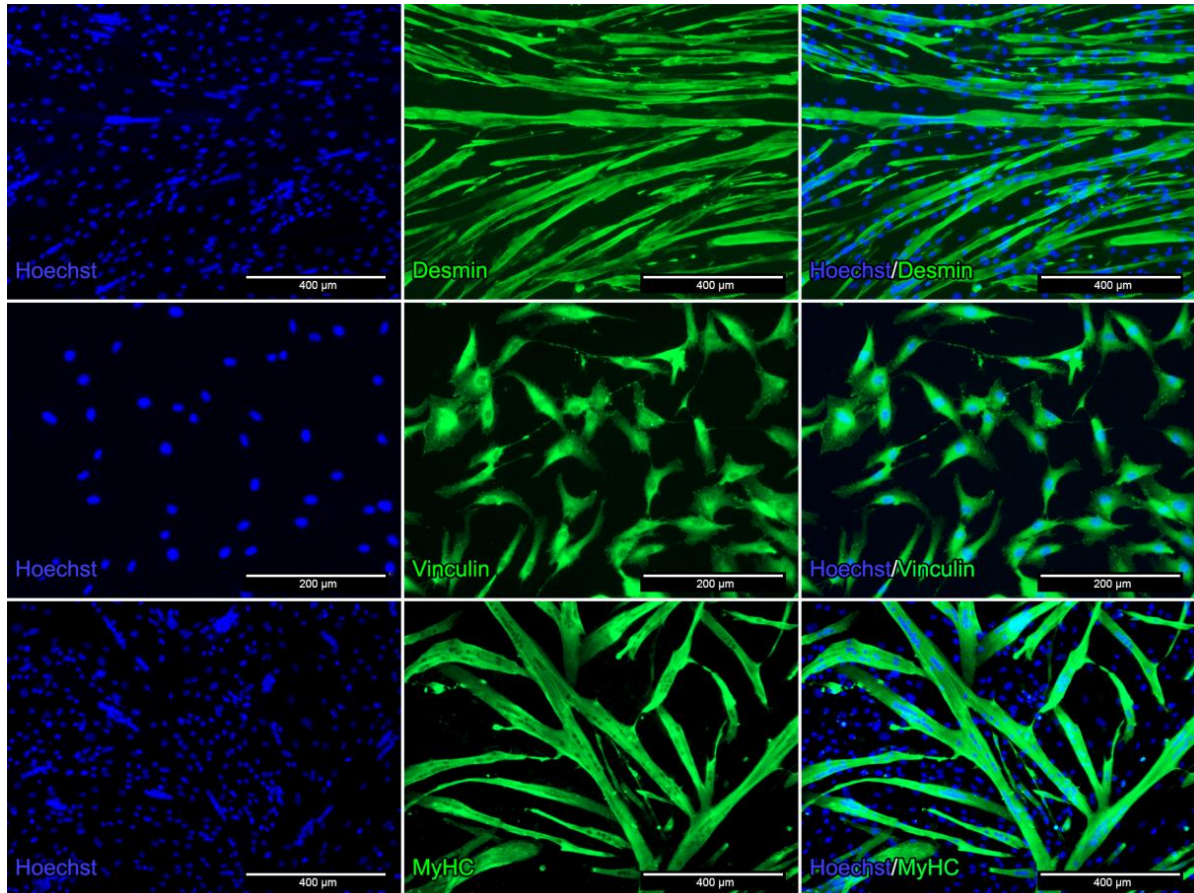


**Abb. 20: Immunfluoreszenz primärer Myoblasten.**

Die Zellen wurden mit Pax7 (grün) und  $\beta$ -Aktin (rot), Myf5 (rot), MyoD (grün) und NCAM (grün) gefärbt. Die Nukleusfärbung erfolgte mit Hoechst (blau).

Die Zellen sind für den Satellitenzellmarker Pax7 sowie für die Myoblastenmarker Myf5, MyoD und NCAM positiv (Abb. 20). Der Anteil an Pax7<sup>+</sup> Zellen war allerdings im Vergleich zu den anderen Markern deutlich reduziert.

## 4 Ergebnisse und Diskussion



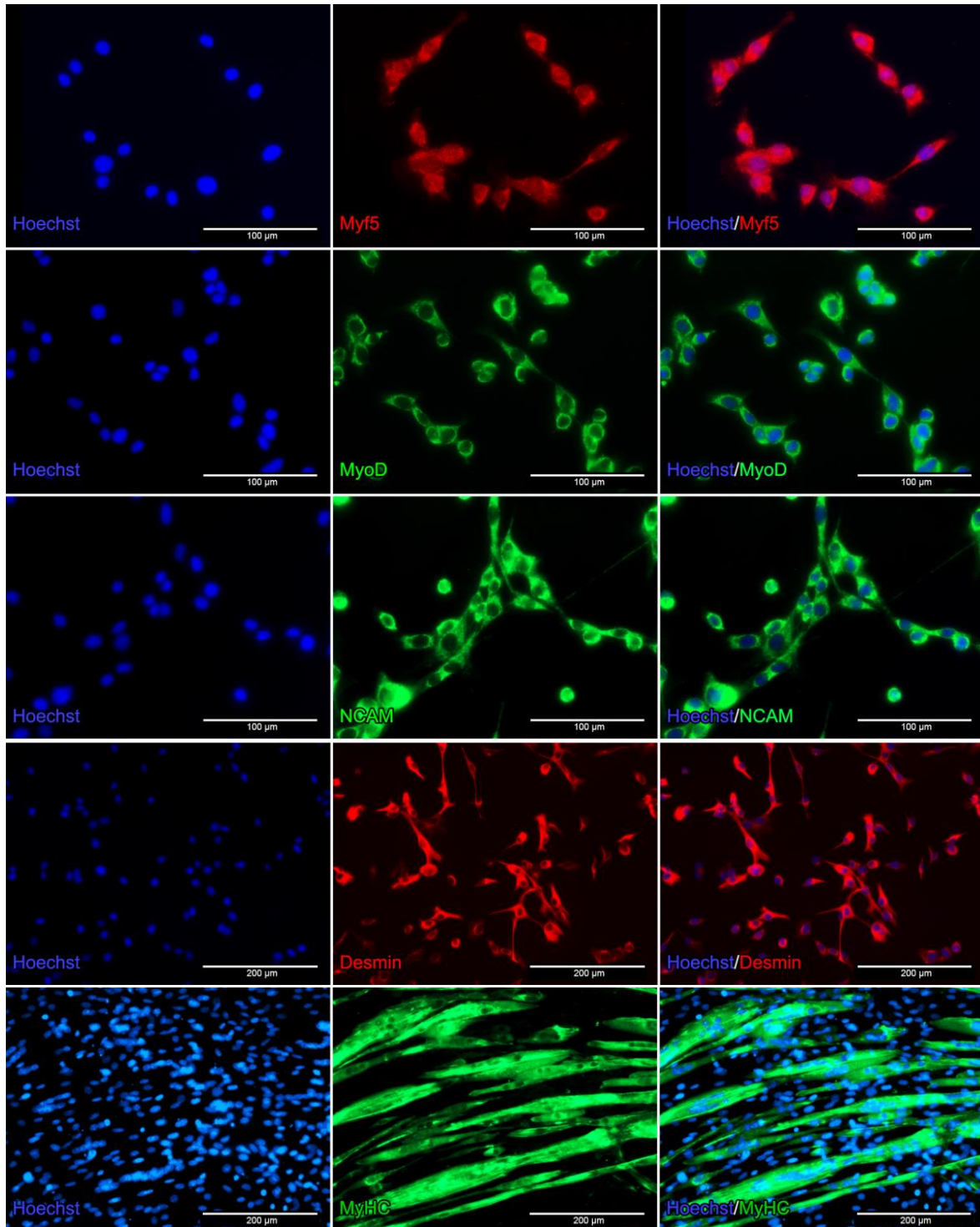
### **Abb. 21: Immunfluoreszenz primärer Myotuben.**

Nach der Differenzierung wurden die Zellen mit Myosin gefärbt. Vinculin und Desmin wurden zum Nachweis von Intermediärfilamenten detektiert. Die Nukleusfärbung erfolgte mit Hoechst (blau).

Die ausdifferenzierten Myoblasten sind Myosin<sup>+</sup> und zeigen die typische Myotuben Form. Weiterhin exprimieren sie Desmin. Die Vinculin Färbung wurde zur Visualisierung des Zytoskeletts verwendet (Abb. 21).

Weitere Färbungen für CD31, Fibroblast Surface Protein (FSP) und  $\alpha$ -SMA waren negativ.

## 4 Ergebnisse und Diskussion



**Abb. 22: Immunfluoreszenz der murinen Zelllinie C2C12.**

Die Zellen wurden mit Myf5 (rot), NCAM (grün), Desmin (rot) und Myosin (grün) gefärbt. Die Myosinfärbung zeigt die ausdifferenzierten Myotuben. Die Nukleusfärbung erfolgte mit Hoechst (blau).

Die murinen C2C12 Myoblasten sind für Myf5, MyoD und NCAM positiv. Die Myotuben exprimieren Myosin und Desmin (Abb. 22). CD31, FSP und  $\alpha$ -SMA werden von dieser Zelllinie nicht exprimiert.

## 4 Ergebnisse und Diskussion

Die hohe Expression der muskelspezifischen Proteine Myf5, MyoD und NCAM (Abb. 20) bestätigt ebenfalls die Anwesenheit von primären Myoblasten<sup>155</sup>.

Es konnte eine geringe Population von Pax7<sup>+</sup> Zellen in der Myoblastenpopulation identifiziert werden<sup>156</sup> (Abb. 20). Die Aktivierung dieser Zellen könnte durch die enzymatische Dissoziation des Gewebes und die Kultivierung in myogenem Medium erreicht worden sein<sup>157</sup>. Der geringe Anteil von Pax7<sup>+</sup> Zellen ist erklärbar, denn die Isolierungsmethode ist myoblasten- und nicht satellitenzellspezifisch.

Das Intermediärfilament Desmin wird von proliferierenden Myoblasten exprimiert<sup>158,159</sup> (Abb. 21) und ist in Myozyten der Skelettmuskeln zu finden. Seine Expression weist auf die myogene Differenzierung hin<sup>160</sup>. NCAM wird vorwiegend von proliferierenden Myoblasten exprimiert<sup>161,162</sup>, von der Muskulatur selbst allerdings nicht<sup>163</sup>. Die Myoblasten Differenzierung wurde durch eine Reduktion an Serum und Wachstumsfaktoren im Medium induziert<sup>157</sup>. Die Myosin Expression weist ebenfalls auf Myotuben hin<sup>164</sup> (Abb. 21).

Die Myoblastenzelllinie C2C12 weist die gleiche Expression der Myoblasten Marker Myf5, MyoD, NCAM und Desmin auf. Die ausdifferenzierten Myotuben exprimieren Myosin und Desmin (Abb. 22). Wie erwartet wurden keine Pax7<sup>+</sup> Zellen detektiert, da diese Zelllinie dieses Protein nicht exprimiert.

### 4.1.4 Zusammenfassung

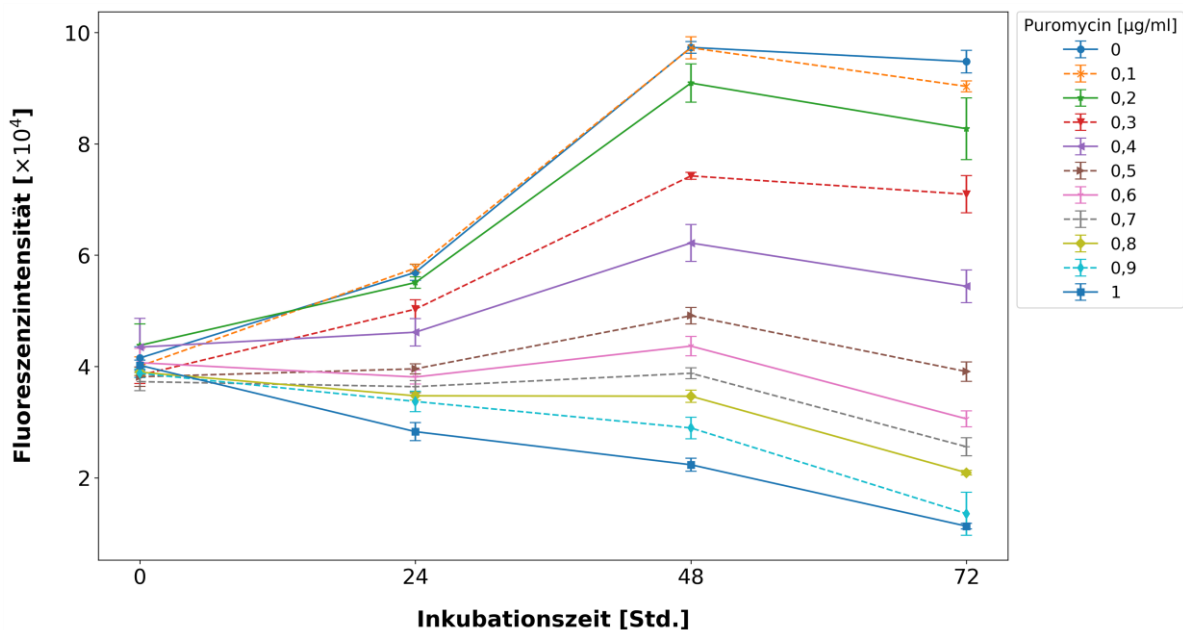
Die humanen Myoblasten, isoliert aus Skelettmuskelgewebe, exprimieren die myogenen proliferations- und differenzierungstypischen Gene und Proteine. Die Expression verschiedener Oberflächenantigene, wie z.B. CD105, zeigt dass die humanen Myoblasten über einen mesenchymalen Stamm- und Vorläuferzellencharakter verfügen. Schlussendlich ist also eindeutig nachgewiesen, dass es sich bei den isolierten Zellen tatsächlich um humane Myoblasten handelt und diese Zellen für weitere experimentelle Versuche zur Muskelatrophie eingesetzt werden können.

## 4.2 MicroRNA - Vektortransfer

Alle nachfolgenden Analysen dieses Kapitels wurden für den Vektortransfer der microRNA durchgeführt (siehe 3.2)

### 4.2.1 Bestimmung der Selektionskonzentration

Die Zellviabilität wurde mit verschiedenen Puromycin Konzentrationen mit dem AlamarBlue® Reagent bestimmt. Das Antibiotikum wurde zur Vektorselektion, zur Kultivierung einer stabilen Zelllinie, eingesetzt. Die Viabilität der Zellen wurde vor Beginn (also bei 0 Std.) der Zugabe von Puromycin, nach 24, 48 und 72 Std. photometrisch bestimmt. Zur Kontrolle wurden die Zellen ohne Selektionsantibiotikum inkubiert.



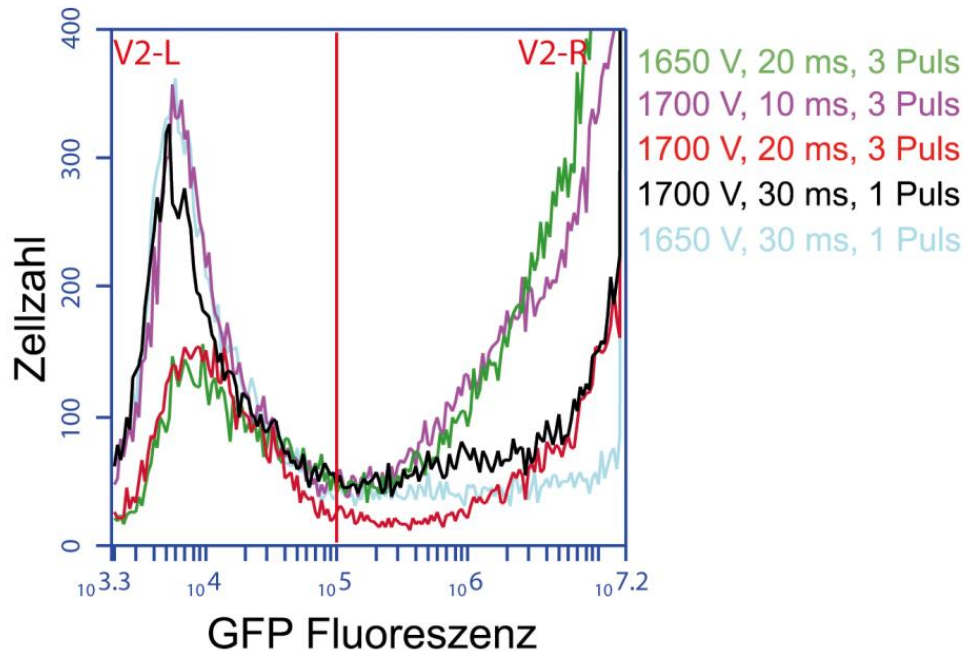
**Abb. 23: Zellviabilität der Myoblasten mit dem Selektionsantibiotikum Puromycin.**

Die Resultate des AlamarBlue® Assays sind in einem Liniendiagramm unter Angabe der Standardabweichung, in Form von Fehlerbalken, dargestellt. Die Fluoreszenzintensität wurde gegen die Inkubationszeit aufgetragen (n = 6).

Die Zellviabilität nahm mit einer Konzentration von 0,5 µg/ml (braune Linie) ab einer Inkubationszeit drastisch ab (Abb. 23). Diese Konzentration wurde zur Zellselektion ausgewählt. Die Zellen wurden nach der Transduktion zusätzlich mit Puromycin über einen Zeitraum von max. 72 Std. inkubiert. Danach wurden die Zellen wieder mit normalem Medium versorgt.

## 4.2.2 Transfektionseffizienz nach Elektroporation und Transfektion

Nach der Elektroporation sowie der Transfektion von Myoblasten mit dem lentiviralen eGFP-miR-23a Vektor erfolgte die durchflusszytometrische Bestimmung der Effizienz. In Abb. 24 ist die Effizienz für verschiedene Parameterwerte grafisch dargestellt.



**Abb. 24: Transfektionseffizienz der Elektroporation nach 48 Std.**

Die Zellzahl ist in Abhängigkeit der Fluoreszenz aufgetragen. Als Negativkontrolle wurden untransfizierte Zellen verwendet. V2-L: GFP negativ, V2-R: GFP-positiv.

Die Elektroporation wurde unter variierenden Parametern, zur Ermittlung der optimalen Bedingungen, durchgeführt. Für die Effizienz wurden die elektroporierten Zellen im Vergleich zu nicht-transfizierten Zellen gemessen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 aufgelistet.

**Tabelle 4: Transfektionseffizienz.**

Parameter	Effizienz [%]
1650 V, 20 ms, 3 Puls	81,1
1700 V, 10 ms, 3 Puls	64,0
1700 V, 20 ms, 3 Puls	54,6
1700 V, 30 ms, 1 Puls	48,4
1650 V, 30 ms, 1 Puls	30,0

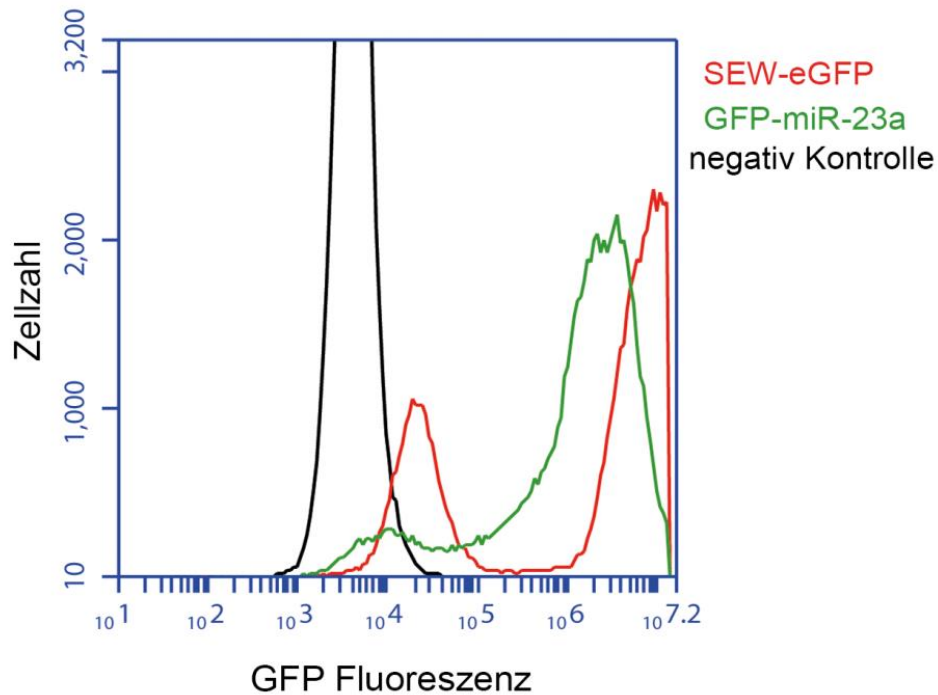
Die beste Transfektionseffizienz, gemessen 48 Std. nach der Transfektion, wurde mit der Einstellung 1650 V, 20 ms und 3 Puls (81,1%) bei den Myoblasten erreicht. Die Effizienz der anderen Werte (Tabelle 4) war deutlich geringer.

Sowohl die Transfektion mit dem jetPRIME® Reagent (~20%, Daten nicht gezeigt), als auch die Elektroporation der Zellen (Abb. 24) lieferte eine maximale Effizienz von 81,1%. Auch eine weitere Selektion der Zellen mit dem Selektionsantibiotikum führte ebenfalls zu keiner Verbesserung. Das Resultat wurde als ineffizient eingestuft. Deshalb wurde die virale Transduktion als weitere Möglichkeit in Betracht gezogen. Durch sie konnte eine stabile Integration des Vektors in den Zellen erreicht werden.



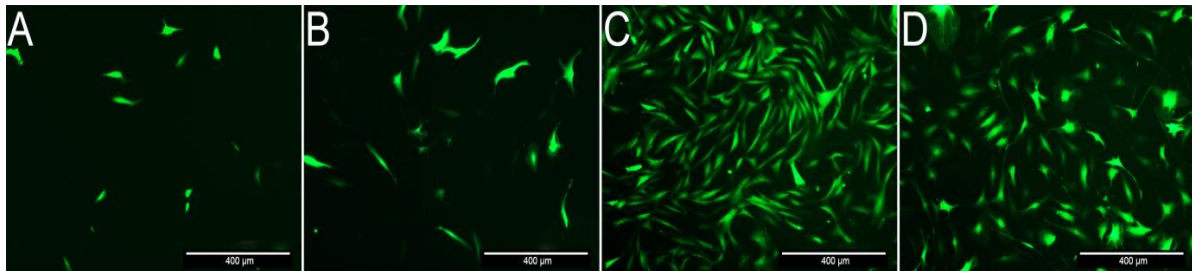
### 4.2.3 Transduktionseffizienz nach viraler Transduktion

Die Transduktionsmessung erfolgte 48 Std. nach dem Vektortransfer durchflusszytometrisch (Abb. 25).



**Abb. 25: Transduktionseffizienz der humanen Myoblasten.**

Die Zellzahl ist in Abhängigkeit von der Fluoreszenz aufgetragen. Als Negativkontrolle wurden untransduzierte Zellen (schwarz) verwendet. SEW-eGFP: 72,2% (rot), GFP-miR-23a: 90,0% (grün).



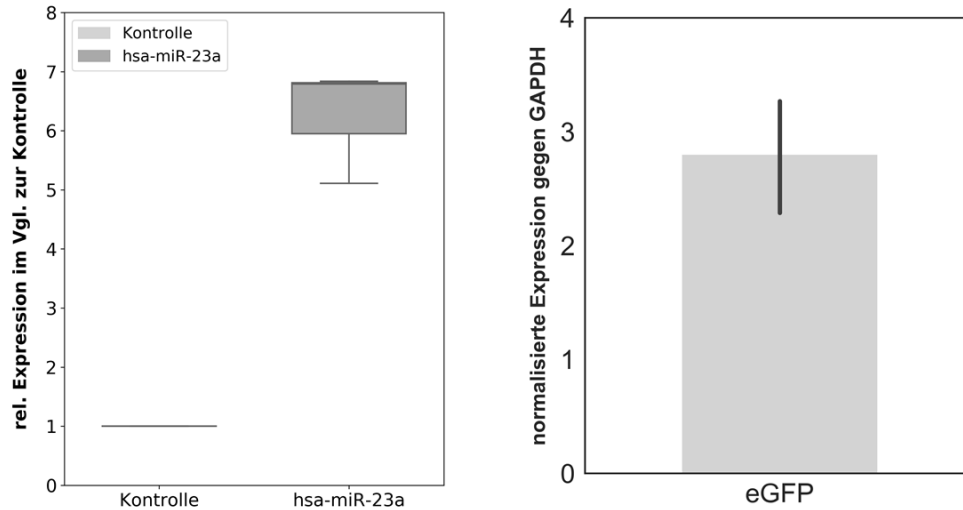
**Abb. 26: Fluoreszenzmikroskopie der verschiedenen Transfermethoden des lentiviralen GFP-miR-23a Vektors bei Myoblasten.**

A: Transfektion des GFP-miR-23a Vektors, B: Elektroporation des GFP-miR-23a Vektors, C: Transduktion des SEW-eGFP Vektors, D: Transduktion des GFP-miR-23a Vektors.

Sowohl die fluoreszenzmikroskopische Beurteilung (Abb. 26) als auch die quantitative Bestimmung der Transfektions- und Transduktionseffizienz (Abb. 24 und Abb. 25), zeigen im direkten Vergleich, dass die lentivirale Transduktion mit einer Transduktionseffizienz von über 90%, die vorteilhafteste Vektor-Transfermethode für die humanen Myoblasten ist.

#### 4.2.4 qPCR des eGFP-hsa-miR-23a Vektors in Myoblasten

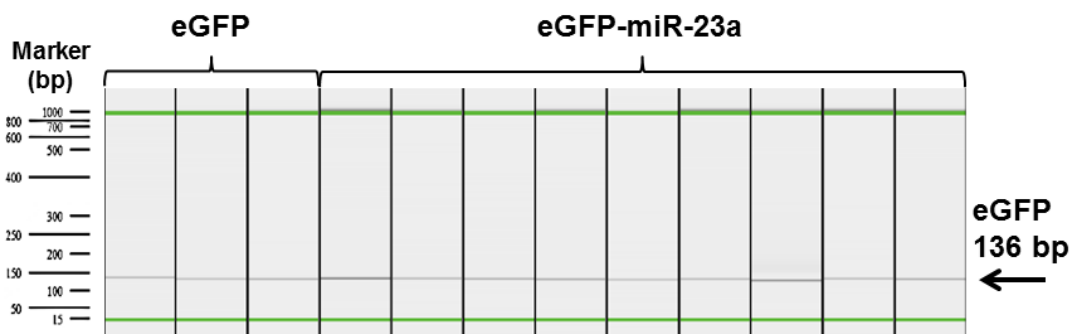
Die Verifizierung der Überexpression der miR-23a in Myoblasten erfolgte mit spezifischen Primern. Die Auswertung der relativen Expression erfolgte gemäß der  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode nach Livak<sup>145</sup> und zeigt eine deutlich erhöhte Expression (6-fach) in transduzierten Zellen. Die eGFP Expression wurde in Abb. 27 lediglich auf die von GAPDH normalisiert. Zur Normalisierung der miR-23a wurde RNU6 verwendet und die Expression der transduzierten Zellen mit untransduzierten verglichen.



**Abb. 27: Quantitative Genexpression des eGFP-hsa-miR-23a Vektors.**

Überexpression hsa-miR-23a im Vergleich zu untransduzierten Myoblasten (Mediane und Quartile, (links). Normalisierte eGFP-Expression in den Myoblasten (Liniendiagramm unter Angabe der Standardabweichung, in Form von Fehlerbalken, rechts). (n = 3).

Darüber hinaus wurde die Amplikongröße des eGFPs (Abb. 28) überprüft.



**Abb. 28: DNA-Screening zur Detektion der Vektorexpression in humanen Myoblasten.**

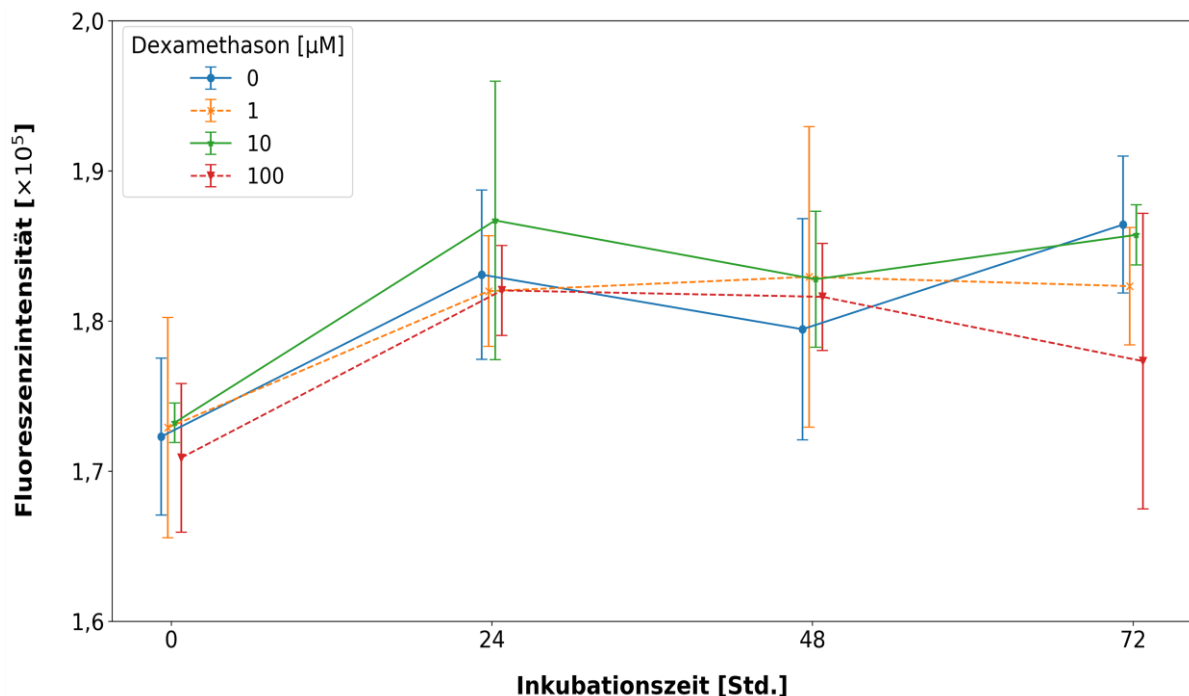
Die detektierte Amplikongröße von eGFP bei ca. 136 bp (Abb. 28) zeigt eindeutig, dass der lentivirale Vektor von den Myoblasten exprimiert wurde. Zur Kontrolle wurde ein SEW-eGFP Vektor (Linie 1-3, links) eingesetzt. In den Linien 4-9 wurden alle verwendeten eGFP-miR-23a transduzierten Zellen im Triplikat aufgetragen. Ihre Amplikongröße stimmt mit der Kontrollgruppe überein.

### 4.2.4.1 Zusammenfassung

Durch die lentivirale Transduktion konnte die beste Effizienz des Transfers erreicht werden. Auch der quantitative Nachweis der Genexpression der miR-23a und die Verifizierung der Amplikongröße des eGFPs zeigen eindeutig die Überexpression des Vektors und damit der miR-23a in den Myoblasten.

### 4.2.5 Myoblastenviabilität nach der Inkubation mit Dexamethason

Zur Analyse der Auswirkung von Dexamethason auf humane Myoblasten wurde zuerst die Viabilität unter Verwendung des AlamarBlue® Reagent untersucht. Hier wurden die Zellen nach der Differenzierung mit Dexamethason in den Konzentrationen 1, 10 und 100  $\mu\text{M}$  jeweils über einen Zeitraum von 48 und 72 Std. inkubiert (Abb. 29). Weiterhin wurden die Zellen für einen Zeitraum von 8 Tagen differenziert und mit den genannten Konzentrationen inkubiert (Abb. 30). Dexamethason wird in dieser Studie zur Induktion atrophischer Bedingungen eingesetzt.



**Abb. 29: AlamarBlue® Assay der Myoblasten nach der Inkubation mit Dexamethason.**

Die Ergebnisse der Myotubenviabilität sind in einem Liniendiagramm unter Angabe der Standardabweichung, in Form von Fehlerbalken, dargestellt. Die Fluoreszenzintensität wurde gegen die Inkubationszeit aufgetragen ( $n = 6$ ).

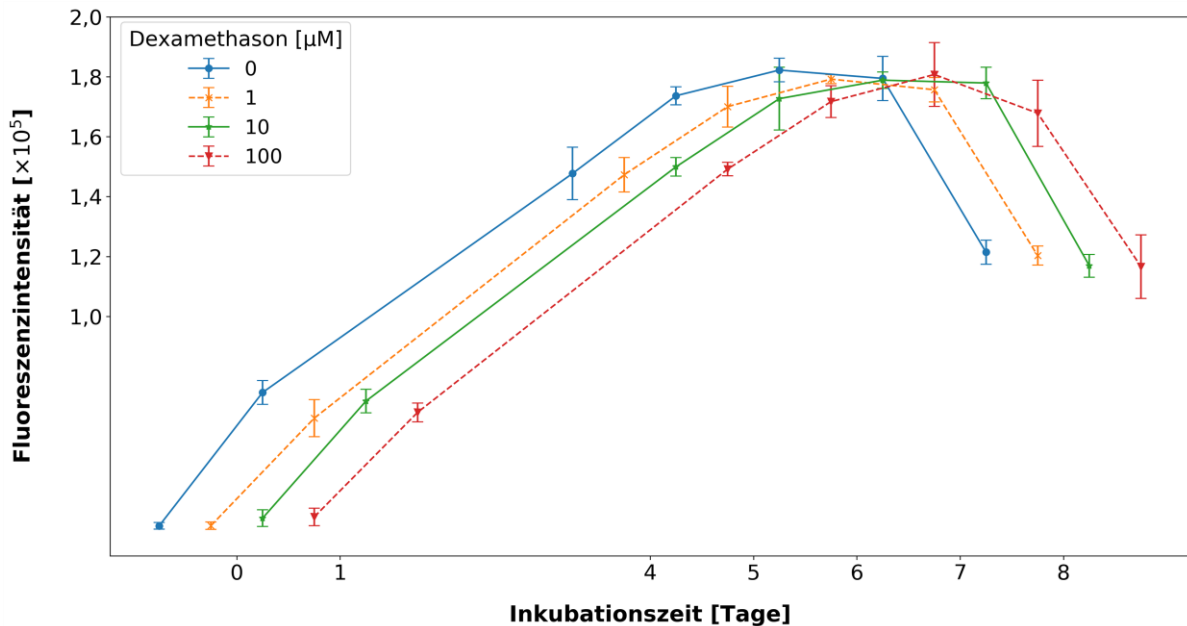
Die Myoblasten wurden zunächst 5 Tage mit Differenzierungsmedium kultiviert. Darauf folgte die Inkubation mit 1 (orange), 10 (grün) und 100  $\mu\text{M}$  (rot) Dexamethason für 48 und 72 Std. in Differenzierungsmedium (Abb. 29).

Die Messung erfolgte nach 0, 24, 48 und 72 Std. Die Kontrollzellen (blau) wurden ohne Dexamethason inkubiert.

Dexamethason hatte in den verwendeten Konzentrationen, keinen Einfluss auf die Zellviabilität im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Abb. 29).

## 4 Ergebnisse und Diskussion

Da die Dexamethason Wirkung auch während der Differenzierung beurteilt werden sollte, wurden die Zellen über einen Zeitraum von 8 Tagen, ab Beginn der Differenzierung, mit Dexamethason inkubiert (Abb. 30).



**Abb. 30: AlamarBlue® Assay differenzierender Myoblasten während der Inkubation mit Dexamethason.**

Die Ergebnisse der Myotubenviabilität sind in einem Liniendiagramm unter Angabe der Standardabweichung, in Form von Fehlerbalken, dargestellt. Die Fluoreszenzintensität wurde gegen die Inkubationszeit aufgetragen ( $n = 6$ ).

Die Myoblasten wurden 8 Tage inklusive 1 (orange), 10 (grün) und 100 (rot)  $\mu\text{M}$  Dexamethason differenziert. Die Kontrollzellen (blau) wurden ohne Dexamethason differenziert (Abb. 30).

Die durchgängige Inkubation zeigte bis zu Tag 7 keine Auswirkung auf die Zellviabilität. Lediglich danach zeigte sich ein Einfluss auf die Viabilität. Da diese Beeinträchtigung jedoch auch in der Kontrolle zu beobachten war, scheint Dexamethason nicht dafür verantwortlich zu sein, sondern eher die gehemmte Proliferation durch den Differenzierungsprozess.

### 4.2.5.1 Zusammenfassung

Durch Inkubation der Myotuben mit Dexamethason konnte keine negative Auswirkung auf die Zellviabilität durch das Glukokortikoid festgestellt werden. Dexamethason konnte von nun an ohne Bedenken für die weitere experimentelle Analyse verwendet werden.

### **4.3 Genexpressionsanalyse der dexamethasoninduzierten Atrophie in vitro**

Der Einfluss des Glukokortikoids Dexamethason auf humane Myoblasten und Myotuben wurde mittels qPCR bestimmt. Nachdem die humanen Zellen mit Dexamethason inkubiert wurden, erfolgte nach der RNA-Isolierung und anschließender cDNA-Synthese, die Quantifizierung von MAFbx, MuRF-1, Foxo, mTOR, Myf5, MyoD, MyoG und Myosin via qPCR. Zur Evaluierung wurde die Expression mit unbehandelten Zellen verglichen (rel. Expression von unbehandelten Zellen = 1) und nach der  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode ausgewertet.

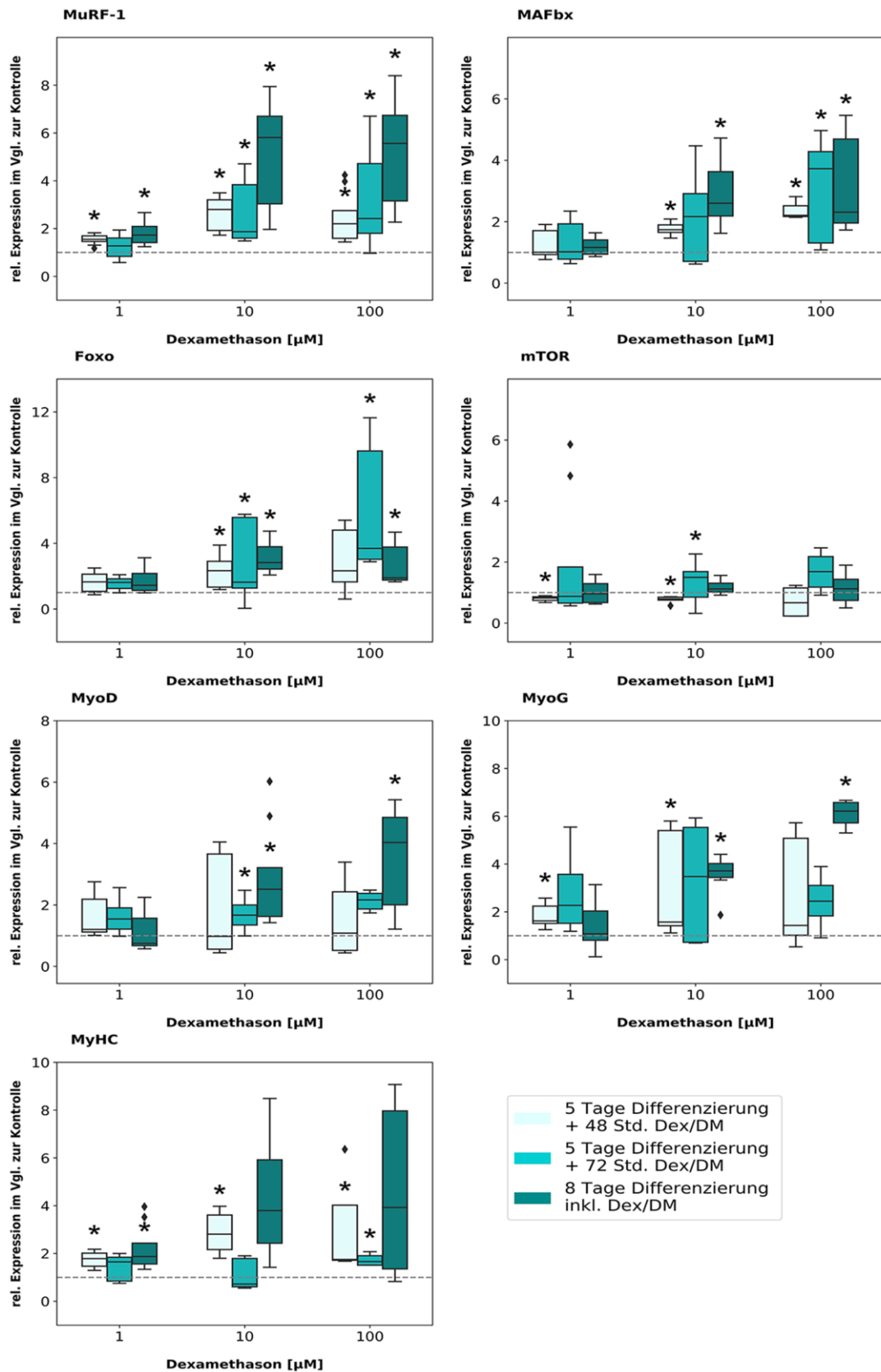
#### **4.3.1 Dexamethason induziert die Expression der E3-Ligasen MuRF-1 und MAFbx**

Bei der Muskelatrophie wird der Transkriptionsfaktor mTOR vermindert exprimiert und im Gegenzug Foxo vermehrt. Durch seine Aktivierung werden die E3-Ubiquitin-Ligasen MAFbx und MuRF-1 hochreguliert.

Dieser Abschnitt ist der Analyse der mRNA Expression der genannten Gene, nach der Atrophieinduktion bei humanen Myoblasten mit dem synthetischen Glukokortikoid Dexamethason, gewidmet. Hierzu wurden die Myoblasten nach der Differenzierung (über 5 Tage) für 48 und 72 Std. sowie für 8 Tage mit Dexamethason inkubiert (jeweils 1, 10, 100  $\mu$ M), siehe Abb. 31. Neben der Genexpression unter dem Einfluss von Dexamethason in Myotuben, wurde ebenfalls die Genexpression von Differenzierungsmarkern untersucht.

Die verwendeten Inkubationszeiten (mit Ausnahme von 48 Std.) wurden bislang in keiner Studie publiziert.

## 4 Ergebnisse und Diskussion



**Abb. 31: Relative Expression von MuRF-1, MAFbx, Foxo, mTOR, MyoD, MyoG und MyHC in Myotuben.**

Die Genexpression der behandelten Gruppen wurde mit der unbehandelten Kontrolle verglichen. Die Ergebnisse sind als Mediane und Quartile dargestellt (n = 4-9). Post-Hoc- und Mann-Whitney-U Test (\*p<0,05).

## 4 Ergebnisse und Diskussion

Der Atrophiemarker MuRF-1 wird durch jede verwendete Konzentration (außer 1  $\mu\text{M}$  nach 72 Std.), ob niedrig oder hoch, signifikant erhöht exprimiert. Sowohl nach der kürzesten Inkubationszeit von 48 Std., über 72 Std. bis hin zu 8 Tagen wird er signifikant erhöht exprimiert, im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle von humanen Myotuben. Das zeigt, dass selbst geringe Konzentrationen und Inkubationszeiten zur vermehrten mRNA Expression von MuRF-1 durch das Glukokortikoid Dexamethason führen. Die zweite Ubiquitin-Ligase MAFbx zeigt erst ab einer mittleren Konzentration (10  $\mu\text{M}$ ) nach allen Inkubationszeiten eine signifikant erhöhte Expression (außer 10  $\mu\text{M}$  nach 72 Std.). Ihre Expression ist nach 72 Std. lediglich bei 100  $\mu\text{M}$  erhöht exprimiert. Dexamethason hat einen geringeren Einfluss auf MAFbx als auf MuRF-1.

Der Transkriptionsfaktor Foxo wird erst ab einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  Dexamethason nach allen Inkubationszeiten signifikant erhöht exprimiert. Jedoch ist seine Expression nach 48 Std. und einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  statistisch nicht signifikant, die Expression bleibt unverändert im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

Die mTOR Expression weist keine statistische Signifikanz im Vergleich zu unbehandelten Myotuben nach einer Behandlung mit 100  $\mu\text{M}$  Dexamethason auf, sowohl nach kurzer als auch nach langer Inkubationszeit. Jedoch zeigte sich nach 48 Std. (1 und 10  $\mu\text{M}$ ) eine signifikante Reprimierung der mTOR Expression im Vergleich zur Kontrolle. Die 8-tägige Behandlung hat keinen Effekt auf die Expression von mTOR. nach 48 Std. bei 1 und 10  $\mu\text{M}$  Dexamethason. Eine signifikante Hochregulierung von mTOR konnte einzig nach 72 Std. bei 10  $\mu\text{M}$  Dexamethason festgestellt werden. Durch Dexamethason wird die Expression von Foxo aktiviert, die Expression von mTOR teilweise gehemmt oder nicht beeinflusst.

Dexamethason hat nach 48 Std. weder bei niedrigen noch bei hohen Konzentrationen statistisch signifikante Auswirkung auf die MyoD Expression in humanen Myotuben.

Nach 72 Std. (10  $\mu\text{M}$ ) wird MyoD signifikant erhöht exprimiert und nach der Behandlung mit 100  $\mu\text{M}$  wird er, relativ zur unbehandelten Kontrolle, zwar mehr jedoch nicht statistisch signifikant erhöht exprimiert. Mittlere und hohe Konzentrationen wirken sich während der Differenzierung (8 Tage) signifikant erhöhend auf die MyoD Expression aus.

MyoG wird zwar bei allen Konzentrationen nach 72 Std. erhöht exprimiert, allerdings nicht signifikant in Bezug zur Kontrolle. Eine signifikante MyoG Expression lässt sich nach einer kurzen Inkubationszeit und nach der Behandlung mit 1 und 10  $\mu\text{M}$  belegen.

Im Gegensatz dazu wird sie bei längerer Inkubationszeit (8 Tage) erst ab einer mittleren Konzentration signifikant erhöht exprimiert.

Eine kurze Inkubationszeit von 48 Std. führt sowohl bei geringen, mittleren als auch hohen Konzentrationen von Dexamethason zu einer signifikant erhöhten Myosin Expression.

Nach 72 Std. wird Myosin nur mit der höchsten Konzentration signifikant erhöht exprimiert, während mittlere und geringe Konzentrationen keinerlei Veränderungen der Expression zeigen. Durch lange Inkubationszeiten und eine geringe Konzentration (1  $\mu\text{M}$ ) wird Myosin signifikant erhöht exprimiert, während steigende Konzentrationen keine statistische Signifikanz relativ zu unbehandelten Myotuben aufweisen.

Dexamethason hat vereinzelt einen verstärkenden Effekt auf die Expression der myogenen Differenzierungsmarker MyoD, MyoG und Myosin (Abb. 31).

Glukokortikoide, wie Dexamethason, können zur Reprimierung des PI3K/Akt/mTOR Signalwegs führen, muskelspezifische Ubiquitin-Ligasen aktivieren und die Proteolyse der Muskelfaserproteine induzieren<sup>44,165,166</sup>.

Die Expression des Transkriptionsfaktors mTOR wurde, in humanen Myotuben signifikant verringert, sowohl durch geringe Konzentrationen Dexamethason (1 und 10  $\mu\text{M}$ ) als auch nach

## 4 Ergebnisse und Diskussion

kurzen Inkubationszeiten (Abb. 31). Auch die Expression von Akt wurde durch Dexamethason reprimiert (Daten nicht gezeigt). Diese Verringerung von Akt und mTOR, könnte zur Aktivierung Foxos und seiner signifikant erhöhten Expression geführt haben.

Zu vergleichbaren Ergebnissen kam man auch bei murinen Myotuben durch Glukokortikoide<sup>167</sup>, daher könnte das Glukokortikoid Dexamethason eine ähnliche Wirkung auf humane Myotuben haben wie auf murine, bezogen auf diese Transkriptionsfaktoren. Laut Literatur kann mTOR durch Glukokortikoide reprimiert und Foxo erhöht werden, was die Proteolyse einleitet<sup>44</sup>.

Die Expression von Foxo (ab 10  $\mu\text{M}$ ) könnte darauf hinweisen, dass dieser Transkriptionsfaktor erst durch höhere Konzentrationen Dexamethason in humanen Myotuben signifikant erhöht exprimiert wird (Abb. 31), allerdings wird Foxo in murinen Myotuben bereits ab 1  $\mu\text{M}$  Dexamethason signifikant erhöht exprimiert<sup>34</sup>. Daher könnte Dexamethason einen größeren Einfluss auf murine Myotuben als auf humane Myotuben besitzen. Allerdings wird seine Expression sowohl in dieser als auch in vorangegangenen Studien durch Dexamethason induziert. Denn Akt und mTOR könnten nicht mehr phosphoryliert und dadurch ihre Expression verringert werden (Abb. 31), was ebenfalls von Sandri et al. und in anderen Studien festgestellt wurde<sup>34,47</sup>. Daher kann man davon ausgehen, dass Foxo auch in humanen Myotuben durch Dexamethason, verbunden mit der Reprimierung von Akt und mTOR, dephosphoryliert und in den Nukleus transportiert wurde<sup>30</sup> um dort die Expression der E3-Ligasen MuRF-1 und MAFbx zu induzieren<sup>168-172</sup>.

Die signifikante Erhöhung der Genexpression von MuRF-1 durch geringe Konzentrationen Dexamethason und kurze Inkubationszeiten (1  $\mu\text{M}$  und 48 Std.), siehe Abb. 31, belegen eindeutig, dass auch in humanen Myotuben die Induktion der MuRF-1 Expression durch Glukokortikoide ausgelöst werden kann. Dies stimmt mit bereits publizierten Studien (murine Myotuben) überein und kann zur Myotuben Atrophie führen<sup>34</sup>. Jedoch zeigten andere Studien in einem direkten Vergleich von L6 (Ratten) und murinen Myotuben, dass Dexamethason einen stärkeren Effekt sowohl auf die MuRF-1 Expression in L6 Myotuben (ab 50 nM) als auch auf murine Myotuben hat. In dieser Studie wurde keine signifikant erhöhte Expression von MuRF-1 in C2C12 festgestellt<sup>173</sup>. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sowohl Speziesunterschiede als auch Studienunterschiede bezüglich der Auswirkung von Dexamethason auf die MuRF-1 Expression bestehen.

MAFbx wurde in humanen Myotuben erst unter der Verwendung von 10  $\mu\text{M}$  Dexamethason signifikant erhöht exprimiert (Abb. 31), woraus sich schließen lässt, dass der Effekt von Dexamethason auf MAFbx geringer ist als auf MuRF-1. Allerdings zeigen auch diese Ergebnisse eindeutig die Induktion der Ubiquitin-Ligase MAFbx durch Dexamethason in humanen Myotuben und die Einleitung der Atrophie, was in murinen Zellen ebenfalls gezeigt wurde<sup>33,40</sup>. Ebenso die Konzentrationsabhängigkeit (10  $\mu\text{M}$  Dexamethason) lässt sich mit bereits publizierten Studien vergleichen<sup>174</sup>.

In L6 Myotuben zeigte sich allerdings, dass die MAFbx Expression bei 50 nM Dexamethason höher war, als bei 1000 nM<sup>173</sup>. Diese Ergebnisse verdeutlichen ebenfalls die unterschiedliche Auswirkung von Dexamethason auf unterschiedliche Spezies.

Die inkubationszeit- und konzentrationsabhängige Genexpression beider E3-Ligasen bestätigt die Glukokortikoid induzierte Atrophie in humanen Myotuben<sup>52,175</sup>. Beide sind in der Lage die Proteolyse zu aktivieren<sup>44</sup>. Die hier vorliegenden Ergebnisse mit humanen Myotuben belegen, dass diese Aktivierung sowohl in L6, C2C12 als auch, erstmals gezeigt in humanen Myotuben durch Dexamethason induziert werden kann. Hier scheint der gleiche Mechanismus und auch die Verbindung mit der zuvor beschriebenen foxoinduzierten E3-Ubiquitin Aktivierung plausibel.



## 4 Ergebnisse und Diskussion

MyoD und MyoG sind Substrate von MAFbx<sup>36,176,177</sup>. Durch MAFbx werden beide polyubiquitiniert, degradiert und so die Myoblasten Differenzierung zu Myotuben in C2C12 Myotuben inhibiert<sup>178,179</sup>. Dieses Verhalten konnte in humanen Myotuben (Abb. 31) nicht aufgezeigt werden, denn hier wurde die mRNA Expression von beiden nicht signifikant reprimiert, sondern sogar erhöht. Hier scheint Dexamethason einen anderen Effekt auf humane Myotuben als auf murine zu haben. Ein besonderer Unterschied der Studien ist, dass MAFbx erhöht exprimiert wurde, seine Expression jedoch nicht den gleichen Einfluss auf murine und humane Zellen hat. Die Ergebnisse könnten darauf schließen, dass MAFbx, spezieabhängig, keinen Einfluss auf die Genexpression von MyoD oder MyoG hat.

Anstatt die Expression von MyoD und MyoG zu reprimieren, übt Dexamethason eher einen expressionsverstärkenden Effekt auf beide aus. Eine ähnlich verstärkte Differenzierung wurde auch bei C2C12 durch Dexamethason festgestellt, allerdings bezogen auf die Myosin mRNA Expression<sup>186</sup>. Möglicherweise könnte MAFbx lediglich an Moleküle binden, die sich auf die Proteinsynthese und das Muskelwachstum beschränken und diese beeinflussen. Währenddessen könnte MuRF-1 als allgemeiner Regulator des Protein-Levels der Degradierung fungieren und beim Zellmetabolismus mitwirken. Da MyoD signifikant erhöht exprimiert wurde, könnte es sein, dass die Differenzierung der humanen Myoblasten zu Myotuben durch Dexamethason verlangsamt wurde. Ebenfalls könnten nur einige wenige Zellen noch am Beginn der Differenzierung stehen. Die MyoD Expression könnte auch eine verlangsamte oder verlängerte Dauer der Differenzierung durch Dexamethason andeuten, denn MyoD wird bereits während der frühen Differenzierung exprimiert<sup>187</sup>.

Die Expression der Myosin mRNA wurde in humanen Myotuben (Abb. 31) sowie auch in C2C12 Myotuben durch Dexamethason nicht reprimiert, sondern eher verstärkt<sup>174</sup>.

Allerdings zeigte sich bei murinen Zellen eine verringerte Genexpression von Myosin nach der Behandlung mit 100 µM Dexamethason, die bei humanen Myotuben nicht auftrat.

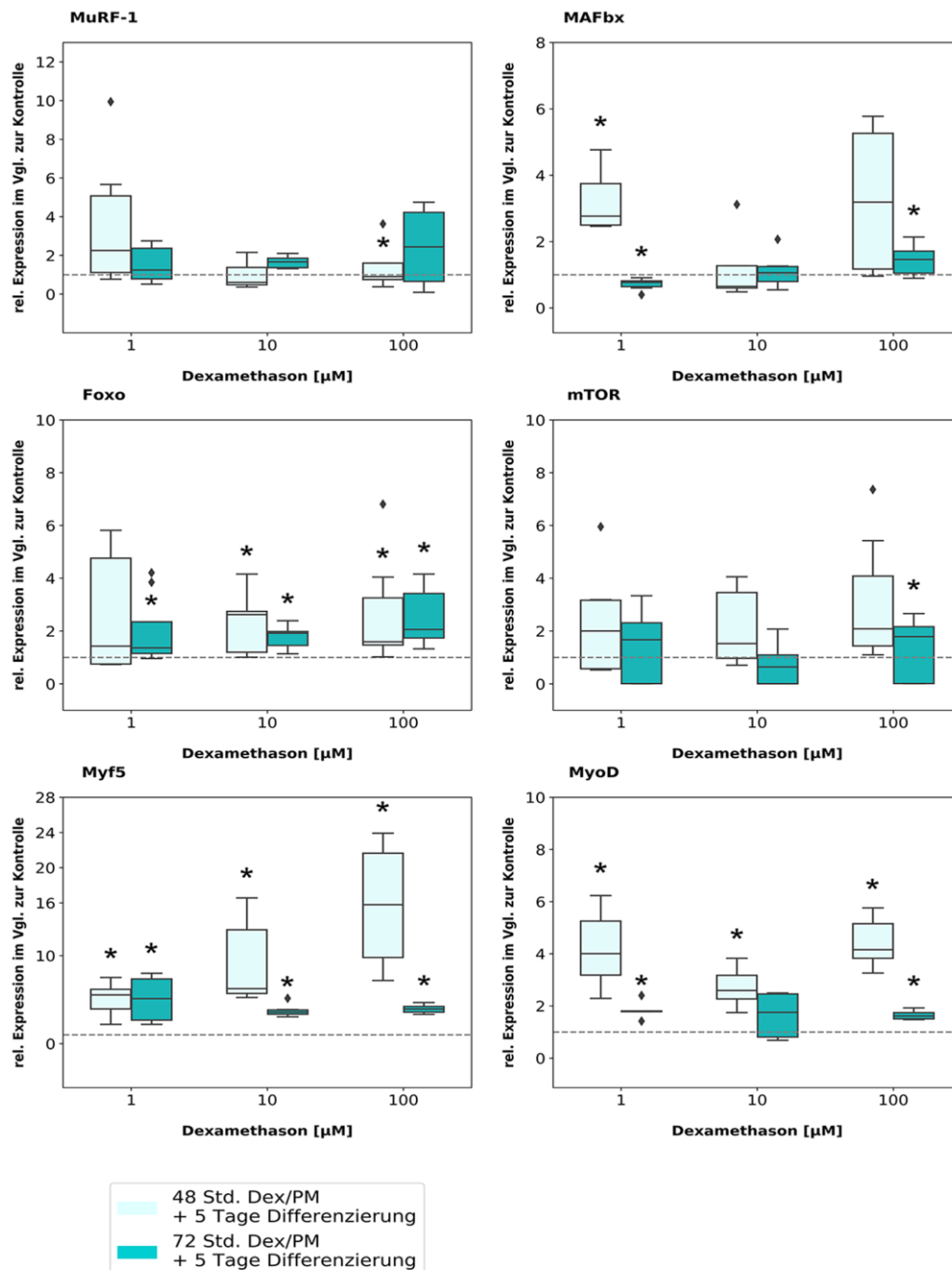
Im Gegenteil, die Expression wies nach einer Inkubationszeit von 48 und 72 Std. eine signifikant erhöhte Expression von Myosin auf, verglichen zur unbehandelten Kontrolle.

Diese erhöhte Myosin Expression durch sowohl niedrige als auch hohe Konzentrationen Dexamethason, könnten darauf hinweisen, dass dieses Glukokortikoid den Differenzierungsprozess verstärken könnte<sup>174</sup>. Myosin ist ein Target von MuRF-1. MuRF-1 bindet an Myosin und markiert es dadurch für den proteosomalen Abbau<sup>37,54</sup>. Die vorliegenden Ergebnisse weisen auf keine Reprimierung der Expression von Myosin hin, daher kann die verstärkte Myosin mRNA Expression ein Anzeichen dafür sein, dass die Zelle versucht, diesem beschleunigten Abbau entgegenzuwirken. Allerdings ist es möglich, dass MuRF-1 keinen Einfluss auf die Genexpression von Myosin hat, sondern erst posttranslational die Proteinexpression beeinflusst. Dies ist eine mögliche Erklärung der unterschiedlichen Effekte auf RNA- und Proteinebene.

Stitt et al. zeigten, dass die Expression von MAFbx nach einer 24-stündigen Behandlung mit 1, 10 und 100 µM Dexamethason in C2C12, konstant mit der Konzentrationserhöhung anstieg. MuRF-1 wurde allerdings weniger exprimiert als MAFbx, aber deutlich erhöht als bei unbehandelten Zellen. Doch auch hier, zeigte sich der gleiche konzentrations-abhängige Anstieg, wie auch in humanen Myotuben<sup>52</sup>. Die MAFbx Expression in humanen Myotuben zeigte allerdings bei einer Konzentration von 1 µM keine signifikante Erhöhung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Daraus lässt sich schließen, dass Dexamethason, unter Verwendung der gleichen Konzentrationen, eine andere Auswirkung auf die MAFbx Expression in murinen und humanen Myotuben hat.

### 4.3.2 Unterschiedliche Effekte von Dexamethason auf Myotuben und Myoblasten

Der Einfluss von Dexamethason sollte nicht nur auf die Differenzierung von Myotuben (Abb. 31), sondern auch auf Myoblasten im proliferierenden Zustand und deren Differenzierung zu Myotuben untersucht werden (Abb. 32). Dafür wurden die Zellen 48 und 72 Std. mit Dexamethason in Proliferationsmedium (PM) inkubiert und anschließend für 5 Tage ohne Dexamethason differenziert.



**Abb. 32: Relative Expression von MuRF-1, MAFbx, Foxo, mTOR, Myf5 und MyoD in humanen Myoblasten.**

Die Genexpression der behandelten Gruppen wurde mit der unbehandelten Kontrolle verglichen. Die Ergebnisse sind als Mediane und Quartile dargestellt (n = 4-9). Post-Hoc- und Mann-Whitney-U Test (\*p < 0,05).

## 4 Ergebnisse und Diskussion

Eine signifikant erhöhte MuRF-1 Expression hat Dexamethason lediglich nach 48 Std. und einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$ , bezogen auf unbehandelte Zellen. Auch auf die generelle Expression, der nicht statistisch signifikanten Gruppen, hat Dexamethason bezüglich der MuRF-1 Expression keinen erheblichen Einfluss, denn die Expression bleibt annähernd vergleichbar mit der Kontrolle. Mittlere Konzentrationen (10  $\mu\text{M}$ ) haben auf die MAFbx Expression keinen Einfluss, sie bleibt unverändert im Vergleich zur Kontrolle. Jedoch bewirken niedrige Konzentrationen eine signifikant erhöhte Expression nach 48 Std. und nach 72 Std. wird die MAFbx Expression signifikant reprimiert. Dagegen zeigt sich eine statistisch erhöhte Expression nach 72 Std., während nach 48 Std. MAFbx zwar exprimiert wird, jedoch keine statistische Signifikanz im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle auftritt.

Wie auch in Abb. 31 gezeigt, wird der Transkriptionsfaktor Foxo signifikant erhöht exprimiert (außer bei 1  $\mu\text{M}$  nach 48 Std.). Im Gegensatz dazu wird mTOR zwar exprimiert, jedoch ist seine Expression nur bei hoher Dosis und einer längeren Inkubationszeit (72 Std.), im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, statistisch signifikant.

Einen besonders ausgeprägten Effekt hat Dexamethason auf die Expression des Myoblasten-Markers Myf5. Er wird sowohl bei niedrigen als auch bei hohen Konzentrationen und sowohl nach kurzer als auch nach langer Inkubationszeit, im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, signifikant erhöht exprimiert (Abb. 32). Myf5 wird nach beiden Inkubationszeiten und bereits ab 1  $\mu\text{M}$  Dexamethason signifikant erhöht exprimiert (bis zu 20-fach, 100  $\mu\text{M}$ ). Aber es zeigt sich, dass bei einer kurzen Inkubationszeit (48 Std.), die Expression mit Konzentrationszunahme ebenfalls ansteigt. MyoD wird ebenfalls signifikant erhöht exprimiert, außer nach 72 Std. und bei 10  $\mu\text{M}$ . Wobei auch hier eine kurze Inkubationszeit einen größeren Effekt auf seine Expression hat. Die myogenen Differenzierungs-Marker MyoG und Myosin wurden in dieser Versuchsreihe nicht exprimiert.

Die oben beschriebenen Ergebnisse zu Abb. 32 zeigen, dass Dexamethason, aufgrund der fehlenden Expression der terminalen Differenzierungsgene MyoG und Myosin und der sehr hohen Expression der Proliferations-Marker Myf5 und MyoD, einen inhibierenden Effekt auf humane Myoblasten und deren Differenzierung zu Myotuben hat. Bei induzierter Differenzierung wären MyoG und Myosin bereits exprimiert worden, während Myf5 nicht mehr und MyoD nur sehr wenig exprimiert werden würde (Vergleich zu Abb. 16). Daher lässt sich in humanen Myoblasten ein eindeutiger proliferationsverstärkender Effekt durch Dexamethason und eine damit verbundene Inhibierung der Differenzierung zeigen. Beide E3-Ligasen werden zwar exprimiert jedoch hat Dexamethason eher eine geringe Auswirkung auf die Expression von MuRF-1 im Vergleich zu Abb. 31. Diese Resultate belegen, dass Dexamethason in humanen Myoblasten kaum Einfluss auf die Expression von MuRF-1 hat, im Vergleich zu humanen Myotuben und dass folglich eine Aktivierung der Proteolyse durch MuRF-1 markiertes Myosin eher gering ist. Myosin wird hier nämlich noch nicht exprimiert. Auch die Expression von MAFbx scheint weniger durch Dexamethason beeinflusst zu werden. Zwar wird er exprimiert, auch mehr als MuRF-1, aber dies scheint hier eher unabhängig von Dexamethason zu geschehen. Folglich kann Dexamethason möglicherweise die Expression beider Ligasen aktivieren, jedoch ohne dabei tiefgreifende Auswirkungen auf die Proteolyse oder Muskelgene zu haben. Die Foxo Expression weist allerdings eindeutig auf eine Induktion der Atrophie *in vitro* in humanen Myoblasten wie auch in murinen Zellen hin<sup>168-172</sup>. Foxo wird zwar exprimiert scheint allerdings keinen besonderen Einfluss auf die Aktivierung oder die erhöhte Expression der E3-Ligasen zu haben.

Da der Transkriptionsfaktor mTOR nur nach einer hohen Dosis (100  $\mu\text{M}$ ) Dexamethason eine signifikante Hochregulierung zeigte, jedoch auch keine Reprimierung, sondern eine zur

Kontrolle unveränderte Expression (Abb. 32), kann die hohe Expression von Myf5 auf hypertrophieähnliche Zustände in der Zelle hinweisen. Durch eine hohe Expression von mTOR könnte eine Hypertrophie entstehen, wie bereits in C2C12 beschrieben und lediglich eine Blockierung mTORs könnte die Phosphorylierung weiterer Transkriptionsfaktoren reprimieren<sup>31,180</sup>. Beim Vergleich der mTOR Expression zwischen Myotuben (Abb. 31) und Myoblasten (Abb. 32) wird eine höhere, wenn auch nicht signifikante, mTOR Expression in humanen Myoblasten, durch Dexamethason, deutlich. Diese könnte durch einen geringeren Einfluss von Dexamethason auf Myoblasten erklärt werden.

Die extreme Hochregulierung von Myf5 durch Dexamethason, die für eine erhöhte Proliferation steht, könnte auf eine unterdrückte Differenzierung hinweisen. Diese Hypothese wird auch durch die inhibierte Expression von MyoG und Myosin in humanen Myoblasten getragen. Diese inhibierenden Effekte wurden auch in murinen C2C12, bezogen auf die MyoG und Myosin Expression, festgestellt<sup>181,164</sup> und zeigen, dass Dexamethason auf beide Spezies den gleichen Effekt hat. Die Expression des Myoblasten-Markers MyoD belegt auch eindeutig, dass Dexamethason die Proliferation verstärkt hat. Er wird, nach der Behandlung mit Dexamethason, von Myoblasten stärker exprimiert als von Myotuben (Abb. 31).

Allerdings könnte auch der Wachstumsfaktor bFGF (enthalten im Proliferationsmedium) die Differenzierung zusätzlich verzögert haben, was bereits in murinen Zellen nachgewiesen wurde<sup>182</sup> und die hier vorliegenden Resultate bestätigt. Allerdings zeigten Han et al., eine verstärkte Differenzierung in murinen Myotuben nach der Behandlung von Myoblasten mit Dexamethason. Auch zeigten sie eine MAFbx Reprimierung und eine erhöhte Myosin Expression<sup>174</sup>, diese stehen wiederum im Gegensatz zu den Ergebnissen mit humanen Zellen (Abb. 32). Die Foxo Expression weist allerdings eindeutig auf eine Induktion der Atrophie in vitro in humanen Myoblasten wie auch in murinen Zellen hin<sup>168-172</sup>. Foxo wird zwar exprimiert scheint allerdings keinen besonderen Einfluss auf die Aktivierung oder die erhöhte Expression der E3-Ligasen zu haben.

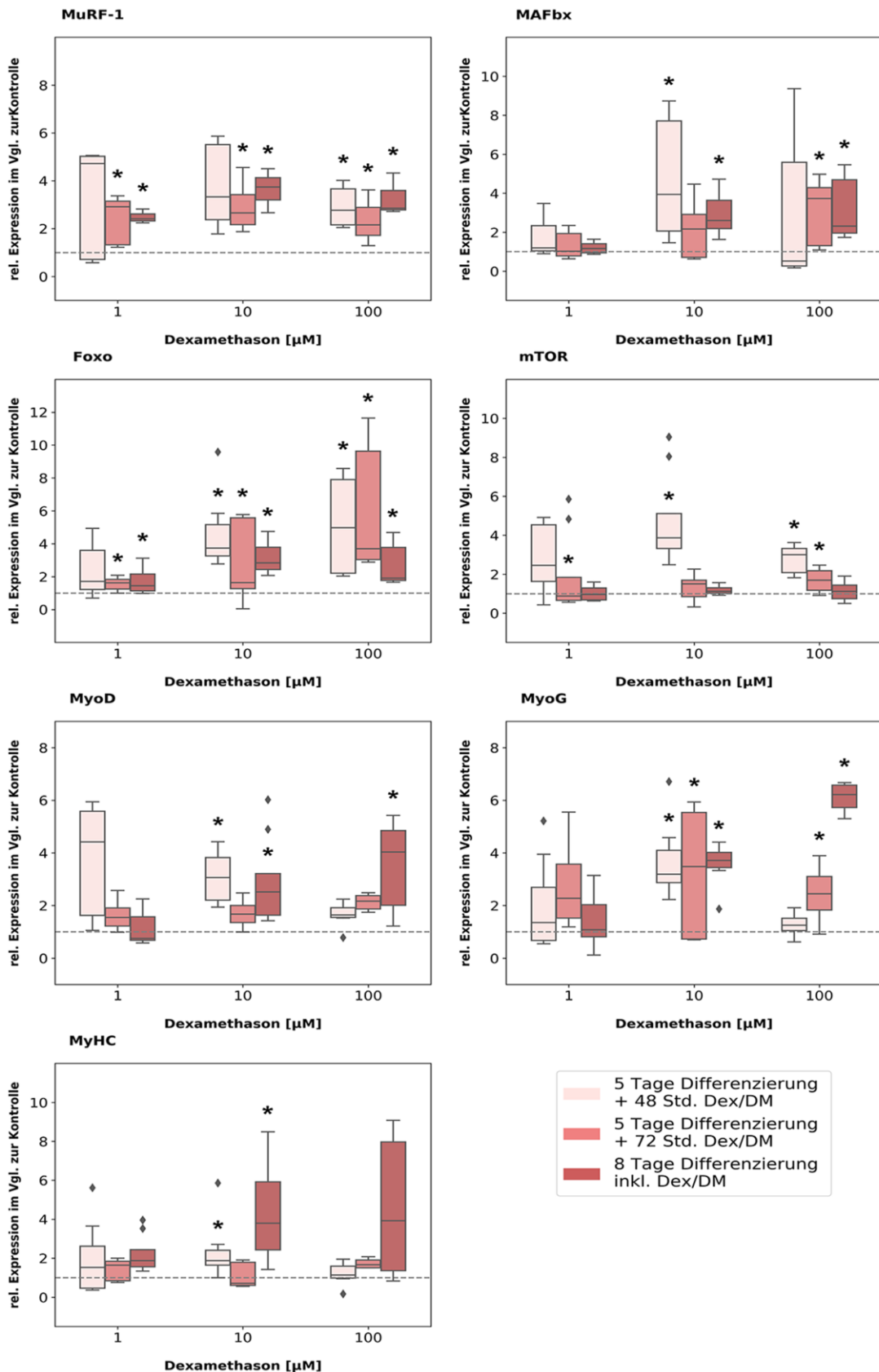
### 4.3.2.1 Zusammenfassung

Dexamethason induziert eindeutig in humanen Myotuben die Expression der E3-Ligasen MuRF-1 und MAFbx sowie den Transkriptionsfaktor Foxo, der letztere aktiviert. Ebenfalls induziert Dexamethason eine verstärkte Expression der Differenzierungs-Marker MyoD, MyoG und Myosin. Im Gegensatz hierzu hat Dexamethason einen inhibierenden Effekt auf die Differenzierung und damit auf die MyoG und Myosin Expression, jedoch einen verstärkenden Effekt auf die Expression der myogenen Proliferations-Marker Myf5 und MyoD in humanen Myoblasten. MuRF-1 und MAFbx werden zwar trotzdem exprimiert, jedoch nicht statistisch signifikant im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Auch Foxo wird von mit Dexamethason behandelten Myoblasten exprimiert, jedoch scheinbar ohne die Ubiquitin-Ligasen zu aktivieren, durch ihre Erhöhung atrophe Bedingungen auszulösen und die Proteolyse zu aktivieren. Folglich hat Dexamethason unterschiedliche Effekte auf Myoblasten und Myotuben.

### 4.3.3 Ausbleibende Reprimierung der E3-Ligasen mRNA durch miR-23a

Eine Überexpression der miR-23a in Myotuben soll die Expression von MuRF-1 reprimieren und dadurch die glukokortikoidinduzierten atrophischen Bedingungen in den Zellen inhibieren. Daher wurde diese microRNA in den Myoblasten überexprimiert, die Zellen differenziert und mit Dexamethason, wie zuvor in 4.3.1 beschrieben, inkubiert (Abb. 33).

## 4 Ergebnisse und Diskussion



**Abb. 33: Relative Expression von MuRF-1, MAFbx, Foxo, mTOR, MyoD, MyoG und MyHC, in miR-23a transduzierten humanen Myotuben.**

Die Genexpression der behandelten Gruppen wurde mit der unbehandelten Kontrolle verglichen. Die Ergebnisse sind als Mediane und Quartile dargestellt (n = 3-9). Post-Hoc- und Mann-Whitney-U Test (\* $p < 0,05$ ).

## 4 Ergebnisse und Diskussion

In den miRNA überexprimierten Zellen wird die relative Expression von MuRF-1 sowohl durch geringe als auch durch hohe Dosen Dexamethason signifikant erhöht exprimiert.

Dosen von 1 und 10  $\mu\text{M}$  (48 Std.) weisen aber keine statistische Signifikanz im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle auf. Im Vergleich dazu haben geringe Konzentrationen Dexamethason (1  $\mu\text{M}$ ) keinen signifikanten Effekt auf die MAFbx Expression in humanen Myotuben, unabhängig von der Inkubationszeit. Mittlere Konzentrationen sowie kurze und lange Inkubationszeiten (mit Ausnahme von 72 Std.) führen zu einer signifikanten Hochregulierung der MAFbx Expression (Abb. 33), wohingegen hohe Konzentrationen (100  $\mu\text{M}$  Dexamethason) erst durch lange Inkubationszeiten zu einer signifikanten Erhöhung führen. Auch wenn bei beiden Ubiquitin-Ligasen MuRF-1 und MAFbx keine statistische Signifikanz relativ zur unbehandelten Kontrolle auftritt, werden beide trotzdem exprimiert und MuRF-1 zeigt eine stärkere Expression als MAFbx bei ansteigender Konzentration.

Foxo wird, außer nach 48 Std. und einer Dexamethason Konzentration von 1  $\mu\text{M}$ , sowohl durch geringe als auch durch hohe Konzentrationen sowie nach kurzen und langen Inkubationszeiten signifikant erhöht exprimiert. Seine Expression ist konzentrations- und zeitabhängig.

Eine Expressionsveränderung von mTOR lässt sich nach einer 8-tägigen Inkubation weder durch niedrige noch durch hohe Konzentrationen feststellen. Die niedrigste und die höchste Konzentration bewirken lediglich nach 72 Std. eine signifikant erhöhte Expression mTORs durch Dexamethason. Bei 10 sowie 100  $\mu\text{M}$  wird er durch Dexamethason nach kurzen Inkubationszeiten signifikant erhöht exprimiert.

Geringe Konzentrationen Dexamethason führen zu keiner statistisch signifikanten Änderung der MyoD Expression. Auch eine hohe Konzentration bewirkt nur nach einer 8-tägigen Inkubation einen statistisch signifikanten Anstieg im Vergleich zur Kontrolle, wohingegen 10  $\mu\text{M}$  Dexamethason zur signifikanten Erhöhung der MyoD Expression führen (außer nach 72 Std.). Jedoch wird MyoD, wenn auch nicht statistisch signifikant, in Dexamethason behandelten Myotuben teils mehr exprimiert als in der Kontrolle.

Die 8-tägige Inkubation verursacht eine signifikante Erhöhung der Expression des myogenen Markers MyoD nach der Behandlung mit Konzentrationen von 10 und 100  $\mu\text{M}$ . Bei 10  $\mu\text{M}$  erhöht sich die Expression nach 48 Std. signifikant, bezüglich der Kontrolle. Dexamethason hat auf MyoD und MyoG in geringen Konzentrationen keinen Effekt, aber hohe Konzentrationen und lange Inkubationszeiten führen zur signifikant erhöhten Genexpression. Der quantitative Effekt von Dexamethason ist konzentrations- und zeitabhängig.

Auch auf die Expression des myogenen Differenzierungs-Markers MyoG hat eine geringere Konzentration keinen Einfluss. Eine mittlere Konzentration (10  $\mu\text{M}$ ) bewirkt sowohl nach kurzen als auch nach längeren Inkubationsphasen eine signifikante Erhöhung von MyoG. Allerdings bewirken 100  $\mu\text{M}$  Dexamethason eine Hochregulierung nur durch längere Inkubationszeiten. Die relative Myosin Expression führt nur nach einer Behandlung mit 10  $\mu\text{M}$  Dexamethason (außer nach 72 Std.) zu einer statistisch signifikanten Expression im Vergleich zur Kontrolle. Durch niedrige und hohe Konzentrationen, unabhängig von Inkubationszeiten, wird Myosin zwar auch exprimiert, teilweise mehr als von der Kontrolle, jedoch ist die Expression, im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, nicht signifikant.

MicroRNAs können die Genexpression durch Bindung an die 3'UTR einer komplementären mRNA beeinflussen<sup>94</sup>. In murinen C2C12 Myotuben wurde die miR-23a überexprimiert und eine daraus folgende Inhibierung der Myosin mRNA nachgewiesen<sup>121</sup>.

## 4 Ergebnisse und Diskussion

Eine derartige Inhibierung der Myosin mRNA durch eine Überexpression der miR-23a konnte in humanen Myotuben nicht bestätigt werden (Abb. 33).

Auch Dexamethason nimmt auf die mRNA Expression von Myosin keinen Einfluss. Jedoch zeigt sich im Vergleich der Myosin Expression von miR-23a transduzierten (Abb. 33) und untransduzierten Myotuben (Abb. 31) eine weniger starke Myosin Expression durch Dexamethason in miR-23a transduzierten Zellen (nur nach 10  $\mu$ M). Jedoch konnte auch hier keine Inhibierung nachgewiesen werden. Allerdings könnte, die miR-23a, wie auch in C2C12, die Expression der einzelnen Myosin Gene reprimieren<sup>121</sup> und so die Expression abschwächen, jedoch ohne das gesamte Gen zu beeinflussen.

Ohne Überexpression der miR-23a zeigt eine Studie in C2C12, dass die miR-23a bei Beginn der Differenzierung weniger exprimiert jedoch nach 5 Tagen wieder mehr exprimiert wird<sup>183</sup>. Der gleiche Mechanismus könnte eventuell auch in humanen Myotuben greifen. So könnte sich die oben beschriebene geringere Myosin Expression, bei transduzierten Myotuben, im Vergleich zu nicht-transduzierten erklären lassen. Das heißt, die miR-23a wird allgemein in humanen Myotuben bei Beginn der Differenzierung weniger exprimiert. Da sie jedoch konstant durch die Überexpression exprimiert wird, könnte es zur verringerten Myosin Expression geführt haben. Die Überexpression könnte, im Vergleich zu untransduzierten Myotuben, eine dexamethasonunabhängige Herunterregulierung von Myosin durch die miR-23a bewirkt haben.

Weder die Genexpression von MuRF-1 noch von MAFbx konnte durch die miR-23a in humanen, mit Dexamethason behandelten, Myotuben inhibiert oder reprimiert werden. Folglich hat die überexprimierte miR-23a keinen Effekt auf die Genexpression der Atrogene, was allerdings in murinen Myotuben gezeigt wurde<sup>95</sup>.

Generell wird angenommen, dass durch die miR-23a eine dexamethasoninduzierte Aktivierung der E3-Ubiquitin-Ligasen MuRF-1 und MAFbx in vitro in murinen Myotuben inhibiert werden kann<sup>95</sup> und die Proteindegradierung von Myosin dadurch inhibiert wird.

Normalerweise kontrolliert mTOR die Proteinsynthese und andere Zellfunktionen<sup>30,184</sup>.

Er phosphoryliert und aktiviert weitere Transkriptionsfaktoren die zu einer gesteigerten Proteinsynthese führen können<sup>47</sup>.

In humanen Myotuben wird mTOR durch geringe und hohe Konzentrationen Dexamethason signifikant erhöht. Das könnte auf eine verstärkte Proteinsynthese durch die Überexpression der miR-23a hinweisen. Denn durch ihre Überexpression könnte sie einer Reprimierung mTORs durch Dexamethason entgegenwirken. So könnte das konstante Expressions-Level der miR-23a in humanen Myotuben hypertrophieähnliche Zustände hervorgerufen haben. Und damit könnte sie einerseits die Proteinsynthese aufrecht erhalten und andererseits zur Reduktion des Dexamethason-Levels beigetragen haben (Abb. 33). Diese Hypothese könnte die deutlich geringere Expression von mTOR in untransduzierten dexamethasonbehandelten Myotuben (Abb. 31) erklären. So könnte die Überexpression der miR-23a, in humanen Myotuben zur Aufrechterhaltung der mTOR Expression trotz Dexamethason geführt haben. Denn normalerweise wird mTOR durch das Glukokortikoid reprimiert<sup>44</sup>.

Jedoch scheint die miR-23a keinen Einfluss auf die Expression des Transkriptionsfaktor Foxo zu nehmen (Abb. 33). Seine Expression steigt mit Zunahme der Konzentration von Dexamethason an. Dadurch kann Foxo weiterhin die Expression von Atrogenen positiv regulieren und zu ihrer Expression führen, was letztendlich zur Proteolyse führen kann<sup>34,40</sup>. Jedoch könnte seine Expression, induziert durch Dexamethason und unabhängig von der miR-23a, in Zusammenhang mit der erhöhten Expression von mTOR stehen. Durch seine vermehrte Expression versuchen die Zellen mTOR und die damit verbundene erhöhte Proteinsynthese, die eventuell zu einer Hypertrophie führen könnte, auszugleichen. Die miR-

23a hat hier jedoch keine direkte Auswirkung auf die Signalkaskade an sich, sondern einen eher indirekten Effekt.

Dexamethason hat sowohl auf transduzierte (Abb. 33) als auch auf nicht-transduzierte humane Myotuben (Abb. 31) keinen reprimierenden Effekt auf die MyoG Expression. Jedoch wurde bereits eine Hemmung der MyoG Expression durch die Überexpression der miR-23a in C2C12 gezeigt<sup>183</sup>. Weiterhin zeigen die hier vorliegenden Ergebnisse gerade nach längeren Inkubationszeiten und einer höheren Konzentration von Dexamethason eine signifikant erhöhte Expression, im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Die geringere Expression in der Kontrolle könnte darauf hinweisen, dass die miR-23a die Expression von MyoG reprimieren könnte. Da Dexamethason bereits in untransduzierten Myotuben eher zu einem verstärkten als reprimierenden Effekt auf die MyoG Expression führte, könnte durch die Überexpression und die Behandlung mit hohen Dosen Dexamethason der reprimierende Effekt der miR-23 ausgeglichen worden sein (Abb. 33). Im Gegenzug könnte die hohe MyoG Expression auch auf eine verlangsamte Differenzierung der Zellen hinweisen. Denn die signifikant erhöhte Expression von Myosin in nicht-transduzierten Myotuben (Abb. 31) tritt in transduzierten Myotuben nicht auf.

### **4.3.3.1 Vergleich von miR-23a überexprimierte Myotuben mit untransduzierten Myotuben**

Vergleicht man die Genexpression von miR-23a überexprimierten mit untransduzierten Myotuben, so ist lediglich die Expression von mTOR in nicht-transduzierten Myotuben statistisch signifikant geringer als in den transduzierten Zellen. Hingegen treten beim Vergleich der MuRF-1 und MAFbx Expression keine Signifikanzen auf.

### **4.3.3.2 Zusammenfassung**

In humanen Myotuben kann durch Dexamethason die Expression von Foxo durch die Expression der Ubiquitin-Ligasen MAFbx und MuRF-1 induziert werden. Die Expression dieser Atrogene inhibiert allerdings nicht die mRNA Expression myogener Differenzierungs-Marker. Ihre Expression wird durch Dexamethason eher verstärkt. Bei Myoblasten bewirkt Dexamethason zwar eine Induktion von Foxo, aber eine geringere Expression der Atrogene und eine Inhibierung der Differenzierungs-Marker MyoG und Myosin. Weiterhin kann eine Überexpression der miR-23a die Expression von MuRF-1 und MAFbx nicht inhibieren und hat auf die Expression von Foxo keinen Einfluss. Die verstärkte Expression von MyoG und Myosin durch Dexamethason in untransduzierten Myotuben lässt sich in miR-23a überexprimierten humanen Myotuben nicht nachweisen. Schlussfolgernd lässt sich sagen, dass Dexamethason einen anderen Einfluss auf humane als auf murine Myotuben hat und dass in humanen Zellen keine Atrophie in vitro erzeugt werden konnte.

#### **4.3.3.2.1 Abschluss**

In publizierten Studien zur Atrophieinduktion via Dexamethason gibt es wesentliche Unterschiede der verwendeten Konzentrationen (10 nM bis 100 µM) und der Inkubationszeiten. Ebenfalls wurden Zellen unterschiedlicher Spezies verwendet<sup>189,190</sup>. Durch einen Vergleich von L6 und C2C12 Zellen wurde eine Verringerung der Proteinsynthese in L6 Myotuben durch Dexamethason, in C2C12 jedoch keine Veränderung nachgewiesen. Ebenfalls zeigte sich, dass Dexamethason keinen Effekt auf die MURF-1 Expression in C2C12 hat allerdings zur einer Erhöhung in L6 Myotuben führt<sup>185</sup>. In dieser Studie wurde zum ersten Mal eine durch Dexamethason induzierte Atrophie in vitro in humanen primären Myotuben durchgeführt. Teilweise stimmen die Resultate mit bereits publizierten Daten überein,



## 4 Ergebnisse und Diskussion

andererseits ergaben sich auch gegenteilige Resultate. Die verwendeten Inkubationszeiten dieser Studie wurden bis dato noch nicht verwendet. Einerseits wurde der Einfluss von Dexamethason während der Differenzierung noch nicht analysiert und andererseits wachsen und differenzieren sich primäre humane Zellen, im Vergleich zu einer Zelllinie, langsamer. Da es keine klaren Vorgaben, weder zur Konzentration von Dexamethason oder anderen Glukokortikoiden noch zur Inkubationszeit gibt, sind die Resultate dieser Studie durch weitere Versuche auszuweiten und zu verifizieren. Durch die Überexpression der miR-23a in humanen Myoblasten sollte ihre Resistenz gegenüber Glukokortikoiden erreicht werden um so die Myotuben vor der Proteolyse zu schützen. Diese Inhibierung wurde in dieser Studie nicht erreicht, denn die mRNA Expression der E3-Ligase MuRF-1 konnte nicht unterdrückt werden. Denn dieses Gen ist vor allem für die Proteolyse von Myosin verantwortlich.

## 4.4 Proteinexpressionsanalyse in humanen Myotuben

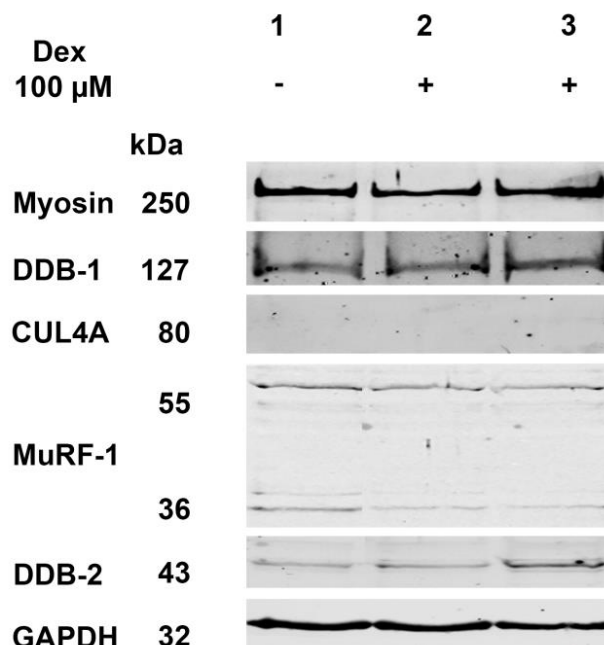
In verschiedenen Studien zur Atrophie in vitro wurde neben der Transkription auch die Translation von MuRF-1 und Myosin in dexamethasonbehandelten murinen Myotuben analysiert. Auch der Einfluss der miR-23 wurde diesbezüglich untersucht, denn der Effekt von sowohl Dexamethason als auch der miR-23a soll eher posttranslational sein. Deshalb wurde auch in dieser Studie die Proteinexpression mit einem Western Blot verifiziert. Damit wurde auch der Einfluss von Dexamethason und der miR-23a auf die Expression von CUL4A, einer weiteren Ubiquitin-Ligase, analysiert.

### 4.4.1 Western Blot

Die Proteinexpression wurde zur qualitativen Analyse von Myosin und MuRF-1 in Myotuben durchgeführt. Die Zellbehandlung sowie die Inkubationszeiten wurden wie in 4.3 beschrieben verwendet. Allerdings wurde hier nur die höchste Konzentration von 100  $\mu$ M Dexamethason eingesetzt, da sie bereits in der Genexpression den höchsten Effekt auf die mRNA Expression von MuRF-1 aufwies. GAPDH wurde als Ladekontrolle und eGFP zur Überprüfung der überexprimierten miR-23a verwendet. Eine Quantifizierung der Proteinexpression erfolgte nicht.

#### 4.4.1.1 Dexamethason kann keine eindeutige Myosin Degradierung in humanen Myotuben hervorrufen

Zuerst wurde die Proteinexpression von Myosin und MuRF-1 nach einer kurzen Inkubationszeit (Abb. 34) und anschließend nach einer längeren sowie während der Differenzierung (Abb. 35) überprüft.



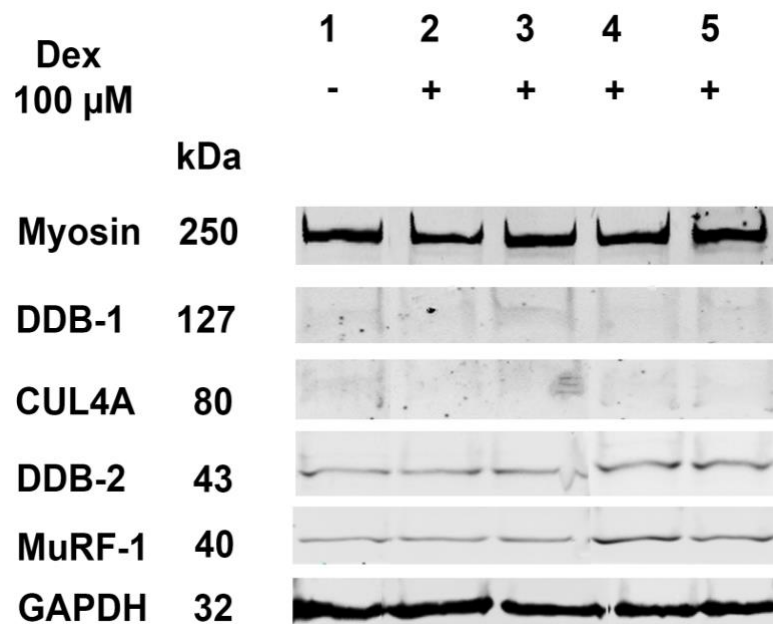
**Abb. 34: Proteinexpression von Myosin, DDB-1, CUL4A, DDB-2 und MuRF-1 in humanen Myotuben.**

7 Tage Differenzierung: Kontrolle (Linie 1 (-)) ohne Dex, 5 Tage Differenzierung, 48 Std. 100  $\mu$ M Dex (Linie 2, 3 (+)). Als Ladekontrolle wurde GAPDH verwendet.

## 4 Ergebnisse und Diskussion

Die Proteinexpression von Myosin ist in unbehandelten Myotuben, der Kontrolle (Linie 1 (-) in Abb. 34), stärker exprimiert als in den behandelten Myotuben, die für 48 Std. mit 100  $\mu$ M Dexamethason inkubiert wurden (Linie 2, 3 (+)). Bei der Proteinexpression von DDB-1 werden zwischen der Kontrolle und den behandelten Myotuben keine eindeutigen Unterschiede sichtbar und die Ubiquitin-Ligase CUL4A wird weder von der Kontrolle noch von mit Dexamethason behandelten Myotuben exprimiert.

Die MuRF-1 Proteinexpression zeigt sowohl in der Kontrolle als auch in den behandelten Zellen keine Banden bei den erwarteten 40 kDa. Lediglich bei ca. 55 und 36 kDa wurden undefinierte Banden in allen Gruppen detektiert. Fraglich ist, ob hier die 55 kDa Bande auf ein durch MuRF-1 gebundenes Ubiquitin (8,5 kDa) hinweist oder MuRF-1 entweder nicht oder nicht mehr exprimiert wurde. Das Linker-Protein DDB-2 wird in allen Gruppen etwa gleich exprimiert. Nach der Differenzierung und einer 48-stündigen Inkubation mit Dexamethason lassen sich keine eindeutigen Unterschiede zwischen unbehandelten und behandelten humanen Myotuben nachweisen (Abb. 34).



**Abb. 35: Proteinexpression von Myosin, DDB-1, CUL4A, DDB-2 und MuRF-1 in Myotuben.**

8 Tage Differenzierung: Kontrolle (Linie 1 (-)) ohne Dex, 5 Tage Differenzierung, 72 Std. 100  $\mu$ M Dex (Linie 2, 3 (+)). 8 Tage Differenzierung inkl. 100  $\mu$ M Dex (Linie 4, 5 (+)). Als Ladekontrolle wurde GAPDH verwendet.

Längere Inkubationszeiten mit 100  $\mu$ M Dexamethason (Abb. 35) beeinflussen die Myosin Proteinexpression weder nach 72 Std. (Linie 2, 3 (+)) noch nach 8 Tagen (Linie 4, 5 (+)). Eindeutige Expressionsunterschiede der Gesamtproteinexpression werden nicht deutlich. Ebenfalls gibt es keinen qualitativen Expressionsunterschied zwischen den verschiedenen Inkubationszeiten. Trotzdem wird bei allen behandelten Gruppen eine zweite blasse Bande unterhalb der starken Myosin Bande sichtbar. Diese Bande tritt bei der Kontrolle nicht auf. Das Adapterprotein DDB-1 wird zwar ohne Unterschied zwischen Kontrolle und Dexamethason-behandelten Myotuben exprimiert, jedoch ist seine Expression verglichen mit der Expression nach 48 Std. (Abb. 34) deutlich geringer. Wie auch zuvor (Abb. 34) wird die Ubiquitin-Ligase CUL4 nicht exprimiert, wohingegen ihr Linker-Protein DDB-2 sowohl von der Kontrolle (-) als auch nach 72 Std. und 100  $\mu$ M Dexamethason (Linie 2, 3 (+)) etwa gleich stark

## 4 Ergebnisse und Diskussion

exprimiert wird. Nach der 8-tägigen Inkubation (Linie 4, 5 (+)) scheint die Expression sogar etwas stärker zu sein als zuvor beschrieben.

Die E3-Ligase MuRF-1 wird sowohl von der Kontrolle (Linie 1) als auch nach 72 Std. 100 µM Dexamethason gleich stark exprimiert und nach 8 Tagen (Linie 4, 5) wird das MuRF-1 Protein sogar noch mehr exprimiert.

Durch Glukokortikoide können *in vitro* atrophische Bedingungen nachempfunden werden und dadurch Atrogene aktiviert werden, die zur Proteindegradierung führen<sup>24,173</sup>. Dexamethason kann die Proteindegradierung durch Hochregulierung von mehreren Genen des Ubiquitin-Proteasom Signalwegs *in vitro* induzieren<sup>40,52</sup>.

Die Behandlung von humanen Myotuben mit 100 µM Dexamethason zeigte keine eindeutige Proteindegradierung oder Reprimierung von Myosin (Abb. 34 und Abb. 35).

Die Myoblasten wurden 5 Tage differenziert und die Myotuben anschließend für 48 und 72 Std. mit je 100 µM Dexamethason inkubiert. Weiterhin wurden die Myoblasten während der Differenzierung mit 100 µM Dexamethason für einen Zeitraum von 8 Tagen inkubiert.

In dieser Versuchsreihe konnte keine Myosin Degradierung nach 48 Std. nachgewiesen werden (Abb. 34), woraus sich folgern lässt, dass Dexamethason die Proteinexpression nach 48 Std. in humanen Myotuben nicht sonderlich beeinflusst, worauf das Verhalten in murinen Myotuben hinweist<sup>37,54</sup>. Ebenfalls wurde keine, nach dieser Inkubationszeit eindeutige, MuRF-1 Expression detektiert, was im Gegensatz zu Studien in murinen C2C12 Myotuben steht.

Dort wurde eine höhere MuRF-1 und eine Verringerung der Myosin Proteinexpression durch Dexamethason gezeigt<sup>32</sup>.

Die Expression von MuRF-1 konnte eindeutig erst nach längeren Inkubationszeiten, dann allerdings auch in der Kontrolle, festgestellt werden (Abb. 35). Jedoch wurde es nach einer 8-tägigen Behandlung mehr exprimiert. Weiterhin zeigte sich durch längere Inkubationszeiten auch eine andere Myosin Bande, die deutlich unterhalb der 250 kDa Bande zu erkennen ist. Daher könnte die Expression von MuRF-1 mit dem Beginn der Myosin Proteolyse in Verbindung stehen, die durch Dexamethason induziert wurde. Wie auch in murinen Zellen, könnten diese Ergebnisse auf die Induktion der Proteolyse in humanen Myotuben hinweisen<sup>13,32,185</sup>. Folglich hat Dexamethason erst nach längeren Inkubationszeiten einen Effekt auf die Proteinexpression von Myosin und MuRF-1 in humanen Myotuben als bei murinen Myotuben.

Da es noch andere Ubiquitin-Ligasen gibt, wurde die Expression von CUL4A und deren Adapter- und Linker-Proteinen analysiert (Beschreibung in 1.3.4). Die vorliegenden Ergebnisse zeigen eindeutig, dass die CUL4A-RING-Ligase weder durch Dexamethason noch generell, in dieser Versuchsreihe, von humanen Myotuben exprimiert wird. Der CUL4A-Komplex wird durch Nedd8 aktiviert und ist an der Differenzierung von Myotuben beteiligt.

Er konnte zu diesem Zeitpunkt der Differenzierung bereits nicht mehr exprimiert werden, denn die Myotuben Differenzierung ist bereits abgeschlossen und die Neddylierung des CUL4A-Ubiquitin-Komplexes wird direkt bei Beginn der Differenzierung induziert. Dabei wird die Expression von Nedd8 in C2C12 hochreguliert<sup>186</sup>. Im Verlauf der Differenzierung sinkt seine Expression allerdings wieder ab und Myosin wird exprimiert<sup>186</sup>. Würde er weiterhin exprimiert werden, könnte Myosin nicht exprimiert und so die Myotuben Bildung gehemmt werden. Allerdings weisen humane Myotuben keine Inhibierung von Myosin auf. Da hingegen DDB-1 und DDB-2 die Adapter- und Linker-Proteine von CUL4A sind und sie in dexamethasonbehandelten Zellen mehr exprimiert werden als in unbehandelten, könnte ihre Expression auf einen anderen Mechanismus, eventuell durch Dexamethason induziert, hinweisen.

## 4 Ergebnisse und Diskussion

Ebenfalls könnte die Expression von DDB-1 und DDB-2 unabhängig von CUL4A in den Zellen und der Behandlung durch Dexamethason sein<sup>63,64,187</sup>.

Eine eindeutige MuRF-1 Expression (40 kDa) konnte nach 48 Std. nicht induziert werden (Abb. 34). Folglich wird MuRF-1 nach dieser Inkubationszeit in humanen Myotuben nicht exprimiert. Entweder fand durch die verwendete Inkubationszeit keine Aktivierung von MuRF-1 durch Dexamethason in humanen Myotuben statt oder die detektierte Bande (55 kDa) weist auf ein gebundenes Ubiquitin hin. Trotzdem zeigen sich deutliche Unterschiede in der MuRF-1 Expression in murinen und humanen Myotuben<sup>188</sup>. Denn hier wurde MuRF-1 eindeutig exprimiert.

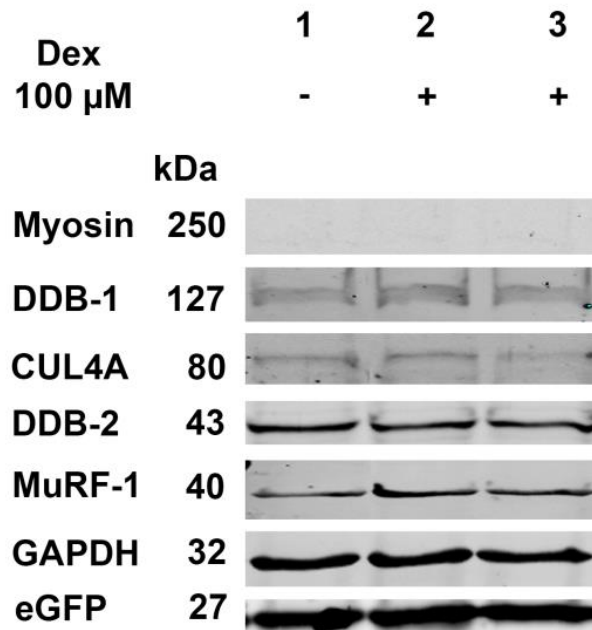
Die stärkere MuRF-1 Expression nach einer 8-tägigen Inkubation könnte darauf hinweisen, dass Dexamethason sich stärker auf den Differenzierungsprozess auswirkt als auf bereits differenzierte Myotuben. Allerdings tauchte auch eine gleich starke MuRF-1 Expression in unbehandelten Myotuben und nach 72 Std. Dexamethason auf (Abb. 34). Dies deutet darauf hin, dass allgemein durch die Differenzierung die Proteindegradierung auch in humanen Zellen aktiviert wurde<sup>188</sup>.

Das Protein Myosin ist ein direktes Target von MuRF-1 und Myosin wird durch diese E3-Ligase mit Ubiquitin markiert, durch das Proteasom erkannt und degradiert<sup>37,54</sup>. In C2C12 Myotuben wurde durch die Behandlung mit Dexamethason eine erhöhte Expression von MuRF-1 und eine deutliche Verringerung der Proteinexpression von Myosin festgestellt<sup>32</sup>. Da MuRF-1 in dieser Studie auch in unbehandelten Myotuben exprimiert wurde, könnte MuRF-1 unabhängig von Dexamethason während der Differenzierung exprimiert worden sein. Diese Expression von MuRF-1 in der Kontrolle wurde auch in C2C12 Myotuben gezeigt<sup>167</sup>. Allerdings wurde in dieser Studie die MuRF-1 Expression in unbehandelten Myotuben nicht diskutiert und sehr kurze Differenzierungs- und Inkubationszeiten verwendet.

Da in behandelten Myotuben (72 Std. und 8 Tage) unterhalb der charakteristischen Myosin Bande (250 kDa) eine weitere Bande zu erkennen ist (Abb. 35), könnte dies auf eine beginnende Degradierung hinweisen, wie auch schon bei murinen Myotuben ausgelöst durch MuRF-1<sup>44</sup>.

#### 4.4.1.2 Posttranskriptionelle Inhibierung der Myosin Expression durch miR-23a

Die überexprimierte miR-23a sollte die durch Dexamethason induzierte MuRF-1 Expression hemmen und so die Myosin Degradierung verhindern.

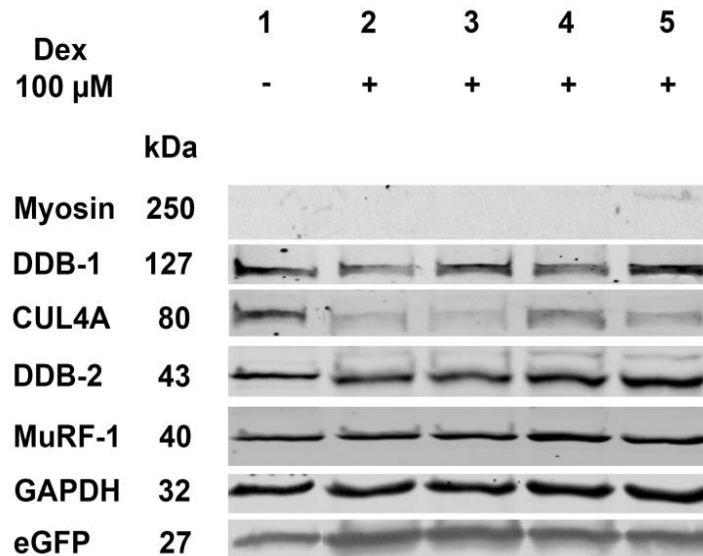


**Abb. 36: Proteinexpression von Myosin, DDB-1, CUL4A, DDB-2 und MuRF-1 in miR-23a überexprimierten Myotuben.**

7 Tage Differenzierung: Kontrolle (Linie 1 (-)) ohne Dex, 5 Tage Differenzierung, 48 Std. 100  $\mu$ M Dex (Linie 2, 3 (+)). Als Ladekontrolle wurde GAPDH verwendet.

Nach einer Differenzierung über 5 Tage und nach einer nachfolgenden Behandlung (48 Std.) mit (Linie 2, 3 (+) in Abb. 36) oder ohne 100  $\mu$ M Dexamethason (Linie 1(-)) wurde Myosin weder in unbehandelten noch in behandelten Myotuben exprimiert. Wohingegen alle Komponenten des CUL4A-Ubiquitin-Ligase Komplex DDB-1 und DDB-2 sowohl in der Kontrolle als auch in den behandelten Gruppen gleich stark exprimiert werden. Das Protein MuRF-1 wird in der Kontrolle deutlich geringer als in behandelten Zellen exprimiert. Die eGFP Expression ist in allen Gruppen nach 48 Std. gleich stark und zeigt damit die Expression des lentiviralen miR-23a Vektors.

## 4 Ergebnisse und Diskussion



**Abb. 37: Proteinexpression von Myosin, DDB-1, CUL4A, DDB-2 und MuRF-1 in miR-23a transduzierten Myotuben.**

8 Tage Differenzierung: Kontrolle (Linie 1 (-)) ohne Dex, 8 Tage Differenzierung inkl. 100  $\mu$ M Dex (Linie 2, 3 (+)), 5 Tage Differenzierung und 72 Std. 100  $\mu$ M Dex (Linie 4, 5 (+)). Als Ladekontrolle wurde GAPDH verwendet.

Auch nach längeren Inkubationszeiten (Abb. 37), unabhängig von Dexamethason, exprimieren die miR-23a transduzierten Myotuben kein Myosin. Geringe Unterschiede der DDB-1 Expression lassen sich zwischen der Kontrolle (Linie 1) und den behandelten Myotuben (Linie 2-5) erkennen. DDB-1 scheint nach 72 Std. Dexamethason (Linie 4, 5) leicht erhöht exprimiert zu sein. Die Expression von CUL4A hingegen ist in der Kontrolle deutlich stärker als nach der Dexamethason Behandlung. Nach 72 Std. Inkubation mit Dexamethason (Linie 4, 5) ist die DDB-2 Expression stärker als in der Kontrolle (Linie 1) und nach der 8-tägigen Behandlung (Linie 2, 3). MuRF-1 scheint in der unbehandelten Kontrolle geringer exprimiert zu sein als in den behandelten Myotuben. Nach 72 Std. (Linie 4, 5) wird dieser mehr exprimiert als nach 8 Tagen (Linie 2, 3). Die eGFP Expression zeigt eindeutig die Expression der miR-23a in allen Gruppen und eine stärkere Expression in den behandelten Zellen.

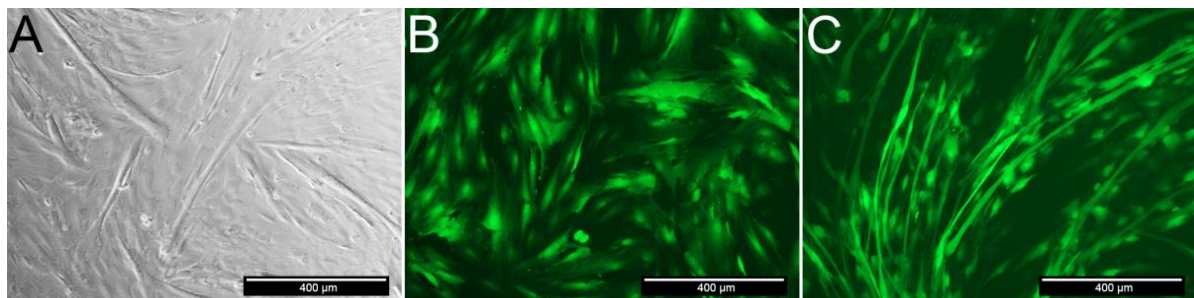
Eine Überexpression der miR-23a soll die MuRF-1 Proteinexpression und die damit verbundene dexamethasoninduzierte Myosin Degradierung, wie auch in C2C12, hemmen<sup>95</sup>. MuRF-1 trägt zur Degradierung des Myosin Proteins und anderen Myofibrillen Proteinen bei und führt so zur Instabilität struktureller Muskelproteine<sup>13,32</sup>. In humanen Myotuben wurde die Inhibierung von MuRF-1 durch die miR-23a nicht erreicht (Abb. 36 und Abb. 37). Seine Expression schließt ebenfalls die Kontrolle ohne Dexamethason mit ein. Daher hat diese microRNA einen anderen Effekt auf die MuRF-1 Expression in murinen und humanen Myotuben. Auffällig ist auch die vermehrte MuRF-1 Expression nach einer längeren Differenzierung, unabhängig von Dexamethason. Denn nach 48 Std. (Abb. 36) ist sie geringer als nach 72 Std. und 8 Tagen (Abb. 37). Dennoch verursacht die Überexpression der miR-23a sowohl in murinen als auch in humanen Myotuben die Inhibierung des Proteins Myosin, unabhängig von Dexamethason<sup>121</sup>.

Der CUL4A-DDB-1-DDB-2 Komplex wird in miR-23a transduzierten humanen sowie auch in C2C12 Zellen deutlich exprimiert<sup>63,64,187</sup>. Eine Erklärung hierfür könnte die dexamethasoninduzierte Proteindegredierung durch die überexprimierte miR-23a sein.

Die miR-23a könnte eine Ubiquitinisierung durch diese Ubiquitin-Ligase verringert haben. Ähnliches wurde auch in murinen Zellen gezeigt<sup>95</sup>. Allerdings könnte auch die stärkere Expression von CUL4A in unbehandelten Zellen darauf hinweisen, dass die miR-23a durch Dexamethason stärker exprimiert und so die Ubiquitinisierung in behandelten Zellen stärker unterdrückt. Hier könnte die Proteinexpression von eGFP, die in den behandelten Zellen stärker als in unbehandelten ist, einen Zusammenhang darstellen (Abb. 37). Sie könnte aufgrund einer durch Dexamethason verstärkten miR-23a Expression entstanden sein. DDB-2 und DDB-1 verbinden sich mit Cullin4 und bilden den E3-Ubiquitin-Ligase Komplex. DDB-1 dient als Linker-Protein während DDB-2 an DDB-1 bindet und als Substratrezeptormolekül fungiert. So können Proteine ubiquitiniert und degradiert werden<sup>63,64,187</sup>. Allerdings könnte die inhibierte Myosin Expression ebenfalls durch die Reprimierung des CUL4A-Komplexes entstanden sein. Denn durch die Inhibierung der Cullin-Ligase und der damit verbundenen, nicht erfolgten Neddylierung, könnte so ebenfalls die Expression von Myosin gehemmt worden sein. Denn durch eine Inhibierung der Cullin-RING-Ligase wird die Differenzierung in C2C12 inhibiert<sup>186</sup>. Die Komponenten des Komplexes werden zwar exprimiert, allerdings könnte die miR-23a diese Neddylierung inhibieren und damit auch die Muskeldifferenzierung und die Proteinexpression von Myosin. Dexamethason könnte diesen Effekt noch verstärkt haben.

### 4.4.2 Analyse der Myotuben Bildung in miR-23a überexprimierten Myoblasten

Da die Expression von Myosin und die damit verbundene Inhibierung der Myotuben Bildung in humanen Myotuben nachgewiesen wurde (Abb. 36 und Abb. 37), sollte im Folgenden eine längere Differenzierungsphase eine eindeutige Aussage über den Differenzierungsprozess unter Einfluss der überexprimierten miR-23a geben. Hierfür wurden die miR-23a überexprimierenden Myoblasten über einen Zeitraum von 11 Tagen differenziert und mikroskopisch auf die Myotuben Bildung überprüft (Abb. 38).



**Abb. 38: Myotuben Bildung in Myoblasten und miR-23a transduzierten Myoblasten.**

Die Zellen wurden 5 Tage ausdifferenziert. Myotuben (A, Phasenkontrast), miR-23a transduzierte Myoblasten (B, GFP), miR-23a transduzierte Myotuben nach 11 Tagen Differenzierung (C, GFP).

Nach 5 Tagen Differenzierung verschmelzen die Myoblasten zu Myotuben (Abb. 38 A). Im Gegensatz dazu differenzieren die miR-23a transduzierten Myoblasten nach der gleichen Zeit nicht (Abb. 38B). Erst nach einer längeren Differenzierungsphase der miR-23a transduzierten Myoblasten (Abb. 38C) konnte die Bildung von Myotuben in miR-23a überexprimierenden Myotuben verifiziert werden.

In Abb. 38C wird deutlich, dass die Überexpression dieser microRNA den Differenzierungsprozess reprimiert und die Myotubenbildung länger als 5 Tage andauert.



### 4.4.2.1 Zusammenfassung

Durch Dexamethason konnte in vitro bei humanen Myotuben die Expression der Ubiquitin-Ligase MuRF-1 induziert werden. Eine deutliche Proteindegradierung von Myosin durch Dexamethason konnte allerdings nicht nachgewiesen werden. Auch die Expression von MuRF-1 konnte erst nach 72 Std. detektiert werden. In miR-23a überexprimierten Myotuben wurde Myosin nicht exprimiert allerdings MuRF-1. Diese MuRF-1 Expression beschränkte sich jedoch nicht nur auf die behandelten Zellen, sondern auch auf die Kontrolle. Die stärkste MuRF-1 Expression trat nach einer Inkubationszeit von 72 Std. auf. Die Überexpression der miR-23a verursachte keine Inhibierung der Myotuben Bildung und der Myosin Expression, sie verzögerte jedoch den Differenzierungsprozess in humanen Myotuben deutlich.

### 4.4.3 Abschließende Diskussion und Zusammenfassung

In bisher veröffentlichten Studien variierte die Dexamethasonkonzentration um das 10.000-fache<sup>173</sup>. Ebenfalls wurden unterschiedliche Myoblastenspezies verwendet, die unterschiedliche Reaktionen auf Dexamethason zeigten<sup>189,190</sup>. Auch Speziesunterschiede der MuRF-1 wurden in C2C12 Myotuben und L6 Myotuben festgestellt<sup>173</sup>. Daher gibt es bislang keinen stichhaltigen Nachweis der Wirkung von Dexamethason auf Myotuben.

Die Überexpression der miR-23a sollte die Translation von MAFbx und MuRF-1 unterdrücken und so eine Atrophie, die durch Dexamethason induziert wurde, verhindern<sup>95</sup>. Die Inhibierung von MuRF-1 durch diese microRNA sollte der Myosin Degradierung in Myotuben vorbeugen. Aber eine Überexpression der miR-23a inhibierte auch die Expression des Myosin Proteins und die Myotuben Bildung. Daher werfen diese Aussagen einige Fragen auf: 1. Wenn die Myotuben Bildung durch die Überexpression der miR-23a inhibiert wird, wird auch die Myosin Proteinexpression verhindert? 2. Wie soll die miR-23a die Myosin Degradierung verhindern, wenn es nicht oder verzögert translatiert wird? 3. Wenn Myosin nicht translatiert wird, hat Dexamethason dann überhaupt einen Effekt auf die Myotuben und lässt sich überhaupt eine valide Aussage über die Atrophie Induktion und die Reprimierung dieser durch die miR-23a treffen?

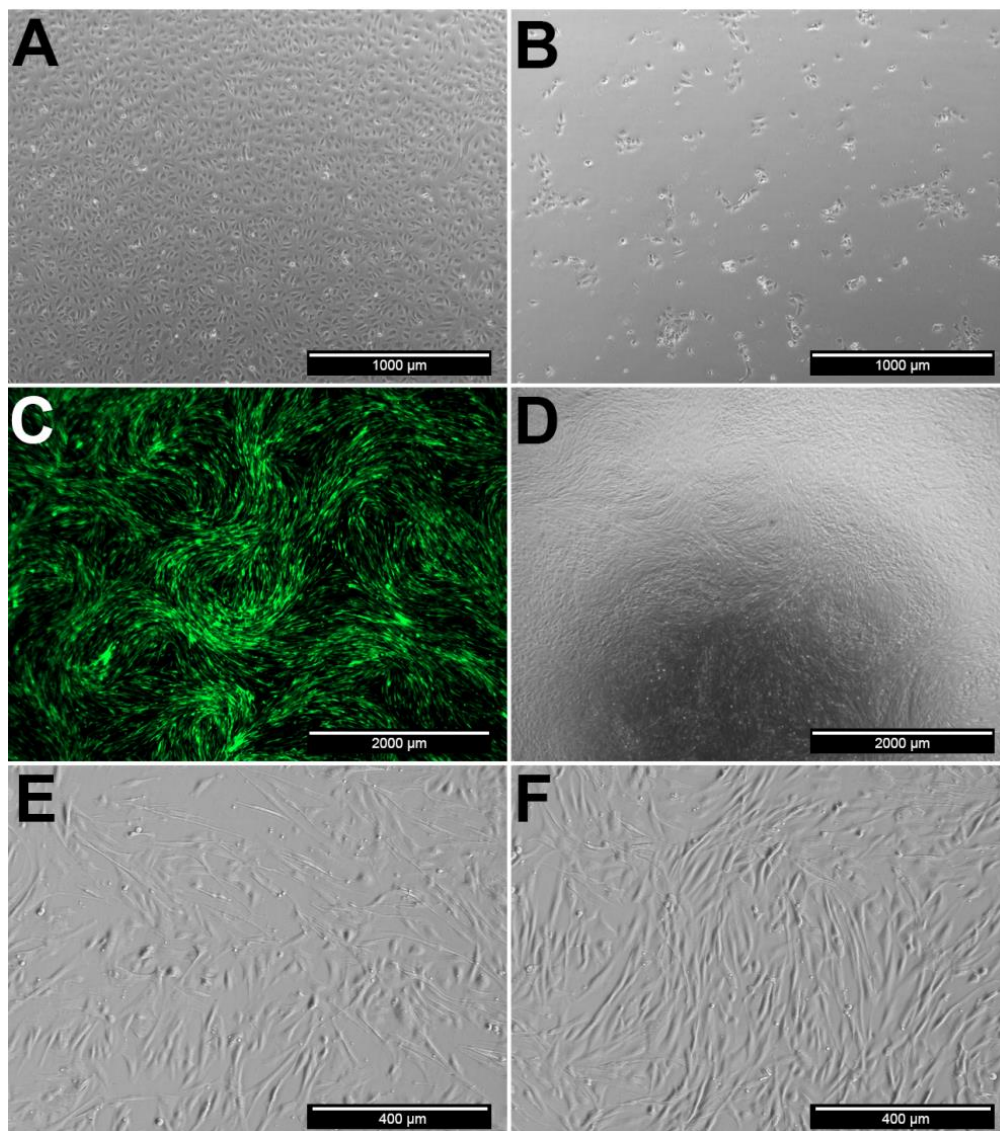
Durch die Überexpression der miR-23a in humanen Myoblasten sollte ihre Resistenz gegenüber Glukokortikoiden erreicht werden. Allerdings konnte dadurch die Expression der E3-Ligase MuRF-1 nicht unterdrückt werden. Eher wurde festgestellt, dass diese Überexpression die Proteinexpression von Myosin und die Differenzierung der Myoblasten reprimiert. In der aktuellen Literatur wurden diese Ergebnisse schon in murinen Myotuben festgestellt. Es wurde aber keine Analyse der Myotuben Bildung nach einem Zeitraum von 5 Tagen durchgeführt, lediglich wurde eine Inhibierung der Myosin Proteinexpression erwähnt, nicht jedoch überprüft ob es sich um eine verzögerte Expression handelt. Anhand der unterschiedlichen Ergebnisse der Studien könnte die Atrophieentstehung, durch Glukokortikoide, zwischen unterschiedlichen Spezies aufgrund der Aktivierung anderer Mechanismen verursacht werden und damit ebenfalls andere Signalwege aktiviert werden.

## 4.5 Die Angiogenese in der Kokultur

Eine Kokultur aus Myoblasten und Endothelzellen wurde zur besseren Beurteilung der Zellinteraktionen etabliert. Diese Zellinteraktion wurde in Zusammenhang mit der Muskelatrophie gestellt, da sich die generelle Frage der Nährstoffversorgung im atrophischen Muskelgewebe stellt. Da in vitro die Angiogenese bei Endothelzellen durch Dexamethason gehemmt werden kann, wurde auch der Einfluss von Dexamethason, zu einem späteren Zeitpunkt untersucht.

Nach erfolgreicher Kultivierung wurde die Kokultur für 5 Tage in unterschiedlichen Medienkompositionen differenziert und mit spezifischen Angiogenese Antikörpern gefärbt. Zur Visualisierung der Zellformationen wurden transduzierte HUVECs (mCherry) verwendet.

In der nachfolgenden Abb. 39 (A-F) sind die Mono- und Kokulturen in unterschiedlichen Medien dargestellt, um ihr Wachstumsverhalten zu analysieren.



**Abb. 39: Mono- und Kokultur nach 5 Tagen Kultivierung in unterschiedlichen Medien.**

A: HUVECs in 1:1 (EBM-2/DM, (v/v)), B: HUVECs in DM, C: Myoblasten in EBM-2 (grün), D und E: Kokultur in EBM-2 EGM-2™ Bullet-Kit™, F: Myoblasten in 1:1 (EBM-2/DM, (v/v)).

## 4 Ergebnisse und Diskussion

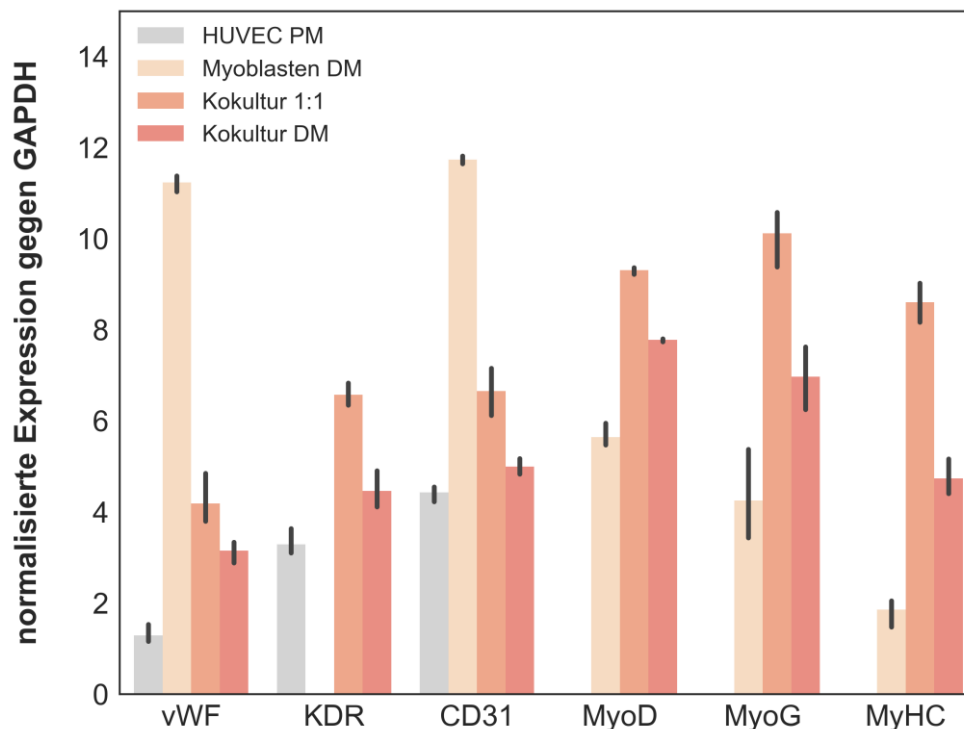
In Abb. 39 (A, B) wird deutlich, dass HUVECs zum Überleben und zur Proliferation Wachstumsfaktoren benötigen. Im EBM-2 + EGM-2™ Bullet-Kit™/DM Medium können sie trotz reduzierter Konzentration an Wachstumsfaktoren überleben und proliferieren (A). Beim Entzug dieser Faktoren sterben sie (B). Myoblasten können in EBM-2 proliferieren und überleben (C). D und E zeigen die Kokultur in Differenzierungsmedium (DM). Beide Zellarten können als Kokultur in EBM-2 überleben und proliferieren. Die Visualisierung der Kokultur in einer kleineren Vergrößerung (D) zeigt die Bildung kleiner zusammengelagerter Strukturen. In einer höheren Vergrößerung werden diese Strukturen allerdings nicht sichtbar (E). Myoblasten im Medium 1:1 (EBM-2/DM, F) wachsen, können allerdings nicht differenzieren. Allgemein benötigen HUVECs verschiedene Wachstumsfaktoren (Tabelle 7: Wachstumsmedien).

Auch ihre röhrenförmigen und verzweigten Strukturen können sie nur in einer 3D-Gel Matrix, z.B. aus Kollagen (Abb. 8D), ausbilden. HUVECs können in keinem myogenen Medium als Monokultur proliferieren und werden nach spätestens 5 Tagen apoptotisch.

Myoblasten hingegen wachsen und überleben in DMEM/F12 Medium mit 10% FCS und 2,5 ng/ml bFGF (Abb. 10A). Ihre Differenzierung wird durch Serums Entzug erreicht. Dadurch fusionieren sie zu Myotuben (Abb. 10B).

### 4.5.1.1 Genexpression in den Mono- und Kokulturen

Zur Genexpressionsanalyse der Kokulturen wurden die Zellen 5 Tage in den Medien kultiviert (Abb. 40). Die Monokulturen wurden in Proliferations (PM)- und Differenzierungsmedium (DM) kultiviert und als Kontrolle verwendet. Die Expression wurde mit der  $\Delta C_t$ -Methode ( $Ct_{G01} - Ct_{GAPDH}$ ) ausgewertet und die Werte auf GAPDH normalisiert. In Tabelle 5 sind die  $\Delta C_t$ -Werte aufgelistet.



**Abb. 40: Normalisierte Genexpression der Mono- und Kokulturen nach 5 Tagen.**

HUVEC PM (grau), Myoblasten DM (beige), Kokultur 1:1 (orange), Kokultur DM (rosé). Die Ergebnisse sind als Balkendiagramm unter Angabe der Standardabweichung, in Form von Fehlerbalken, dargestellt (n = 3).

**Tabelle 5:  $\Delta$ Ct-Werte von Mono- und Kokultur.**

Zellen & Medien	vWF	CD31	KDR	MyoD	MyoG	MyHC
HUVEC PM	2.04	6.90	4.57			
Myoblasten DM	11.23	11.73		5.64	3.69	1.85
Kokultur 1:1	4.18	6.65	6.57	9.30	10.11	8.61
Kokultur DM	3.15	4.99	4.46	7.78	6.97	4.74

HUVECs exprimieren die Endothelzellmarker vWF, CD31 und KDR (grau) wobei CD31 und KDR, im Vergleich zu vWF, geringer exprimiert werden. Jedoch werden die myogenen Marker MyoD, MyoG und Myosin von HUVECs nicht exprimiert. Im Gegensatz dazu exprimieren die Myotuben ihre myogenen Differenzierungs-Marker MyoD, MyoG und Myosin (beige). Deutlich ist zu erkennen, dass MyoD geringer als MyoG und Myosin exprimiert werden. Eine KDR Expression wurde bei den Myotuben nicht festgestellt, wohingegen CD31 und vWF von Myotuben sehr gering exprimiert werden. Vergleichend dazu wird in der Kokultur 1:1 (orange) eine Expression der genannten myo- und angiogenen Marker deutlich. Auffällig ist, dass sowohl vWF als auch KDR und CD31 mehr exprimiert werden als MyoD, MyoG und Myosin. Das gleiche Expressionsmuster zeigt sich auch in der Kokultur DM (rosé). Hier lässt sich eine starke Expression von myogenen und angiogenen Markers im Vergleich zur Kokultur 1:1 feststellen. Wobei auch hier MyoD, MyoG und Myosin weniger exprimiert werden als vWF und KDR. Auffällig ist die vergleichbare Expression von CD31 und Myosin.

Beim Vergleich der  $\Delta$ Ct-Werte (Tabelle 5) wird nochmals die höhere Expression der angiogenen Marker vWF, KDR und CD31 in der Kokultur DM (orange) im Vergleich zur Kokultur 1:1 deutlich. Auch CD31 zeigt eine höhere Expression in der Kokultur DM als in der Monokultur HUVECs (zweifach höher). Auffällig ist auch die fast identische Expression von KDR in der Kokultur DM im Vergleich zu HUVECs und die zweifach geringere Expression in der Kokultur 1:1.

Allgemein können HUVECs, in dem verwendeten Differenzierungsmedium ohne Wachstumsfaktoren nicht überleben (Abb. 39). Ein Grund dafür stellen vor allem fehlende Wachstumsfaktoren dar<sup>191</sup>. Allerdings können sie in einer Kokultur mit Myoblasten in Medium ohne Wachstumsfaktoren und reduziertem Serums Anteil überleben. In dieser Kokultur können HUVECs, ohne sich in einer 3D-Matrix zu befinden, überleben und ihre röhrenartigen Strukturen ausbilden (Abb. 41). Neben Myoblasten gibt es auch Kokulturen von HUVECs mit Osteoblasten, in denen ebenfalls ein Überleben von HUVECs unter anderen Wachstumsverhältnissen möglich war<sup>192</sup>. Auch in der Studie von Ertan et al.,<sup>144</sup> wurden Myoblasten bereits erfolgreich mit Endothelzellen kultiviert.

Dass CD31 und vWF, verglichen mit der Monokultur HUVECs, auch in beiden Kokulturen exprimiert wurden, weist ebenfalls eindeutig auf ein Überleben und ein Zusammenspiel beider Zellarten hin, denn beide Gene sind endothelzell-spezifische Marker<sup>193,194</sup>. Ebenfalls ist zu erwähnen, dass die Kultivierung mit Myoblasten die KDR Expression von HUVECs in der Kokultur DM sogar verstärkt hat. Denn da KDR ausschließlich von Endothelzellen exprimiert wird<sup>195</sup> ist seine Expression nur auf HUVECs, nicht aber auf Myoblasten zurückzuführen. Da allgemein MyoD, MyoG sowie Myosin nur von Myoblasten exprimiert werden<sup>181,164</sup> und ihre Expression in den Kokulturen im Gegensatz zur gesteigerten KDR Expression in Myoblasten reprimiert wurde, könnte eine unterdrückte myogene Differenzierung durch die Endothelzellen ein Grund dafür darstellen.

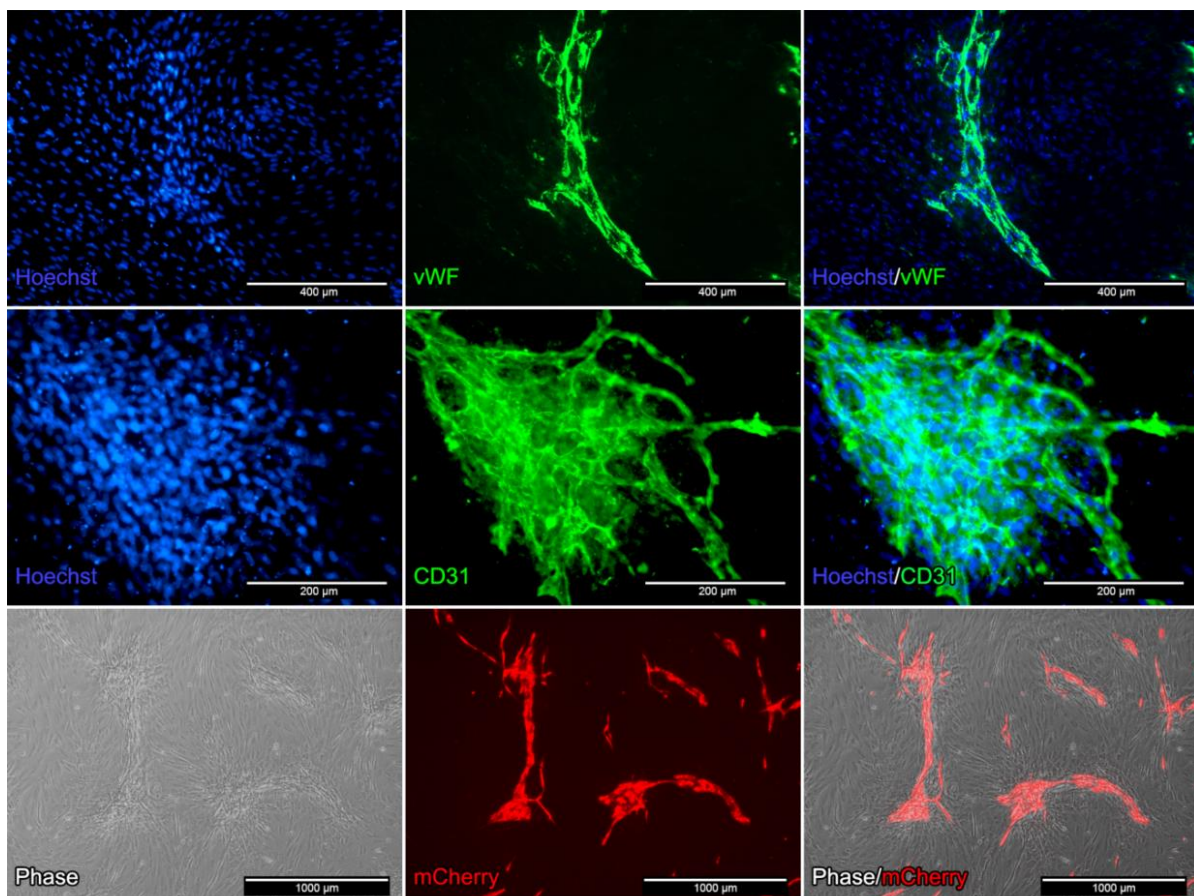
Die hohe Expression des Endothelzellmarkers vWF<sup>194</sup> in HUVECs und in der Kokultur (1:1) könnte nicht nur durch den Zelltyp selbst, sondern auch durch Supplemente im Medium

## 4 Ergebnisse und Diskussion

ausgelöst worden sein. Sowohl VEGF als auch bFGF, die beide als Supplemente zum Medium dazugegeben werden, induzieren die Proliferation von Endothelzellen und die Hochregulierung von vWF<sup>195</sup>. Ebenso könnte die VEGF-Supplementierung (HUVECs Monokultur) im Medium, die Expression von CD31, die im Vergleich zu KDR und vWF geringer ist, induziert haben. Denn VEGF induziert die Angiogenese und die Migration von Endothelzellen<sup>130</sup>, allerdings nur wenn sie sich als Monokultur in einem 3D-System befinden. In dieser Studie wurden die Endothelzellen allerdings nicht in einer 3D-Gel Matrix untersucht und die Angiogenese dadurch nicht induziert. Daher könnte die CD31 Expression unter diesen Versuchsbedingungen geringer sein. Da vWF, CD31 und KDR in der Kokultur/DM stärker exprimiert werden als in der Kokultur 1:1, könnte ihre Expression durch die VEGF Sezernierung durch die humanen Myoblasten induziert worden sein. Diese Sezernierung wurde bereits bei der murinen C2C12 Myoblastenzelllinie nachgewiesen<sup>196</sup>. Die Ergebnisse dieser Studie könnten darauf hinweisen, dass auch humane Myoblasten VEGF sezernieren.

### 4.5.1.2 Proteinexpression in den Kokulturen

Zum Nachweis der Proteinexpression der Angiogenese Marker wurden die Kokulturen mit spezifischen Antikörpern CD31 und vWF gefärbt. Zur Zelltypunterscheidung wurden transduzierte HUVECs verwendet.

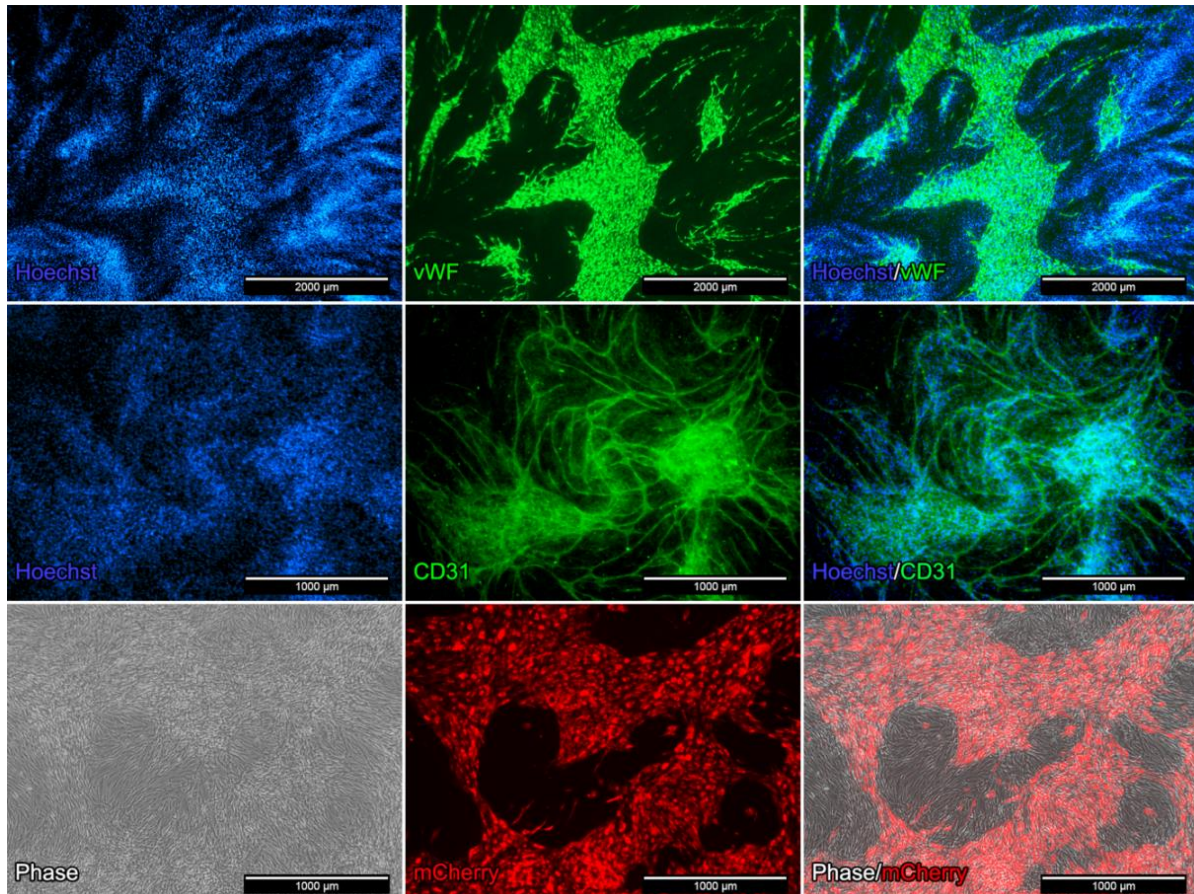


**Abb. 41: Immunfluoreszenz Kokultur 5 Tage in Differenzierungsmedium.**

Die Zellen wurden mit vWF (grün) und CD31 (grün) gefärbt. Die Nukleusfärbung erfolgte mit Hoechst. Phasenkontrast: Transduzierte HUVECs mit dem mCherry Vektor (rot). Die Myoblasten wurden nicht transduziert (lichtmikroskopisch/grau).

## 4 Ergebnisse und Diskussion

Die Färbung der Kokultur nach 5 Tagen im Differenzierungsmedium (Abb. 41) zeigte eine positive Färbung für vWF und CD31. Im Phasenkontrast wurden kleine, längliche Auswölbungen an Zellformationen sichtbar, die sich eindeutig den rot transduzierten HUVECs zuordnen lassen. Bei der vWF-Färbung werden ebenfalls kleine, längliche Röhren angefärbt und die CD31-Färbung lässt längliche, röhrenförmige Verzweigungen, die gebündelt vorliegen, sichtbar werden. Die positiven Färbungen lassen eindeutig auf den Prozess der Angiogenese durch die Endothelzellen schließen.



**Abb. 42: Immunfluoreszenz Kokultur 5 Tage in EBM-2/Differenzierungsmedium (1:1, (v/v)).**

Die Zellen wurden mit vWF (grün) und CD31 (grün) gefärbt. Die Nukleusfärbung erfolgte mit Hoechst (blau). Phasenkontrast: Transduzierte HUVECs mit dem mCherry Vektor (rot). Die Myoblasten wurden nicht transduziert (lichtmikroskopisch/grau).

Die Immunfluoreszenz Färbung der Kokultur 1:1 ist für vWF und CD31 positiv. Im Phasenkontrast lassen sich deutlich die großen Areale an Zellformation der Endothelzellen erkennen. Die vWF-Färbung zeigt ebenfalls deutlich diese größeren Zellareale. Die Färbung mit CD31 zeigt weit verzweigte, längliche und röhrenförmige Strukturen.

In Abb. 42 wurden lichtmikroskopisch und unter Verwendung rot transduzierter HUVECs große Areale an Zellformationen detektiert. Durch die CD31-Färbung wurde eine ausgeprägte, röhrenartige Verzweigung sichtbar, wohingegen die vWF-Färbung eher eine Zellenansammlung, ähnlich dem Phasenkontrast, zeigte (Abb. 42). Hier könnte vWF nicht von HUVECs, sondern von den Myoblasten exprimiert worden sein und der vWF-Antikörper an Myoblasten gebunden haben. Allerdings haben die kleinen Zellen eher die charakteristische Form von Endothelzellen, da Myoblasten in dieser Medienzusammensetzung als Monokultur

## 4 Ergebnisse und Diskussion

eine eher längliche Struktur haben und größer sind als HUVECs (Abb. 39 F). In Abb. 41 sind die angefärbten Areale deutlich kleiner. Die röhrenartigen Verzweigungen der CD31- und vWF-positiven Zellen sind deutlich weniger ausgeprägt. Durch einen phasenkontrastmikroskopischen Vergleich der beiden Medien zeigt sich, dass HUVECs in Differenzierungsmedium kleine Auswölbungen bilden (Abb. 41). Im 1:1 Medium formieren sie sich dagegen zu großen Zellarealen inmitten der Myoblasten (Abb. 42).

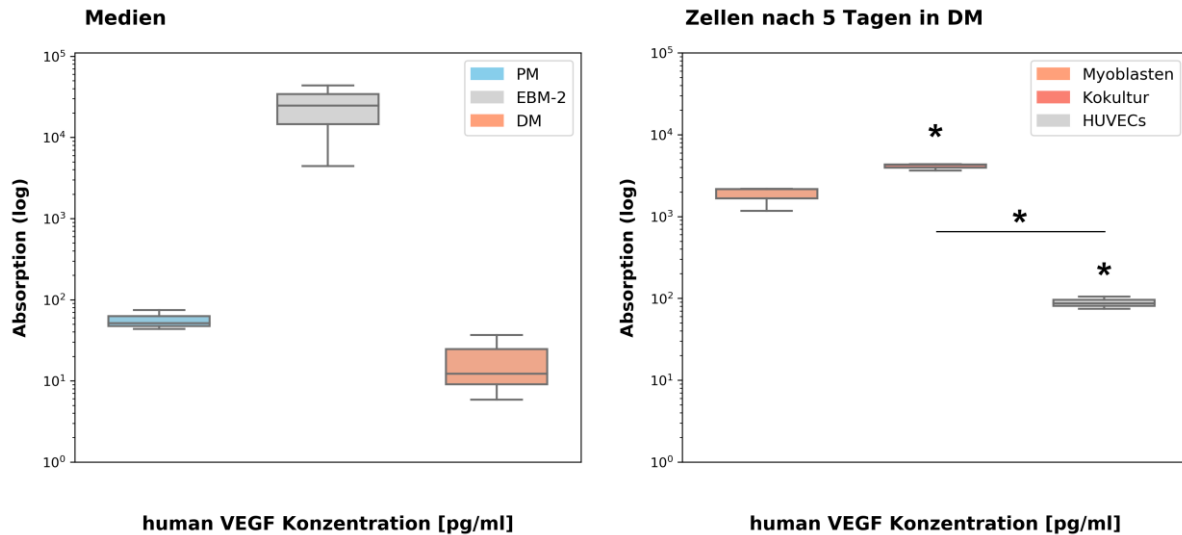
Die starke Angiogenese in beiden Kokulturen (Abb. 41/Abb. 42), nachgewiesen durch die CD31 Proteinexpression, könnte möglicherweise durch eine VEGF-Abgabe durch die humanen Myoblasten geschehen sein, denn die VEGF-Abgabe wurde schon bei murinen Myoblasten gezeigt<sup>196,197</sup>. Dadurch kann die vaskuläre Entwicklung<sup>198</sup> reguliert werden. Sowohl durch VEGF als auch durch FGF oder ihrer Kombination könnte die Proteinexpression von vWF in beiden humanen Kokulturen hochreguliert worden sein<sup>195</sup>. Der mesenchymale Stammzellcharakter (Tabelle 2, CD105) der humanen Myoblasten könnte ebenfalls ein Indiz für eine erhöhte VEGF-Abgabe sein<sup>144</sup>. Beide Zellarten wurden in den Kokulturen willkürlich im Verhältnis 1:1 ausgesät. Jedoch ist eine deutliche Zellformierung der HUVECs zu erkennen (Abb. 41 und Abb. 42), was auf eine Migration von HUVECs, bedingt durch die Sezernierung von VEGF durch die Myoblasten schließen lässt. Die Ausbildung eines kapillaren Netzwerks wurde ebenfalls bei murinen Myoblasten entdeckt<sup>200</sup>.

Die Myosin Proteinexpression und die Bildung der Myotuben waren in beiden Kokulturen nur sehr gering (Daten nicht gezeigt). Daraus könnte man schließen, dass die verstärkte Angiogenese mit einer verringerten myogenen Differenzierung verbunden ist.

Die verstärkte CD31 Proteinexpression (Abb. 42) und die röhrenförmigen Strukturen könnten 1. durch die Mediensupplementierung mit VEGF und 2. durch die VEGF-Sezernierung durch die Myoblasten entstanden sein<sup>199</sup>. Gleiches könnte zur starken Expression von vWF in dieser Kokultur geführt haben. Die Resultate könnten auf eine verstärkte Angiogenese in vitro, induziert durch die Kultivierung mit Myoblasten, deuten.

#### 4.5.1.3 VEGF-Sezernierung durch Myoblasten

Da die Proteinexpression von CD31 und vWF und die damit verbundene Angiogenese in den Kokulturen detektiert wurde, sollte nun eine Quantifizierung der VEGF Konzentration mit einem ELISA durchgeführt werden. Die VEGF-Konzentration in den Medienüberständen sollte analysiert werden, um eine klare Aussage über die mögliche Induktion der Angiogenese, durch die VEGF-Sezernierung von humanen Myoblasten, zu erhalten. Abb. 43 illustriert die VEGF-Konzentration in den Medien sowie in den Überständen der Monokulturen und der Kokultur DM.



**Abb. 43: VEGF Konzentration der Mono- und Kokulturen in Differenzierungsmedium.**

Links: Proliferationsmedium (PM), EBM-2, Differenzierungsmedium (DM), Rechts: Zellen nach 5 Tagen in DM. Die Ergebnisse sind als Mediane und Quartile dargestellt ( $n = 3$ ). Die Signifikanz der VEGF Konzentration wurde innerhalb der Kulturen und im Vergleich zum Differenzierungsmedium überprüft. Games-Howel Test ( $*p < 0,05$ ).

Die reinen Medien weisen im Vergleich untereinander keine statistische Signifikanz auf, obwohl in PM und DM kein VEGF als Supplement hinzugegeben wurde. Im Mediumsüberstand von HUVECs wurde eine signifikant geringere Konzentration an VEGF nachgewiesen als in der Kokultur. Auch der signifikant höhere VEGF-Anteil im Mediumsüberstand der Kokultur, im Vergleich zum reinen Differenzierungsmedium, wird deutlich. Er ist auch ebenfalls in der Monokultur HUVEC signifikant höher als im reinen Differenzierungsmedium. Keine statistische Signifikanz tritt bei Myotuben und dem reinen Differenzierungsmedium bezüglich der VEGF Konzentration auf. Diese Quantifizierung der VEGF Konzentration im Überstand der Kokultur belegt eindeutig, dass die humanen Myoblasten dieses sezernieren, denn eine Supplementierung des Mediums fand nicht statt und HUVECs sezernieren kein VEGF. Dadurch wird wiederum deutlich, dass die Angiogenese durch diese Sezernierung induziert worden sein muss. Zu ähnlichen Ergebnissen kam man auch in anderen Studien mit murinen Zellen<sup>195–197</sup>. Daraus könnte sich auch eine Erklärung der verringerten Myosin Expression, verbunden mit einer Verringerung der Myotuben Bildung, ergeben. Die Erhöhung der angiogenen Marker könnte diese Verringerung verursacht haben und diese Resultate könnten auf die VEGF-Abgabe zurückzuführen sein, wie auch schon publiziert<sup>199</sup>.

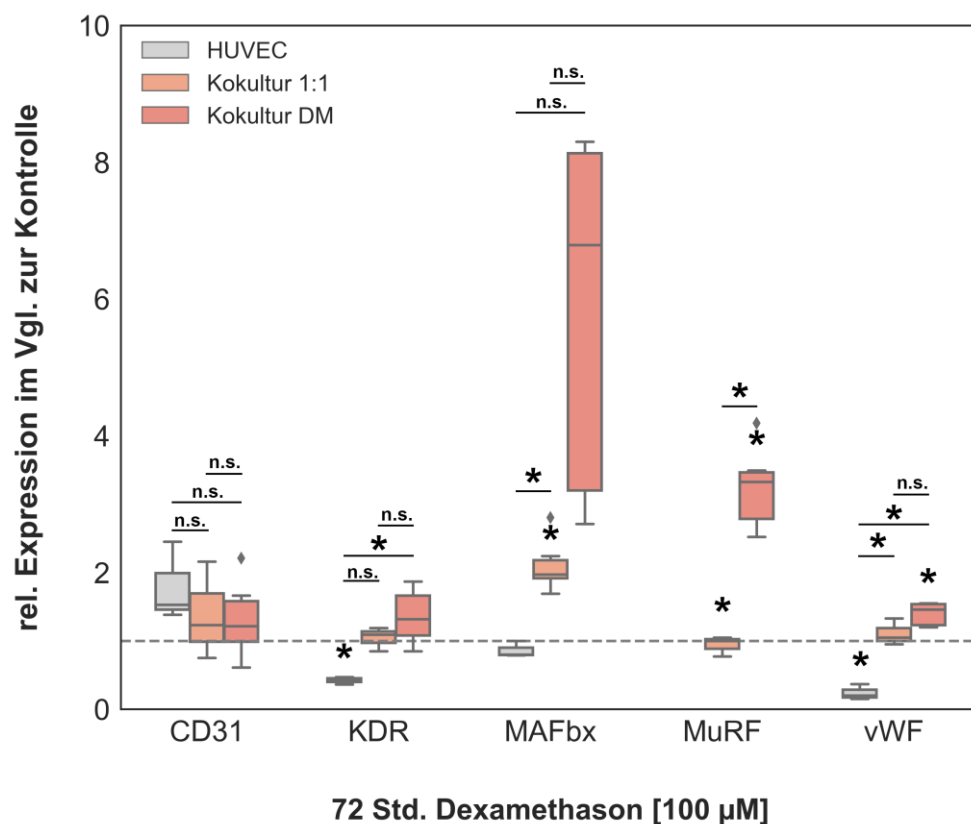


### **4.5.1.4 Zusammenfassung**

Durch eine Kokultur aus HUVECs und Myoblasten konnte die Angiogenese in einem 2D-System etabliert werden und die Angiogenese in dieser Kokultur induziert werden. Diese Induktion wurde durch die VEGF-Sezernierung der humanen Myoblasten verursacht. Auch eine verringerte Myotuben Bildung wurde anhand dieser Versuchsreihe nachgewiesen. Daher ist es zukünftig wichtig in vitro einen Fokus nicht nur auf eine Mono- sondern auch auf eine Kokultur zu legen. Denn in vivo wechselwirken alle Gewebe und auch Zellen untereinander, sodass eine Atrophie auch durch andere Gewebe ausgelöst werden kann, die sich allerdings auf umliegende Gewebe auswirken kann. Eine Verschlechterung der Vaskularisierung könnte zur Unterversorgung der Gewebe mit Sauerstoff, Nährstoffen und Wachstumsfaktoren führen, was wiederum zur Beeinträchtigung der betroffenen Gewebe führt.

#### 4.5.2 Allgemeine Genexpression in Mono- und Kokulturen nach Behandlung mit Dexamethason

Da HUVECs in der Kokultur zur Angiogenese fähig sind (Abb. 41 und Abb. 42), sollte der Einfluss von Dexamethason auf die Expression der angiogenen Marker CD31, KDR und vWF sowie die Expression von MuRF-1 und MAFbx analysiert werden (Abb. 44). So sollte diese Versuchsreihe Aufschlüsse darüber geben, welcher Zelltyp durch Glukokortikoide, und damit für eine Atrophieinduktion, verstärkt betroffen ist, denn Dexamethason kann auch die Angiogenese inhibieren. HUVECs wurden zunächst für 72 Std. mit 100  $\mu$ M Dexamethason in Proliferationsmedium inkubiert und anschließend für 5 Tage ohne Dexamethason weiter inkubiert. Beide Kokulturen wurden erst 5 Tage in den entsprechenden Medien differenziert und anschließend für 72 Std. mit 100  $\mu$ M Dexamethason inkubiert.



**Abb. 44: Genexpression von CD31, KDR, MAFbx, MURF und vWF in HUVECs und beiden Kokulturen nach Dexamethason Inkubation.**

Die Ergebnisse sind als Mediane und Quartile dargestellt (n = 3-9). Post-Hoc und Mann-Whitney-U Test (\* $p < 0,05$ ).

Der Angiogenese-Marker CD31 wird sowohl von der Monokultur HUVECs als auch von beiden Kokulturen exprimiert. Seine Expression wird allerdings durch Dexamethason, im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, nicht signifikant beeinflusst. Auch zwischen den Gruppen gibt es keine signifikanten Unterschiede der CD31 Expression. Folglich bleibt die CD31 Expression von Dexamethason unbeeinflusst. Abb. 44 zeigt, dass die mRNA Expression von KDR durch Dexamethason in HUVECs signifikant, im Vergleich zur Kontrolle, reprimiert wird. Währenddessen bleibt die Expression in beiden Kokulturen unverändert. Nur zwischen HUVECs und der Kokultur DM tritt eine statistische Signifikanz seiner KDR Expression auf. In der Kokultur wird KDR vermehrt exprimiert.

## 4 Ergebnisse und Diskussion

Die Ubiquitin-Ligase MAFbx wird von HUVECs und beiden Kokulturen exprimiert, jedoch wird MAFbx von beiden Kokulturen mehr exprimiert als von HUVECs allein. In der Kokultur 1:1 ist MAFbx signifikant, im Vergleich zur Kontrolle, erhöht. Zwar wird MAFbx in der Kokultur DM exprimiert, tatsächlich besteht aber keine Signifikanz im Vergleich zur Kontrolle. Die zweite Ubiquitin-Ligase MuRF-1 wird von HUVECs trotz Dexamethason nicht exprimiert, im Gegensatz zu beiden Kokulturen. In der Kokultur 1:1 wird er signifikant geringer exprimiert und in der Kokultur DM signifikant erhöht exprimiert. Dieser Expressionsunterschied führt auch zur statistischen Signifikanz zwischen beiden Kokulturen.

Auch der angiogene Marker vWF wird von HUVECs nach der Behandlung mit Dexamethason signifikant geringer exprimiert, während er von der Kokultur DM signifikant erhöht exprimiert wird. MuRF-1 und MAFbx sind muskelspezifische Ubiquitin-Ligasen<sup>44</sup> und beide können durch die Proteinmarkierung mit Ubiquitin zur Proteindegradierung führen<sup>13,32,185</sup>.

Beide Ligasen werden von beiden Kokulturen exprimiert und lassen dadurch auf die Induktion der Atrophie schließen (Abb. 44). In der Kokultur (1:1) könnte die Mediensupplementierung mit Wachstumsfaktoren zur verringerten Expression von MuRF-1 geführt haben. Auch hier ist die Expression eher auf die Myotuben zurückzuführen als auf die Endothelzellen, denn MuRF-1 ist eine muskelspezifische Ubiquitin-Ligase<sup>175</sup>. Seine höhere Expression in der Kokultur DM könnte hier ebenfalls durch Myotuben induziert worden sein und zusätzlich verfügen die Zellen über keinen exogenen Wachstumsfaktor. Die gleiche Hypothese könnte auch für die MAFbx Expression Anwendung finden, wobei MAFbx auch von HUVECs exprimiert wird. Zwar ist seine Expression reprimiert, aber er wird trotz Muskelspezifität von Endothelzellen exprimiert. In HUVECs könnte MAFbx als Ubiquitin-Ligase in einen anderen unbekanntem Mechanismus involviert sein. Auch hier wird er wieder in beiden Kokulturen exprimiert, was auch hier auf die Myoblasten zurückzuführen sein könnte.

Der Endothelzell-Marker CD31 wurde in keiner der Kulturen durch Dexamethason reprimiert oder signifikant höher exprimiert. Hier hat Dexamethason keinen Effekt auf seine Expression, obwohl Glukokortikoide normalerweise die Expression von Angiogenese-Markern hemmen<sup>132</sup> und so die Angiogenese inhibieren. Diese Inhibierung lässt sich vor allem durch die Reprimierung von KDR und vWF in HUVECs nach der Behandlung mit Dexamethason erkennen. In diesem Falle könnte Dexamethason die Angiogenese oder allgemein die Zellgenexpression und ihre Proliferation hemmen, denn beide sind Endothelzell-Marker.

Die Expression des KDRs ist ausschließlich auf Endothelzellen exprimiert<sup>200</sup>. Durch die Wirkung von Dexamethason könnte die KDR Expression in HUVECs reprimiert worden sein, denn Glukokortikoide inhibieren die Angiogenese schon in sowohl bereits publizierten Studien als auch in dieser Studie<sup>135</sup>. Da die Ausbildung der röhrenförmigen Strukturen VEGF-abhängig ist<sup>132</sup>, könnte Dexamethason direkt auf VEGF wirken, diesen reprimieren und so auch die Expression von KDR<sup>139</sup>. Dieser Effekt von Dexamethason wird in beiden Kokulturen aufgefangen. Hier könnte auf der einen Seite die Mediensupplementierung (Kokultur 1:1) und auf der anderen Seite die starke VEGF-Sezernierung durch die Myoblasten (Kokultur DM), siehe Abb. 43, Einfluss auf seine Expression nehmen und so seine Expression erstens hochregulieren und zweitens Dexamethason keine Auswirkung auf ihn haben. So könnte auch alleine durch die VEGF-Abgabe der humanen Myoblasten der inhibierende Effekt von Dexamethason auf die KDR Expression in HUVECs reprimiert worden sein<sup>195</sup>. Eine ähnliche Hypothese könnte auch eine Erklärung für die vWF Reprimierung in HUVECs und die erhöhte Expression in beiden Kokulturen sein. Denn vWF wird auch nur von Endothelzellen exprimiert<sup>194</sup> und sein Effekt wurde durch die Kultivierung beider Zellarten gehemmt.

## 4 Ergebnisse und Diskussion

Bei einer Muskelatrophie wird Muskelgewebe mit Fett infiltriert und verliert so seine Funktion zur Stabilisierung der Wirbelsäule. Diese Umwandlung von Muskel- zu Fettgewebe könnte als Folge einer schlechten Vaskularisierung und einem damit verbundenen Nährstoffmangel zusammenhängen. Daher sollte vermehrt auf das Zusammenspiel von Muskelgewebe und Blutgefäßen geachtet werden. Diese Kokultur aus Myoblasten und Endothelzellen könnte zur weiteren Untersuchung dieser Gewebetransformation in vitro beitragen.

### 4.5.2.1 Zusammenfassung

Beide Ubiquitin-Ligasen wurden durch Dexamethason auch in der Kokultur mit HUVECs exprimiert. Folglich konnte die Inhibierung von Atrogenen, induziert durch Dexamethason, in der Kokultur nicht erreicht werden. Aber die reprimierenden Effekte von Dexamethason auf die Expression von KDR und vWF konnten durch die Kokultur gehemmt werden und so könnte dieses Model zur weiteren Untersuchung bezüglich der Muskelatrophie in vitro genutzt werden.

### 4.5.2.2 Schlussfolgerung und Ausblick

In dieser Studie konnten die bereits publizierten Studien zur Entstehung einer Muskelatrophie durch das Glukokortikoid Dexamethason, bezüglich der Mechanismen, nicht bestätigt werden und daher keine Aussage über die Entstehung der Atrophie getroffen werden. Die vorliegenden Ergebnisse der Studie sollten für eine zweifelsfreie Aussage verifiziert und die Versuche umgehend wiederholt werden. Weiterhin sollten neben Dexamethason auch UPS-Inhibitoren eingesetzt werden und zusätzlich sowohl die Proteinsynthese als auch die Degradierung quantitativ analysiert und erneut mit aktuellen Publikationen verglichen werden. Ebenfalls sollten weitere mögliche Transduktionskaskaden und deren Mechanismen in Betracht gezogen werden. Auch die Auswirkung unterschiedlicher Dexamethason Inhibitoren sollten in den Zellen nochmals überprüft und auch eine Quantifizierung von Ubiquitin erfolgen. Die Ergebnisse sollten mit anderen Glukokortikoiden, wie Cortison und dessen Auswirkung auf die unterschiedlichen Myoblastenspezies, verglichen werden.

## 5 Literaturverzeichnis

1. Mayer TG, Vanharanta H, Gatchel RJ, Mooney V, Barnes D, Judge L, Smith S, Terry A: Comparison of CT scan muscle measurements and isokinetic trunk strength in postoperative patients. *Spine* 1989, 14:33–36.
2. Waddell G: 1987 Volvo award in clinical sciences. A new clinical model for the treatment of low-back pain. *Spine* 1987, 12:632–644.
3. Kelsey JL, White AA, Pastides H, Bisbee GE: The impact of musculoskeletal disorders on the population of the United States. *The Journal of bone and joint surgery. American volume* 1979, 61:959–964.
4. Prof. Dr. P. Schirmacher: Atrophie. [https://eliph.klinikum.uni-heidelberg.de/texte\\_a/12/12-atrophie](https://eliph.klinikum.uni-heidelberg.de/texte_a/12/12-atrophie). Accessed 4 August 2012.
5. Bonaldo P, Sandri M: Cellular and molecular mechanisms of muscle atrophy. *Disease models & mechanisms* 2013, 6:25–39.
6. Hermans G, van den Berghe G: Clinical review: intensive care unit acquired weakness. *Critical care (London, England)* 2015, 19:274.
7. Annane D: What Is the Evidence for Harm of Neuromuscular Blockade and Corticosteroid Use in the Intensive Care Unit? *Seminars in respiratory and critical care medicine* 2016, 37:51–56.
8. Schakman O, Gilson H, Kalista S, Thissen JP: Mechanisms of muscle atrophy induced by glucocorticoids. *Hormone research* 2009, 72 Suppl 1:36–41.
9. McKinnell IW, Rudnicki MA: Molecular mechanisms of muscle atrophy. *Cell* 2004, 119:907–910.
10. Jackman RW, Kandarian SC: The molecular basis of skeletal muscle atrophy. *American journal of physiology. Cell physiology* 2004, 287:C834-43.
11. Marzuca-Nassr GN, Vitzel KF, Mancilla-Solorza E, Márquez JL: Sarcomere Structure: The Importance of Desmin Protein in Muscle Atrophy. *Int. J. Morphol.* 2018, 36:576–583.
12. Hopkins PM: Skeletal muscle physiology. *Continuing Education in Anaesthesia Critical Care & Pain* 2006, 6:1–6.
13. Cohen S, Brault JJ, Gygi SP, Glass DJ, Valenzuela DM, Gartner C, Latres E, Goldberg AL: During muscle atrophy, thick, but not thin, filament components are degraded by MuRF1-dependent ubiquitylation. *The Journal of cell biology* 2009, 185:1083–1095.
14. Alibegovic AC, Højbjerg L, Sonne MP, van Hall G, Alsted TJ, Kiens B, Stallknecht B, Dela F, Vaag A: Increased rate of whole body lipolysis before and after 9 days of bed rest in healthy young men born with low birth weight. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 2010, 298:E555-64.
15. Alibegovic AC, Sonne MP, Højbjerg L, Bork-Jensen J, Jacobsen S, Nilsson E, Faerch K, Hiscock N, Mortensen B, Friedrichsen M, Stallknecht B, Dela F, Vaag A: Insulin resistance induced by physical inactivity is associated with

- multiple transcriptional changes in skeletal muscle in young men. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 2010, 299:E752-63.
16. Bergouignan A, Rudwill F, Simon C, Blanc S: Physical inactivity as the culprit of metabolic inflexibility: evidence from bed-rest studies. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)* 2011, 111:1201–1210.
  17. Brocca L, Cannavino J, Coletto L, Biolo G, Sandri M, Bottinelli R, Pellegrino MA: The time course of the adaptations of human muscle proteome to bed rest and the underlying mechanisms. *The Journal of physiology* 2012, 590:5211–5230.
  18. Chopard A, Hillock S, Jasmin BJ: Molecular events and signalling pathways involved in skeletal muscle disuse-induced atrophy and the impact of countermeasures. *Journal of cellular and molecular medicine* 2009, 13:3032–3050.
  19. Chopard A, Lecunff M, Danger R, Lamirault G, Bihouee A, Teusan R, Jasmin BJ, Marini JF, Leger JJ: Large-scale mRNA analysis of female skeletal muscles during 60 days of bed rest with and without exercise or dietary protein supplementation as countermeasures. *Physiological genomics* 2009, 38:291–302.
  20. Marimuthu K, Murton AJ, Greenhaff PL: Mechanisms regulating muscle mass during disuse atrophy and rehabilitation in humans. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)* 2011, 110:555–560.
  21. Moriggi M, Vasso M, Fania C, Capitanio D, Bonifacio G, Salanova M, Blottner D, Rittweger J, Felsenberg D, Cerretelli P, Gelfi C: Long term bed rest with and without vibration exercise countermeasures: effects on human muscle protein dysregulation. *Proteomics* 2010, 10:3756–3774.
  22. Dolor JP, Cambon B, Vigneron P, Reyne Y, Nouguès J, Casteilla L, Bacou F: Expression of specific white adipose tissue genes in denervation-induced skeletal muscle fatty degeneration. *FEBS letters* 1998, 439:89–92.
  23. Rhen T, Cidlowski JA: Antiinflammatory action of glucocorticoids--new mechanisms for old drugs. *The New England journal of medicine* 2005, 353:1711–1723.
  24. Hasselgren PO: Glucocorticoids and muscle catabolism. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care* 1999, 2:201–205.
  25. Li B-G, Hasselgren P-O, Fang C-H, Warden GD: Insulin-like growth factor-I blocks dexamethasone-induced protein degradation in cultured myotubes by inhibiting multiple proteolytic pathways: 2002 ABA paper. *The Journal of burn care & rehabilitation* 2004, 25:112–118.
  26. Fournier M, Huang Z-S, Li H, Da X, Cercek B, Lewis MI: Insulin-like growth factor I prevents corticosteroid-induced diaphragm muscle atrophy in emphysematous hamsters. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 2003, 285:R34-43.
  27. Löfberg E, Gutierrez A, Wernerman J, Anderstam B, Mitch WE, Price SR, Bergström J, Alvestrand A: Effects of high doses of glucocorticoids on free amino acids, ribosomes and protein turnover in human muscle. *European journal of clinical investigation* 2002, 32:345–353.

#### 4 Ergebnisse und Diskussion

28. Tomas FM, Munro HN, Young VR: Effect of glucocorticoid administration on the rate of muscle protein breakdown in vivo in rats, as measured by urinary excretion of N tau-methylhistidine. *The Biochemical journal* 1979, 178:139–146.
29. Goldberg AL, Tischler M, DeMartino G, Griffin G: Hormonal regulation of protein degradation and synthesis in skeletal muscle. *Federation proceedings* 1980, 39:31–36.
30. Hay N, Sonenberg N: Upstream and downstream of mTOR. *Genes & development* 2004, 18:1926–1945.
31. Bodine SC, Stitt TN, Gonzalez M, Kline WO, Stover GL, Bauerlein R, Zlotchenko E, Scrimgeour A, Lawrence JC, Glass DJ, Yancopoulos GD: Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. *Nature cell biology* 2001, 3:1014–1019.
32. Clarke BA, Drujan D, Willis MS, Murphy LO, Corpina RA, Burova E, Rakhilin SV, Stitt TN, Patterson C, Latres E, Glass DJ: The E3 Ligase MuRF1 degrades myosin heavy chain protein in dexamethasone-treated skeletal muscle. *Cell metabolism* 2007, 6:376–385.
33. Satchek JM, Ohtsuka A, McLary SC, Goldberg AL: IGF-I stimulates muscle growth by suppressing protein breakdown and expression of atrophy-related ubiquitin ligases, atrogin-1 and MuRF1. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 2004, 287:E591-601.
34. Sandri M, Sandri C, Gilbert A, Skurk C, Calabria E, Picard A, Walsh K, Schiaffino S, Lecker SH, Goldberg AL: Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. *Cell* 2004, 117:399–412.
35. Schakman O, Gilson H, Thissen JP: Mechanisms of glucocorticoid-induced myopathy. *The Journal of endocrinology* 2008, 197:1–10.
36. Tintignac LA, Lagirand J, Batonnet S, Sirri V, Leibovitch MP, Leibovitch SA: Degradation of MyoD mediated by the SCF (MAFbx) ubiquitin ligase. *The Journal of biological chemistry* 2005, 280:2847–2856.
37. Foletta VC, White LJ, Larsen AE, Léger B, Russell AP: The role and regulation of MAFbx/atrogin-1 and MuRF1 in skeletal muscle atrophy. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 2011, 461:325–335.
38. Jackson PK, Eldridge AG: The SCF ubiquitin ligase: an extended look. *Molecular cell* 2002, 9:923–925.
39. Glass DJ: PI3 kinase regulation of skeletal muscle hypertrophy and atrophy. *Current topics in microbiology and immunology* 2010, 346:267–278.
40. Latres E, Amini AR, Amini AA, Griffiths J, Martin FJ, Wei Y, Lin HC, Yancopoulos GD, Glass DJ: Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) inversely regulates atrophy-induced genes via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mammalian target of rapamycin (PI3K/Akt/mTOR) pathway. *The Journal of biological chemistry* 2005, 280:2737–2744.
41. Schiaffino S, Mammucari C: Regulation of skeletal muscle growth by the IGF1-Akt/PKB pathway: insights from genetic models. *Skeletal muscle* 2011, 1:4.

#### 4 Ergebnisse und Diskussion

42. Manning BD, Cantley LC: AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* 2007, 129:1261–1274.
43. Zoncu R, Efeyan A, Sabatini DM: mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nature reviews. Molecular cell biology* 2011, 12:21–35.
44. Cohen S, Nathan JA, Goldberg AL: Muscle wasting in disease. *Molecular mechanisms and promising therapies. Nature reviews. Drug discovery* 2015, 14:58–74.
45. Vivanco I, Sawyers CL: The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nature reviews. Cancer* 2002, 2:489–501.
46. Datta SR, Brunet A, Greenberg ME: Cellular survival: a play in three Akts. *Genes & development* 1999, 13:2905–2927.
47. Sandri M: Signaling in muscle atrophy and hypertrophy. *Physiology (Bethesda, Md.)* 2008, 23:160–170.
48. Glass DJ: Skeletal muscle hypertrophy and atrophy signaling pathways. *The international journal of biochemistry & cell biology* 2005, 37:1974–1984.
49. Hanai J-i, Cao P, Tanksale P, Imamura S, Koshimizu E, Zhao J, Kishi S, Yamashita M, Phillips PS, Sukhatme VP, Lecker SH: The muscle-specific ubiquitin ligase atrogin-1/MAFbx mediates statin-induced muscle toxicity. *The Journal of clinical investigation* 2007, 117:3940–3951.
50. Waddell DS, Baehr LM, van den Brandt J, Johnsen SA, Reichardt HM, Furlow JD, Bodine SC: The glucocorticoid receptor and FOXO1 synergistically activate the skeletal muscle atrophy-associated MuRF1 gene. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 2008, 295:E785-97.
51. Smith IJ, Alamdari N, O'Neal P, Gonnella P, Aversa Z, Hasselgren P-O: Sepsis increases the expression and activity of the transcription factor Forkhead Box O 1 (FOXO1) in skeletal muscle by a glucocorticoid-dependent mechanism. *The international journal of biochemistry & cell biology* 2010, 42:701–711.
52. Stitt TN, Drujan D, Clarke BA, Panaro F, Timofeyeva Y, Kline WO, Gonzalez M, Yancopoulos GD, Glass DJ: The IGF-1/PI3K/Akt pathway prevents expression of muscle atrophy-induced ubiquitin ligases by inhibiting FOXO transcription factors. *Molecular cell* 2004, 14:395–403.
53. Stefanetti RJ, Lamon S, Wallace M, Vendelbo MH, Russell AP, Vissing K: Regulation of ubiquitin proteasome pathway molecular markers in response to endurance and resistance exercise and training. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 2015, 467:1523–1537.
54. Centner T, Yano J, Kimura E, McElhinny AS, Pelin K, Witt CC, Bang ML, Trombitas K, Granzier H, Gregorio CC, Sorimachi H, Labeit S: Identification of muscle specific ring finger proteins as potential regulators of the titin kinase domain. *Journal of molecular biology* 2001, 306:717–726.
55. Kedar V, McDonough H, Arya R, Li H-H, Rockman HA, Patterson C: Muscle-specific RING finger 1 is a bona fide ubiquitin ligase that degrades cardiac troponin I. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004, 101:18135–18140.



#### 4 Ergebnisse und Diskussion

56. Nandi D, Tahiliani P, Kumar A, Chandu D: The ubiquitin-proteasome system. *Journal of biosciences* 2006, 31:137–155.
57. Panasenko OO: Identification of ubiquitinated proteins. *MATER METHODS* 2014, 4.
58. Voutsadakis IA: The ubiquitin-proteasome system and signal transduction pathways regulating Epithelial Mesenchymal transition of cancer. *Journal of biomedical science* 2012, 19:67.
59. Petroski MD, Deshaies RJ: Function and regulation of cullin-RING ubiquitin ligases. *Nature reviews. Molecular cell biology* 2005, 6:9–20.
60. Jackson S, Xiong Y: CRL4s: the CUL4-RING E3 ubiquitin ligases. *Trends in biochemical sciences* 2009, 34:562–570.
61. Kapetanaki MG, Guerrero-Santoro J, Bisi DC, Hsieh CL, Rapić-Otrin V, Levine AS: The DDB1-CUL4A/DDB2 ubiquitin ligase is deficient in xeroderma pigmentosum group E and targets histone H2A at UV-damaged DNA sites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2006, 103:2588–2593.
62. Wang H, Zhai L, Xu J, Joo H-Y, Jackson S, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Xiong Y, Zhang Y: Histone H3 and H4 ubiquitylation by the CUL4-DDB-ROC1 ubiquitin ligase facilitates cellular response to DNA damage. *Molecular cell* 2006, 22:383–394.
63. Sugawara K, Okuda Y, Saijo M, Nishi R, Matsuda N, Chu G, Mori T, Iwai S, Tanaka K, Tanaka K, Hanaoka F: UV-induced ubiquitylation of XPC protein mediated by UV-DDB-ubiquitin ligase complex. *Cell* 2005, 121:387–400.
64. Nag A, Bondar T, Shiv S, Raychaudhuri P: The xeroderma pigmentosum group E gene product DDB2 is a specific target of cullin 4A in mammalian cells. *Molecular and cellular biology* 2001, 21:6738–6747.
65. Bosu DR, Kipreos ET: Cullin-RING ubiquitin ligases: global regulation and activation cycles. *Cell division* 2008, 3:7.
66. Zhou W, Wei W, Sun Y: Genetically engineered mouse models for functional studies of SKP1-CUL1-F-box-protein (SCF) E3 ubiquitin ligases. *Cell research* 2013, 23:599–619.
67. Zhou L, Zhang W, Sun Y, Jia L: Protein neddylation and its alterations in human cancers for targeted therapy. *Cellular signalling* 2018, 44:92–102.
68. Skaar JR, Pagan JK, Pagano M: Mechanisms and function of substrate recruitment by F-box proteins. *Nature reviews. Molecular cell biology* 2013, 14:369–381.
69. Bartel DP: MicroRNAs. Genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004, 116:281–297.
70. Bartel DP: MicroRNAs. Target recognition and regulatory functions. *Cell* 2009, 136:215–233.
71. Lee RC, Ambros V: An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science (New York, N.Y.)* 2001, 294:862–864.
72. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V: The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 1993, 75:843–854.

#### 4 Ergebnisse und Diskussion

73. Lewis BP, Burge CB, Bartel DP: Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 2005, 120:15–20.
74. Lewis BP, Shih I-h, Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Burge CB: Prediction of Mammalian MicroRNA Targets. *Cell* 2003, 115:787–798.
75. Mourelatos Z, Dostie J, Paushkin S, Sharma A, Charroux B, Abel L, Rappsilber J, Mann M, Dreyfuss G: miRNPs. A novel class of ribonucleoproteins containing numerous microRNAs. *Genes & development* 2002, 16:720–728.
76. Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, Horvitz HR, Ruvkun G: The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 2000, 403:901–906.
77. Friedman RC, Farh KK-H, Burge CB, Bartel DP: Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome research* 2009, 19:92–105.
78. Kim VN, Han J, Siomi MC: Biogenesis of small RNAs in animals. *Nature reviews. Molecular cell biology* 2009, 10:126–139.
79. Hamilton AJ, Baulcombe DC: A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science (New York, N.Y.)* 1999, 286:950–952.
80. Hammond SM: MicroRNAs as oncogenes. *Current opinion in genetics & development* 2006, 16:4–9.
81. Wightman B, Ha I, Ruvkun G: Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell* 1993, 75:855–862.
82. Griffiths-Jones S: The microRNA Registry. *Nucleic acids research* 2004, 32:D109-11.
83. Griffiths-Jones S, Saini HK, van Dongen S, Enright AJ: miRBase: tools for microRNA genomics. *Nucleic acids research* 2008, 36:D154-8.
84. Bhaskaran M, Mohan M: MicroRNAs: history, biogenesis, and their evolving role in animal development and disease. *Veterinary pathology* 2014, 51:759–774.
85. van Rooij E, Olson EN: MicroRNAs. Powerful new regulators of heart disease and provocative therapeutic targets. *The Journal of clinical investigation* 2007, 117:2369–2376.
86. Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, Lee J, Provost P, Rådmark O, Kim S, Kim VN: The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 2003, 425:415–419.
87. Lund E, Güttinger S, Calado A, Dahlberg JE, Kutay U: Nuclear export of microRNA precursors. *Science (New York, N.Y.)* 2004, 303:95–98.
88. Denli AM, Tops BBJ, Plasterk RHA, Ketting RF, Hannon GJ: Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature* 2004, 432:231–235.
89. Gregory RI, Yan K-P, Amuthan G, Chendrimada T, Doratotaj B, Cooch N, Shiekhattar R: The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature* 2004, 432:235–240.

#### 4 Ergebnisse und Diskussion

90. Callis TE, Chen J-F, Wang D-Z: MicroRNAs in skeletal and cardiac muscle development. *DNA and cell biology* 2007, 26:219–225.
91. Chen J-F, Callis TE, Wang D-Z: microRNAs and muscle disorders. *Journal of cell science* 2009, 122:13–20.
92. Drummond MJ: MicroRNAs and exercise-induced skeletal muscle adaptations. *The Journal of physiology* 2010, 588:3849–3850.
93. Ge Y, Chen J: MicroRNAs in skeletal myogenesis. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* 2011, 10:441–448.
94. Wang XH: MicroRNA in myogenesis and muscle atrophy. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care* 2013, 16:258–266.
95. Wada S, Kato Y, Okutsu M, Miyaki S, Suzuki K, Yan Z, Schiaffino S, Asahara H, Ushida T, Akimoto T: Translational suppression of atrophic regulators by microRNA-23a integrates resistance to skeletal muscle atrophy. *The Journal of biological chemistry* 2011, 286:38456–38465.
96. Buckingham M: Skeletal muscle formation in vertebrates. *Current opinion in genetics & development* 2001, 11:440–448.
97. Parker MH, Seale P, Rudnicki MA: Looking back to the embryo: defining transcriptional networks in adult myogenesis. *Nature reviews. Genetics* 2003, 4:497–507.
98. NAYA F, OLSON E: MEF2: a transcriptional target for signaling pathways controlling skeletal muscle growth and differentiation. *Current Opinion in Cell Biology* 1999, 11:683–688.
99. Perdiguero E, Sousa-Victor P, Ballestar E, Muñoz-Cánoves P: Epigenetic regulation of myogenesis. *Epigenetics* 2009, 4:541–550.
100. Saccone V, Lorenzo Puri P: Epigenetic regulation of skeletal myogenesis. *Organogenesis* 2010, 6:48–53.
101. Chen J-F, Tao Y, Li J, Deng Z, Yan Z, Xiao X, Wang D-Z: microRNA-1 and microRNA-206 regulate skeletal muscle satellite cell proliferation and differentiation by repressing Pax7. *The Journal of cell biology* 2010, 190:867–879.
102. Williams AH, Liu N, van Rooij E, Olson EN: MicroRNA control of muscle development and disease. *Current Opinion in Cell Biology* 2009, 21:461–469.
103. Chen J-F, Mandel EM, Thomson JM, Wu Q, Callis TE, Hammond SM, Conlon FL, Wang D-Z: The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation. *Nature genetics* 2006, 38:228–233.
104. Liu N, Williams AH, Kim Y, McAnally J, Bezprozvannaya S, Sutherland LB, Richardson JA, Bassel-Duby R, Olson EN: An intragenic MEF2-dependent enhancer directs muscle-specific expression of microRNAs 1 and 133. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2007, 104:20844–20849.
105. Rao PK, Kumar RM, Farkhondeh M, Baskerville S, Lodish HF: Myogenic factors that regulate expression of muscle-specific microRNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2006, 103:8721–8726.

#### 4 Ergebnisse und Diskussion

106. Rosenberg MI, Georges SA, Asawachaicharn A, Analau E, Tapscott SJ: MyoD inhibits Fstl1 and Utrn expression by inducing transcription of miR-206. *The Journal of cell biology* 2006, 175:77–85.
107. Zhao Y, Samal E, Srivastava D: Serum response factor regulates a muscle-specific microRNA that targets Hand2 during cardiogenesis. *Nature* 2005, 436:214–220.
108. Kim HK, Lee YS, Sivaprasad U, Malhotra A, Dutta A: Muscle-specific microRNA miR-206 promotes muscle differentiation. *The Journal of cell biology* 2006, 174:677–687.
109. Sun Y, Ge Y, Drnevich J, Zhao Y, Band M, Chen J: Mammalian target of rapamycin regulates miRNA-1 and follistatin in skeletal myogenesis. *The Journal of cell biology* 2010, 189:1157–1169.
110. Dmitriev P, Barat A, Poleskaya A, O'Connell MJ, Robert T, Dessen P, Walsh TA, Lazar V, Turki A, Carnac G, Laoudj-Chenivresse D, Lipinski M, Vassetzky YS: Simultaneous miRNA and mRNA transcriptome profiling of human myoblasts reveals a novel set of myogenic differentiation-associated miRNAs and their target genes. *BMC genomics* 2013, 14:265.
111. Lassar AB, Skapek SX, Novitsch B: Regulatory mechanisms that coordinate skeletal muscle differentiation and cell cycle withdrawal. *Current Opinion in Cell Biology* 1994, 6:788–794.
112. Sabourin LA, Rudnicki MA: The molecular regulation of myogenesis. *Clinical Genetics* 2000, 57:16–25.
113. Weintraub H: The MyoD family and myogenesis: Redundancy, networks, and thresholds. *Cell* 1993, 75:1241–1244.
114. Chargé SBP, Rudnicki MA: Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiological reviews* 2004, 84:209–238.
115. Pownall ME, Gustafsson MK, Emerson CP: Myogenic regulatory factors and the specification of muscle progenitors in vertebrate embryos. *Annual review of cell and developmental biology* 2002, 18:747–783.
116. Yun K, Wold B: Skeletal muscle determination and differentiation: story of a core regulatory network and its context. *Current Opinion in Cell Biology* 1996, 8:877–889.
117. Black BL, Olson EN: Transcriptional control of muscle development by myocyte enhancer factor-2 (MEF2) proteins. *Annual review of cell and developmental biology* 1998, 14:167–196.
118. Schiaffino S, Reggiani C: Myosin isoforms in mammalian skeletal muscle. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)* 1994, 77:493–501.
119. Buckingham M: Myogenic progenitor cells and skeletal myogenesis in vertebrates. *Current opinion in genetics & development* 2006, 16:525–532.
120. Carvajal JJ, Rigby PWJ: Regulation of gene expression in vertebrate skeletal muscle. *Experimental cell research* 2010, 316:3014–3018.
121. Wang L, Chen X, Zheng Y, Li F, Lu Z, Chen C, Liu J, Wang Y, Peng Y, Shen Z, Gao J, Zhu M, Chen H: MiR-23a inhibits myogenic differentiation through down regulation of fast myosin heavy chain isoforms. *Experimental cell research* 2012, 318:2324–2334.

#### 4 Ergebnisse und Diskussion

122. Lin Z, Murtaza I, Wang K, Jiao J, Gao J, Li P-F: miR-23a functions downstream of NFATc3 to regulate cardiac hypertrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2009, 106:12103–12108.
123. Siegel C, Li J, Liu F, Benashski SE, McCullough LD: miR-23a regulation of X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) contributes to sex differences in the response to cerebral ischemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2011, 108:11662–11667.
124. Chhabra R, Dubey R, Saini N: Cooperative and individualistic functions of the microRNAs in the miR-23a~27a~24-2 cluster and its implication in human diseases. *Molecular cancer* 2010, 9:232.
125. Safdar A, Abadi A, Akhtar M, Hettinga BP, Tarnopolsky MA: miRNA in the regulation of skeletal muscle adaptation to acute endurance exercise in C57Bl/6J male mice. *PloS one* 2009, 4:e5610.
126. Wang XH, Hu Z, Klein JD, Zhang L, Fang F, Mitch WE: Decreased miR-29 suppresses myogenesis in CKD. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 2011, 22:2068–2076.
127. Kukreti H, Amuthavalli K, Harikumar A, Sathiyamoorthy S, Feng PZ, Anantharaj R, Tan SLK, Lokireddy S, Bonala S, Sriram S, McFarlane C, Kambadur R, Sharma M: Muscle-specific microRNA1 (miR1) targets heat shock protein 70 (HSP70) during dexamethasone-mediated atrophy. *The Journal of biological chemistry* 2013, 288:6663–6678.
128. Liekens S, Clercq E de, Neyts J: Angiogenesis: regulators and clinical applications. *Biochemical Pharmacology* 2001, 61:253–270.
129. Ortega S, Ittmann M, Tsang SH, Ehrlich M, Basilico C: Neuronal defects and delayed wound healing in mice lacking fibroblast growth factor 2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1998, 95:5672–5677.
130. Nissen NN, Polverini PJ, Koch AE, Volin MV, Gamelli RL, DiPietro LA: Vascular endothelial growth factor mediates angiogenic activity during the proliferative phase of wound healing. *The American Journal of Pathology* 1998, 152:1445–1452.
131. Matsumoto T, Claesson-Welsh L: VEGF receptor signal transduction. *Science's STKE : signal transduction knowledge environment* 2001, 2001:re21.
132. Logie JJ, Ali S, Marshall KM, Heck MMS, Walker BR, Hadoke PWF: Glucocorticoid-mediated inhibition of angiogenic changes in human endothelial cells is not caused by reductions in cell proliferation or migration. *PloS one* 2010, 5:e14476.
133. Deckers MM, Karperien M, van der Bent C, Yamashita T, Papapoulos SE, Löwik CW: Expression of vascular endothelial growth factors and their receptors during osteoblast differentiation. *Endocrinology* 2000, 141:1667–1674.
134. Rissanen TT, Vajanto I, Hiltunen MO, Rutanen J, Kettunen MI, Niemi M, Leppänen P, Turunen MP, Markkanen JE, Arve K, Alhava E, Kauppinen RA, Ylä-Herttuala S: Expression of Vascular Endothelial Growth Factor and

- Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2 (KDR/Flk-1) in Ischemic Skeletal Muscle and Its Regeneration. *The American Journal of Pathology* 2002, 160:1393–1403.
135. Folkman J, Langer R, Linhardt R, Haudenschild C, Taylor S: Angiogenesis inhibition and tumor regression caused by heparin or a heparin fragment in the presence of cortisone. *Science (New York, N.Y.)* 1983, 221:719–725.
  136. Hasan Q, Tan ST, Gush J, Peters SG, Davis PF: Steroid Therapy of a Proliferating Hemangioma: Histochemical and Molecular Changes. *Pediatrics* 2000, 105:117–120.
  137. Hadoke PWF, Iqbal J, Walker BR: Therapeutic manipulation of glucocorticoid metabolism in cardiovascular disease. *British journal of pharmacology* 2009, 156:689–712.
  138. Grosskreutz CL, Anand-Apte B, Dupláa C, Quinn TP, Terman BI, Zetter B, D'Amore PA: Vascular endothelial growth factor-induced migration of vascular smooth muscle cells in vitro. *Microvascular research* 1999, 58:128–136.
  139. Waltenberger J, Claesson-Welsh L, Siegbahn A, Shibuya M, Heldin CH: Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor. *The Journal of biological chemistry* 1994, 269:26988–26995.
  140. Germani A, Di Carlo A, Mangoni A, Straino S, Giacinti C, Turrini P, Biglioli P, Capogrossi MC: Vascular Endothelial Growth Factor Modulates Skeletal Myoblast Function. *The American Journal of Pathology* 2003, 163:1417–1428.
  141. Deasy BM, Feduska JM, Payne TR, Li Y, Ambrosio F, Huard J: Effect of VEGF on the regenerative capacity of muscle stem cells in dystrophic skeletal muscle. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 2009, 17:1788–1798.
  142. Stewart JD, Masi TL, Cumming AE, Molnar GM, Wentworth BM, Sampath K, McPherson JM, Yaeger PC: Characterization of proliferating human skeletal muscle-derived cells in vitro: differential modulation of myoblast markers by TGF-beta2. *Journal of cellular physiology* 2003, 196:70–78.
  143. Landesärztekammer Rheinland-Pfalz: Nutzung von sog. Überschussmaterial in der klinischen Forschung: Regelung mit der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz.
  144. ERTAN AB, KENAR H, BEYZADEOĞLU T, KÖK FN, TORUN KÖSE G: An in vitro human skeletal muscle model: coculture of myotubes, neuron-like cells, and the capillary network. *Turk J Biol* 2017, 41:514–525.
  145. Livak KJ, Schmittgen TD: Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-Delta Delta C(T)</sup> Method. *Methods (San Diego, Calif.)* 2001, 25:402–408.
  146. Jászai J, Corbeil D, Fargeas CA: Comprehensive Overview of CD133 Biology in Neural Tissues across Species, Elsevier, 2015, pp. 113–129.
  147. Sidney LE, Branch MJ, Dunphy SE, Dua HS, Hopkinson A: Concise review: evidence for CD34 as a common marker for diverse progenitors. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 2014, 32:1380–1389.

#### 4 Ergebnisse und Diskussion

148. Srijbos M, van Krimpen B, Debets R, Kraan J, Sleijfer S, Gratama JW, Lamers C: mRNA levels of CD31, CD144, CD146 and von Willebrand factor do not serve as surrogate markers for circulating endothelial cells. *Thromb Haemost* 2010, 104:318–326.
149. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop D, Horwitz E: Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006, 8:315–317.
150. Zhang Y, Boesen CC, Radaev S, Brooks AG, Fridman W-H, Sautes-Fridman C, Sun PD: Crystal Structure of the Extracellular Domain of a Human FcγRIII. *Immunity* 2000, 13:387–395.
151. Nakano A, Harada T, Morikawa S, Kato Y: Expression of leukocyte common antigen (CD45) on various human leukemia/lymphoma cell lines. *Acta pathologica japonica* 1990, 40:107–115.
152. Chen C-W, Corselli M, Péault B, Huard J: Human blood-vessel-derived stem cells for tissue repair and regeneration. *Journal of biomedicine & biotechnology* 2012, 2012:597439.
153. Cerletti M, Molloy MJ, Tomczak KK, Yoon S, Ramoni MF, Kho AT, Beggs AH, Gussoni E: Melanoma cell adhesion molecule is a novel marker for human fetal myogenic cells and affects myoblast fusion. *Journal of cell science* 2006, 119:3117–3127.
154. Chen WCW, Saporov A, Corselli M, Crisan M, Zheng B, Péault B, Huard J: Isolation of blood-vessel-derived multipotent precursors from human skeletal muscle. *Journal of visualized experiments : JoVE* 2014:e51195.
155. LAWSON-SMITH MJ, McGEACHIE JK: The identification of myogenic cells in skeletal muscle, with emphasis on the use of tritiated thymidine autoradiography and desmin antibodies. *J Anatomy* 1998, 192:161–171.
156. Seale P, Sabourin LA, Girgis-Gabardo A, Mansouri A, Gruss P, Rudnicki MA: Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells. *Cell* 2000, 102:777–786.
157. Allen RE, Temm-Grove CJ, Sheehan SM, Rice G: Skeletal muscle satellite cell cultures. *Methods in cell biology* 1997, 52:155–176.
158. Kaufman SJ, Foster RF: Replicating myoblasts express a muscle-specific phenotype. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1988, 85:9606–9610.
159. Lawson-Smith MJ, McGeachie JK: The identification of myogenic cells in skeletal muscle, with emphasis on the use of tritiated thymidine autoradiography and desmin antibodies. *Journal of anatomy* 1998, 192 (Pt 2):161–171.
160. Lazarides E, Hubbard BD: Immunological characterization of the subunit of the 100 A filaments from muscle cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1976, 73:4344–4348.
161. Illa I, Leon-Monzon M, Dalakas MC: Regenerating and denervated human muscle fibers and satellite cells express neural cell adhesion molecule recognized by monoclonal antibodies to natural killer cells. *Annals of neurology* 1992, 31:46–52.

#### 4 Ergebnisse und Diskussion

162. Belles-Isles M, Roy R, Dansereau G, Goulet M, Roy B, Bouchard JP, Tremblay JP: Rapid selection of donor myoblast clones for muscular dystrophy therapy using cell surface expression of NCAM. *European journal of histochemistry* : EJH 1993, 37:375–380.
163. Schubert W, Zimmermann K, Cramer M, Starzinski-Powitz A: Lymphocyte antigen Leu-19 as a molecular marker of regeneration in human skeletal muscle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1989, 86:307–311.
164. Kim M, Sung B, Kang YJ, Kim DH, Lee Y, Hwang SY, Yoon J-H, Yoo M-A, Kim CM, Chung HY, Kim ND: The combination of ursolic acid and leucine potentiates the differentiation of C2C12 murine myoblasts through the mTOR signaling pathway. *International journal of molecular medicine* 2015, 35:755–762.
165. Tiao G, Fagan J, Roegner V, Lieberman M, Wang JJ, Fischer JE, Hasselgren PO: Energy-ubiquitin-dependent muscle proteolysis during sepsis in rats is regulated by glucocorticoids. *The Journal of clinical investigation* 1996, 97:339–348.
166. Zamir O, Hasselgren P-O, Allmen D von, Fischer JE: The effect of interleukin-1 $\alpha$  and the glucocorticoid receptor blocker RU 38486 on total and myofibrillar protein breakdown in skeletal muscle. *Journal of Surgical Research* 1991, 50:579–583.
167. Wang XJ, Xiao JJ, Liu L, Jiao HC, Lin H: Excessive glucocorticoid-induced muscle MuRF1 overexpression is independent of Akt/FoXO1 pathway. *Bioscience reports* 2017, 37.
168. Lecker SH, Jagoe RT, Gilbert A, Gomes M, Baracos V, Bailey J, Price SR, Mitch WE, Goldberg AL: Multiple types of skeletal muscle atrophy involve a common program of changes in gene expression. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2004, 18:39–51.
169. Almon RR, DuBois DC, Yao Z, Hoffman EP, Ghimbovschi S, Jusko WJ: Microarray analysis of the temporal response of skeletal muscle to methylprednisolone: comparative analysis of two dosing regimens. *Physiological genomics* 2007, 30:282–299.
170. Komamura K, Shirota-Ikejima H, Tatsumi R, Tsujita-Kuroda Y, Kitakaze M, Miyatake K, Sunagawa K, Miyata T: Differential gene expression in the rat skeletal and heart muscle in glucocorticoid-induced myopathy: analysis by microarray. *Cardiovascular drugs and therapy* 2003, 17:303–310.
171. Jagoe RT, Redfern CPF, Roberts RG, Gibson GJ, Goodship THJ: Skeletal muscle mRNA levels for cathepsin B, but not components of the ubiquitin-proteasome pathway, are increased in patients with lung cancer referred for thoracotomy. *Clinical science (London, England : 1979)* 2002, 102:353–361.
172. Bodine SC, Latres E, Baumhueter S, Lai VK, Nunez L, Clarke BA, Poueymirou WT, Panaro FJ, Na E, Dharmarajan K, Pan ZQ, Valenzuela DM, DeChiara TM, Stitt TN, Yancopoulos GD, Glass DJ: Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science (New York, N.Y.)* 2001, 294:1704–1708.



#### 4 Ergebnisse und Diskussion

173. Menconi M, Gonnella P, Petkova V, Lecker S, Hasselgren P-O: Dexamethasone and corticosterone induce similar, but not identical, muscle wasting responses in cultured L6 and C2C12 myotubes. *Journal of cellular biochemistry* 2008, 105:353–364.
174. Han D-S, Yang W-S, Kao T-W: Dexamethasone Treatment at the Myoblast Stage Enhanced C2C12 Myocyte Differentiation. *International journal of medical sciences* 2017, 14:434–443.
175. Sacheck JM, Hyatt J-PK, Raffaello A, Jagoe RT, Roy RR, Edgerton VR, Lecker SH, Goldberg AL: Rapid disuse and denervation atrophy involve transcriptional changes similar to those of muscle wasting during systemic diseases. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2007, 21:140–155.
176. Lagirand-Cantaloube J, Offner N, Csibi A, Leibovitch MP, Batonnet-Pichon S, Tintignac LA, Segura CT, Leibovitch SA: The initiation factor eIF3-f is a major target for atrogen1/MAFbx function in skeletal muscle atrophy. *The EMBO journal* 2008, 27:1266–1276.
177. Li H-H, Kedar V, Zhang C, McDonough H, Arya R, Wang D-Z, Patterson C: Atrogen-1/muscle atrophy F-box inhibits calcineurin-dependent cardiac hypertrophy by participating in an SCF ubiquitin ligase complex. *The Journal of clinical investigation* 2004, 114:1058–1071.
178. Lagirand-Cantaloube J, Cornille K, Csibi A, Batonnet-Pichon S, Leibovitch MP, Leibovitch SA: Inhibition of atrogen-1/MAFbx mediated MyoD proteolysis prevents skeletal muscle atrophy in vivo. *PloS one* 2009, 4:e4973.
179. Jogo M, Shiraishi S, Tamura T-a: Identification of MAFbx as a myogenin-engaged F-box protein in SCF ubiquitin ligase. *FEBS letters* 2009, 583:2715–2719.
180. Rommel C, Bodine SC, Clarke BA, Rossman R, Nunez L, Stitt TN, Yancopoulos GD, Glass DJ: Mediation of IGF-1-induced skeletal myotube hypertrophy by PI(3)K/Akt/mTOR and PI(3)K/Akt/GSK3 pathways. *Nature cell biology* 2001, 3:1009–1013.
181. Francetic T, Li Q: Skeletal myogenesis and Myf5 activation. *Transcription* 2011, 2:109–114.
182. Yoshiko Y, Hirao K, Maeda N: Differentiation in C(2)C(12) myoblasts depends on the expression of endogenous IGFs and not serum depletion. *American journal of physiology. Cell physiology* 2002, 283:C1278-86.
183. Shen L, Chen L, Zhang S, Zhang Y, Wang J, Zhu L: MicroRNA-23a reduces slow myosin heavy chain isoforms composition through myocyte enhancer factor 2C (MEF2C) and potentially influences meat quality. *Meat science* 2016, 116:201–206.
184. Teleman AA, Hietakangas V, Sayadian AC, Cohen SM: Nutritional control of protein biosynthetic capacity by insulin via Myc in *Drosophila*. *Cell metabolism* 2008, 7:21–32.
185. Fielitz J, Kim M-S, Shelton JM, Latif S, Spencer JA, Glass DJ, Richardson JA, Bassel-Duby R, Olson EN: Myosin accumulation and striated muscle myopathy result from the loss of muscle RING finger 1 and 3. *The Journal of clinical investigation* 2007, 117:2486–2495.

#### 4 Ergebnisse und Diskussion

186. Blondelle J, Shapiro P, Domenighetti AA, Lange S: Cullin E3 Ligase Activity Is Required for Myoblast Differentiation. *Journal of molecular biology* 2017, 429:1045–1066.
187. Stoyanova T, Roy N, Kopanja D, Bagchi S, Raychaudhuri P: DDB2 decides cell fate following DNA damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2009, 106:10690–10695.
188. Hershko A, Ciechanover A: The ubiquitin system. *Annual review of biochemistry* 1998, 67:425–479.
189. Sultan KR, Henkel B, Terlou M, Haagsman HP: Quantification of hormone-induced atrophy of large myotubes from C2C12 and L6 cells: atrophy-inducible and atrophy-resistant C2C12 myotubes. *American journal of physiology. Cell physiology* 2006, 290:C650-9.
190. Tortorella LL, Pilch PF: C2C12 myocytes lack an insulin-responsive vesicular compartment despite dexamethasone-induced GLUT4 expression. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 2002, 283:E514-24.
191. Yang S, Graham J, Kahn JW, Schwartz EA, Gerritsen ME: Functional Roles for PECAM-1 (CD31) and VE-Cadherin (CD144. in Tube Assembly and Lumen Formation in Three-Dimensional Collagen Gels. *The American Journal of Pathology* 1999, 155:887–895.
192. Ma J, van den Beucken JJJP, Yang F, Both SK, Cui F-Z, Pan J, Jansen JA: Coculture of osteoblasts and endothelial cells: optimization of culture medium and cell ratio. *Tissue engineering. Part C, Methods* 2011, 17:349–357.
193. Newman PJ: The biology of PECAM-1. *The Journal of clinical investigation* 1997, 99:3–8.
194. Jaffe EA, Hoyer LW, Nachman RL: Synthesis of antihemophilic factor antigen by cultured human endothelial cells. *The Journal of clinical investigation* 1973, 52:2757–2764.
195. Zanetta L, Marcus SG, Vasile J, Dobryansky M, Cohen H, Eng K, Shamamian P, Mignatti P: Expression of Von Willebrand factor, an endothelial cell marker, is up-regulated by angiogenesis factors: a potential method for objective assessment of tumor angiogenesis. *International journal of cancer* 2000, 85:281–288.
196. Ozawa CR, Banfi A, Glazer NL, Thurston G, Springer ML, Kraft PE, McDonald DM, Blau HM: Microenvironmental VEGF concentration, not total dose, determines a threshold between normal and aberrant angiogenesis. *The Journal of clinical investigation* 2004, 113:516–527.
197. Degenfeld G von, Banfi A, Springer ML, Wagner RA, Jacobi J, Ozawa CR, Merchant MJ, Cooke JP, Blau HM: Microenvironmental VEGF distribution is critical for stable and functional vessel growth in ischemia. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2006, 20:2657–2659.
198. Marsano A, Maidhof R, Luo J, Fujikara K, Konofagou EE, Banfi A, Vunjak-Novakovic G: The effect of controlled expression of VEGF by transduced

#### 4 Ergebnisse und Diskussion

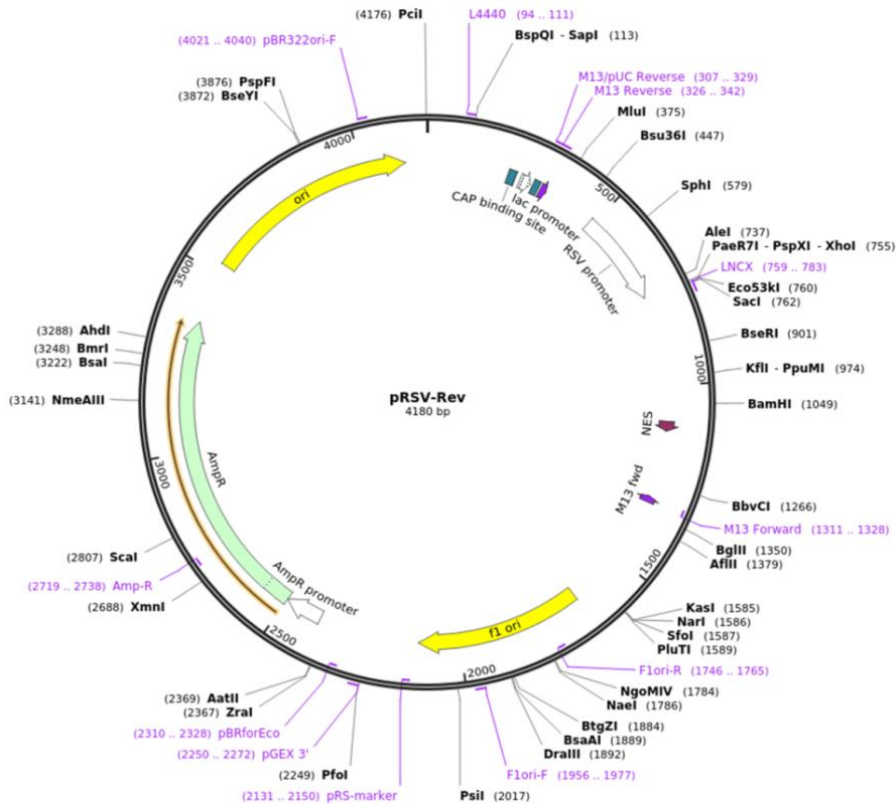
myoblasts in a cardiac patch on vascularization in a mouse model of myocardial infarction. *Biomaterials* 2013, 34:393–401.

199. Nagamori E, Ngo TX, Takezawa Y, Saito A, Sawa Y, Shimizu T, Okano T, Taya M, Kino-oka M: Network formation through active migration of human vascular endothelial cells in a multilayered skeletal myoblast sheet. *Biomaterials* 2013, 34:662–668.

200. Wang J, Morita I, Onodera M, Murota S-I: Induction of KDR expression in bovine arterial endothelial cells by thrombin: involvement of nitric oxide. *Journal of cellular physiology* 2002, 190:238–250.

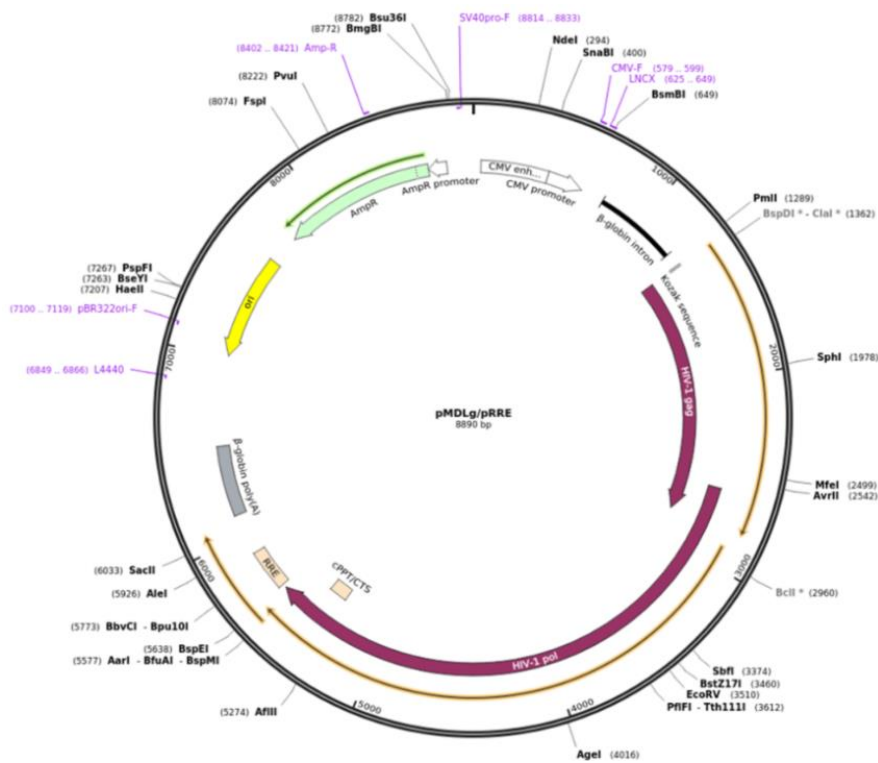
## 6 Anhang

Vektorkarten der Plasmide zur Herstellung lentiviraler Partikel. Die lentiviralen Plasmide gehören zur dritten Generation. Alle Plasmide enthalten eine bakterielle Ampicillin-Resistenz.



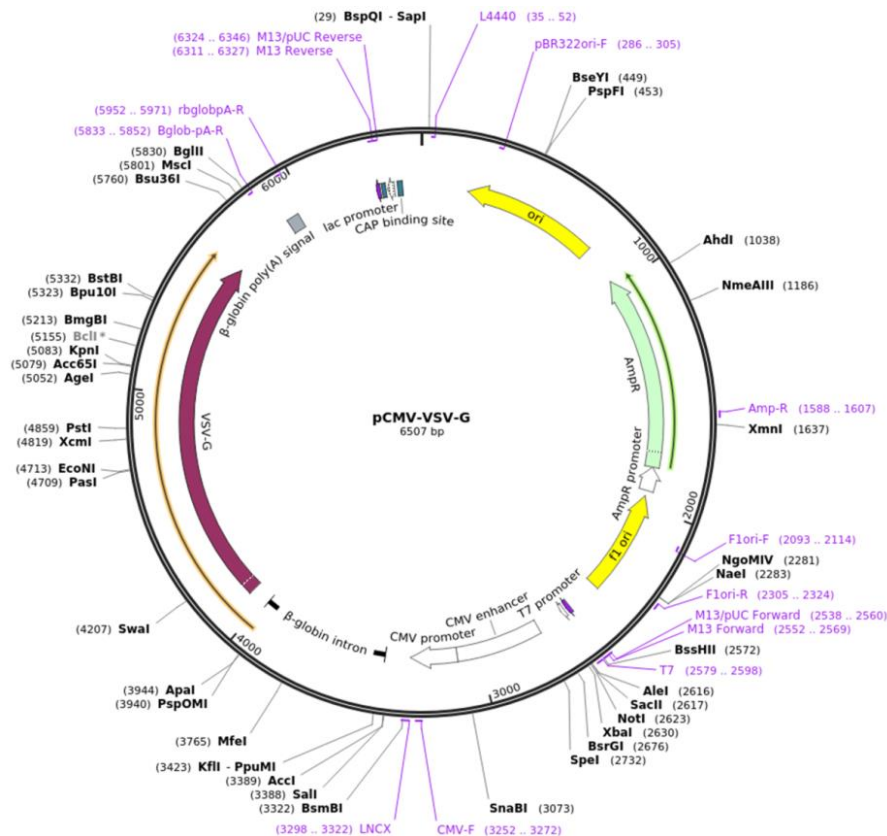
**Abb. 45: pRSV-Rev Verpackungsplasmid.**

Der Plasmid enthält die Rev-Sequenz (regulator of expression of virion proteins) und steht unter der Kontrolle des RSV U3 Promotors. Das regulatorische Gen aktiviert die virale Transkription und reguliert die Expression von gag, pol und env. Rev wird für die HIV-1 Replikation benötigt.



**Abb. 46: pMDLg/pRRE Verpackungsplasmid.**

Der pRRE-Plasmid (rev response element) enthält die Gag-Sequenz und ist für die virale Infektion und den viralen Aufbau zuständig. Sie codiert die viralen Hauptstrukturproteine. Die Pol-Sequenz ist verantwortlich für retroviral-spezifische Enzyme (Protease, Integrase und Reverse Transkriptase). Zuständig für die genomische Integration und die Reverse Transkription. Die RRE Sequenz ist eine Bindungsstelle für das Rev Protein, das den Export der RNA vom Nukleus erleichtert.



**Abb. 47: pCMV-VSV-G Hüllplasmid.**

Das Hüllprotein, aus dem Vesicular stomatis Virus, ist für die Produktion der lentiviralen Partikel zuständig. Es kodiert für verschiedene Proteine (Nukleoprotein, Matrixprotein u.w.), die für die Fusion der viralen Hülle mit der endosomalen Membran verantwortlich sind. Vermittelt die virale Anheftung an der Wirtszelle wo es endozytiert wird.

**Tabelle 6: Verwendete Zellen**

Zellen	Hersteller
C2C12	DSMZ, Braunschweig
HUVEC, Human Umbilical Vein Endothelial Cells	PromoCell GmbH, Heidelberg
HEK 293T (CRL-3216™)	ATCC®, Manassas, USA
Hela	ATCC®, Manassas, USA

**Tabelle 7: Wachstumsmedien**

Myoblasten	HUVEC	HEK 293T	C2C12
DMEM/F-12	EBM-2	DMEM	RPMI 1640
10% FCS	5% FCS	10% FCS	10% FCS
2,5 ng/ml bFGF	EGM™-2 Bullet Kit™		
1% Pen.Strep.		1% Pen.Strep.	1% Pen.Strep.

**Tabelle 8: Differenzierungsmedien**

<b>Myoblasten</b>	<b>C2C12</b>
DMEM/F-12	DMEM/F-12
5% Horse Serum	2% Horse Serum
1% Pen.Strep.	

**Tabelle 9: Transfektionsmedien**

<b>Myoblasten</b>	<b>HEK 293T</b>
DMEM/F-12	DMEM
20% FCS	20% FCS
2,5 ng/ml bFGF	

**Tabelle 10: Transduktionsmedien**

<b>Myoblasten</b>	<b>HUVEC</b>
DMEM/F-12	EBM-2
10% FCS	5% FCS
2,5 ng/ml bFGF	EGM™-2 Bullet Kit™
1% Pen.Strep.	

**Tabelle 11: Kokultur Medien**

<b>Wachstumsmedium Verhältnis 1:1(v/v)</b>	
DMEM/F-12	EBM-2
10% FCS	5% FCS
2,5 ng/ml bFGF	EGM™-2 Bullet Kit™
1% Pen.Strep.	

**Differenzierungsmedium Verhältnis 1:1 (v/v)**

DMEM/F-12	EBM-2
5% Horse Serum	5% FCS
	EGM™-2 Bullet Kit™
1% Pen.Strep.	

**Differenzierungsmedium**

DMEM/F-12
5% Horse Serum
1% Pen.Strep.

**Tabelle 12: Messsysteme, verwendetes Laborequipment**

<b>Equipment</b>	<b>Hersteller</b>
µKüvette G1.0	Eppendorf, Hamburg
5804 R, 5810 R, 5415 C, Zentrifuge	Eppendorf, Hamburg
Autoklav Systec DX-45	Systec GmbH, Wetzlar
Bakterienschüttler	Certomat®H, B. Braun Melsungen AG
Biophotometer	Eppendorf, Hamburg
Eismaschine, 083817	ZIEGRA Eismaschinen GmbH, Isernhagen
Electrophorese power supply, Consort EV231	Consort bvba, Turnhout, Belgien
Elektrophorese System, PerfectBlue™ horizontal Mini Gel System, 40-0911	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen Carlsbad, USA

Elektrophorese Kammer, Transferkammer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
EVOS® Digital Inverted Microscope	Life Technologies, Carlsbad, USA
Flow cytometer, accuri® C6 Flow cytometer, C. Sampler®	Accuri Cytometers Inc., Ann Arbor, USA
GloMax® Multidetector System	Promega, Madison, USA
Heißluftsterilisator: Typ FD 115	WTC-Binder, Tuttlingen
Heizplatte, 13800	Medax Nagel GmbH, Kiel
Heraeus Fresco 17, Zentrifuge	Thermo Scientific, Waltham, USA
Imaging System, Gel logic 2200	Eastman Kodak Company, Rochester, USA
Inkubator, HERAcell 240	Heraeus Thermo Scientific, Waltham, USA
Kryoboxen, Cryo 1C	NUNC International, Rochester, USA
Magnetrührer, Heidolph MR Hei-Mix-S	Heidolph Instruments, Schwabach
Magnetrührer, IKA RET basic, IKA RO 5 power	IKA® Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Mikroliterpipetten, 10 µl/200 µl/1000 µl	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Mikroliterpipetten, 2,5 µl/5 µl/10 µl/100 µl/200 µl/1000 µl	Eppendorf, Hamburg
Mikroskop Wilovert®, 202888 inverted	Helmut Hund GmbH, Wetzlar
Mini Zentrifuge, Spectrafuge, 3-1810	neoLab® Migge GmbH, Heidelberg
Mini Zentrifuge, Sprout®, 12V	Heathrow Scientific®, Vernon Hills, USA
Neon™ Transfektions System	Invitrogen™ Life Technologies, Carlsbad, USA
ODYSSEY Sa	LI-COR®, Lincoln, USA
pH-Meter, Sartorius PB-11	Sartorius AG, Göttingen
QIAxcel Advanced	Qiagen, Hilden
qTOWER³G	Analytik Jena AG, Jena
Real-Time PCR System 7300	Applied Biosystems, Foster City, USA
Sicherheitswerkbank, NuAIRE™ Biological safety cabinets, NU-440-600E, class II	NuAire, Plymouth, USA
SpectraMax® 384	Molecular Devices, LLC, Sunnyvale, USA
Stepper/Repetitive pipette, HandyStep® electronic	BRAND GmbH & Co. KG, Wertheim
Stickstofftank, Container, Arpege 110	Air Liquide S.A., Paris, Frankreich
Thermocycler, peqSTAR 2x Gradient	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Thermomixer	Thermomixer comfort Eppendorf, Hamburg
Vakuumpumpe, BVC21 NT Vario	Vacuubrand, GmbH & Co KG, Wertheim
Vortex Mixer, IKA® MS 3 digital	IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Waagen	Sartorius, Göttingen
Wasserbad E100	LAUDA Scientific GmbH, Lauda- Königshofen



Cell counter, Luna™ automated cell counter, L10001	Nexcelom Bioscience LLC, Lawrence, USA
--	--

**Tabelle 13: Software**

<b>Software</b>	<b>Hersteller</b>
Adobe Photoshop CS6	Adope System Software Ireland Limited, Dublin, Irland
BD Accuri™ C6 / CSampler™ Software, Ink. 1.0.264.21	BD Bioscience, Heidelberg
Citavi 5.6	Swiss Academic Software GmbH, Wädenswil, Schweiz
Image Studio 3.1	LI-COR®, Lincoln, USA
Microsoft Office ProPlus 365, Word, Excel, Power Point Version 2016	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Primer3web, Version 4.0.0	Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge, USA
Python, 3.7.0	Python Software Foundation, Wilmington, Delaware, USA
QIAxcel® Screen Gel Software Version 1.0.2	Qiagen, Hilden
qPCR software 3.4.6.0	Analytik Jena AG, Jena
Sequence detection software 1.4, AB 7300 System	Applied Biosystems, Foster City, USA
SoftMax Pro Software	Molecular Devices, LLC, Sunnyvale, USA
SPSS Statistics Version 24	IBM® Deutschland GmbH, Ehningen

**Tabelle 14: Verbrauchsmaterialien, Einmalartikel**

<b>Material</b>	<b>Hersteller</b>
Adhäsionsfolie, Micro Amp PCR	Applied Biosystems, Foster City, USA
Combitips advanced® Biopur®, 1 ml / 5 ml / 10 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Disposable hypodermic needle Sterican®, 0.45 x 25 mm, 26G	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Einmalpipetten Cellstar®, 2 ml / 5 ml / 10 ml / 25 ml / 50 ml	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich
Einmalpipetten COSTAR®, 2 ml / 5 ml / 10 ml / 25 ml / 50 ml	Corning Inc., Corning, USA
Einmalskalpelle Fig. 11, 15, 23,	FEATHER® Safety Razor Co., Osaka, Japan
Eppendorf Reaktionsgefäße, 0,5 ml/1,5 ml/2 ml/5 ml	Eppendorf, Hamburg
Gel Blotting Papier	Schleicher & Schuell Bioscience GmbH, Dassel
Human VEGF, DuoSet® ELISA DEVELOPMENT SYSTEM	R&Dsystems™ Inc., Minneapolis, USA
KIMTECH Science Kimwipes, white	Kimberly-Clark Professional, Roswell, USA
Messröhrchen	PS-Röhrchen GLKL, GreinerBio-One, Kremsmünster, Österreich
Mikroplatten, 96-Loch, F-bottom	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich

Minisart® high flow syringe filter, 0,22 µM, Polyethersulfon	Sartorius Stedim Biotec SA, Göttingen
Nalgene® Kryoröhrchen	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Nitrocellulosemembran, 0,45 µm	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Pasteurpipetten, 150 mm/230 mm	Carl-Roth® GmbH, Karlsruhe
PCR 8-Well Tube Strips und Deckel	VWR® International Radnor, USA
Petrischalen	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich
Pipettenspitzen, TipOne® 10 µl/200 µl/1000 µl	STARLAB International GmbH, Hamburg
Filterspitzen 10 µl/200 µl/1000 µl XL	
Plastikröhrchen, Cellstar®15 ml/50 ml	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich
QIAshredder	Qiagen GmbH, Hilden
SemiSkirted 96 well PCR Platten	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Spritzen Discardit™ II, 5 ml/10 ml	Becton Dickinson S.A., Fraga, Spain
Spritzen Injekt®-F, 1 ml/3 ml	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Sterilfilter, 70 µm Nylon Filter	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
Zellkulturflaschen, 25 cm <sup>2</sup> /75 cm <sup>2</sup> /175 cm <sup>2</sup>	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich
Zellkulturplatten, Cellstar® 24-Loch/6-Loch/96-Loch	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich
Zellzählkammern, Luna™ Cell Counting Slide	Nexcelom Bioscience LLC, Lawrence, USA

**Tabelle 15: Feste/flüssige Chemikalien/Lösungen**

<b>Substanz</b>	<b>Hersteller</b>
2-Propanol Rotipuran®	Carl-Roth® GmbH, Karlsruhe
4you4 dNTPs Mix (10 mM)	BIORON GmbH, Ludwigshafen
Accutase® Solution	Sigma-Aldrich® GmbH, St. Louis, USA
Agar-Agar, Kobe I	Carl-Roth® GmbH
Agarose, electrophoresis grade	Invitrogen™ Life Technologies, Carlsbad, USA
AlamarBlue® cell viability reagent	Gibco® Invitrogen™ Life Technologies, Carlsbad, USA
Ampicillin	AppliChem GmbH, Darmstadt
APS	Carl-Roth® GmbH, Karlsruhe
Aqua ad injectabilia	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Bacto™ Tryptone	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
Bovine Serum Albumin (BSA), 30%	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Collagen Type I, Rat tail, 3,59 mg/ml	CORNING®, Discovery Labware, Amsterdam, Niederlande
Collagenase Type II	Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, USA
cOmplete Tablets, EDTA-free, Protease Inhibitor	Roche, Basel, Schweiz

Coomassie® Brillantblau R-250 (C.I. 42660)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Destilliertes Wasser Aqua dest. Spüllösung	B. Braun Melsungen AG
Dexamethason	Sigma-Aldrich® GmbH, St. Louis, USA
Dimethylsulfoxid, (DMSO) Hybrid-MAX	Sigma-Aldrich® GmbH, St. Louis, USA
Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM/F-12)(1:1) + GlutaMAX	Gibco®, Invitrogen™ Life Technologies, Carlsbad, USA
Dulbecco's Modified Eagle Medium DMEM, high glucose, pyruvate	Gibco®, Invitrogen™ Life Technologies, Carlsbad, USA
Dulbecco's phosphate buffered saline, [-] CaCl <sub>2</sub> , [-] MgCl <sub>2</sub> ,	Gibco® Invitrogen™ Life Technologies, Carlsbad, USA
EBM-2, EGM™-2 Bullet Kit™	LONZA, Basel, Schweiz
Eisessig	Carl-Roth® GmbH, Karlsruhe
Ethanol absolute	AppliChem GmbH, Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Fetales Kälberserum (FCS), Fetal Calf Serum (FCS)	Biochrom GmbH, Berlin
FGF2/bFGF (human)	BPS Bioscience, San Diego, USA
Glycerin 87%	AppliChem GmbH, Darmstadt
Glycerol	Sigma-Aldrich® GmbH, St. Louis, USA
Glycin	AppliChem GmbH, Darmstadt
Hefeextrakt	Carl-Roth® GmbH, Karlsruhe
Hoechst Färbelösung	Sigma-Aldrich® GmbH, St. Louis, USA
Human Basis Fibroblast-Growth-Factor	Sigma-Aldrich® GmbH, St. Louis, USA
Kanamycin 10 mg/ml	Sigma-Aldrich® GmbH, St. Louis, USA
Ladepuffer, 6x	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Methanol	Carl-Roth® GmbH, Karlsruhe
M-MuLV Reverse Transcriptase	M0253S New England Biolabs, Ipswich, USA
Natriumchlorid	AppliChem GmbH, Darmstadt
Paraformaldehyd	Gibco® Invitrogen™ Life Technologies, Carlsbad, USA
Penicillin Streptomycin, 10,000 U/ml Penicillin; 10,000 µg/ml Streptomycin	Gibco®, Life Technologies, Grand Island, USA
Pferdeserum (HS), Horse Serum	Biochrom GmbH, Berlin
PhosSTOP, Phosphatase Inhibitor	Roche, Basel, Schweiz
Ponceau S	Sigma-Aldrich® GmbH, St. Louis, USA
PowerUp™ SYBR® green master mix, 2x	Applied Biosystems, Foster City, USA
Protaminsulfat	Sigma-Aldrich® GmbH, St. Louis, USA
Puromycin 10 mg/ml	InvivoGen, San Diego, USA
Random primers, 500 µg/ml, 20 µg	Promega, Madison, WI, USA
RNase freies Wasser	Qiagen, Hilden
Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1)	Carl-Roth® GmbH, Karlsruhe
SDS Ultra Pure	Carl-Roth® GmbH, Karlsruhe
β-Mercaptoethanol	AppliChem GmbH, Darmstadt
β-Mercaptoethanol	Carl-Roth® GmbH, Karlsruhe

SYBR® Safe DNA gel stain, 10,000x concentrate	Gibco®Invitrogen™ Life Technologies, Carlsbad, USA
TEMED	Carl-Roth® GmbH, Karlsruhe
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	AppliChem GmbH, Darmstadt
Triton™ X-100	Sigma-Aldrich®GmbH, St. Louis, USA
Trypanblau, Trypan Blue Stain, (0,4%)	Gibco®Invitrogen™ Life Technologies, Carlsbad, USA
Trypsin/EDTA 0,25%/0,02% in PBS	Biochrom GmbH, Berlin
Trypsin/EDTA Solution; 0,25%/0,02%	Biochrom GmbH, Berlin
Tween®20	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA

**Tabelle 16: Komplettsysteme & Kits**

<b>Kit</b>	<b>Hersteller</b>
AllPrep DNA/RNA/miRNA Universal Kit	Qiagen, Hilden
BD Accuri™C6 Flow Cytometer Fluid Kit	BD, Heidelberg
DC™ Protein Assay Reagent B, A, S Protein Assay Standard II	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA
EndoFree® Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
jetPRIME®transfection reagent	Polyplus transfection® SA, Illkirch-Graffenstaden, Frankreich
miScript II RT Kit	Qiagen, Hilden
miScript SYBR® Green PCR Kit, miScript Primer Assay	Qiagen, Hilden
NEB 5-alpha Competent <i>E. coli</i> (High Efficiency)	New England Biolabs, Ipswich, USA
Neon™ Transfection Kit, 10 µL	Invitrogen™ Life Technologies, Carlsbad, USA
peqGold Micro Spin Total RNA Kit	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
peqGold Total RNA Kit	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
QIAprep® Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
QIAxcel DNA Screening Kit	Qiagen, Hilden
RIPA-Puffer	Sigma-Aldrich®GmbH, St. Louis, USA
RNase-freies DNase Set (50)	Qiagen, Hilden
Ubiquitin E3 Ligase Complex Antibody Sampler Kit	Cell Signaling Technology®, Danvers, USA

**Tabelle 17: Molekulargewichtsmarker & Längenstandards**

<b>Marker</b>	<b>Hersteller</b>
Page Ruler™ Plus, Pre-stained Protein Ladder	Invitrogen™ Life Technologies, Carlsbad, USA
Chameleon™ Duo, Pre-stained Protein Ladder	LI-COR®, Lincoln, USA
peqGold DNA 100 bp DNA-Leiter	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
QxAlignment Marker 15 bp/1 kb	Qiagen, Hilden
QxDNA Size Marker 50-800 bp v2.0	Qiagen, Hilden

**Tabelle 18: Verwendete Vektoren**

Vektoren	Hersteller
pCMV-VSV-G, #8454	Addgene, Watertown, USA
pMDLg/pRRE, #12251	Addgene, Watertown, USA
pRSV-Rev, #12853	Addgene, Watertown, USA
LentimiRa-GFP-hsa-miR-23a, mh11068	Applied Biological Materials (abm) Inc. Vancouver, Kanada

**Tabelle 19: QuantiTect® Primer/Qiagen**

Primer	Cat. Nummer
Hs_miR-23a_2	MS00031633
Control_EGFP_1_SG	QT01171611
Hs_RNU6-2	MS00033740

**Tabelle 20: Primer Sequenzen/Eurofins Genomics**

Gen	Spezies	Sequenz
GAPDH	hs	FW cgaccactttgtcaagctca RV aggggagattcagtggtg
Myf5	hs	FW tgcccgaatgtaacagtct RV ggaactagaagcccctggag
MyoD	hs	FW ggggctaggttcagcttct RV gctctggcaaagcaactct
MyoG	hs	FW gccagactatccccttctc RV gaggccgcgttatgataaaa
Myosin	hs	FW ggcaaaacggaaggagctag RV tcttctcctcctcagctct
CD31	hs	FW cattggcgtgttggaagaa RV gctcatgtttgcctagctcc
Foxo3	hs	FW agccagtctatgcaaacct RV ccaaccatcagcatccatg
MAFbx	hs	FW cgtttcactttcaccagg RV actgcatttctcccctcaa
MuRF-1	hs	FW gagccaccttctcttgact RV tgggtccttctcctccc
mTOR	hs	FW cctgcctttgtcatgcctt RV ctgggttgatcagggctct
Akt	hs	FW aggctgggtgaaagttaa RV ttcttgggtcagttcgtgg
vWF	hs	FW ggattcagtgatgcagcag RV tagggaggctctcgattcgc
KDR	hs	FW ttacttcaggggacagagg RV ttcccggtagaagcactgt

**Tabelle 21: Antikörper**

<b>Antikörper</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Hersteller</b>
Alexa Fluor® 568, ab175702	1:200	Abcam, Cambridge, GB
Alexa-Fluor 488® goat anti-mouse IgG (H+L), A11001	1:200	Invitrogen™ Life Technologies, Carlsbad, USA
Alexa-Fluor 488® goat anti-rabbit IgG (H+L), A11008	1:200	Invitrogen™ Life Technologies, Carlsbad, USA
Anti-Fibroblast Surface Protein [1B10] (ab11333)	1:500	Abcam, Cambridge, GB
beta-Actin, PA1-183	1:200	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
CD31, ab28364	1:50/1:500	Abcam, Cambridge, GB
Cy™3-conjugated donkey Anti-Goat IgG (H+L) 705-165-003	1:450	Jackson Immuno Research Laboratories, Inc, West Grove, USA
Desmin, ab15200	1:250	Abcam, Cambridge, GB
eGFP, ab111258	1:500	Abcam, Cambridge, GB
FKHRL1 (D-12): sc-48348	1:100	Santa Cruz Biotechnology, Texas, USA
GAPDH	1:10.000	Acris Antibodies GmbH, Herford
Human Smooth Muscle Actin Clone 1A4 M 0851	1:50	Dako Cytomation, Hamburg
IRDye® 800CW Goat Anti-Mouse, Anti-rabbit IgG (H+L) LI-COR	1:10.000	LI-COR®, Lincoln, USA
IRDye® 650RD Goat Anti-Mouse, Anti-rabbit IgG (H+L) LI-COR	1:10.000	LI-COR®, Lincoln, USA
IRDye® 800CW Donkey anti-Goat (H+L) LI-COR	1:10.000	LI-COR®, Lincoln, USA
Monoclonal mouse IgG2a/FITC Clone: RPC 5	1:200	Ancell™ Immunology Research Products, Bayport, USA
MuRF-1 (C-11): sc-398608	1:100	Santa Cruz Biotechnology, Texas, USA
Myf5 (M-18): sc-31949	1:100	Santa Cruz Biotechnology, Texas, USA
MyoD (M-318): sc-760	1:150	Santa Cruz Biotechnology, Texas, USA
Pax7, ab199010	1:200	Abcam, Cambridge, GB
Skeletal Muscle Myosin (F59): sc-32732	1:200	Santa Cruz Biotechnology, Texas, USA
β-Actin, Clone AC15, 5441	1:10.000	Sigma-Aldrich®GmbH, St. Louis, USA
Vinculin, V9131	1:400	Sigma-Aldrich®GmbH, St. Louis, USA
Von-Willebrand-Faktor, ab6994	1:100	Abcam, Cambridge, GB

**Tabelle 22: Antikörper Durchflusszytometrie**

<b>Antikörper</b>	<b>Hersteller</b>
Mouse IgG1-FITC	MACS <sup>®</sup> , Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
Mouse Anti-Human CD3/CD14/CD19 FITC	MACS <sup>®</sup> , Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
CD11b APC human	MACS <sup>®</sup> , Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
CD34 FITC human	MACS <sup>®</sup> , Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
Mouse IgG1-APC	MACS <sup>®</sup> , Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
CD105 APC human	MACS <sup>®</sup> , Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
CD16 APC human	MACS <sup>®</sup> , Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
CD31 APC human	MACS <sup>®</sup> , Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
CD45 APC human	MACS <sup>®</sup> , Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
CD34 APC human	MACS <sup>®</sup> , Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
CD146 APC human	MACS <sup>®</sup> , Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
CD144 APC human	MACS <sup>®</sup> , Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach

## Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Eva Langendorf, dass die vorgelegte Dissertation von mir selbstständig, ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel, angefertigt wurde. Alle von mir benutzten Veröffentlichungen, ungedruckten Materialien, sonstige Hilfsmittel sowie Textstellen, die ich wörtlich oder inhaltlich aus gedruckten oder ungedruckten Arbeiten übernommen habe, habe ich als solche gekennzeichnet und mit den erforderlichen bibliographischen Angaben nachgewiesen. Unterstützungsleistungen, die ich von anderen Personen erhalten habe, wurden in der Dissertationsschrift als solche benannt.

Die Dissertation wurde bei keiner anderen Fakultät oder einem anderen Fachbereich vorgelegt, weder im In- noch im Ausland. Überdies bin ich nicht im Besitz eines anderen Doktorgrades. Ein bisher erworbener Doktorgrad wurde mir nicht aberkannt. Ich habe bisher kein Promotionsverfahren erfolglos beendet. Mir ist bekannt, dass die Zulassung zur Promotion zu versagen ist, wenn die Unterlagen unvollständig oder die Angaben unrichtig sind. Ich bin darüber informiert, dass ich zur Führung des Dokortitels erst mit Aushändigung der Promotionsurkunde berechtigt bin.

Mainz 2019

Eva Langendorf