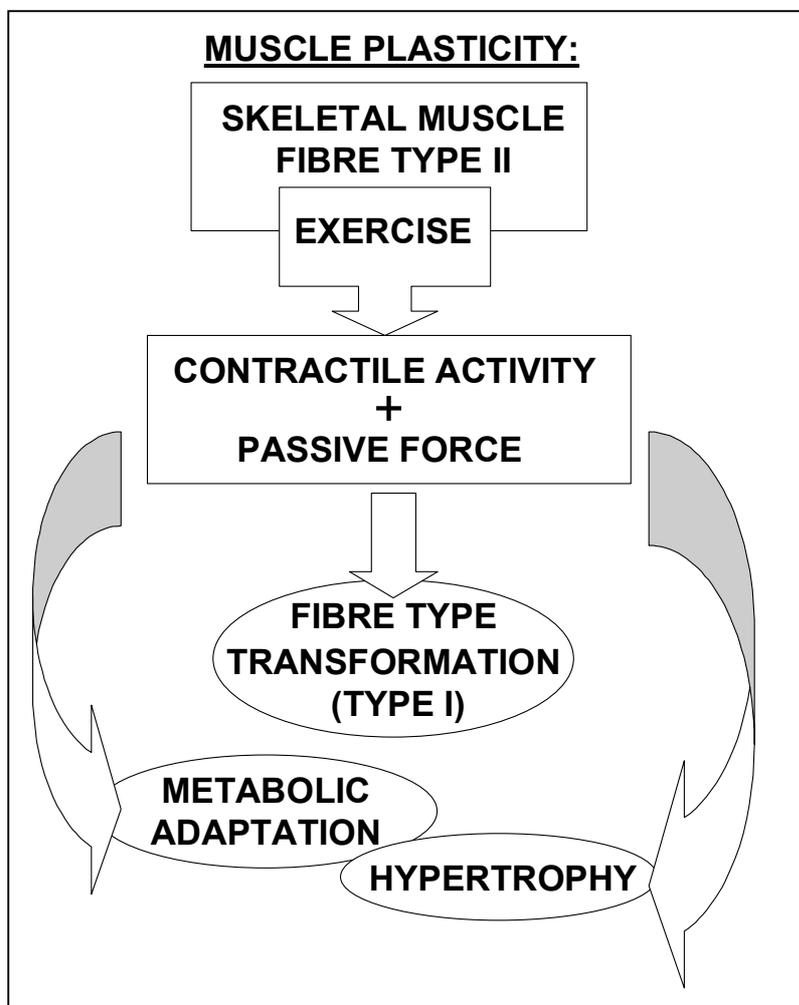
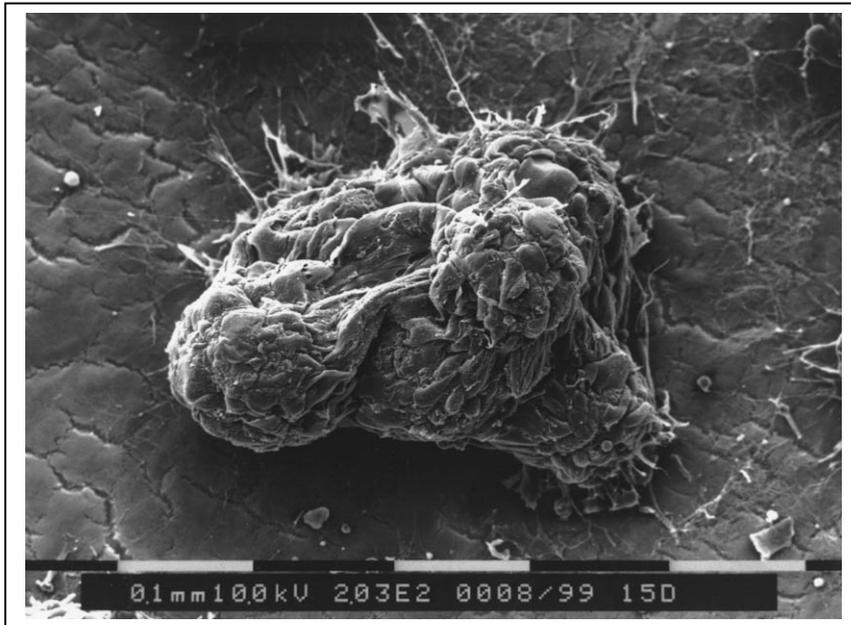


## Projekt: Muskelplastizität

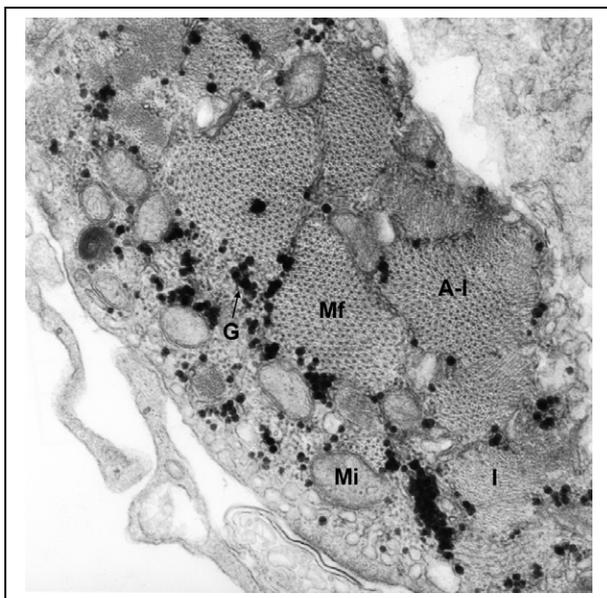
Adulte Skelettmuskelzellen sind als enddifferenzierte Zellen nicht mehr in der Lage sich zu teilen. Trotzdem besitzen sie eine ausgeprägte Fähigkeit, auf Belastungen, beispielsweise muskuläres Training, mit einer Änderung der Expression von kontraktilen Proteinen und metabolischen Enzymen zu reagieren. Dieses kann zu einem Wechsel des Muskelfasertyps (z.B. vom schnell kontrahierenden, schnell ermüdenden Fasertyp II zum langsam kontrahierenden, ermüdungsresistenten Fasertyp I,) oder auch zur Hypertrophie der Zellen führen. Die unterschiedlichen Stimuli, die während der Belastung auf die Muskelzellen wirken (z.B. passive mechanische Kräfte, Ionenströme an der Zellmembran, erniedrigter Sauerstoffpartialdruck, Wachstumsfaktoren und vieles andere) müssen von der Zelle in Signaltransduktionswege umgesetzt und integriert werden, die dann die Transkription von Genen und die Translation steuern. Beispielsweise führt wiederholtes kurzzeitiges Training mit hohen Gewichten zu einer Hypertrophie der schnellen, leicht ermüdbaren Typ II Fasern, langandauerndes Training mit niedriger Belastungsintensität zu einer stärkeren Vermehrung von langsamen, ermüdungsresistenten Typ I Fasern. Wie Muskelzellen die bei Belastung auftretenden Stimuli in spezifische Genaktivität umsetzen, ist nur sehr unvollständig bekannt. Das Ziel unseres Projektes "Muskelplastizität" ist die Aufklärung der Signalwege, die die Entscheidung über die Expression der Fasertypen (langsam oder schnell) oder über die Entwicklung einer Hypertrophie treffen.



Wir verwenden für unsere Untersuchungen ein Zellkulturmodell des adulten schnellen Muskelfasertyps (Kubis et al. 1997). Hierbei werden aus Myoblasten sich entwickelnde Muskelzellen vom Kaninchen in primärer Kultur auf Microcarriern über mehrere Wochen gezüchtet. Diese Zellen können durch Elektrostimulation, passive mechanische Kräfte oder verändertes Substratangebot zu Änderungen ihrer Genaktivität veranlaßt werden.



*Abb. 1: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von Muskelzellen auf Microcarriern.*



*Abb. 2: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Querschnittes einer Muskelzelle auf Microcarrier. Mi, Mitochondrium; I, Actinfilamente im I-Band; Mf, Myofibrille; A-I, Actin und Myosinfilamente im A-I-Band; G, Glykogen.*

### a) Fast-to-slow Transformation

Bei diesem Projekt wurden Skelettmuskelzellen auf Microcarriern durch Elektrostimulation mit unterschiedlichen Reizmustern belastet. Hierbei konnte erstmals gezeigt werden, dass durch die bei der Elektrostimulation induzierten Calciumtransienten die Proteinphosphatase Calcineurin via Calcium-Calmodulin aktiviert werden kann und dadurch der Transkriptionsfaktor NFATc1 dephosphoryliert wird. Die Dephosphorylierung von NFATc1 ermöglicht dessen Kernimport, der dann zur Aktivierung von Genen des langsamen Fasertyps I, z.B. des Myosins I  $\beta$ , führt. Durch bestimmte Kombinationen von Reizmustern, die Stimulations- und Ruhephasen enthalten, kann der Kernimport von NFATc1 langfristig und über die Ruhephasen hinweg anhaltend aufrechterhalten werden und somit der langsame Fasertyp I stabilisiert bzw. induziert werden. Bei Reizmustern, die aus kurzen Stimulationszeiten und längeren Ruhephasen bestehen, wird kein Kernimport von NFATc1 erreicht und es kommt umgekehrt zur Stabilisierung des schnellen Fasertyps II (Meißner et al. 2000; Kubis et al. 2001; Kubis et al. 2002).

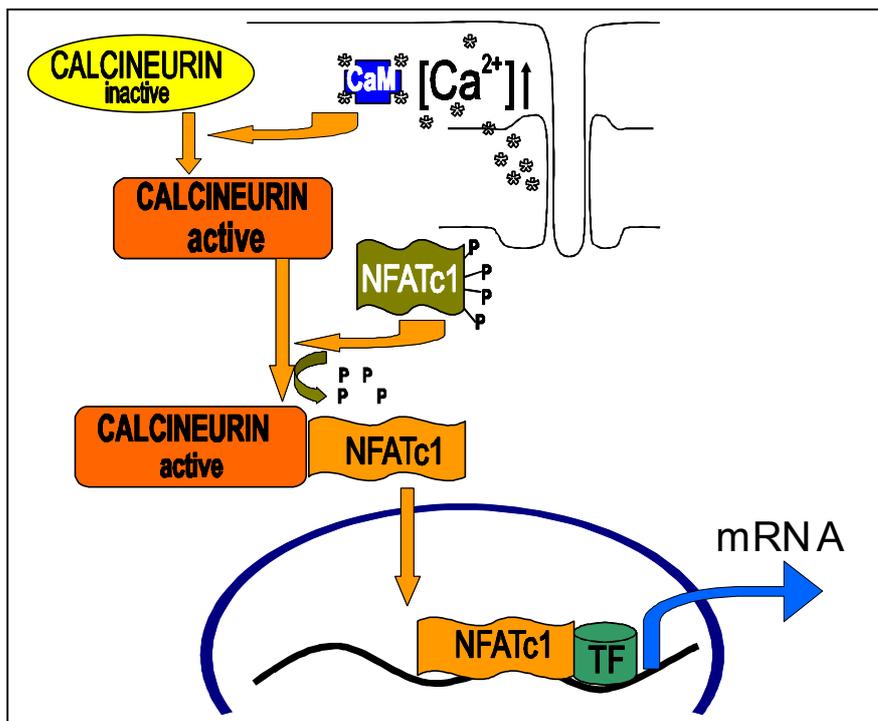


Abb. 3: Schema der Signaltransduktion bei der Induktion der Gene kontraktiver Proteine des langsamen Fasertyps I.

Gegenwärtig wird mit Hilfe von Promotorassays des langsamen Typ I Myosins (MHC I) und des schnellen Typ II Myosins (MHC II) untersucht, welche Transkriptionsfaktoren zusätzlich zu NFATc1 die Transkription dieser beiden wichtige Myosinisoformen regulieren. Hierfür werden die Skelettmuskelzelllinie C2C12 und Satellitenzellkulturen verwendet, um darin verschiedene

Transkriptionsfaktoren zu exprimieren, wie etwa MEF2, MyoD oder Mutanten von NFATc1.

Zusätzlich wird der Einfluss verschiedener Signaltransduktionswege, wie z.B. des P38-MAP-kinase- oder Ras-MAP-kinase-Wegs auf die Genexpression von MHCII und MHCI untersucht, die möglicherweise mit an Fasertypdifferenzierung beteiligt sind. Insbesondere wird die Wirkung von aktiviertem Ras auf die Promotoraktivität von MHC I und II in Satellitenzellkulturen untersucht, welches, wie von Schiaffino et al. (2001) berichtet, einen starken Einfluss auf die Expression des langsamen Fasertyps haben soll. Hierbei wird durch Hemmung verschiedener Signalwege, in die Ras eingeflochten ist, überprüft, welche Signaltransduktionswege die Wirkung von Ras auf MHCI und II vermitteln.

## b) Metabolische Adaptation

Während der Anpassung der Muskelzellen an Belastungen (muskuläres Training), kommt es im Rahmen einer Fasertypumwandlung nicht nur zu einem Wechsel der Isoformen kontraktile Proteine wie Myosin, sondern auch zur Zunahme der Kapazität des oxidativen und zur Abnahme der Kapazität des anaerob-glykolytischen Stoffwechsels. Die Signalwege, die zu der gegenläufigen Anpassung von mitochondrialem Stoffwechsel, also oxidativer Kapazität, und von anaerober Glykolyse während einer Fasertransformation von Typ II zu Typ I führen, sind nicht bekannt. Sicher ist nur, dass diese Signale nicht Teil der Signaltransduktionswege für die kontraktile Proteine (Calcineurin-NFATc1) sind, da wir zeigen konnten, dass die Umwandlung des kontraktile Apparates auch ohne metabolische Anpassung erfolgen kann und die metabolische Anpassung nicht durch Hemmung von Calcineurin beeinflussbar ist. Wir untersuchen gegenwärtig, welche Parameter die metabolische Anpassung des Muskels entscheidend beeinflussen und welche Signalwege daran beteiligt sind. So wird beispielsweise untersucht, wie die Sauerstoffverfügbarkeit in den Muskelzellen mit und ohne Belastung durch Elektrostimulation sich auf die Expression mitochondrialer Transkriptionsfaktoren (PGC1) und Enzyme (Fumarase, Citrat Synthase), sowie glykolytischer Enzyme (GAPDH, LDH) auswirkt und in welcher Weise der Hypoxie-induzierbare Transkriptionsfaktor (HIF) beteiligt ist.

Einen weiteren Einfluss auf metabolische Anpassungsprozesse kann das Verhältnis von ATP/ADP/AMP haben, das sich bei starker kontraktile Aktivität ändert und via der AMP-abhängigen Proteinkinase auf Transkriptionsfaktoren für Gene metabolischer Enzyme wirken kann. Wir verstärken die Abnahme der "Energieladung" der Zelle während der Elektrostimulation zusätzlich durch das Zufügen eines Kreatinanalogs, um die Abhängigkeit der unterschiedlichen stoffwechselrelevanten Gene vom Energiestatus zu erfassen. Dabei wird auch die Phosphorylierung (Aktivierung bzw. Hemmung) entscheidender Proteinkinasen, wie AMP-Kinase, AKT und GSK3beta untersucht. Ein weiterer wichtiger Parameter, der entscheidend auf die Regulation von stoffwechselrelevanten Genen wirken kann, ist der Glykogengehalt der Muskelzellen, der in vivo unter Belastung großen Änderungen unterworfen ist.

Es ist bekannt, dass wichtige Proteinkinasen wie AMP-kinase oder GSK3- $\beta$  mit Glykogen assoziiert sein können. Hierdurch könnte die Signaltransduktion dieser Kinasen beeinflusst werden. Um diese Möglichkeit zu prüfen, werden Muskelzellen in Kultur durch Veränderungen des Zellkulturmediums unter Elektrostimulation in ihrem Glykogengehalt variiert, um mögliche Wechselwirkungen zwischen Signaltransduktionswegen und Glykogengehalt aufzuklären.

### c) Hypertrophie

Durch Training können Muskelzellen zum Dickenwachstum angeregt werden - sie exprimieren dann große Mengen kontraktile Proteine, wie z.B. Myosin. Diese Anpassung an starke mechanische Belastungen (große Gewichte) wird als Hypertrophie bezeichnet. Da nur der trainierte Muskel hypertrophiert, muss es sich um Signale handeln, die lokal wirken. Es ist bekannt, dass Muskelzellen durch passive Dehnung und/oder muskuläre Aktivität zur Bildung von Wachstumsfaktoren angeregt werden können, die mit IGF-1 (insulin-like-growth-factor) identisch sind, und zusätzlich einer Splicevariante von IGF-1, MGF (mechanical-growth-factor). Diese beiden Wachstumsfaktoren werden als Vermittler hypertropher Anpassung des Muskels angesehen. Sie wirken sowohl autokrin als auch parakrin und führen einerseits zu einer vermehrten Expression von kontraktile Proteinen in differenzierten Muskelzellen, andererseits auch zur Proliferation von Satellitenzellen genannten Muskelstammzellen, die mit adulten Fasern fusionieren oder neue Fasern bilden können. Es wird vermutet, dass die Signaltransduktion des IGF-1-Rezeptors bei der Vermittlung der Hypertrophie über die Aktivierung des AKT-mTOR-Signaltransduktionsweges gesteuert wird. Jedoch ist völlig unbekannt, welche Signalwege zur Expression von IGF-1 und MGF führen.

In zurückliegenden Experimenten mit unseren Muskelzellkulturen konnten wir durch passive mechanische Belastung (Schütteln der Carrierkulturen) die Muskelzellen zur Expression von IGF-1 und MGF stimulieren. Bei fehlender passiver mechanischer Belastung dagegen war die Transkription der beiden Wachstumsfaktoren stark unterdrückt. Zeitlich verzögert wurde durch das Fehlen der mechanischen Belastung die Transkription des schnellen Myosins (MHC II) reduziert, jedoch die des langsamen Myosins (MHC I) nicht. Zur Stimulation der Expression von MGF und IGF-I war keine kontraktile Aktivität der Muskelzellen notwendig, passive mechanische Kräfte reichten zur Induktion dieser Faktoren aus. Gegenwärtig wird untersucht welche Signaltransduktionswege an der Induktion der beiden Wachstumsfaktoren beteiligt sind und wie die mechanische Belastung in ein biochemisches Signal umgewandelt wird. Hier könnten Ionenkanäle beteiligt sein, z.B. der SAC-channel (stress-activated-calcium-channel) oder auch Integrine, die durch Übersetzung der Spannung in eine Aktivierung von Proteinkinasen wie z.B. FAK wirken könnten. Daneben wird die Aktivität "prominenter" Signalwege auf ihr Antwortverhalten bei Änderungen der mechanischer Beanspruchung der Muskelzellen hin analysiert, u.a. der AKT-mTOR- und der Ras-MAPK-Weg zu nennen.